



HAL
open science

Étude de la vascularisation aberrante du ccRCC par le développement de micro-tumeurs 3D invasives

Noémie Brassard-Jollive

► **To cite this version:**

Noémie Brassard-Jollive. Étude de la vascularisation aberrante du ccRCC par le développement de micro-tumeurs 3D invasives. Biologie cellulaire. Sorbonne Université, 2022. Français. NNT : 2022SORUS289 . tel-04630095

HAL Id: tel-04630095

<https://theses.hal.science/tel-04630095>

Submitted on 1 Jul 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.

THESE DE DOCTORAT DE SORBONNE UNIVERSITE

Au sein du Centre Interdisciplinaire de Recherche en Biologie du Collège de France

Spécialité Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique

Présentée par

Noémie Brassard-Jollive

Pour obtenir le grade de

DOCTEURE de SORBONNE UNIVERSITE

Etude de la vascularisation aberrante du ccRCC par le développement de micro-tumeurs 3D invasives

Soutenue le 29 Juin 2022 au Collège de France

Devant le jury composé de :

Madame la Professeure Isabelle Cremer

Madame la Professeure Agnès Noël

Madame la Docteure Eva Faurobert

Monsieur le Professeur Guilhem Bousquet

Madame la Docteure Charlotte Rivière

Madame la Docteure Catherine Monnot

Présidente du jury

Rapporteure

Rapporteure

Examineur

Examinatrice

Directrice de thèse

À Alexandre Jollive,

Remerciements

Tout d'abord, j'exprime ma sincère gratitude à **Eva Faurobert** et **Agnès Noël** pour leur mission de rapporteure de ma thèse. Je remercie également **Guilhem Bousquet** et **Charlotte Rivière** d'avoir accepté d'être membre de mon jury. Enfin, je remercie vivement **Isabelle Cremer** pour avoir présidé ce jury.

Je remercie **Stéphane Germain** pour m'avoir donné l'opportunité d'intégrer son équipe pendant ces 4 années. Je le remercie également pour ses conseils et remarques constructives tout au long de ma thèse. Je remercie **Laurent Muller** pour toute l'expertise technique et scientifique qu'il a apportée au projet.

Catherine Monnot, je te remercie d'avoir été ma directrice de thèse. Tu m'as beaucoup apporté tant scientifiquement, humainement que culturellement ! Quelle chance j'ai eu de croiser ta route et si je devais dire tout le bien que je pense de toi, cela ne tiendrait pas sur cette page ! En espérant que tu gardes un bon souvenir de ce travail. Je te souhaite de t'épanouir dans tes futurs projets, tu le mérites plus que quiconque.

Je souhaite vivement remercier nos collaborateurs **Guilhem Bousquet**, **Christophe Leboeuf** et **Morad El Bouchtaoui** de l'hôpital Avicenne, ainsi que notre collaboratrice **Mathilde Sibony** de l'hôpital Cochin pour leurs participations indispensables à ce projet. Je remercie **Christophe Helary** du laboratoire de la chimie de la matière condensée pour ces nombreux dons de collagène I à notre équipe.

Je remercie l'ensemble des membres de la plateforme d'imagerie du CIRB, **Philippe Maily**, **Julien Dumont**, **Estelle Anceaume** et **Tristan Piolot** pour leur expertise et leur aide apportées sur ces projets.

J'exprime ma sincère gratitude à **Corinne Ardidie-Robouant**, pour toutes les expériences que tu as réalisées pour ce projet, je n'aurais jamais pu y arriver sans toi ! Mais également pour ta bienveillance au quotidien. Je n'aurais jamais pu tenir si tu n'avais pas été là. J'espère que l'on se reverra, à l'occasion, autour d'un verre ou d'une bouteille !

Je remercie **Yoann Atlas**, d'abord pour le rôle qu'il a joué dans ce projet et enfin pour m'avoir transmis son expertise.

Je ne pourrai jamais assez te remercier **Camille Compère** pour tout ce que tu as fait pour moi lors de ces deux dernières années de thèse. Je te souhaite le meilleur, je sais que tu vas réussir, je n'en doute pas une seule seconde alors fonce ! Je pars le cœur léger en sachant que tu feras de « belles choses » avec ces structures vasculaires aberrantes. N'oublie pas de m'appeler pour ta soutenance.

J'ai une pensée pour **Adèle Mauroux** avec qui j'ai partagé mon bureau pendant quelques années, merci pour ta bonne humeur au quotidien et ton positivisme. Je sais que tu te maries dans quelques jours, profite à fond de ces moments uniques !

Marion Marchand, je te remercie pour ces belles années passées avec toi, tu as été d'un soutien inconditionnel. Je te souhaite de belles aventures et au plaisir de te croiser à l'autre bout du monde. **Emmanuelle Guérin**, je te remercie pour toutes ces discussions que

l'on a pu avoir ensemble, sache que tu m'as beaucoup appris. Merci pour toute l'aide que tu m'as apportée et je te souhaite une belle aventure professionnelle entre l'hôpital et le labo !

Cyrielle Desnos, j'ai commencé cette aventure avec toi et j'ai apprécié chaque moment à tes côtés au laboratoire ou autour d'un verre. Je te remercie d'être comme tu es, de mettre de la bonne humeur partout où tu passes, ne m'oublies pas surtout ! J'ai une pensée pour toutes les belles personnes que j'ai pu croiser dans ce laboratoire : **Sabrina Martin, Samaher Besbes, Lucie Boulgakoff, Emilie Trebla, Emilie Attiogbe, Matthieu Proust, Thomas Frapard, Yves Dupraz** et tant d'autres ! J'ai une pensée pour **Matthieu Lesage**, qui nous a quitté trop tôt; tu nous manques Matthieu.

Marie Karam, Pierre Bercier, Pierre-Emmanuelle Girault, Juliette Durand, Sonia Taïb, Maëla Paul, Emma Bruder je ne vous remercierai jamais assez pour tous les bons moments passés avec vous au labo, au musée ou autour d'un verre. Heureusement que vous avez été là, vous avez contribué à rendre cette expérience beaucoup plus belle !

J'ai une pensée pour les nouveaux arrivants, **Gaëtan Pallot (docteur galette)** et **Alexandre Rutault**, notre cohabitation aura été de courte durée mais merci pour toutes ces discussions et votre bonne humeur quotidienne ! Au plaisir de vous recroiser.

J'ai une pensée pour mes amies de longue date. **Pauline Daurces**, je ne pourrai jamais oublier toutes les années passées avec toi et je sais qu'il y en aura beaucoup d'autres. Merci d'avoir toujours été à mes côtés, dans les bons comme dans les mauvais moments ! Ton soutien m'a été indispensable et m'a donné la force de continuer. Et surtout, soit fière de la femme que tu es devenue.

Lucile Gzresiak, nous avons commencé l'aventure universitaire ensemble. Je te remercie pour tous les instants partagés. Je sais pertinemment que, sans toi, je ne serais jamais allée aussi loin. Je te souhaite de t'épanouir à Cambridge, ou partout ailleurs dans le monde; où que tu sois, j'aurai toujours une grande affection pour toi.

Enfin, j'ai une pensée pour les membres de ma famille. Je remercie ma mère **France Lamarche**, qui m'a toujours encouragé à donner le meilleur de moi-même notamment dans ma vie professionnelle. Je te remercie pour toute l'aide que tu m'as apportée, je ne l'oublierai jamais. **Guillaume** et **Alexandre Brassard**, je vous remercie d'avoir été à mes côtés pendant toutes ces années. **Guillaume**, je te souhaite de trouver ta voie, cesse de douter de toi, tu as énormément de qualités. **Alex** je te souhaite le meilleur également, je suis très fière de ton parcours; je vous aime fort. Je te remercie **Florent Bicanic** pour ton soutien et ton aide au quotidien ainsi que pour ton humour ! Je remercie mon père, **Jean-Guy Brassard**, la vie nous a séparé mais je pense beaucoup à toi, malgré tout.

Enfin, je voudrais remercier mon mari, **Alexandre Jollive**, sans qui je n'aurais jamais pu y arriver. Merci de m'avoir soutenu pendant ces quatorze années et de m'accepter comme je suis. La « vraie vie » nous attend maintenant !

Résumé

Le carcinome du rein à cellules claires (ccRCC), l'un des cancers les plus représentés dans le monde, est fréquemment associé à une altération du gène *Von Hippel-Lindau* (VHL), entraînant un état de pseudo-hypoxie, qui favorise la transition épithélio-mésenchymateuse des cellules épithéliales, l'invasion tumorale, le remodelage matriciel et l'hypermécanisation. De nombreuses études alimentent une controverse concernant une potentielle corrélation entre densité microvasculaire et pronostic des patients du ccRCC. En parallèle, quelques travaux rapportent une architecture vasculaire complexe et aberrante, distincte de la vasculature physiologique rénale. Mon travail de doctorat repose sur l'hypothèse que la complexité du réseau vasculaire pourrait constituer un indice plus pertinent de la biologie et des réponses aux traitements du cRCC que sa densité.

Depuis une vingtaine d'années, les traitements anti-angiogéniques constituent un pilier de la prise en charge du ccRCC, bien que de nombreuses résistances et échappements aux traitements soient décrits. L'absence de modèles *in vitro* 3D pertinents reconstituant la vascularisation du ccRCC est aujourd'hui un écueil dans l'étude de ce cancer.

Mon projet de thèse a eu pour objectif d'étudier : i) - la vascularisation aberrante du ccRCC en interaction avec des cellules tumorales invasives; ii) la sensibilité de ces structures vasculaires aux traitements anti-angiogéniques; iii) le rôle des propriétés du microenvironnement tumoral sur les stratégies d'invasion et sur la formation de la vascularisation aberrante.

Utilisant un modèle de xénogreffes implantées en sous-cutané chez la souris, j'ai réalisé la première caractérisation 3D de la vascularisation du ccRCC composée de structures longues et fines appelées feuillets ou de structures larges et dilatées appelées étangs. Pour étudier les mécanismes cellulaires de formation de ces structures aberrantes ainsi que leur sensibilité aux traitements, j'ai développé un modèle de micro-tumeurs vascularisées impliquant l'inclusion de sphéroïdes d'une lignée cellulaire tumorale du ccRCC, présentant une mutation perte de fonction pour VHL et des cellules endothéliales en hydrogel de collagène I. Cette co-culture induit la formation d'étang vasculaire au sein du sphéroïde, semblable à ceux observés dans le ccRCC. De manière innovante, j'ai démontré que ces structures vasculaires aberrantes sont résistantes aux thérapies anti-angiogéniques telles que le sunitinib. Ces travaux ont également suggéré un lien fort entre formation de l'étang vasculaire et invasion des cellules tumorales, associé à un remodelage matriciel dans le microenvironnement tumoral.

Dans un second temps, j'ai donc analysé l'impact de la modulation de l'invasion du sphéroïde et du remodelage matriciel sur la formation des étangs vasculaires. Je me suis appuyée sur des travaux antérieurs de l'équipe ayant permis la caractérisation des propriétés mécaniques et structurales d'hydrogels de collagène I, formés sous différentes conditions de pH. Nos travaux démontrent que les stratégies d'invasion des cellules tumorales mutées pour VHL sont régulées par les propriétés mécaniques de la matrice extracellulaire et associées à l'activation de voies de mécanotransduction relayées par YAP. En co-culture, un lien fonctionnel réciproque s'établit entre cellules tumorales invasives et cellules endothéliales, associé à un remodelage matriciel local, les cellules tumorales invasives favorisant la formation de l'étang vasculaire et les cellules endothéliales induisant la migration individuelle des cellules tumorales. L'altération des propriétés de mécanotransduction des cellules tumorales m'a permis de démontrer que la formation de l'étang vasculaire nécessite le remodelage matriciel induit par les cellules tumorales invasives. L'ensemble de ces travaux suggèrent que les cellules tumorales invasives remodelent une niche favorable à la formation de l'étang vasculaire. En retour, les cellules endothéliales participent à la malignité tumorale en maintenant une invasion tumorale individuelle.

Sommaire

Liste des figures et tableaux	1
Abréviations	2
Synthèse bibliographique.....	3
I. Le microenvironnement tumoral.....	3
A. Le compartiment stromal cellulaire.....	4
a. Les cellules endothéliales et les capillaires sanguins	5
b. Les cellules immunitaires et les structures lymphoïdes tertiaires (TLS).....	6
c. Les fibroblastes associés au cancer	7
B. La matrice extracellulaire tumorale.....	10
a. Composition de la matrice extracellulaire interstitielle.....	10
• Les collagènes fibrillaires	10
• La fibronectine	13
b. Propriétés physiques de la matrice extracellulaire.....	13
c. Altération de la matrice extracellulaire tumorale.....	15
• Altération de la composition matricielle.....	15
• Remodelages structuraux matriciels.....	15
• Remodelage enzymatique.....	17
II. Invasion tumorale et plasticité	19
A. Transition épithélio-mésenchymateuse	19
a. Marqueurs de la transition épithélio-mésenchymateuse.....	20
b. La transition épithélio-mésenchymateuse partielle	20
B. Les différentes stratégies de migration	20
a. Migration individuelle	21
b. Migration collective.....	22
• Mécanisme meneur-suiveur	23
C. Mécanotransduction et invasion tumorale	25
a. Les adhésions cellule-matrice extracellulaire	27
b. Les jonctions cellule-cellule.....	27
c. Dynamique du cytosquelette et polarisation cellulaire	28
d. Le noyau	28
D. La plasticité cellulaire lors de l'invasion tumorale.....	29
III. Angiogenèse et morphogenèse vasculaire	32
A. Angiogenèse physiologique	34
a. Mécanismes moléculaires et cellulaires de l'angiogenèse par bourgeonnement	34
• Le stimulus hypoxique.....	34
• La réponse au VEGF.....	35
• La spécification tip/stalk cell	37
• Formation de la lumière.....	38
• Anastomose vasculaire	41
• Stabilisation et maturation	43
b. Remodelage de la matrice extracellulaire lors de l'angiogenèse	44
• Dégradation de la matrice extracellulaire.....	44
• Synthèse d'une membrane basale vasculaire.....	45
B. Angiogenèse tumorale.....	47

a.	Les caractéristiques	47
•	Le réseau vasculaire et l'endothélium	49
•	Les péricytes	50
•	La membrane basale	50
b.	Les mécanismes cellulaires	52
•	Angiogenèse par intussusception	53
•	La co-option vasculaire	53
•	Le mimétisme vasculaire	54
IV.	Le carcinome du rein à cellules claires.....	56
A.	Epidémiologie	56
a.	Incidence et mortalité	56
b.	Facteurs de risque	56
B.	Les différents carcinomes rénaux et leurs caractéristiques histologiques	57
C.	Gènes et voies de signalisation	57
a.	Mutation du gène suppresseur de tumeur VHL.....	57
b.	Evènements additionnels génétiques ou épigénétiques	58
c.	Classifications et spécificités du ccRCC : les critères moléculaires.....	61
D.	EMT et invasion des cellules tumorales.....	64
E.	Vascularisation dans le ccRCC.....	65
a.	Densité microvasculaire (MVD).....	65
b.	Classification actuelle des types de vaisseaux	67
•	Critères morphologiques.....	67
•	Critères moléculaires	68
F.	Les traitements	69
a.	Les thérapies anti-angiogéniques.....	69
b.	Les thérapies ciblant la voie de signalisation mTOR.....	71
c.	Les immunothérapies	71
d.	Les thérapies combinées : La première ligne thérapeutique actuelle	73
G.	Les modèles d'étude du ccRCC	74
a.	Les lignées cellulaires du ccRCC	74
b.	Les modèles murins pré-cliniques.....	76
•	Les modèles de xénotransplantes.....	77
•	Les modèles génétiquement modifiés	78
V.	Les modèles <i>in vitro</i> 3D d'étude des interactions entre cellules tumorales et capillaires .	81
A.	Les limites des modèles actuels.....	81
B.	Les cellules endothéliales	82
C.	Les méthodes impliquant angiogenèse par bourgeonnement et vasculogenèse.....	83
D.	Les cellules tumorales	85
E.	Les propriétés biophysiques et biochimiques du microenvironnement tumoral contrôlées en hydrogel 3D	
85		
a.	Les polymères naturels pour hydrogel.....	86
b.	Les polymères synthétiques	88
F.	Les modèles statiques de co-culture 3D	89
a.	Les sphéroïdes vascularisés en hydrogel pour étudier	89
•	Les interactions cellulaires	89
•	Les interactions avec la MEC.....	90
b.	Conclusion sur les modèles statiques de co-culture	91

G. Défis et futures applications	92
Objectifs du travail de thèse	94
Résultats.....	97
I. Les micro-tumeurs du ccRCC révèlent une vascularisation aberrante résistante aux traitements anti-angiogéniques.....	97
II. Les stratégies d'invasion et la vascularisation spécifique du ccRCC sont déterminées par les propriétés de la MEC	142
Conclusion.....	188
Discussion et perspectives	191
I. Développement de micro-tumeurs vascularisées : Enjeux et limites.....	191
A. Parallèle avec l'état de l'art	191
B. Vers la médecine personnalisée	192
a. Les « tumoroïdes » : Cellules tumorales isolées à partir de patients.....	192
b. Les cellules endothéliales dérivées de cellules souches pluripotentes induites	193
II. L'étang vasculaire du ccRCC : caractérisation moléculaire, cellulaire et fonctionnelle....	194
A. Etude des défauts fonctionnels	194
B. Etude de la couverture péricytaire	195
C. Les CAF : Acteur cellulaire majeur ?.....	197
D. Signature moléculaire	198
III. Perspectives cliniques	198
A. Etangs et feuillets vasculaires : spécificité du site primaire dans ccRCC ?	198
B. Les structures vasculaires aberrantes du ccRCC : un marqueur de mauvais pronostic ?.....	200
C. Les micro-tumeurs vascularisées : Un outil de criblage de molécules thérapeutiques.....	201
IV. Stratégies d'invasion tumorale et mécanotransduction dans le ccRCC	202
A. Rôle de YAP dans la détermination des stratégies d'invasion	202
B. Mécanisme meneur-suiveur : Implication de jonctions mécaniquement actives ?	203
Références bibliographiques	205
Annexes	231
I. Annexe 1 : Synthèse bibliographique des principaux marqueurs de l'EMT exprimés par 3 lignées cellulaires du ccRCC (RCC4, 786-O et UMRC2) en fonction du statut VHL	231
II. Annexe 2 : Revue « Brassard-Jollive et al., 2020 ».....	232

Liste des figures et tableaux

- Figure 1** : Les marqueurs du cancer en 2022
- Figure 2** : Le microenvironnement tumoral
- Figure 3** : Principales fonctions des CAF dans le microenvironnement tumoral
- Figure 4** : Réticulation du collagène I par les LOX dans le cancer
- Figure 5** : Les propriétés physiques et mécaniques de la MEC
- Figure 6** : Remodelage de la MEC dans le microenvironnement tumoral
- Figure 7** : Les stratégies de migration des cellules tumorales
- Figure 8** : Mécanisme meneur-suiveur, la création d'une voie de migration
- Figure 9** : Mécanotransduction et invasion tumorale
- Figure 10** : Régulation de la migration en réponse aux propriétés du microenvironnement
- Figure 11** : Artères, veines et capillaires
- Figure 12** : Les étapes clés de l'angiogenèse par bourgeonnement
- Figure 13** : Induction de l'angiogenèse par l'hypoxie
- Figure 14** : Activation du VEGF et voies de signalisation
- Figure 15** : Signalisation du bourgeonnement endothélial
- Figure 16** : La formation de la lumière lors de l'angiogenèse par bourgeonnement
- Figure 17** : Morphogenèse lors de l'anastomose
- Figure 18** : Organisation structurale de la membrane basale vasculaire
- Figure 19** : Rôle de l'hypoxie dans l'angiogenèse tumorale
- Figure 20** : Anomalies structurales des vaisseaux tumoraux
- Figure 21** : La membrane basale des vaisseaux tumoraux présente des anomalies structurales
- Figure 22** : Les caractéristiques morphologiques et fonctionnelles des vaisseaux tumoraux par rapport aux vaisseaux "normaux"
- Figure 23** : La vascularisation tumorale implique différents processus cellulaires
- Figure 24** : Les événements moléculaires clés dans le ccRCC
- Figure 25** : Induction de la transition épithéliale/mésenchymateuse par la perte d'expression de pVHL dans le ccRCC
- Figure 26** : Vascularisation du ccRCC par rapport à un rein sain
- Figure 27** : Masques représentatifs des différents patterns vasculaires dans le ccRCC
- Figure 28** : 2 sous-populations de cellules endothéliales identifiées dans le ccRCC par RNAseq
- Figure 29** : Nouvelles recommandations pour la première ligne thérapeutique du ccRCC
- Figure 30** : Analyse morphométrique d'un réseau de capillaires 3D bourgeonnant à partir d'une bille de cytodex en hydrogel de fibrine
- Figure 31** : Formation d'un réseau de capillaires *in vitro* 3D par vasculogenèse en hydrogel de collagène I
- Figure 32** : Les propriétés structurales des hydrogels de collagène I sont modulées par la température et le pH
- Figure 33** : Protocoles expérimentaux pour la formation de capillaires et la croissance tumorale
- Figure 34** : Système microfluidique de micro-tumeurs vascularisées développées au sein du laboratoire de Christopher Hugues
- Figure 35** : Modélisation *in vitro* 3D d'un capillaire et de sa couverture péricytaire
- Tableau 1** : Résumé des caractéristiques des sous-groupes moléculaires du ccRCC
- Tableau 2** : Les lignées du ccRCC les plus citées dans la littérature et leurs principales caractéristiques

Abréviations

ACM : Artificial cancer mass	PcG : Polycomb
AMIS : Apical membrane initiation site	PDGF : Platelet-derived growth factor
ANGPTL4 : Angiopoietin-like 4	PDGFR-β : PDGF receptor β
ASL : Arterial spin labeling	PD-1 : Programmed cell death 1
BAP1 : BRCA1-associated protein	PEG : Polyethylene glycol-heparine
CAF : Cancer Associated Fibroblast	PGY1 : P-glycoprotéine 1
ccRCC : clear cell renal cell carcinoma	PGE2 : Prostaglandin E2
CDX : Cell derived xenograft	PHD : Prolyl hydroxylases
chRCC : chromophobe renal cell carcinoma	POSTN : Periostin
COL3A1 : Collagen alpha-1(III)	pRCC : papillary renal cell carcinoma
CRP : C-reactive protein	PRMT1 : Protein arginine methyltransferase 1
CTC : Circulating tumor cells	RASIP1 : Ras-interacting protein 1
CTLA-4 : Cytolytic T-lymphocyte-associated protein 4	Rb : Retinoblastoma protein
DII4 : Delta-like 4	RM : Résonance magnétique
EHS : Engelbreth-Holm-Swarm	RCC : Renal cell carcinoma
EPC : Endothelial progenitor cells	ROS : Reactive oxygen species
FDA : Food and Drug Administration	RNA seq : RNA sequencing
FGF-2 : Fibroblast growth factor 2	SCNA : Somatic copy number alterations
GEMM : Genetically engineered mouse model	SDF-1 : Stromal cell-derived factor 1
HCC : Hepatocellular carcinoma	SETD2 : SET domain containing 1A/B
HDMEC : Human dermal microvascular endothelial cells	SHG : Second harmonic generation
HIF1/2 : Hypoxia-inducible factor 1/2	α-SMA : α Smooth muscle actin
HUVEC : Primary human umbilical vein endothelial cells	TACS : Tumor-associated collagen signature
IFN-α : Interferon α	TEM : Transition épithélio-mésenchymateuse
IMDC : International Metastatic RCC Database Consortium	TGF-β : Transforming growth factor β
ITH : Intratumor heterogeneity	TG2 : Transglutaminase 2
LOX : Lysyl oxidase	TIMP : Tissue inhibitor of matrix metalloproteinases
LOXL2 : Lysyl oxidase-like 2	TKI : Tyrosine kinase inhibitor
MEC : Matrice extracellulaire	TLS : Tertiary lymphoid structures
MFD : Microvessel fractal dimension	TP53 : Tumor protein p53
MMP : Matrix metalloproteinases	VEGF : Vascular endothelial growth factor
MT-MMP : Membrane-type matrix	VEGFR : VEGF receptor
mPFS : Median progression free survival	VHL : Von Hippel Lindau
mTOR : mammalian target of rapamycin	vWf : von Willebrand factor
MVD : Microvascular density	wGII : Weighted genome instability index
NCCN : National Comprehensive Cancer Network	
NHDF : Normal human dermal fibroblasts	
NK : Natural killer	
NOS : Nitric oxide synthase	
PBAF : Polybromo-associated BRG1-associated factor	
PBAF : Polybromo-associated BRG1-associated factor	
PBRM1 : Polybromo 1	

Synthèse bibliographique

I. Le microenvironnement tumoral

Le cancer est initié par un ensemble de changements génétiques, héréditaires ou pouvant être acquis au cours de la vie, conduisant à la prolifération cellulaire non contrôlée et aboutissant ainsi à la formation d'une masse tumorale indifférenciée envahissant les tissus voisins. Les cancers sont donc des maladies multi-étapes nécessitant l'acquisition de capacités fonctionnelles par les cellules tumorales. S'appuyant sur ce constat, Douglas Hanahan a défini 8 à 10 marqueurs du cancer dans le but de regrouper les phénotypes complexes de diverses tumeurs en un ensemble commun de paramètres cellulaires (Rodrigues et al., 2021). Les huit caractéristiques comprennent les capacités acquises pour : - maintenir la signalisation proliférative, - échapper aux suppresseurs de croissance, - résister à la mort cellulaire, - permettre l'immortalité réplivative, - induire/accéder à la vascularisation, - activer l'invasion et les métastases, - reprogrammer le métabolisme cellulaire, - éviter la destruction par le système immunitaire (Figure 1). L'ensemble de ces réponses biologiques réquisitionne tous les acteurs du microenvironnement tumoral.

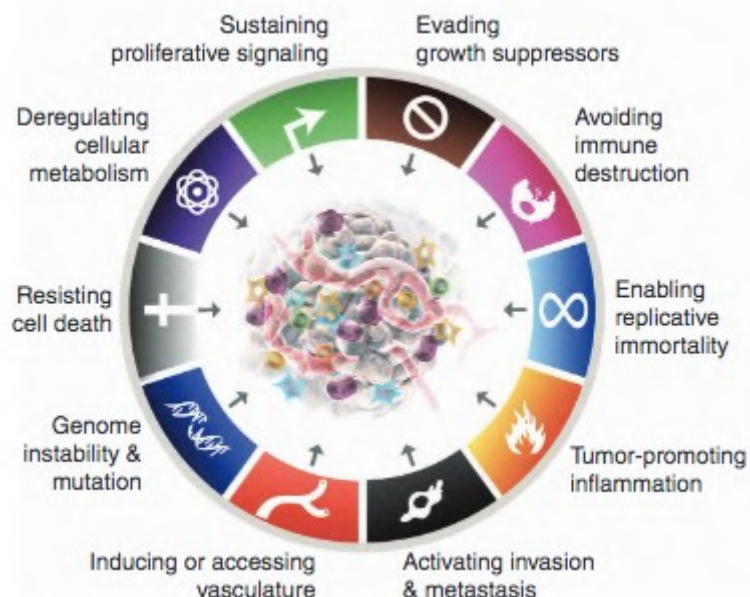


Figure 1 : Les marqueurs du cancer en 2022 (Hanahan, 2022)

A. Le compartiment stromal cellulaire

Il est aujourd’hui largement reconnu que le microenvironnement ou stroma tumoral, en étroit contact avec les cellules tumorales, joue un rôle déterminant dans la progression du cancer. Il est constitué d’une population hétérogène de cellules souches tumorales et d’une multitude de cellules stromales comprenant des cellules endothéliales, immunitaires et des fibroblastes associés au cancer (CAF) inclus dans une matrice extracellulaire (MEC) remodelée (Rodrigues et al., 2021) (Figure 2).

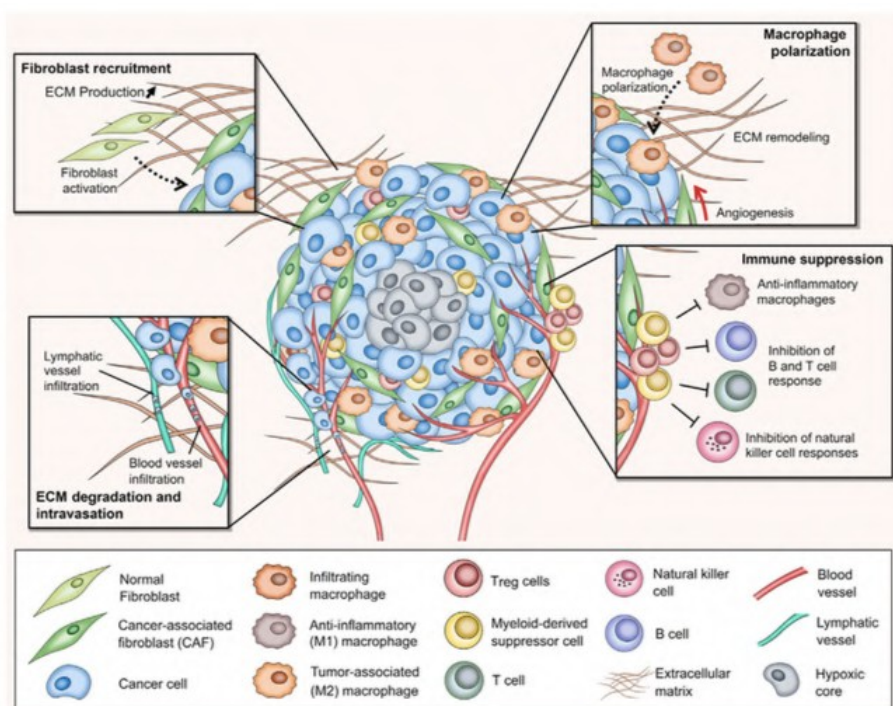


Figure 2 : Le microenvironnement tumoral (Rodrigues et al., 2021)

Les cellules tumorales ont la capacité de modifier profondément l’architecture et les réponses fonctionnelles du microenvironnement par l’intermédiaire du remodelage matriciel et de la sécrétion d’une grande variété de cytokines, chimiokines et autres facteurs résultant en la reprogrammation des cellules du stroma, jouant un rôle déterminant dans la progression du cancer (Hinshaw and Shevde, 2019). Ces effets biologiques majeurs impliquent donc les grands compartiments cellulaires stromaux.

a. Les cellules endothéliales et les capillaires sanguins

Comme tous les organes, les tumeurs ont besoin de s'approvisionner en sang pour satisfaire leurs besoins en oxygène et nutriments afin d'accomplir toutes leurs fonctions métaboliques. Cet apport se fait principalement par les capillaires sanguins, les plus petits vaisseaux de l'organisme, composé d'une monocouche de cellules endothéliales, d'une lame basale et d'une couverture péricytaire. Les morphologies particulières de ces vaisseaux et leur spécificité en fonction des cancers seront discutées dans la partie III. Au sein du microenvironnement tumoral, l'hypoxie induit un commutateur (switch) angiogénique, stimulant l'angiogenèse, processus qui sera discuté dans la partie III. Dans ce présent paragraphe, je m'intéresse aux particularités de ces cellules endothéliales tumorales, décrites comme présentant une forte hétérogénéité génétique et moléculaire (*Aird, 2012; Hida et al., 2016*). Il a été identifié de nombreux sous-types de cellules endothéliales en fonction du type tumoral. Au sein du microenvironnement tumoral, l'acquisition des mutations génétiques est induite par une forte exposition à l'hypoxie et aux espèces réactives de l'oxygène (ROS), réprimant ainsi la machinerie de réparation de l'ADN (*De Palma et al., 2017*). De plus, la forte prolifération des cellules endothéliales promeut leur instabilité génétique. Il a récemment été décrit que les cellules endothéliales peuvent être « instruites » par le microenvironnement tumoral. De plus, il a été reporté que les cellules endothéliales tumorales sont plus résistantes aux traitements cytotoxiques que les cellules endothéliales saines. Ainsi, les cellules endothéliales tumorales acquièrent une résistance aux agents cytotoxiques paclitaxel par la surexpression de la pompe ATP-dépendante, P-glycoprotéine 1 (PGY1 ou ABCB1), qui est induite par la signalisation du Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF-A). Le métabolisme des cellules endothéliales tumorales est aussi modifié : hyper-glycolytiques, elles utilisent largement la glycolyse aérobie pour répondre à leurs besoins énergétiques (*De Palma et al., 2017*).

Il en résulte une augmentation de leurs capacités prolifératives, migratoires et angiogéniques en réponse à des facteurs de croissance et des cytokines en comparaison avec des cellules endothéliales saines (*Potente et al., 2011; Aird, 2012*). Elles montrent aussi une activation constitutive de la signalisation PI3K-AKT, qui promeut la survie cellulaire et la résistance à l'apoptose (*De Palma et al., 2017*).

b. Les cellules immunitaires et les structures lymphoïdes tertiaires (TLS)

Les cellules immunitaires constituent des acteurs majeurs du microenvironnement tumoral dont le rôle a été largement reporté dans la littérature ses dernières années (*Hinshaw and Shevde, 2019*). Mon travail de thèse ne se focalisant pas sur ce compartiment stromal, il ne sera que très brièvement présenté dans ce manuscrit. Des preuves grandissantes de la littérature suggèrent que le système immunitaire inné (macrophages, neutrophiles, cellules dendritiques, cellules lymphoïdes innées, cellules suppresseurs dérivées de la myéloïde et les cellules Natural Killer (NK)) aussi bien que les cellules immunitaires adaptatives (lymphocytes T et B) contribuent à la progression tumorale et l'angiogenèse (*De Palma et al., 2017*) lorsqu'elles sont présentes dans le microenvironnement (*Hinshaw and Shevde, 2019*).

Dans la littérature, il est décrit que les macrophages sécrètent des facteurs comme l'EGF induisant l'invasion des cellules tumorales (*Goswami et al., 2005*). De plus, il est reporté un rôle des neutrophiles dans : - le remodelage de la MEC par la sécrétion d'élastase neutrophile et de métalloprotéinases (MMP 8 et 9), - la progression tumorale par la sécrétion de prostaglandine (PGE₂); - l'invasion tumorale par le relargage de ROS et MMP-9 (*Hinshaw and Shevde, 2019*). Les échanges interactifs entre cellules tumorales et cellules immunitaires favorisent un microenvironnement propice à la croissance tumorale et la dissémination métastatique. La présence de cellules immunitaires comme les macrophages corrèle avec un mauvais pronostic, dans le cancer du sein, de l'estomac, du poumon (...), suggérant leur rôle dans la progression du cancer (*Cardoso et al., 2014; Zhao et al., 2017; Wang et al., 2018*). *A contrario*, une faible activité des cellules NK corrèle avec une augmentation du risque de cancer, illustrant leur rôle de surveillance tumorale (*Imai et al., 2000*). Ces cellules immunitaires peuvent soit adopter un phénotype tolérogène, permettant ainsi à la tumeur de ne pas être reconnue par le système immunitaire ou au contraire un phénotype immunogène entretenant un état inflammatoire chronique.

Les cellules dendritiques, en réponse à des facteurs de croissance (Transforming Growth Factor beta (TGF- β), VEGF...) sécrétées par les cellules tumorales, adoptent un phénotype tolérogène (*Hinshaw and Shevde, 2019*), leur différenciation en cellules immunogènes étant inhibée. En parallèle, les neutrophiles se révèlent inflammatoires lors des

stades précoces du développement tumoral mais adoptent un phénotype immunosuppresseur avec la progression de la maladie (*Fridlender and Albelda, 2012*).

Il a récemment été identifié que les lymphocytes peuvent former des agrégats lymphoïdes appelés structures lymphoïdes tertiaires (TLS) dans le microenvironnement stromal (*Masuda et al., 2022*). Ces structures constituent une organisation spatiale et fonctionnelle spécifique, dans laquelle les lymphocytes B sont entourés par des lymphocytes T. Les lymphocytes B et les TLS sont associés à un pronostic favorable dans de nombreux types de cancer (*Fridman et al., 2022*). De manière intéressante, l'association de la présence des TLS dans le carcinome du rein à cellules claires (ccRCC) à un pronostic clairement établi est plus controversée. En effet, les études très récentes ont rapporté d'une part que les TLS sont associées à une altération de la voie de signalisation mTOR et à un mauvais pronostic (*Masuda et al., 2022*) et d'autre part que la présence de lymphocytes B et de TLS est associée à une inhibition de la progression tumorale et une bonne réponse aux immunothérapies, en fonction de la signature transcriptomique (*Meylan et al., 2022*).

De façon générale, l'environnement tumoral est finement contrôlé afin de promouvoir la croissance, la survie et l'expansion. Reprogrammer les cellules immunitaires innées participe à l'affaiblissement des défenses immunitaires des patients et est ainsi souvent associé à un mauvais pronostic (*Hinshaw and Shevde, 2019*).

c. Les fibroblastes associés au cancer

Les CAF sont les cellules majoritaires du stroma tumoral. Ils sécrètent des facteurs de croissance, des ligands inflammatoires et des protéines de la MEC promouvant ainsi la prolifération et la migration tumorale, la résistance aux thérapies et l'exclusion immunitaire (*Kalluri, 2016*). Il a récemment été décrit, par des approches de séquençage d'ARNs (RNA seq), une forte hétérogénéité des CAF au sein du microenvironnement de tumeurs mammaires et du pancréatiques. Cette hétérogénéité explique pourquoi ces cellules sont parfois associées à la limitation ou à la promotion des tumeurs (*Hartmann et al., 2014*). Les CAF sont recrutés au sein du stroma tumoral principalement par l'action de facteurs de croissance, comme le TGF- beta, le Platelet-Derived Growth Factor (PDGF), le Fibroblast Growth Factor 2 (FGF-2) (*Figure 3*). Le TGF-beta induit la prolifération, l'expansion et la différenciation myofibroblastiques des CAF ainsi que la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM). Plusieurs types cellulaires ont été proposés comme précurseurs

des CAF incluant les cellules étoilées pancréatiques (*Bachem et al., 1998; Apte et al., 1999; Yin et al., 2013*), les fibroblastes résidents (*Orimo et al., 2005; Kojima et al., 2010; Arina et al., 2016*), les cellules souches mésenchymateuses (*Mishra et al., 2008; Lee et al., 2010; Quante et al., 2011; Kidd et al., 2012*), les adipocytes (*Kidd et al., 2012; Bochet et al., 2013; Gao et al., 2018*), les cellules mésothéliales (*Tian et al., 2019*), les cellules endothéliales (*Zeisberg et al., 2007*), les cellules myéloïdes (*Ogawa et al., 2006*), les péricytes (*Hosaka et al., 2016*), les cellules épithéliales (*Iwano et al., 2002*), les cellules souches hématopoïétiques et les cellules circulantes de la moëlle osseuse (*Direkze et al., 2003*). De plus, les CAF présentent une hétérogénéité fonctionnelle et moléculaire. Ainsi, une forte expression de l'alpha-SMA (smooth muscle actin) a longtemps été considérée comme un marqueur distinct de l'activation des CAF par rapport aux fibroblastes normaux (*Lazard et al., 1993*). Cependant, de nombreuses équipes ont récemment identifié la présence de CAF exprimant faiblement l'alpha-SMA, soulignant le besoin de considérer de multiples paramètres pour l'analyse de l'activation des CAF (*Biffi and Tuveson, 2021*). La présence de CAF myofibroblastiques et non-myofibroblastiques semble être l'observation la plus cohérente entre les différents types de cancers (*Biffi and Tuveson, 2021*). Parmi une variété de types de cancers, les CAF myofibroblastiques présentent une signature de cellules synthétisant les composants de la MEC, alors que les CAF non myofibroblastiques sont généralement caractérisés par un phénotype inflammatoire, sécrétoire. Alors que les fibroblastes normaux ont été rapportés comme inhibant la progression du cancer, plusieurs études ont démontré que les CAF peuvent promouvoir la croissance tumorale de multiples façons, incluant : la sécrétion de protéines matricielles (*Olive et al., 2009; Provenzano et al., 2012; Jacobetz et al., 2013*); l'inflammation et la néovascularisation; l'augmentation de l'angiogenèse (*Kaur et al., 2016*); l'augmentation de l'incidence des cellules initiant les tumeurs (*Lau et al., 2016*); la perturbation de la signalisation tumorale par la voie KRAS (*Tape et al., 2016*); le changement du métabolisme et de l'épigénome des cellules; l'établissement d'un microenvironnement tumoral immunosuppresseur (*Kraman et al., 2010; Lakins et al., 2018*); l'acquisition d'une résistance aux thérapies (*Straussman et al., 2012; Ireland et al., 2016; Kaur et al., 2016; Hessmann et al., 2018*) ou d'une radioprotection (*Mantoni et al., 2011*); l'invasion tumorale, la formation de métastases et la TEM (*Gaggioli et al., 2007; Duda et al., 2010; Grugan et al., 2010; Goetz et al., 2011; Calon et al., 2012; Zhang et al., 2013; Kaur et al., 2016; Nielsen et al., 2016; Waghray et al., 2016; Labernadie et al., 2017*); la sécrétion de ligands pro-

tumorigènes; la promotion de l'état souche des cellules tumorales (*Biffi and Tuveson, 2021*); la contribution à un effet systémique comme la cachexie, l'anémie, l'immunosuppression (*Figure 3*).

Les CAF présentent une prévalence élevée dans le microenvironnement tumoral du ccRCC et sont impliqués dans la prolifération des cellules tumorales, l'angiogenèse, les métastases, et l'acquisition d'une résistance aux thérapies (*Chakiryan et al., 2021*). Plusieurs propriétés pro-tumorales des CAF sont médiées par le facteur de transcription Hypoxia-inducible factor 1 (HIF1), surexprimé dans la majorité des ccRCC via l'altération du gène codant pour la protéine Von Hippel Lindau (VHL) et stimulant une voie qui conduit à l'oncogenèse dans le cancer du rein. Cette voie sera détaillée dans la partie III. De récentes études ont démontré que l'augmentation de la densité des CAF dans les tumeurs du ccRCC est associée avec une mauvaise survie globale (*Chakiryan et al., 2021*). Des résultats de cohortes et d'investigations *in silico* ont montré que les inhibiteurs des tyrosines kinases (TKI) ciblant les récepteurs au VEGF (VEGFR) augmentaient significativement le nombre de CAF dans les ccRCC (*Ambrosetti et al., 2022*). Dans cette même population de patients, la proportion de CAF intra-tumoraux corrèle avec une plus courte survie sans progression et survie globale. Les CAF diminuent l'effet cytotoxique des TKI ciblant les VEGFR sur les cellules cancéreuses et augmentent la migration tumorale (*Ambrosetti et al., 2022*) (*Figure 3*). Ces résultats montrent que les TKI ciblant les VEGFR promeuvent le développement des CAF, qui favorisent alors l'agressivité, la dissémination métastatique et la résistance aux traitements dans le ccRCC. Les auteurs suggèrent que les CAF représentent une cible thérapeutique pour combattre la résistance aux traitements dans le ccRCC et plus généralement relève la pertinence d'une combinaison de traitement ciblant les CAF avec une immunothérapie (*Ambrosetti et al., 2022*).

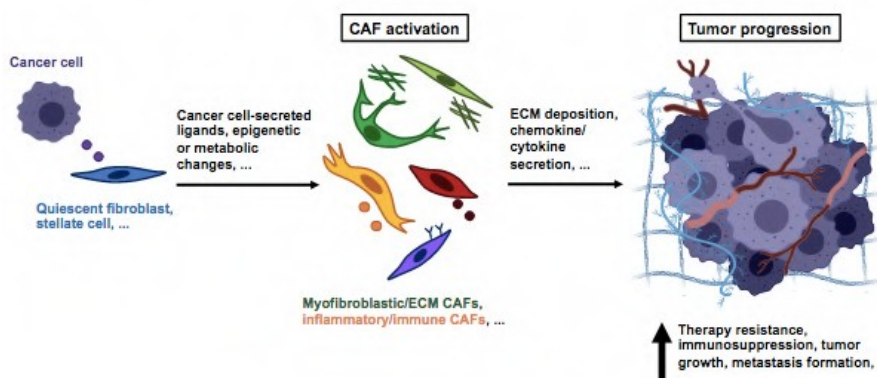


Figure 3 : Principales fonctions des CAF dans le microenvironnement tumoral

Après leur activation, les CAF interviennent dans la croissance tumorale, la dissémination métastatique, le dépôt et le remodelage de la MEC, le maintien d'un environnement immunosuppresseur et la résistance aux thérapies (*Biffi and Tuveson, 2021*).

B. La matrice extracellulaire tumorale

a. Composition de la matrice extracellulaire interstitielle

La MEC joue un rôle crucial dans la prolifération, la différenciation cellulaire et le maintien de l'homéostasie tissulaire (*Mohan et al., 2019*). Elle est majoritairement composée d'eau, de protéines et de polysaccharides. Le collagène, présentant une composition et une structure variable en fonction du tissu, est le composant matriciel le plus abondant. La matrice interstitielle est majoritairement composée de collagènes fibrillaires de type I, II et III. Les collagènes jouent un rôle crucial dans une large variété de maladies et constituent des cibles thérapeutiques. La fibronectine est un autre constituant matriciel majeur. Cette glycoprotéine possédant un motif unique appelé arginine-glycine-aspartate (RGD) se lie aux intégrines $\alpha\beta1$ et $\alpha\beta3$ et forment ainsi des assemblages supramoléculaires fibrillaires dans la MEC (*Salajegheh, 2016*). Ces interactions moléculaires régulent la formation et l'organisation des points focaux d'adhésion et les propriétés mécaniques des cellules. La polymérisation de la fibronectine augmente la capacité de rétention de plusieurs protéines comme la thrombospondine-1 et le collagène I dans la MEC (*Aziz-Seible, 2011*). La matrice interstitielle est aussi composée de molécules riches en carbohydrate, incluant principalement des protéoglycanes et leurs dérivés. Les protéoglycanes sont constitués d'une structure protéique et d'une ou plusieurs chaînes de glycosaminoglycanes, chaînes de polysaccharides avec une configuration primaire constituée de sucres aminés ou d'acide uroniques (*Sarrazin et al., 2011; Iozzo and Gubbiotti, 2018*). Les protéoglycanes matriciels contiennent les glycosaminoglycanes de type chondroïtine sulfates, dermatane sulfates, et héparane sulfates (HSPG), dans les membranes basales (*Conrad et al., 2010; Derler et al., 2017*). Ces chaînes sulfatées à différentes positions sont chargées négativement et les groupes d'acides uroniques sont en interaction avec d'autres protéines matricielles et avec des facteurs de croissance (*Miller et al., 2014*). Dans un environnement tumoral dérégulé, la MEC fournit un support pathologique, conduisant à des signalisations aberrantes et entraînant la formation de structures désorganisées.

- **Les collagènes fibrillaires**

Les collagènes constituent les protéines les plus représentées chez les mammifères. Cette partie sur la caractérisation des collagènes reprend des notions exposées dans le mémoire de thèse de Yoann Atlas, ancien étudiant en doctorat de mon

équipe (<http://www.theses.fr/2019SORUS497>). Ils procurent la plus grande partie de la rigidité structurale de l'échafaudage de la MEC. Contrairement aux autres protéines, les collagènes présentent une structure moléculaire régulière et ils sont décrits comme composés de trois brins polypeptidiques (*Wyckoff et al., 1935; Pauling and Corey, 1951*). La nature et la taille des triple hélices α du collagène permet de distinguer 28 membres collagéniques différents (*Ricard- Blum, 2011*). En fonction du tissu, la synthèse de nombreuses isoformes des chaînes α résulte d'épissages alternatifs différents. Au niveau post-traductionnel, le clivage protéolytique des collagènes leur donne une fonction biologique propre. Les collagènes sont classés en quatre groupes en fonction de leur assemblage supramoléculaire : - les collagènes fibrillaires, - les collagènes associés aux collagènes fibrillaires, - les collagènes s'associant en réseaux, - les autres ayant diverses fonctions d'ancrage et de maintien.

Les collagènes fibrillaires, comprenant les collagènes I, II et III, confèrent les propriétés mécaniques de la MEC. Leur proportion est variable selon les tissus. Le collagène I, s'assemblant en hétérotrimère $\alpha_1\alpha_1\alpha_2$ et chaque chaîne α est composée de la répétition de trois acides aminés Gly-X-Y, où X et Y sont une proline/arginine/lysine et 4-hydroxyproline/hydroxylysine, respectivement, précédée d'une glycine (*Figure 4*). Les collagènes s'assemblent alors pour former une triple hélice nommée procollagène. Cette triple hélice du procollagène possède des résidus lysines et des résidus hydroxylés, riches en liaisons électrostatiques conférant ainsi une grande stabilité (*Persikov et al., 2005*). De plus, cette structure possède des domaines globulaires aux extrémités C- et N-terminales qui sont ensuite clivés en tropocollagène après transport dans l'appareil de Golgi, juste avant la sécrétion (*Canty and Kadler, 2005*). Les tropocollagènes s'auto-assemblent au niveau de la

surface cellulaire avec un décalage les unes par rapport aux autres de 67 nm (*Yamauchi et al., 2018*). Ce décalage, classiquement observé pour les collagènes fibrillaires, est visible par la présence de bandes striées en microscopie électronique (*Figure 4A*). D'abord, de courtes fibres sont formées par l'assemblage de fibrilles puis fusionnent en un réseau 3D de fibres de collagène. La maturation des fibres de collagènes est assurée par des enzymes de réticulation nommées les lysyl oxydases (LOX) catalysant la formation de ponts covalents intramoléculaires et intermoléculaires entre monomères (*Lucero and Kagan, 2006; Yamauchi et al., 2018*) (*Figure 4*). La maturation des fibres de collagènes renforce alors la stabilité au niveau fibrillaire et macromoléculaire. Le pontage des collagènes module les caractéristiques mécaniques matricielles pouvant avoir des conséquences dans le microenvironnement tumoral.

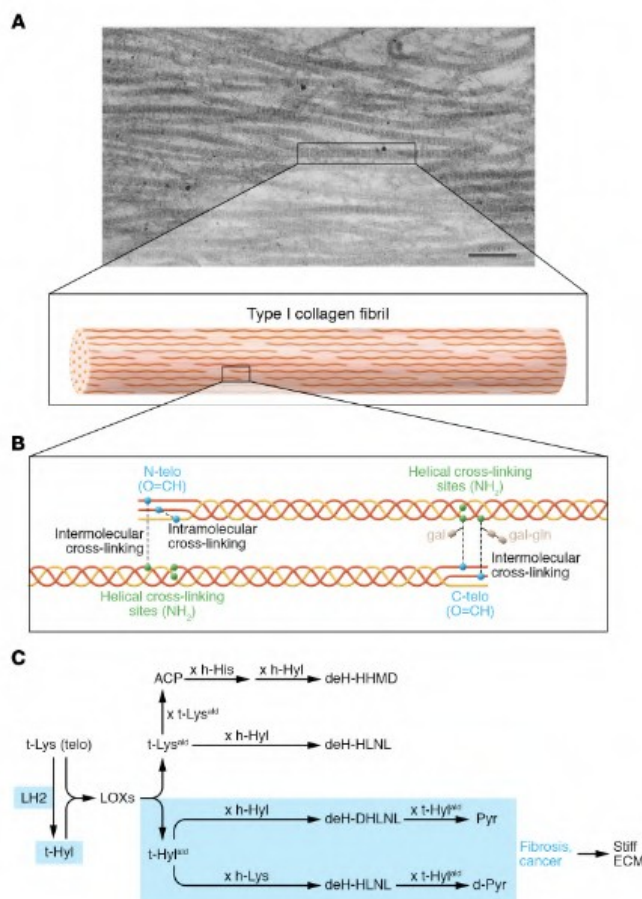


Figure 4 : Réticulation du collagène I par les LOX dans le cancer

(A) Image de microscopie électronique à transmission du tissu tumoral montrant des fibrilles denses de collagène I. Le rectangle indique une seule fibrille. Ci-dessous, schématisation d'une molécule de collagène I contenue dans une fibrille. Ces molécules sont parallèles et décalées les unes par rapport aux autres de 67 nm.

(B) Sites de réticulation des molécules de collagènes adjacentes. Deux aldéhydes de télopeptidyl lysine (O = CH) peuvent se réticuler au sein d'une même molécule (réticulation intramoléculaire). Le télopeptidyl lysine- et l'hydroxylysine-aldéhyde (O=CH) peuvent se condenser avec des groupes ε-amino (NH₂) de résidus lysine ou hydroxylysine hélicoïdaux juxtaposés pour former des réticulations intermoléculaires.

(C) Principales voies de réticulation caractérisées dans les tissus tumoraux. Les LOX initient la réticulation en convertissant les résidus de lysine ou d'hydroxylysine dans les télopeptides en aldéhyde (t-Lysald et t-Hylald, respectivement). Puis l'aldéhyde se condense avec un autre t-Lysald dans la même molécule ou Lys hélicoïdal juxtaposé (h-Lys) ou Hyl (h-Hyl) sur une molécule voisine. Ces réticulations divalentes peuvent ensuite mûrir en réticulations trivalentes et tétravalentes (*Yamauchi et al., 2018*).

- La fibronectine

La fibronectine est une glycoprotéine composée de plusieurs domaines s'assemblant en structures fibrillaires au sein de la MEC. Elle participe à l'organisation de la MEC en liant des composants matriciels entre eux ainsi qu'en liant les intégrines à des composants matriciels comme le collagène IV (*Pankov and Yamada, 2002; Kostourou and Papalazarou, 2014*). La fibronectine régule la migration et l'adhésion cellulaire par sa liaison aux intégrines via son motif RGD induisant ainsi le remodelage du cytosquelette d'actine (*Hynes and Destree, 1978*). Ainsi, un certain nombre de sites de liaisons aux intégrines régulent l'invasion collective de cellules cancéreuses au sein de matrices riches en fibronectine (*Gopal et al., 2017*). Les interactions fibronectine-collagène sont régulées par des forces mécaniques (*Kubow et al., 2015*). La fibronectine joue un rôle dans la morphogenèse vasculaire et l'invasion tumorale (*Van Obberghen-Schilling et al., 2011*).

b. Propriétés physiques de la matrice extracellulaire

Les collagènes et autres protéines, conférant une géométrie 3D fibrillaire et poreuse, déterminent ainsi l'architecture de la MEC (*Pedersen and Swartz, 2005*). La MEC est alors définie par les propriétés physiques suivantes : la densité, la taille, la porosité et l'orientation des fibres (*Figure 5*). De plus, par l'action de forces cellulaires, la MEC subit des contraintes de déformation (*Engler et al., 2006; Martino et al., 2018*).

La composition d'un tissu varie en fonction des organes, chacun d'entre eux présentant des spécificités au niveau des quantités de protéines fibrillaires et des propriétés mécaniques. *In vitro*, la concentration de collagène, la température et le pH régulent la porosité et la densité du collagène I. L'ensemble de ces facteurs modulent la fibrillogenèse du collagène et ainsi changent les propriétés structurales de la MEC (*Doyle et al., 2015; Sapudom et al., 2015*). Comme décrit par van Helvert et coll., la porosité varie extrêmement en fonction du tissu : elle peut être de $100 \mu\text{m}^2$ dans un tissu conjonctif

lâche à des dimensions inférieures à $1 \mu\text{m}^2$ dans des fibres denses de collagène (*van Helvert et al., 2018*). L'orientation et la taille des fibres varient également en fonction des tissus évoluant entre une orientation fibrillaire aléatoire et des structures fortement alignées (*Provenzano et al., 2006*). Cet aspect sera abordé dans le contexte tumoral, dans la partie suivante.

Des forces extérieures peuvent déformer la MEC impactant alors la réponse cellulaire en fonction de sa capacité de déformation élastique caractérisée par son module de Young. Ce principe est aussi appelé rigidité. De manière générale, la MEC est caractérisée par une déformation élastique non linéaire (*Storm et al., 2005*). Les tissus humains présentent une grande variabilité de rigidité pouvant aller de tissus très mous comme le cerveau présentant une rigidité inférieure à 100 Pa à des tissus beaucoup plus durs tels que les os présentant une rigidité supérieure à 1 GPa (*Madsen and Cox, 2017*).

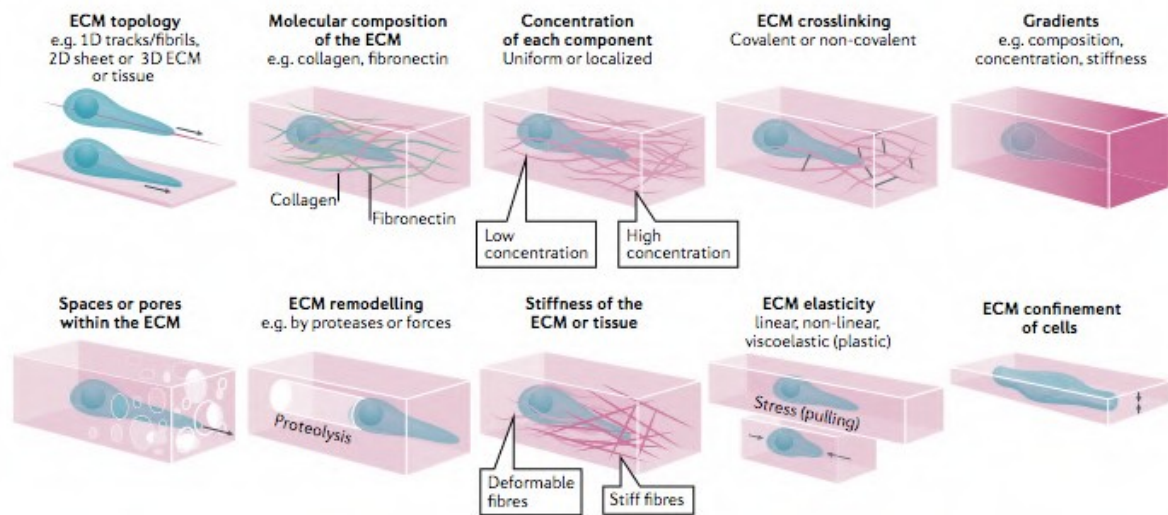


Figure 5 : Les propriétés physiques et mécaniques de la MEC

Les propriétés physiques et mécaniques concernent la topologie de la MEC, la composition moléculaire, la concentration des composants matriciels, la réticulation de la MEC, les gradients de rigidité et molécules, la taille des pores, le remodelage de la MEC par des protéases ou des forces, la rigidité, les propriétés élastiques, le confinement (Yamada and Sixt, 2019).

c. Altération de la matrice extracellulaire tumorale

Au sein du microenvironnement tumoral, la MEC présente des anomalies tant au niveau de son abondance que de sa composition et son architecture. Les propriétés biophysiques de la MEC telles que la topographie, la rigidité et la tension changent donc également.

- **Altération de la composition matricielle**

Le microenvironnement tumoral contient des collagènes fibrillaires en forte abondance; les tenascines (dont la C et la W) et la laminine 332 (Micke and Östman, 2005; Hirata and Sahai, 2017; Ramamonjisoa and Ackerstaff, 2017); la fibronectine, en particulier, les variants d'épissage ED-A et ED-B (Hirata and Sahai, 2017; Ramamonjisoa and Ackerstaff, 2017). De plus, cette forte accumulation peut être corrélée à un faible pronostic, comme dans le cas de la laminine 332 (Guess and Quaranta, 2009; Guess et al., 2009; Chen et al., 2015; Katayama et al., 2019).

- **Remodelages structuraux matriciels**

L'accumulation du collagène fibrillaire dans le stroma crée un réseau dense de protéines fibrillaires, qui conduit graduellement à l'augmentation de la rigidité tissulaire. L'augmentation de la rigidité matricielle associée à l'alignement des fibres est un marqueur

de mauvais pronostic dans le cancer du sein, du pancréas et de la prostate (*Gkretsi and Stylianopoulos, 2018*). Plus précisément, l'orientation des fibres de collagène peut correspondre à une signature structurale, appelée TACS (tumor-associated collagen signature) (*Provenzano et al., 2006; Conklin et al., 2011*). Les TACS sont observées *in vivo* par génération de seconde harmonique. Ainsi, il est possible d'établir une corrélation entre la signature et le grade de la tumeur (*Conklin and Keely, 2012*). En effet, dans le stroma normal, les fibres de collagène apparaissent « bouclées » et anisotropiques (TACS 1) (*Egeblad et al., 2010; Malik et al., 2015*) (Figure 6). Lors de la progression tumorale, la quantité de collagène dans le stroma augmente, les fibres de collagène apparaissent plus droites et alignées par rapport au bord de la tumeur (TACS 2) (*Egeblad et al., 2010; Malik et al., 2015*). Dans les stades invasifs, les fibres de collagène forment des paquets et deviennent perpendiculaires à la membrane basale, fournissant des voies (« tracks ») empruntées par les cellules tumorales (TACS 3). Des motifs similaires ont été trouvés dans un modèle murin de cancer du sein (*Conklin et al., 2011; Malik et al., 2015*). De plus, la forte accumulation de collagène fibrillaire dans le stroma conduit à des connexions intermoléculaires covalentes spécifiques entre les fibres de collagènes au sein du stroma masquant les sites actifs pour l'activité des MMP, renforçant ainsi l'accumulation de fibres de collagène résistantes aux enzymes protéolytiques.

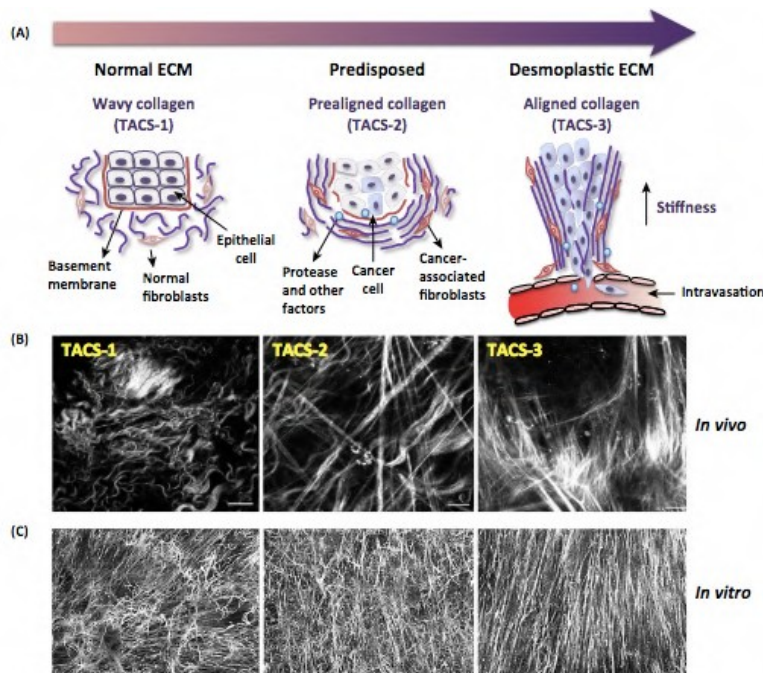


Figure 6 : Remodelage de la MEC dans le microenvironnement tumoral

(A) Schématisation du remodelage progressif des fibres de collagène de la MEC au cours de la progression tumorale.

(B) La signature TACS est visualisée *in vivo* par SHG dans un modèle de cancer du sein chez la souris Wnt-1.

(C) Visualisation du dépôt *in vitro* de collagène I par des fibroblastes dérivés de la MEC d'un carcinome épidermoïde murin (*Malik et al., 2015*).

- Remodelage enzymatique

Deux familles d'enzymes remodelent la MEC dans le stroma tumoral : les LOX dont la lysyl oxydase like-2 (LOXL2) intervenant dans la réticulation (Cox *et al.*, 2013; Moon *et al.*, 2014) et les MMP intervenant dans la dégradation (Jodele *et al.*, 2006; Kessenbrock *et al.*, 2010).

D'une part, des analyses protéomiques d'échantillons de patients ont révélé que les enzymes de réticulation étaient surexprimées dans de nombreux cancers incluant le cancer du sein, de la prostate et pancréatique. LOXL2 est surexprimée dans le stroma tumoral du ccRCC (Barry-Hamilton *et al.*, 2010). Barker *et coll.* ont démontré que le remodelage de la MEC par LOXL2 augmente la rigidité du microenvironnement (Barker *et al.*, 2011). Ainsi, la réticulation induite par les LOX entraîne l'altération de la topologie de la MEC, de son orientation et de ses propriétés mécaniques. Plusieurs travaux ont révélé le rôle de LOX et LOXL2 sécrété par les cellules tumorales dans le développement d'une niche pré-métastatique par l'intermédiaire du remodelage et de la rigidification matricielle en utilisant des modèles *in vivo* et *in vitro* (Barker *et al.*, 2013; Cox *et al.*, 2013; Di Stefano *et al.*, 2016). En effet, la rigidification de la MEC par LOX stimule le recrutement d'adhésions focales et ainsi induit l'invasion tumorale (Levental *et al.*, 2009). D'autres études reportent que dans les cancers du sein et pancréatiques, la réticulation de la MEC promeut sa rigidification, les métastases et l'infiltration de cellules immunitaires. Indépendamment de son rôle extracellulaire sur la modification des propriétés mécaniques de la MEC, LOXL2 intracellulaire stimule la dissémination métastatique du cancer mammaire (Salvador *et al.*, 2017). Aujourd'hui, l'effet de déamination oxydative par les lysyl oxydases sécrétées par les cellules cancéreuses sur la réticulation du collagène et de l'élastine n'est pas connu.

Cependant, au sein de notre équipe, les travaux de Laurent Bidault et Yoann Atlas (Atlas, Bidault *et al.*, en préparation) ont révélé l'effet *in vitro* de LOXL2 exogène sur la modification des propriétés mécaniques matricielles par la modulation de la fibrillogénèse du collagène I.

En plus de la réticulation enzymatique par les LOX, il existe des preuves de la présence d'un mécanisme de réticulation non enzymatique de la MEC, principalement médiée par la glycation et la transglutamination (Mohan *et al.*, 2019). Ce processus de réticulation, que je ne détaillerai pas, conduit à un dépôt excessif de protéoglycanes dans le

stroma, associé à une rigidification matricielle et conduit progressivement à une fibrose (*Mohan et al., 2019*). Ce phénomène est prédictif du développement de la tumeur.

D'autre part, la sécrétion de protéases comme les MMP par les cellules tumorales participent activement au remodelage de la MEC par sa dégradation. Ces enzymes jouent un rôle dans : - la libération de facteurs de croissance séquestrés dans la MEC (*Bergers et al., 2000; Cowden Dahl et al., 2008*); - la régulation de signaux de croissance cellulaire par l'activation du TGF- β (*Mu et al., 2002*); - l'invasion cellulaire par la dégradation protéolytique de la MEC (*Poincloux et al., 2009; Sabeh et al., 2009*). La dérégulation de leur activité altère l'homéostasie tissulaire participant alors au commutateur angiogénique, processus décrit dans la partie II (*Bergers et al., 2000*).

Bien que la MEC subisse un renouvellement constant, ces altérations se maintiennent dans le temps et peuvent donc être considérées comme la « mémoire » ou la « signature » du stroma tumoral. Comme nous venons de l'aborder, les cellules tumorales et stromales participent activement au remodelage de cette niche. En retour, les cellules tumorales sont sensibles aux propriétés physiques et biochimiques de cet environnement par leurs propriétés de mécanotransduction, stimulant notamment leurs capacités d'invasion, que nous aborderont dans la partie ci-dessous : c'est le principe de réciprocity fonctionnelle des interactions cellule-matrice (*Friedl and Alexander, 2011; Martino et al., 2018; Simi et al., 2018*).

II. Invasion tumorale et plasticité

La dissémination métastatique est considérée comme un marqueur clé de la progression tumorale (Figure 1) et elle constitue la première cause de mortalité par cancer. L'invasion est définie comme le processus permettant aux cellules tumorales de pénétrer les tissus voisins et représente donc un aspect essentiel du développement des métastases (Vilchez Mercedes et al., 2021). Lors de ces vingt dernières années, l'apport de l'imagerie intravitale et des modèles *in vitro* 3D a changé notre compréhension des mécanismes de migration cellulaire, antérieurement étudiés sur des substrats en 2D. La migration dans des environnements 3D est difficile car elle nécessite le passage à travers des structures extracellulaires complexes et denses (Yamada and Sixt, 2019) (Figure 7). La migration des cellules tumorales résulte en un cycle d'étapes interdépendantes (Lauffenburger and Horwitz, 1996; Friedl and Brocker, 2000; Friedl and Wolf, 2003). Premièrement, la cellule en mouvement se polarise et s'allonge. Un pseudopode est ensuite formé, via l'extension du front de migration de la cellule, qui se fixe aux substrats matriciels. Puis, la contraction du corps cellulaire génère une force de traction qui conduit au glissement progressif vers l'avant du corps cellulaire et de son bord de fuite. Les extensions cellulaires jouent un rôle dans la reconnaissance et la liaison à la MEC et peuvent être très diverses en termes de morphologie et fonctionnement : lamellipodes, filopodes, pseudopodes ou invadopodes (Adams, 2001). Leur point commun est de contenir des filaments d'actine et de mettre en place des points focaux d'adhésion avec les protéines matricielles. La migration des cellules tumorales est considérée comme un processus flexible et multi-factoriel (Clark and Vignjevic, 2015). En effet, des études menées sur des échantillons de patients ou par imagerie intravitale chez la souris ont révélé une grande diversité concernant les morphologies des cellules cancéreuses invasives.

A. Transition épithélio-mésenchymateuse

La TEM est décrite depuis de nombreuses années pour jouer un rôle déterminant dans l'invasion et la dissémination métastatique (Thiery, 2002; Brabletz et al., 2018). Elle est caractérisée par une perte de la polarité apico-basale et des adhésions cellule-cellule ainsi que l'acquisition des caractéristiques mésenchymateuses comme la polarité antéro/postérieure. Les cellules mésenchymateuses présentent de fortes interactions avec la

MEC, des capacités de migration importante et une augmentation fréquente de la résistance aux chimiothérapies, ce qui représente des caractéristiques essentielles à la dissémination tumorale (*Vilchez Mercedes et al., 2021*). La TEM est principalement une réponse à des signaux extracellulaires dont les cytokines, des facteurs de croissance ou un stress métabolique (*Thiery, 2002*). Des signaux mécaniques comme la rigidité du microenvironnement peuvent déclencher ou renforcer la TEM, selon un processus reporté dans les cellules tumorales (*Wei et al., 2015; Rice et al., 2017*).

a. Marqueurs de la transition épithélio-mésenchymateuse

Lors de la TEM, les cellules acquièrent un ensemble de marqueurs tels que des effecteurs biomécaniques comme la vimentine et la N-cadhérine, des facteurs de transcription régulant la TEM incluant TWIST1, SNAIL et ZEB1, des enzymes de remodelage /dégradation de la MEC comme LOXL2 et les MMP (*Thiery, 2002; Vilchez Mercedes et al., 2021*).

b. La transition épithélio-mésenchymateuse partielle

Cependant, une TEM complète n'est pas nécessairement requise pour induire l'invasion tumorale. Il est aujourd'hui reconnu que la TEM, à l'instar d'être deux états exclusifs, est en fait un processus de transition réversible avec de multiples étapes intermédiaires (*Wei et al., 2015; Nieto et al., 2016; Brabletz et al., 2018; Kröger et al., 2019; Vilchez Mercedes et al., 2021*). Cet état hybride confère une plasticité aux cellules tumorales, leur permettant de passer d'un état à un autre lors de la progression tumorale (*Williams et al., 2019*). Cette plasticité permet de comprendre que les lésions métastatiques des sites secondaires présentent des caractéristiques épithéliales plutôt que mésenchymateuses. Les cellules subissant la TEM partielle acquièrent la combinaison de caractéristiques épithéliales et mésenchymateuses et les analyses *in vivo* révèlent des sous-populations de cellules tumorales exprimant faiblement des marqueurs épithéliaux et plus fortement des marqueurs mésenchymateux (*Yu et al., 2013; Pastushenko et al., 2018*).

B. Les différentes stratégies de migration

Lors de la progression tumorale et de la dissémination métastatique des tumeurs solides, différentes stratégies de migration cellulaire sont mises en place, se définissant par

la migration individuelle et la migration collective, avec la possibilité de passer d'une stratégie de migration à une autre (*Odenthal et al., 2016*). Cette plasticité confère aux tumeurs une capacité unique à s'adapter aux conditions environnementales (*Clark and Vignjevic, 2015*).

a. Migration individuelle

La migration individuelle est caractérisée par une perte des interactions cellule-cellule et une faible coordination de migration avec les cellules voisines. Deux phénotypes sont caractérisés : amiboïde et mésenchymateuse (*Clark and Vignjevic, 2015*).

Dans le cas de la migration de type amiboïde, les cellules présentent une morphologie arrondie et ellipsoïde, une perte des adhésions focales et des complexes protéiques reliant les intégrines au cytosquelette d'actine : elles se déplacent donc avec une faible force d'adhésion et une déformabilité cellulaire importante (*Odenthal et al., 2016*) (*Figure 7*). Plusieurs types de migration amiboïde ont été observés sur les cellules : 1) se déplaçant à des vitesses élevées (0,45 mm/min) et changeant rapidement de morphologie, présentant de courtes et fines protrusions, dépourvues de « blebs »; 2) se déplaçant plus lentement avec une morphologie « blebbing » et des mouvements chaotiques; 3) se déplaçant à faible vitesse (0,1 mm/min), présentant de courtes extensions cytoplasmiques associées à une activité protéolytique (*Clark and Vignjevic, 2015*).

La migration mésenchymateuse est caractérisée par des cellules allongées, en forme de fuseau et émettant de longues extensions cytoplasmiques, de nombreuses interactions cellule-MEC et des forces de tractions élevées sur les deux pôles cellulaires (*Friedl and Wolf, 2003*) (*Figure 7*). Alors que les protrusions de ces cellules avancent relativement rapidement (0,4 mm/min), dans certains cas, l'arrière de la cellule reste immobile, ce qui entraîne une translocation nette relativement lente (0,2 mm/min) (*Clark and Vignjevic, 2015*). Dans un modèle 3D, il a été démontré que les points focaux se forment et se dissocient, expliquant cette vitesse réduite de migration. Ce type de migration est principalement observée dans les tumeurs du tissu conjonctif, telles que les fibrosarcomes, les gliomes et dans les cancers épithéliaux suite à une dédifférenciation progressive, par la TEM notamment. Cette migration représente en effet un mécanisme efficace de dissémination des cellules tumorales et de métastases. Des études comparatives ont identifié les cellules tumorales migrant individuellement, observées lors de la différenciation

néoplasique et dans les néoplasies hématologiques, comme la principale cause de dissémination systémique et de métastases (*Friedl and Wolf, 2003*).

b. Migration collective

La migration cellulaire collective permet des réarrangements tissulaires efficaces nécessitant une translocation et une réorganisation cohérente d'un grand nombre de cellules (*Yamada and Sixt, 2019*). Ce processus est impliqué dans la dissémination des cellules tumorales. Elle est définie par un groupe de cellules qui conservent des adhésions cellule-cellule et des adhésions cellule-MEC pendant la migration et présentent ainsi une forte corrélation de direction avec les cellules jointives (*Yamada and Sixt, 2019*) (*Figure 7*).

Des analyses histologiques réalisées sur des échantillons de patients révèlent que la migration collective de cellules tumorales peut prendre la forme de bourgeons, protrusions, amas et de structures luminales, vides (*Friedl and Alexander, 2011; Weigelin et al., 2012; Alexander et al., 2013; Vilchez Mercedes et al., 2021*). Les cellules migrant collectivement présentent des phénotypes mésenchymateux ou épithéliaux, qui peuvent différer entre les cellules meneuses « leader », se trouvant au front d'invasion et suiveuses « follower », se trouvant à l'arrière (*Khalil and Friedl, 2010; Clark and Vignjevic, 2015*). Dans les tumeurs, le groupe de cellules peut garder un contact avec le site primaire, générant ainsi une invasion locale. Ces caractéristiques ont été histologiquement détectées dans les cancers épithéliaux invasifs tels que le carcinome épidermoïde oral, mammaire, colorectal et d'autres précédemment reportés dans la revue de *Friedl and Wolf publiée en 2003*. Par exemple, il a été observé dans des carcinomes invasifs présentant une structure glandulaire désorganisée, des protrusions multicellulaires s'étendant dans le stroma à partir de ces glandes néoplasiques (*Brabletz et al., 2001; Prall, 2007*). Dans d'autres cas, des amas cellulaires se détachent totalement du site primaire, colonisant notamment le tissu interstitiel et des voies de moindre résistance (*Friedl and Wolf, 2003*). En effet, des amas composés d'environ 5-6 cellules appelés

« tumor buds » ont déjà été observés *in vivo* (*Clark and Vignjevic, 2015*). Plus récemment, il a aussi été identifié dans la circulation sanguine de patients atteints d'un cancer du rein, du poumon ou du mélanome, la présence d'amas de cellules tumorales circulantes (CTC) aussi appelés micro-emboles tumorales (*Hou et al., 2012*). La présence de ces amas pourrait être due à l'agrégation de cellules dans la circulation ou à l'intravasation d'un groupe de cellules. De manière intéressante, une étude réalisée sur un modèle du cancer mammaire chez la

souris propose que ces micro-emboles tumorales sont le résultat de la transmigration d'amas de cellules tumorales et que ceux-ci peuvent efficacement coloniser des organes secondaires (Aceto et al., 2014).

Bien que la migration collective soit la plus lente (0,01 à 0,05 mm/min) (Clark and Vignjevic, 2015), celle-ci confère certains avantages comme une concentration importante de facteurs autocrines et de protéases matricielles ainsi qu'une protection des cellules internes contre les cellules immunitaires (Friedl and Wolf, 2003). De plus, elle permet le déplacement de cellules hétérogènes en une seule unité fonctionnelle et ainsi favorise l'invasion de clones moins mobiles mais portant d'autres caractéristiques essentielles comme la résistance à l'apoptose (Friedl and Wolf, 2003). Il a été démontré que des amas cellulaires peuvent présenter un potentiel métastatique davantage élevé que les cellules tumorales individuelles (Vilchez Mercedes et al., 2021).

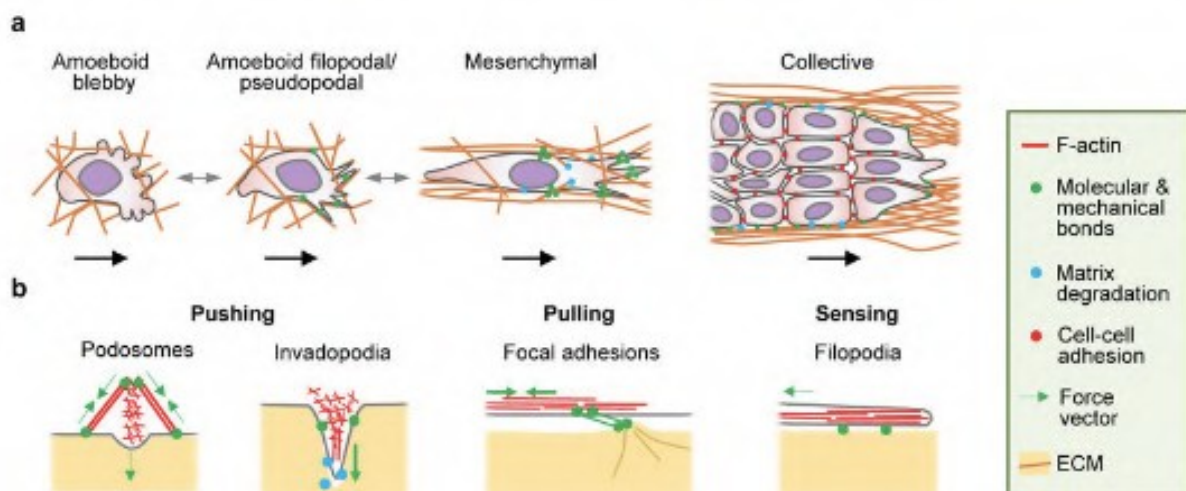


Figure 7 : Les stratégies de migration des cellules tumorales

(A) Schématisation de différentes stratégies de migration dans un environnement 3D incluant la migration individuelle (amiboïde, mésenchymateuse) et collective.

(B) Ces différentes stratégies d'invasion nécessitent la mise en place d'extensions cytoplasmiques riches en actine interagissant avec la MEC impliquant : les podosomes sondant le substrat verticalement, les invadopodes dégradant localement le substrat dans le sens vertical en libérant des protéases, les adhésions focales générant des forces d'adhésion et de traction et les filopodes s'étendant le long de la MEC et générant une force de traction parallèle (Van Helvert, 2018).

- **Mécanisme meneur-suiveur**

De nombreuses études soutiennent désormais la notion que les fronts d'invasion des structures tumorales collectives sont composés de cellules agressives avec des extensions cytoplasmiques riches en actine et une activité de remodelage de la matrice importante. Ce mécanisme particulier est appelé « migration meneur-suiveur » (Figure 8). Les cellules du front d'invasion, appelées cellules meneuses, prennent en charge divers

aspects du processus d'invasion collective (Chen et al., 2020). Bien qu'il n'existe pas aujourd'hui de définition précise de ces cellules meneuses, Vilchez-Mercedes et coll. proposent qu'elles rassemblent un ensemble de capacités clés (Figure 8) :

i) Elles sont responsables de la création de voies de migration à faible résistance à travers la MEC (Winkler et al., 2020). De telles voies peuvent être créées par le dépôt de protéines matricielles, le remodelage de la MEC ou la dégradation de celle-ci;

ii) Elles interagissent avec les cellules suiveuses, par l'intermédiaire de mécanismes biochimiques et biomécaniques, afin de coordonner le mouvement de migration (van Helvert et al., 2018; Chen et al., 2020). Ces interactions agissent sur la machinerie de la motilité cellulaire, mais peuvent également modeler des aspects tels que le métabolisme;

iii) Elles possèdent souvent des propriétés complémentaires aux cellules suiveuses telles que l'état souche ou la résistance aux traitements permettant ainsi d'améliorer la survie de la tumeur.

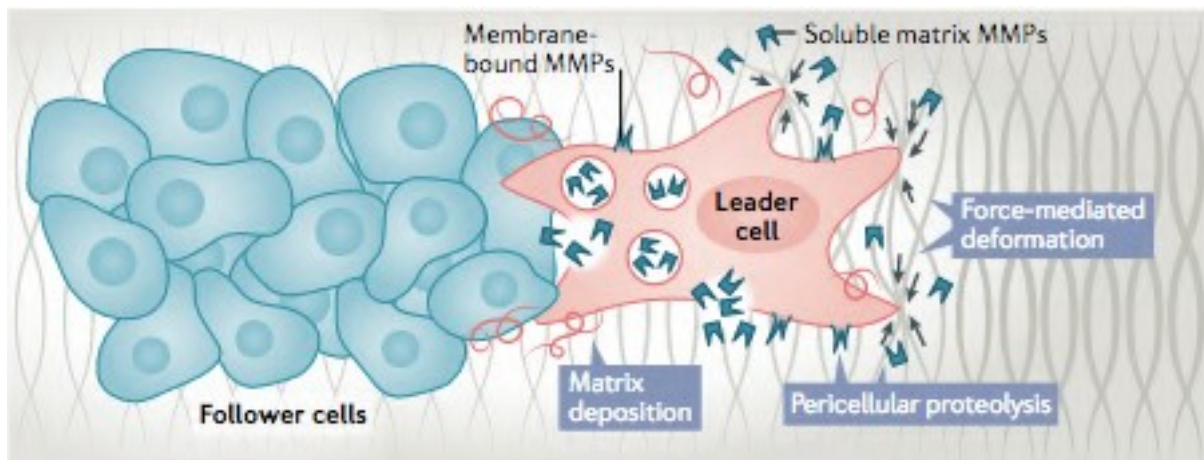


Figure 8 : Mécanisme meneur-suiveur, la création d'une voie de migration

Les cellules meneuses remodelent la MEC pour créer une voie d'invasion à faible résistance pour les cellules suiveuses. Les cellules meneuses peuvent déposer des protéines matricielles pour faciliter l'invasion des cellules suiveuses (chemin de migration indiqué par un gradient sombre dans l'environnement), sécréter des MMP pour réorganiser et dégrader la matrice dans l'environnement. La stratégie spécifique de remodelage de la matrice utilisée dépend à la fois des propriétés de la cellule leader et de la MEC (Vilchez Mercedes et al., 2021).

Sur la base de la définition fonctionnelle évoquée ci-dessus, plusieurs types de cellules du microenvironnement tumoral peuvent jouer le rôle de cellules meneuses. Quatre grandes catégories de cellules meneuses ont été identifiées en fonction de leurs

origines et des caractéristiques décrites : les cellules tumorales basales, les cellules tumorales mésenchymateuses ou hybrides, les macrophages et les CAF (*Vilchez Mercedes et al., 2021*).

Dans mon travail de thèse, je m'intéresse tout particulièrement aux cellules meneuses dérivées de cellules tumorales mésenchymateuses ou hybrides. Il est en effet décrit que les cellules meneuses peuvent être des cellules tumorales ayant réalisé une TEM complète ou partielle. Cela a déjà été observé dans des modèles 3D d'invasion de sphéroïdes, des modèles murins et des analyses histologiques chez le patient (*Wu et al., 2019; Quan et al., 2020*). Dans des sphéroïdes 3D de cancer du sein, les cellules meneuses se trouvant au front d'invasion expriment la E- et la N-cadhérine ainsi que d'autres marqueurs mésenchymateux comme la vimentine, ZEB1, SNAIL et TWIST alors que les cellules suiveuses expriment uniquement des marqueurs épithéliaux (*Quan et al., 2020*). Il est important de noter que les cellules cancéreuses à l'état hybride EM affichent une capacité de croissance accrue sur les sites métastatiques. Par conséquent, ce type d'invasion collective reflète un phénotype agressif (*Pastushenko et al., 2018; Quan et al., 2020; Vilchez Mercedes et al., 2021*).

Durant mon travail de thèse, je me suis intéressée à la migration individuelle mésenchymateuse et collective des cellules tumorales et tout particulièrement aux capacités des cellules tumorales à s'adapter à leur environnement matriciel en réponse à des stimuli biochimiques ou mécaniques.

C. Mécanotransduction et invasion tumorale

La mécanotransduction se définit par la conversion d'un stimulus mécanique en un signal moléculaire. Dans leur microenvironnement, les cellules sont soumises à des forces mécaniques, provenant - du microenvironnement relayées par les points d'adhésions focaux et - des cellules adjacentes relayées par les adhésions cellule-cellule. En plus d'une déformation passive induite par une contrainte mécanique, avec les temps, les cellules tendent soit à retrouver leur forme initiale ou alors à s'adapter au changement d'environnement. Des voies de signalisation bien décrites dans la littérature sont alors activées par les forces appliquées et modulent ainsi le comportement des cellules (*DuFort et al., 2011*). Comme décrit dans la partie I, la MEC au sein du microenvironnement tumoral est fortement remodelée, modifiant ainsi ses propriétés physiques. Ce remodelage affecte alors les fonctions cellulaires par les mécanismes de mécanotransduction et régule la migration

des cellules tumorales. Il convient donc d'apporter une meilleure compréhension des différents mécanismes de mécanotransduction pouvant jouer un rôle dans la progression tumorale (Figure 9).

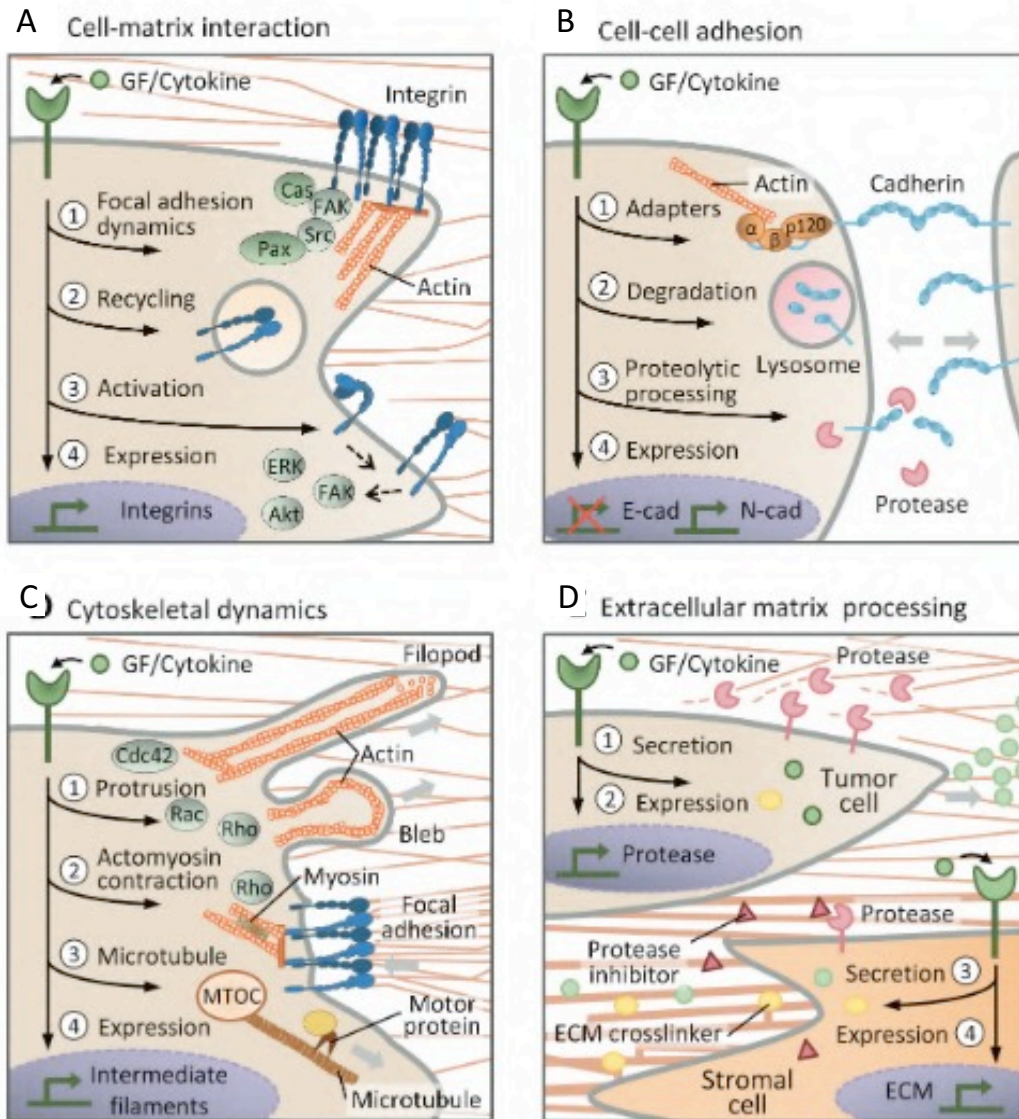


Figure 9 : Mécanotransduction et invasion tumorale

(A) Régulation de l'adhésion cellule-matrice, y compris l'assemblage et le désassemblage de l'adhésion focale (1), le recyclage des intégrines (2), l'activation des intégrines via la signalisation de « inside-out signaling » (3) et l'expression des intégrines (4).

(B) Régulation des jonctions cellule-cellule par les caténines associées à la cadhérine (1), l'endocytose et dégradation de la cadhérine (2), le clivage protéolytique des cadhérines par les protéases (3) et l'expression des cadhérines (4).

(C) Organisation du cytosquelette, par la polarisation cellulaire et la polymérisation de l'actine conduisant à la formation de filopodes ou lamellipodes (1), la contraction de l'actomyosine (2), l'organisation, l'extension et le trafic des microtubules (3) et l'expression de filaments intermédiaires (4).

(D) Régulation de la composition et de l'organisation de la MEC par les cellules tumorales via la sécrétion (1) et l'expression (2) de facteurs de croissance et de cytokines activant les cellules stromales et les protéases dégradant la matrice. Régulation par les cellules stromales via la sécrétion (3) et l'expression (4) principalement de facteurs de croissance et de cytokines guidant la migration des cellules tumorales par haptotaxie/chimiotaxie, ainsi que la libération de protéines de la MEC, d'enzymes de réticulation matricielle et de protéines inhibant les protéases conduisant au remodelage, à l'alignement et à la rigidification de la MEC (D'après Odenthal et al., 2016).

a. Les adhésions cellule-matrice extracellulaire

La migration des cellules tumorales est régulée par les interactions intégrine-MEC. Il a été démontré que la migration en 3D nécessitait un nombre important et robuste d'adhésions focales (*Hakkinen et al., 2011; Doyle et al., 2015; Kubow et al., 2015*) (*Figure 9*). La dynamique sous-jacente des intégrines dépend de l'activation, du regroupement et du recyclage de celles-ci, qui sont des processus étroitement régulés. Lors de l'activation, les intégrines fournissent des informations sur l'emplacement, l'environnement et l'adhésion des cellules en signalant via FAK et les kinases de la famille Src, suivies de l'engagement des Rho GTPases, Akt et ERK, et transmettent en outre le mécanocouplage et la signalisation des réponses cellulaires sous-jacentes, telles que la migration, la prolifération, la survie ou la différenciation (*Harburger et al., 2009*). Dans le cancer, il a été montré que le stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) induit la surexpression des intégrines, dont les $\alpha\beta3$, $\alpha\beta6$ and $\alpha5\beta1$, qui stimulent l'agressivité et l'invasion *in vitro* et *in vivo* dans différents modèles tumoraux (*Sun et al., 2007*). De façon similaire, le TGF- β induit l'expression de l'intégrine $\beta3$ dans des cellules du cancer du sein qui stimule la migration collective et individuelle sur un substrat de collagène I. De nombreux travaux ont montré le rôle des intégrines dont l'intégrine $\beta1$ dans le processus d'extravasation physiologique (leucocyte, neutrophile) et tumorale (*Sökeland and Schumacher, 2019*). La surexpression conjointe d'intégrines et de composants matriciels, telle que l'intégrine $\alpha5\beta1$ et la fibronectine, favorise principalement la progression tumorale (*Roman et al., 2010; Gopal et al., 2017*). Une corrélation positive entre la fonction des intégrines et l'invasion a été démontrée dans les cas du cancer de l'ovaire (intégrines $\beta1$ et $\alpha\beta3$), du carcinome colorectal (intégrine $\alpha6\beta4$), du mélanome (intégrines $\alpha2\beta1$ et $\beta3$), des cellules de carcinome mammaire, prostatique et le gliome (intégrine $\alpha6\beta1$) (*Friedl and Wolf, 2003*).

b. Les jonctions cellule-cellule

Les jonctions cellule-cellule sont impliquées dans la coordination de la migration collective (*Yamada and Sixt, 2019*). Dans le cas des cellules tumorales épithéliales, les interactions cellule-cellule sont principalement assurées par les jonctions adhérentes consistant en des interactions cadhérine-cadhérine qui sont dynamiquement connectées aux microtubules et aux filaments d'actine (*Odenthal et al., 2016*) (*Figure 9*). Les jonctions adhérentes sont contrôlées par au moins quatre mécanismes complémentaires : -

L'expression de la cadhérine; - la fonction des adaptatrices p120-caténines et α/β -caténine qui relient les cadhérines au cytosquelette d'actine et contrôlent la stabilité de la jonction; - la délivrance et le recyclage de la cadhérine au niveau de la membrane plasmique; - le traitement protéolytique des cadhérines par des protéases extracellulaires et intracellulaires (*Odenthal et al., 2016*) (*Figure 9*).

c. Dynamique du cytosquelette et polarisation cellulaire

La polarisation et le couplage des forces mécaniques des cellules tumorales par le biais d'interactions cellule-cellule et cellule-matrice sont tous deux assurés par le cytosquelette d'actine (*Odenthal et al., 2016*) (*Figure 9*). Pour la génération de force, le cytosquelette coopère avec les complexes d'adhésion pour définir le type, la force et la durée de l'interaction cellulaire avec la MEC, la polarité cellulaire et la migration. Les petites GTPases Cdc42 et Rac induisent la polymérisation de l'actine pour former des protrusions cellulaires, notamment des lamellipodes et des filopodes, qui poussent le front d'invasion vers l'avant (*Figure 9*). La contraction de l'actomyosine, sous le contrôle de la petite GTPase RhoA, permet la maturation de l'adhésion focale et la contraction cellulaire. Les microtubules maintiennent la polarité cellulaire, régulent le trafic des vésicules et la livraison de protéines fonctionnelles aux sites d'interaction cellule-matrice, et soutiennent ainsi la régulation de l'adhésion et la migration cellulaire (*Etienne-Manneville, 2013; Akhshi et al., 2014*). Les filaments intermédiaires, y compris les cytokératines et la vimentine, régulent la forme cellulaire, l'adhésion cellule-cellule via les desmosomes, la polarité et la protrusion cellulaire (*Leduc and Etienne-Manneville, 2015*). Les signaux extracellulaires, y compris les voies des récepteurs des facteurs de croissance et des cytokines, via les facteurs d'échange de nucléotides PI3K/Akt, et MAPK régulant les petites Rho GTPases Cdc42, Rac1 et RhoA, dirigent la dynamique du cytosquelette et contrôlent ainsi la forme, l'adhésion et le mouvement des cellules lors des processus d'invasion tumorale (*Odenthal et al., 2016*).

d. Le noyau

Bien qu'il soit généralement un obstacle à une migration 3D efficace, le noyau peut, dans certains cas, également participer activement à la conduite et à la direction de la locomotion dans des environnements 3D (*Yamada and Sixt, 2019*). Quelques travaux révèlent que les cellules mésenchymateuses invasives utilisent dans certains cas leur noyau

pour se propulser vers l'avant. Dans ce mécanisme de migration à « piston nucléaire », la contractilité assurée par la myosine II tire activement le noyau en amont pour pressuriser l'avant de la cellule et fournir un mécanisme de protrusion lobopodiale qui ne nécessite pas de machinerie classique impliquée dans la génération d'une protrusion lamellipodiale (Yamada and Sixt, 2019).

D. La plasticité cellulaire lors de l'invasion tumorale

Il est décrit que les cellules invasives dans un environnement 3D montrent un fort degré de plasticité, signifiant qu'elles peuvent changer de stratégie de migration de manière dépendant du contexte (Yamada et al., 2019). En effet, lorsque les cellules rencontrent de nouvelles conditions environnementales, elles doivent adapter leur stratégie d'invasion (Figure 10). Les principaux paramètres qu'une cellule régule pour adapter son mode de migration sont les adhérences cellule-cellule et cellule-MEC, le type de protrusions, la contractilité, la déformabilité interne (principalement nucléaire) et la capacité protéolytique (Yamada and Sixt, 2019) (Figure 10). Il a été démontré que ces facteurs varient ensemble ou séparément dans différents contextes, entraînant différents modes de migration cellulaire. Il est décrit que les propriétés mécaniques et structurales de la MEC comme la taille des pores, la densité des fibres ou la réticulation, présentés dans la partie I (Figure 5) influencent les stratégies de migration. En effet, une forte densité de collagène I favorise la migration collective dans des cultures de cellules de mélanome et de fibrosarcome (Haeger et al., 2014). Par des études *in vivo* d'imagerie intravitale, il a été décrit dans le cancer du sein la présence de zones à faible densité de collagène I, systématiquement associées à des cellules immobiles, alors que des cellules mobiles ont été observées à proximité de gros faisceaux de collagène I (Giampieri et al., 2009). De plus, les cellules tumorales à migration rapide, présentant un phénotype amiboïde ou mésenchymateux, orientent leurs protrusions parallèlement aux faisceaux de collagène. Ces cellules semblent donc utiliser ces faisceaux comme des « autoroutes » pour une migration directionnelle efficace (Sidani et al., 2006; Geraldo et al., 2012). Il a été suggéré que la vitesse de migration des cellules mammaires est influencée par l'organisation des fibres de collagène, de la présence de macrophages et de la proximité des vaisseaux sanguins (Gligorijevic et al., 2014). Les régions présentant des fibres de collagène mal organisées, plus courtes et bouclées, associées à la signature TASC1 mentionnée dans la partie I, contiennent des cellules tumorales isolées (Gligorijevic et al.,

2014). Cela renforce l'hypothèse selon laquelle l'alignement de la MEC peut favoriser la migration collective.

De plus, il est aussi décrit que la taille des pores influence la vitesse de migration (Harley *et al.*, 2008; Wolf *et al.*, 2013). En effet, une taille de pore inférieure au diamètre nucléaire peut physiquement empêcher la migration cellulaire. De plus, une taille de pore supérieure à la taille de la cellule ralentit drastiquement la migration cellulaire car les cellules perdent un contact continu avec la MEC.

Dans des expériences *in vitro* 3D, la nature et la composition de la MEC semblent aussi moduler les stratégies d'invasion : Les cellules obtenues à partir de fragments de carcinomes primaires du sein (modèle murin de MMTV-PyMT) présentent une migration collective dans le collagène I et une migration individuelle dans le matrigel, constitué de composants de membrane basale partiellement protéolysés (Nguyen-Ngoc and Ewald, 2013).

Enfin, l'augmentation de la rigidité d'une matrice favorise la formation d'adhésions focales et la contraction du cytosquelette d'actine régulée par la signalisation Rho/ROCK. Ainsi, les forces de traction générées sont plus nombreuses que sur un substrat peu rigide (Peyton *et al.*, 2008). Sur un substrat rigide, les cellules sont davantage étalées et ont donc tendance à migrer plus rapidement (Ulrich *et al.*, 2009). Ce principe est nommé *durotaxis*: les gradients de rigidité déterminent ainsi la stratégie et l'intensité de migration cellulaire (DuChesne *et al.*, 2019). Ces gradients peuvent être induit par un remodelage de la MEC par les cellules dans certaines tumeurs.

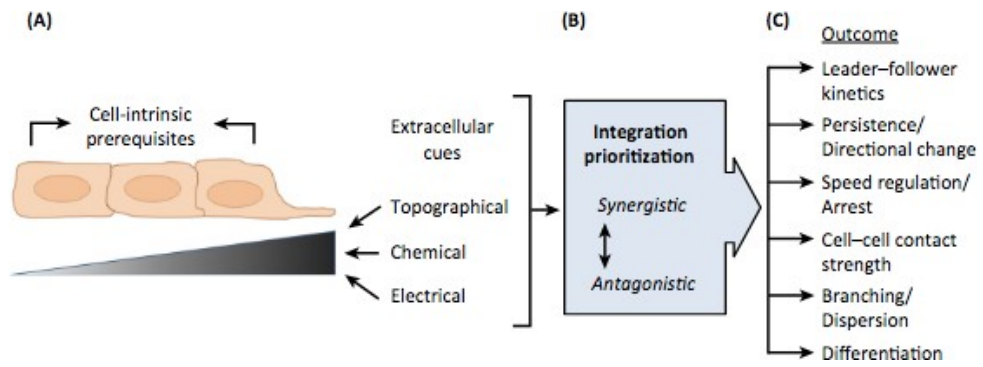


Figure 10 : Régulation de la migration en réponse aux propriétés du microenvironnement

(A) Les interactions cellule-cellule et les interactions cellule-matrice agissent simultanément sur le groupe cellulaire. (B) Intégration et la hiérarchisation des signaux permettant une prise de décision (C) En conséquence, la cellule modifie sa polarité, ses interactions cellule-cellule, sa croissance et sa différenciation, modulant ainsi la direction de la migration, son altération ou son arrêt (Haeger et al., 2015).

III. Angiogenèse et morphogénèse vasculaire

Le développement des vaisseaux sanguins joue un rôle déterminant dans les processus physiologiques et pathologiques comme le cancer. Les vaisseaux sanguins participent à l'homéostasie de l'organisme en fournissant aux tissus en croissance de l'oxygène et des nutriments. Chez les mammifères, ils s'organisent en une structure arborescente, qui existe sous la forme de deux arbres artériels et veineux distincts, reliés l'un à l'autre à leurs extrémités par un lit de capillaires. Les artères transportent le sang à distance du cœur et se ramifient dans des vaisseaux plus petits appelés artérioles, qui distribuent le sang aux capillaires. Les capillaires ramènent le sang vers de petits vaisseaux appelés veinules qui se transforment en veines plus grosses et remontent jusqu'au cœur. Tous les types de vaisseaux présentent des spécificités structurales nécessaires à leur fonction, illustrées sur le schéma ci-dessous et que je ne détaillerai pas (Torres-Vazquez et al., 2003) (Figure 11).

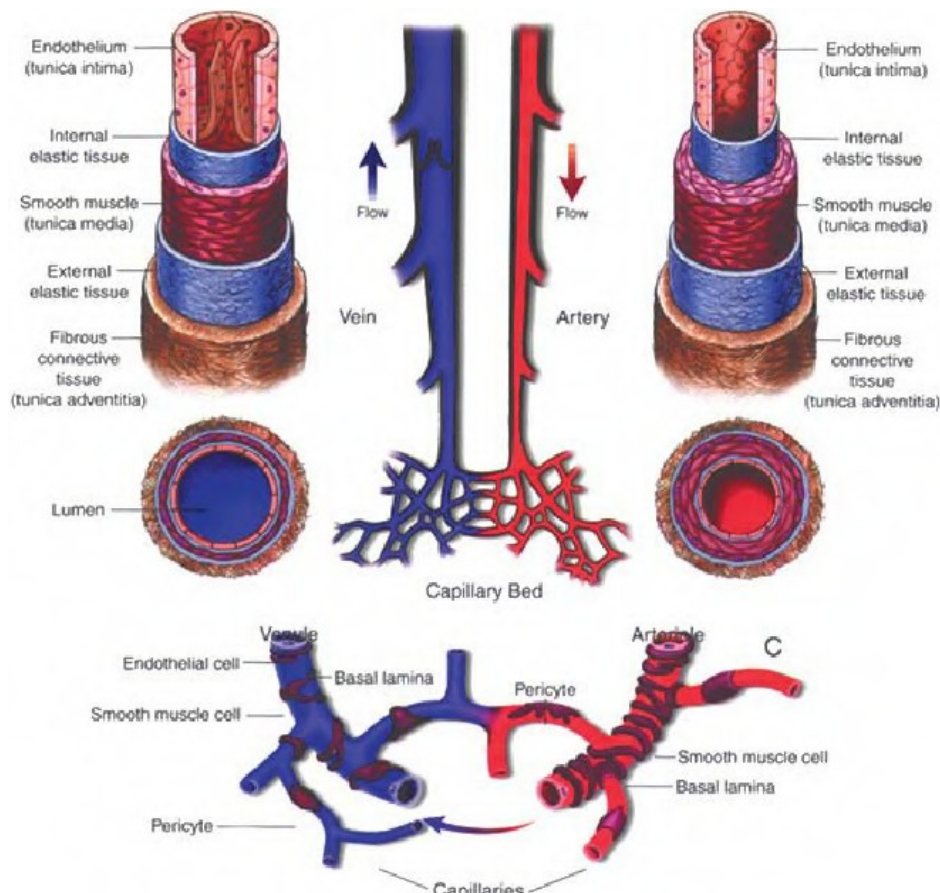


Figure 11 : Artères, veines et capillaires (Torres-Vazquez et al., 2003)

Nous portons un intérêt tout particulier aux capillaires, constituant des sites uniques d'échange avec les tissus. Ce sont les plus petites structures vasculaires de l'organisme, formées d'une monocouche de cellules endothéliales polarisées de manière luminale/abluminale et orientées selon le flux sanguin. Dépourvus de cellules musculaires lisses, les capillaires sont couverts de péricytes de façon éparse (*Figure 11*). Ces cellules peuvent communiquer avec les cellules endothéliales par l'intermédiaire de signalisations paracrines ou de contacts mécaniques. Au pôle luminal, ces petits vaisseaux possèdent une membrane basale, une MEC spécialisée permettant de séparer l'endothélium du tissu stromal. Celle-ci enrobe la monocouche endothéliale et les cellules périvasculaires, qui participent également à sa synthèse et à son organisation.

Lors du développement embryonnaire, la vasculogenèse constitue la première étape de la formation de l'arbre vasculaire, processus de formation d'un plexus primaire à partir d'îlots sanguins composés de cellules précurseurs hématopoïétiques. Puis, les tubes vasculaires se connectent les uns aux autres et le plexus primaire se différencie en vaisseau artériel ou veineux en réponse à un ensemble de stimuli hémodynamiques. Ce plexus primaire ainsi formé est ensuite remodelé par angiogenèse constituant en la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants. Ce processus intervient non seulement au cours du développement mais également tout au long de la vie dans des situations physiologiques comme pathologiques (*Potente et al., 2011*). Deux mécanismes d'angiogenèse sont décrits dans la littérature : le clivage de vaisseaux préexistants par angiogenèse intussusceptive, qui concerne principalement les artères et les veines, et l'angiogenèse par bourgeonnement, impliquée dans la croissance des capillaires. L'angiogenèse par bourgeonnement se produit dans des conditions qui nécessitent une augmentation de l'apport de sang et d'oxygène, et survient dans diverses circonstances pathologiques, dont les pathologies ischémiques cardiovasculaires, les rétinopathies et les cancers. Celle-ci comprend une succession d'étapes détaillées dans la partie ci-dessous.

A. Angiogenèse physiologique

L'angiogenèse est régulée par des facteurs de croissance pro-angiogéniques exprimés dans les tissus en hypoxie. L'angiogenèse par bourgeonnement se déroule en plusieurs étapes définies : bourgeonnement, élongation et branchements, formation de la lumière, anastomose, maturation du vaisseau et stabilisation ou régression (Logsdon et al., 2014) (Figure 12). Ces mécanismes sont décrits ci-dessous.

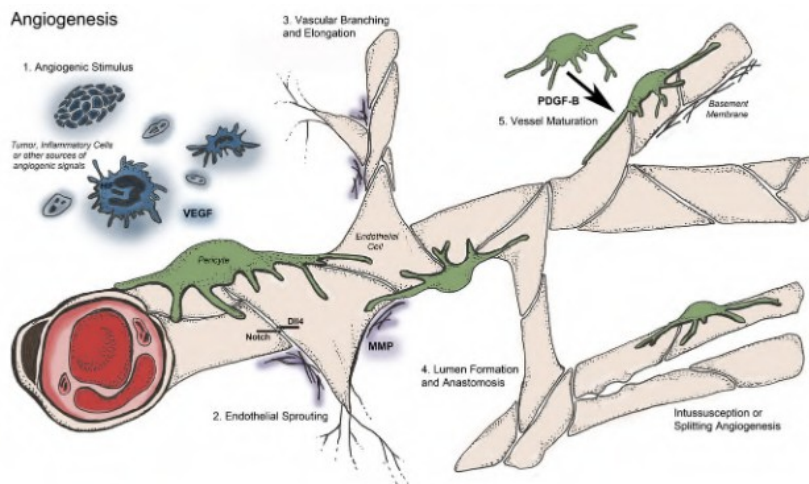


Figure 12 : Les étapes clés de l'angiogenèse par bourgeonnement

1 : Les stimuli angiogéniques et hypoxiques; 2 : Le bourgeonnement endothélial; 3 : Élongation et branchements vasculaires; 4 : Formation de la lumière et anastomose; 5 : Maturation des vaisseaux avec le recrutement des péricytes et le dépôt de la membrane basale (Logsdon et al., 2014).

a. Mécanismes moléculaires et cellulaires de l'angiogenèse par bourgeonnement

- **Le stimulus hypoxique**

L'angiogenèse est principalement induite par des facteurs de croissance exprimés dans les tissus hypoxiques, le plus important étant le VEGF. L'hypoxie, se traduisant comme le manque d'oxygène au sein d'un tissu, est la résultante de processus physiologique ou pathologique comme le développement embryonnaire ou le cancer. L'hypoxie stimule l'angiogenèse principalement par la voie de signalisation impliquant HIF. Composée d'une sous-unité alpha et beta, HIF est une protéine constitutivement exprimée. Il existe 3 sous-unités alpha différentes (HIF-1 α , HIF2 α et HIF-3 α) ayant pour propriété commune d'avoir une demi-vie régulée par la teneur en oxygène. Il est décrit que la modulation de la fonction vasculaire et de l'angiogenèse en réponse à des stimuli hypoxiques est principalement régulée par HIF- 2 α , surexprimé dans les cellules endothéliales. Les senseurs de l'oxygène sont des prolyl hydroxylases (PHD), impliquées dans des modifications post-traductionnelles

d'HIF α . En normoxie, l'hydroxylation d'HIF α par les PHD entraîne sa reconnaissance et sa liaison par l'ubiquitinase-ligase VHL, entraînant ainsi sa dégradation dans le protéasome (Figure 13). *A contrario*, en hypoxie, l'absence d'hydroxylation de la sous-unité alpha par les prolyl hydroxylases empêche sa liaison à VHL et sa dégradation dans le protéasome. Ainsi, HIF α s'accumule, est transloquée dans le noyau et se lie à la sous-unité Beta. Les hétérodimères HIF α /beta se lient alors aux éléments de la réponse hypoxique et active la transcription d'un large spectre de gènes cibles incluant des gènes régulant l'angiogenèse et le remodelage vasculaire, la composition de la MEC et la TEM (Germain et al., 2010; Rahimi, 2012).

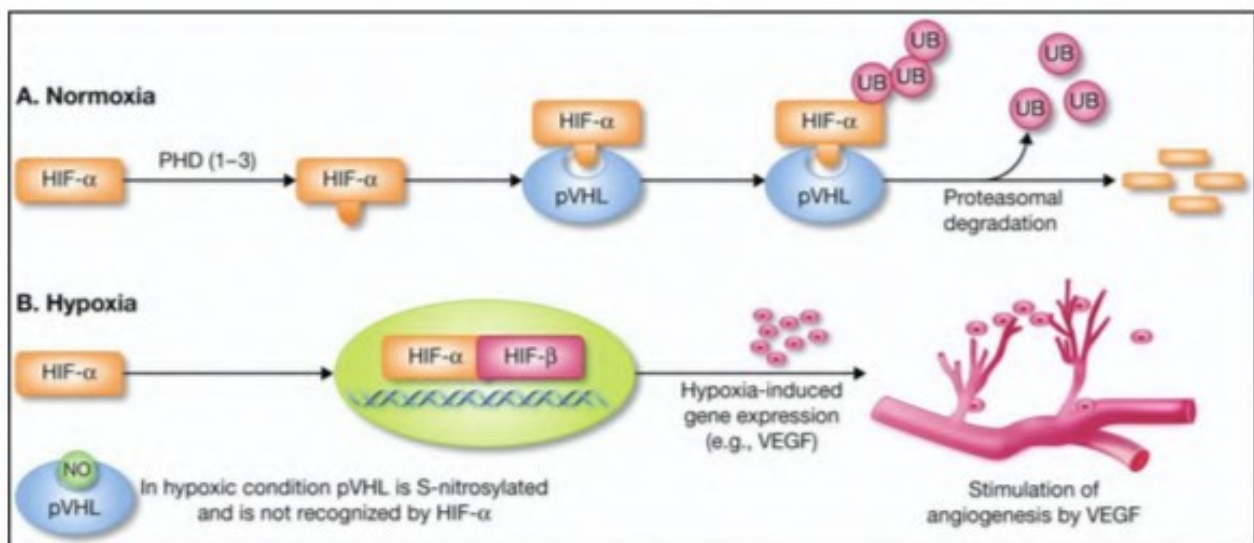


Figure 13 : Induction de l'angiogenèse par l'hypoxie

A : En normoxie, pVHL se lie à HIF α qui est hydroxylée, causant son ubiquitination et donc sa dégradation. B : En hypoxie, pVHL est s-nitrosylée et HIF α n'est pas hydroxylé, empêchant la liaison de ces deux protéines. HIF α s'accumule, transloque dans le noyau et s'associe à la sous-unité Beta. Ainsi, ce dimère permet l'expression de gènes codant pour des facteurs pro-angiogéniques (Rahimi et al., 2012).

- La réponse au VEGF

La famille de protéines VEGF inclut les VEGF-A VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E et le PlGF (Figure 14). Les VEGF-C et D sont principalement impliqués dans la régulation de la lymphangiogenèse. Le VEGF-A joue un rôle déterminant dans la régulation de l'angiogenèse physiologique et pathologique, c'est pourquoi il est considéré comme le membre de référence et je ne considérerai que celui-ci dans cette synthèse bibliographique. Le VEGF présente des épissages alternatifs conduisant à de multiples isoformes. Celles-ci incluent le VEGF121, VEGF165, VEGF189 et le VEGF206. Le VEGF165 est également l'isoforme la plus physiologiquement pertinente, ayant des caractéristiques intermédiaires entre celles

démonstrées par le VEGF121 hautement diffusible et le VEGF189 se liant à la MEC. En effet, une fraction du VEGF165 se lie à la MEC et à la surface cellulaire par son domaine de liaison à l'héparine. De manière générale, les formes plus longues interagissent fortement avec la MEC alors que les formes plus courtes, qui ne possèdent pas les domaines C-terminaux de liaison à l'héparine, du fait d'épissages alternatifs, sont plus diffusibles. En 1992, le récepteur VEGF 1 (R1) a été identifié comme un récepteur à activité tyrosine kinase présentant une forte affinité pour le VEGF (*de Vries et al., 1992*). Son homologue, le VEGFR2 a été identifié comme le principale récepteur de signalisation du VEGF (*Terman et al., 1994*). Le VEGFR1 est considéré comme un piège du VEGF-A car il a une affinité élevée pour le ligand et une faible activité kinase, tandis que l'activation du VEGFR2 pilote la plupart des voies de signalisation dépendantes du VEGF impliquées dans l'angiogenèse.

Les VEGFR1 et VEGFR2 sont principalement exprimés par les cellules endothéliales. Le VEGF-A se lie aux VEGFR1 et VEGFR2, le VEGF-B et le PlGF se lient à VEGFR1, et le VEGF-C et VEGF-D se lient au VEGFR3 (impliqué dans la lymphangiogenèse) mais peuvent se lier au VEGFR2 après clivage protéolytique (*Figure 14*) (*Pajusola et al., 1992*). Comme indiqué ci-dessus, VEGFR2 est le principal récepteur de signalisation dont l'activation favorise la prolifération et la perméabilité des cellules endothéliales vasculaires (*Apte et al., 2019*). Son activation est initiée par la liaison du VEGF à la partie N-terminale du domaine extracellulaire, par diffusion ou par présentation par des co-récepteurs tels que les HSPG et les intégrines. Cette liaison est responsable de l'homo ou de l'hétéro-dimérisation et de l'activation des récepteurs, entraînant des changements conformationnels du domaine intracellulaire et l'auto-phosphorylation des résidus tyrosine dans le dimère du récepteur qui déclenchent l'activation des voies de signalisation en aval impliquées dans l'homéostasie vasculaire.

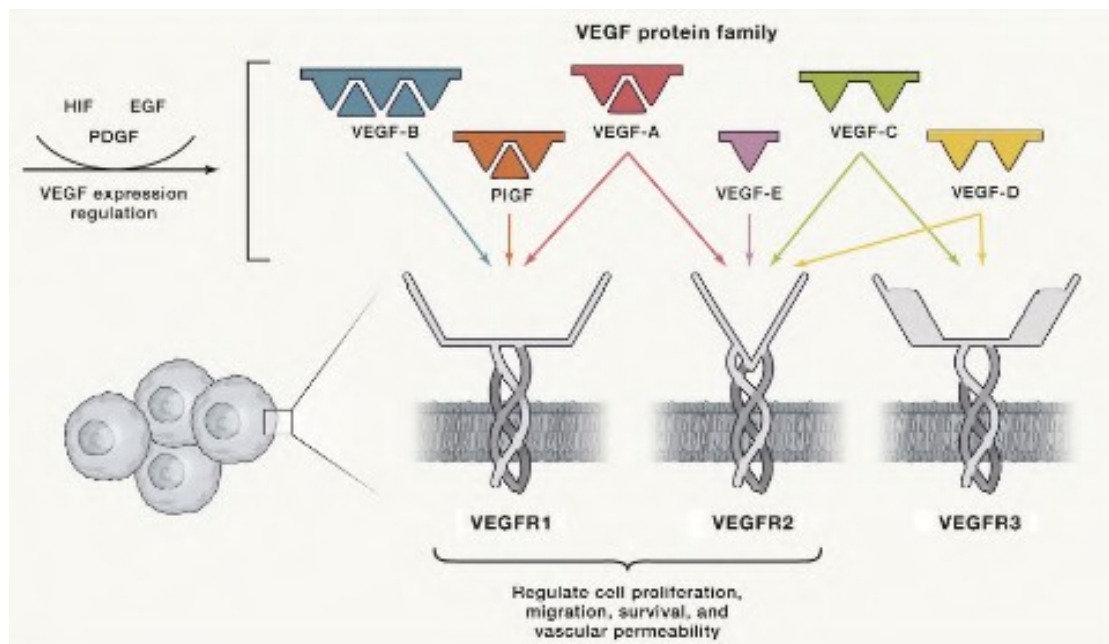


Figure 14 : Activation du VEGF et voies de signalisation (Apte et al., 2019)

- La spécification tip/stalk cell

En hypoxie, les cellules sécrètent des facteurs pro-angiogéniques comme le VEGF qui se lie à son récepteur le VEGFR2 et active certaines cellules endothéliales en leur conférant un phénotype motile et invasif. Ces cellules, émettant de longs filopodes et conduisant le processus de bourgeonnement, sont appelées tip cells. Derrière ces cellules en migration, les stalk cells constituent le bourgeon. Les stalk cells prolifèrent activement permettant ainsi l'élongation du bourgeon endothélial. Les mécanismes moléculaires de la spécification tip/stalk cells ont été largement étudiés, dans des modèles d'angiogenèse *in vivo* comme la rétine postnatale de souris ou l'embryon de poisson zèbre (Fernández-Chacón et al., 2021).

Le couple VEGF/VEGFR2 stimule les voies de signalisation MAPK et ERK et induit l'expression de Delta-like 4 (Dll4) dans les tip cells (Figure 15). Ces tip cells activent la signalisation Notch par l'intermédiaire de la liaison de Dll4 au récepteur Notch1 présent à la surface des cellules endothéliales adjacentes. En conséquence, cela impose une différenciation en stalk cells pour ces cellules adjacentes en bloquant une potentielle différenciation en tip cells. Ainsi, la signalisation Notch dans les stalk cells adjacentes régule à la baisse la signalisation ERK et par conséquent, empêche l'arrêt du cycle cellulaire et permet de maintenir leur prolifération et donc l'élongation du capillaire en

bourgeonnement. Il a été démontré que la délétion de l'un des allèles de Dll4 est suffisante pour induire des branchements et un bourgeonnement excessif causé par la formation excessive de tip cells. La spécification des cellules endothéliales en tip cells est également régulée par la glycosylation des récepteurs Notch par une glycosyltransférase de la famille Fringe nommée Jagged1 (Figure 15). De manière intéressante, il a été démontré par imagerie en temps réel dans le poisson zèbre que la spécification en tip cells est extrêmement transitoire et oscillatoire.

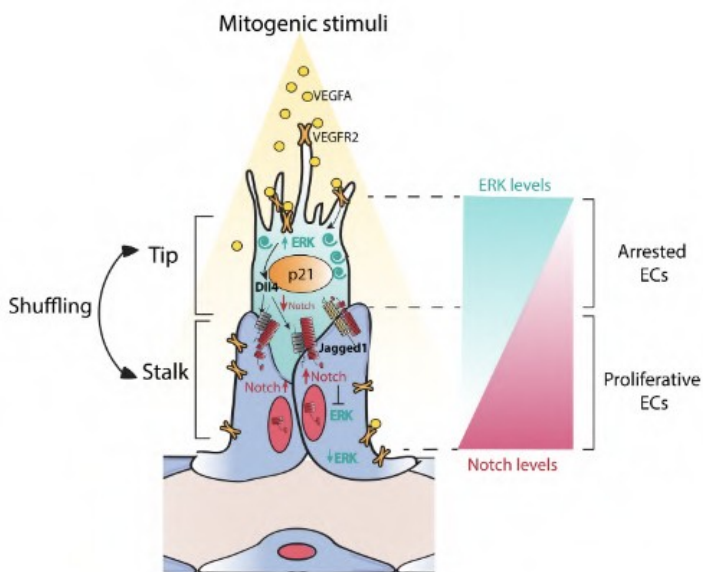


Figure 15 : Signalisation du bourgeonnement endothélial

Le VEGF se lie au récepteur VEGFR2. Cette liaison active la voie de signalisation MAPK/ERK dans les tip cells. Ces cellules expriment également P21, bloquant ainsi leur prolifération. La signalisation VEGF/ERK entraîne l'expression : - de P21, bloquant ainsi la prolifération des tip cells; - Dll4 se liant aux récepteurs Notch des stalk cells et bloquant ainsi la voie de signalisation ERK. Jagged 1 est un régulateur pro-angiogénique principalement exprimé dans les stalk cells, qui antagonise la signalisation Dll4/Notch des stalk cells aux tip cells (Fernández-Chacón et al., 2021).

En effet, une même cellule endothéliale peut passer d'un état de stalk à tip cell au cours de processus de bourgeonnement. Ce processus dynamique est régulé par la signalisation Notch, conduisant à un brassage continu entre tip et stalk cells (Fernández-Chacón et al., 2021).

- **Formation de la lumière**

L'établissement d'une lumière ininterrompue est une étape décisive pour la formation de vaisseaux sanguins (Potente et al., 2011). Cependant, le processus par lequel la lumière se forme dans les bourgeons endothéliaux reste un sujet très débattu dans la communauté scientifique (Betz et al., 2016). Cela s'explique notamment par la difficulté d'analyser les premières étapes de la formation d'un espace luminal (Betz et al., 2016). La formation de la lumière, appelée tubulogénèse, incluent différentes étapes dont la fusion de vacuoles, un réarrangement des protéines de jonction, la définition de la polarité apico-

basale, l'invagination des membranes et enfin la formation d'une lumière extracellulaire (Logsdon et al., 2014). Les mécanismes impliqués dépendent du lit vasculaire ou du type de vaisseaux formés (Potente et al., 2011; Betz et al., 2016). Des observations des vaisseaux intersomitiques d'embryons de poisson zèbre, notamment par des approches d'imagerie en temps réel, indiquent que les cellules endothéliales forment une lumière par la fusion de vacuoles intracellulaires, qui se connectent avec les vacuoles des cellules voisines (processus appelé « cell hollowing ») (Figure 16). Dans ce cas, la lumière se forme par invagination membranaire au sein de cellules (Herwig et al., 2011; Lenard et al., 2013; Gebala et al., 2016; Szymborska and Gerhardt, 2018). D'autres études menées sur de larges vaisseaux axiaux, suggèrent que les cellules endothéliales ajustent leurs formes et réarrangent leurs jonctions pour ouvrir une lumière (processus appelé « cord hollowing ») (Figure 16).

Dans ce second cas, la lumière se forme dans l'espace entre les cellules (Herwig et al., 2011; Lenard et al., 2013; Gebala et al., 2016; Szymborska and Gerhardt, 2018). Dans les deux cas, la différence de pression entre un compartiment avec lumière et sans lumière provoque des déformations locales de la membrane plasmique, qui poussent la lumière soit à l'intérieur d'une seule cellule, soit dans l'espace entre deux cellules adjacentes (Gebala et al., 2016). Beaucoup d'acteurs moléculaires impliqués dans les étapes précoces de l'angiogenèse interviennent dans les mécanismes de formation de la lumière comme les VE-cadhérines, le VEGFA, le VEGFR2 et les intégrines (Logsdon et al., 2014). Dans le processus de « cord hollowing », des glycoprotéines chargées négativement sont exprimées à la membrane apicale des cellules endothéliales et leur confèrent un signal répulsif, ouvrant ainsi la lumière (Potente et al., 2011). Puis, des changements sous-jacents dans la forme des cellules endothéliales, conduites par le VEGF et ROCK, participent à l'agrandissement de cette lumière. La morphogenèse tubulaire requière aussi la Ras-interacting protein 1 (RASIP1), un régulateur de la signalisation GTPase contrôlant le réarrangement du cytosquelette, l'adhésion cellulaire et la polarité des cellules endothéliales (Potente et al., 2011). Il a été décrit que l'inactivation des protéines apicales moesin et podocalyxin conduit à un échec de la formation de la lumière soulignant l'importance de la mise en place de la polarité apico-basale dans ce processus (Strilić et al. 2009). De plus, les jonctions jouent un rôle central dans le renforcement de la polarité car l'inactivation de la VE-cadhérine conduit à une localisation défectueuse de ces marqueurs apicaux (Strilić et al., 2009). D'autre part, l'invalidation de la β -caténine conduit aussi à un défaut de formation de la lumière et de son

maintien (Cattelino *et al.*, 2003). Le réarrangement du cytosquelette joue un rôle dans la formation de la lumière. En effet, il est décrit une accumulation des filaments d'actine aux jonctions cellulaires peu avant la formation de la lumière (Phng *et al.*, 2015). Inhiber l'accumulation de ces fuseaux d'actine aux jonctions induit un défaut de formation de la lumière vasculaire (Szymborska and Gerhardt, 2018). De plus, la signalisation transmise par la MEC peut aussi apporter un signal spatial pour l'organisation de la polarité cellulaire. Par exemple, la perte de l'intégrine $\beta 1$ dans les cellules endothéliales augmente l'expression de protéines présentes aux jonctions cellule-cellule comme la VE-cadhérine et PECAM-1 et perturbe leur polarité, conduisant à la désorganisation des contacts cellule-cellule et inhibant la formation de la lumière (Zvein *et al.*, 2010). Ces résultats suggèrent que les forces établies entre les cellules endothéliales mais aussi entre les cellules endothéliales et la MEC doivent être coordonnées pour former la lumière. Enfin, au cours du développement, la formation des premières lumières vasculaires précède le début de l'activité cardiaque, leur formation est donc indépendante du flux sanguin. *A contrario*, des études plus récentes indiquent que les lumières se propagent des vaisseaux pré-existants aux vaisseaux en formation par des forces hémodynamiques (Gebala *et al.*, 2016). Ces résultats démontrent que dans certains contextes, le flux sanguin est un paramètre supplémentaire régulant la formation de la lumière pendant l'angiogenèse.

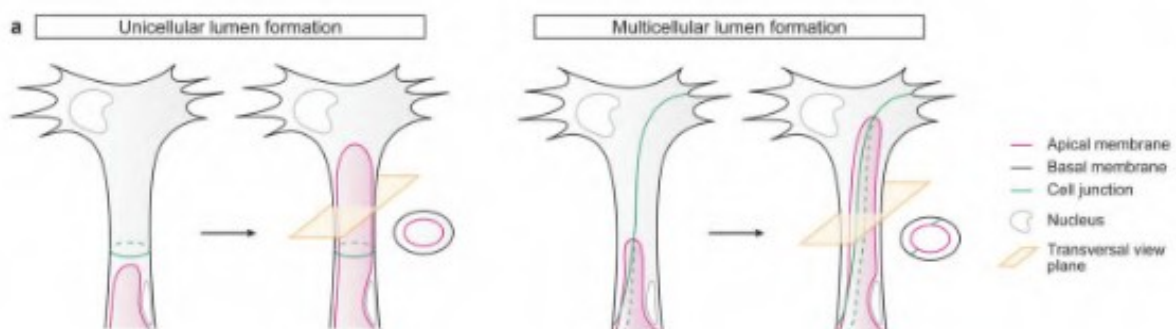


Figure 16 : La formation de la lumière lors de l'angiogenèse par bourgeonnement

La formation de la lumière se fait selon deux processus : unicellulaire aussi appelé « cell hollowing » ou multicellulaire aussi appelé « cord hollowing » (Gebala *et al.*, 2016).

- **Anastomose vasculaire**

L'anastomose, se définissant comme la formation de nouvelles connexions entre deux vaisseaux sanguins, est une étape cruciale de l'angiogenèse par bourgeonnement. Lorsqu'elle implique deux bourgeons endothéliaux et donc deux tip cells, on parle d'anastomose « head- to-head » alors que lorsqu'elle concerne un bourgeon endothélial et un vaisseau sanguin mature, impliquant donc une seule tip cell, elle est appelée anastomose « head-to-side » (*Betz et al., 2016*).

Tout d'abord, l'anastomose implique la formation d'un contact stable entre deux cellules endothéliales. Les tip cells établissent des contacts labiles par l'intermédiaire de leurs filopodes jusqu'à la stabilisation de cette connexion renforcée par le dépôt de protéines des jonctions adhérentes, telles que Cdh5/VE-cadhérine, au site de contact (*Lenard et al., 2013*). Puis, au niveau de ces sites d'adhésion, les cellules déposent une membrane apicale *de novo*, ce qui conduit finalement à la formation de jonctions adhérentes en forme d'anneau avec une membrane apicale. Ce processus se produisant dans les deux cellules anastomosées, une petite poche luminale est alors générée à ce site. Ces sites de contact polarisés se nomment AMIS (apical membrane initiation site) (*Figure 17*). Comme représenté sur le schéma ci- dessous, après ces premières étapes de contact et de polarisation des cellules endothéliales, deux mécanismes cellulaires différents (anastomose de type I et de type II) conduisent à la formation d'un espace luminal interconnecté et à la formation d'un espace multicellulaire perfusé (*Figure 17*) (*Betz et al., 2016*).

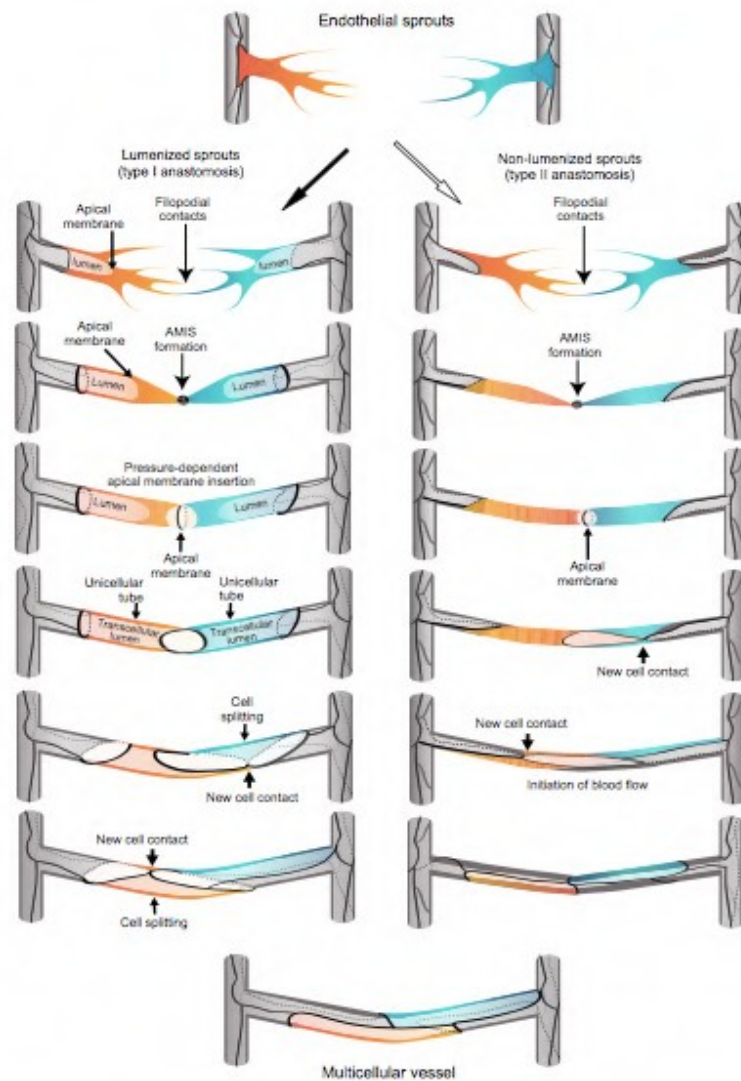


Figure 17 : Morphogénèse lors de l'anastomose

Les différentes étapes de l'anastomose pour des vaisseaux sanguins avec lumière (**gauche**) ou sans lumière (**droite**) (Betz et al., 2016).

L'anastomose de type I, observée dans le cas de bourgeons endothéliaux, se produit en présence de pression sanguine sur la membrane apicale proximale de la tip cell et implique la croissance et l'invagination rapide de cette membrane dans le corps cellulaire (Figure 17). Dans ce cas, la pression artérielle pousse l'espace luminal des tip cells (Lenard et al., 2013; Gebala et al., 2016). Finalement, la lumière en expansion atteint le site nouvellement anastomosé. La fusion des deux membranes apicales génère un tube unicellulaire avec une lumière transcellulaire. La transition ultérieure d'un tube unicellulaire à un tube multicellulaire implique des réarrangements cellulaires et une division des cellules

spécifiques (Betz et al., 2016).

L'anastomose de type II, qui est observée dans le cas d'un bourgeon ne contenant pas de lumière, se produit en l'absence de pression artérielle et s'initie également par contact ou formation d'AMIS et génération d'une poche luminale apicale (Herwig et al., 2011) (Figure 17). Des réarrangements cellulaires similaires à ceux observés dans la deuxième phase de l'anastomose de type I se produisent et conduisent finalement à la formation de nouveaux contacts cellulaires entre les tip cells anastomosées et les stalk cells. L'établissement de nouveaux contacts entre les cellules endothéliales voisines conduit à la fusion des poches luminales isolées en un seul espace luminal, qui peut ensuite être ouvert pour le flux sanguin (Herwig et al., 2011). Ainsi, l'anastomose de type II est caractérisée par la formation d'un tube multicellulaire sans passer par une étape intermédiaire unicellulaire (Figure 17).

Dans différents lits vasculaires, ces deux mécanismes semblent se produire à des fréquences différentes, très probablement en fonction du degré de pression artérielle et de la présence ou de l'absence d'une lumière dans les tip cells participantes (Betz et al., 2016).

- **Stabilisation et maturation**

La formation d'un vaisseau fonctionnel implique différents niveaux de maturation de l'endothélium, de la paroi vasculaire et du réseau (Potente et al., 2011). Au niveau du réseau, la maturation permet le remodelage en un réseau hiérarchiquement ramifié et l'adaptation de ce réseau vasculaire aux besoins des tissus locaux.

Cela implique le recrutement de cellules murales et le dépôt de matrice extracellulaire (Jain, 2005; Potente et al., 2011). Les péricytes établissent un contact direct avec les cellules endothéliales dans les capillaires, artérioles et veinules, tandis que les cellules musculaires lisses vasculaires recouvrent les artères et les veines (Gaengel et al., 2009; Potente et al., 2011). Le rôle des péricytes dans la fonction des capillaires et l'angiogenèse comprend la régulation de la prolifération et de la migration des cellules endothéliales, ainsi que dans le dépôt de la membrane basale vasculaire (Potente, Gerhardt, Carmeliet, 2011).

Bien que la présence des péricytes soit essentielle pour la stabilisation des capillaires, la dissociation de ceux-ci est également indispensable pour permettre la naissance de nouveaux bourgeons (Logsdon et al., 2014). Le recrutement des péricytes est

contrôlé par le récepteur- β du PDGF (PDGFR- β) (*Gerhardt and Betsholtz, 2003; Gaengel et al., 2009; Potente et al., 2011*). Lors du recrutement péricytaire, le PDGF-BB est exprimé par les cellules endothéliales et tout particulièrement par les tip cells. Le PDGFR β est exprimé par les cellules murales. Le PDGF-BB se lie préférentiellement aux HSPG, établissant ainsi un gradient dans la MEC qui permet le recrutement des péricytes (*Armulik et al., 2011*). Benjamin et coll. ont démontré que l'injection de PDGF-BB ectopique dans la rétine de souris interfère avec la protéine endogène, causant ainsi le détachement des péricytes des vaisseaux nouvellement formés. De manière intéressante, en résulte une régression vasculaire excessive et un remodelage anormal soulignant l'importance de l'association péricyte-endothélium dans la stabilisation des vaisseaux néo-formés (*Benjamin et al., 1998*). Quelques années plus tard, il fut décrit que l'inactivation du gène *Pdgfb* ou *Pdgfrb* chez la souris induit un déficit en péricytes, un dysfonctionnement vasculaire, la formation de micro-anévrismes et des saignements (*Gaengel et al., 2009; Potente et al., 2011*).

De plus, des travaux de la littérature ont révélé que des souris HSPG-déficientes ou présentant une mutation sur le motif de liaison HSPG en C-terminal du PDGF-b, possèdent une réduction de la couverture péricytaire (*Abramsson et al., 2002; Kurup et al., 2006*). De plus, la corrélation avec la rétention *in vitro* du PDGF-BB par les HSPG révèle l'importance de la rétention du PDGF-BB à la surface des cellules endothéliales dans le recrutement des péricytes. Cette signalisation entre les péricytes et les cellules endothéliales induit l'activation de protéines en aval du PDGFR β notamment MAPK, Rac et NF- κ B, stimulant ainsi la migration, la survie, la prolifération et la différenciation des péricytes (*Evrova and Buschmann, 2017*). Une expression adéquate, la liaison à la MEC et la présentation spatiale de PDGF-BB au PDGFR- β sont donc indispensables à la maturation vasculaire.

b. Remodelage de la matrice extracellulaire lors de l'angiogenèse

- Dégradation de la matrice extracellulaire

Lors de l'angiogenèse, l'initiation du bourgeonnement nécessite la dégradation locale de la MEC (*Heissig et al., 2003; Page-McCaw et al., 2007*). Ceci est assuré par l'action conjointe de la famille des MMP et de leurs inhibiteurs, les TIMP. La dégradation de la MEC permet de : - dissocier les barrières physiques afin de permettre la migration cellulaire; - jouer un rôle dans le relargage de facteurs de croissance séquestrés dans la MEC; - activer certaines enzymes par clivage protéolytique (*van Hinsbergh and Koolwijk, 2008*). Il existe 23

membres de MMP connus chez l'homme rassemblés au sein de la famille des endopeptidases à zinc. On distingue les MMP sécrétées et les MMP transmembranaires (MT-MMP, membrane-type matrix metalloproteinase). Les MMP sont composées de trois domaines : un domaine pro-peptide, un domaine catalytique et un domaine hemopexine like-C-terminal permettant la reconnaissance du substrat. Il est décrit que les cellules endothéliales expriment les MMP-2, -9, -19 ainsi que la MT1-MMP. Des études *in vitro* révèlent par l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques ou biologiques de MMP que la dégradation de la MEC induit la migration cellulaire et l'angiogenèse (Davis and Saunders, 2006; Trappmann et al., 2017). Comme précédemment décrit, les MMP participent au relargage de facteurs de croissance. En effet, comme mentionné dans les paragraphes précédents, les facteurs de croissances tels que le VEGF, le PDGF-BB et le FGF-2 interagissent avec les protéines matricielles via les HSPG. Ces facteurs peuvent être libérés par clivage des HSPG, effectué par les MMP. La biodisponibilité du VEGF165 (Houck et al., 1992) et son effet pro-angiogénique sont régulés ainsi dans des modèles *in vivo* (Hashimoto et al., 2002; Lee et al., 2005; Ebrahim et al., 2010).

- Synthèse d'une membrane basale vasculaire

La membrane basale vasculaire constitue une fine structure séparant les cellules endothéliales et les péricytes de la MEC interstitielle. Elle permet de soutenir l'intégrité vasculaire, constitue un réservoir de facteurs de croissance et assure le premier support mécanique du capillaire. La composition de la MEC comprend du collagène IV, des laminines, du perlécan, du nidogène et de la fibronectine (Marchand et al., 2019) (Figure 18). L'assemblage de ces protéines selon un ordre bien défini dans le temps et l'espace abouti donc à la formation d'une superstructure polarisée (Figure 18). En effet, la membrane basale est constituée de deux réseaux de collagène IV et de laminine connectés par une glycoprotéine nidogène/entactin et par des HSPG tels que le perlécan et l'agrine. Les intégrines constituent l'intermédiaire entre le réseau de laminine et les cellules endothéliales. Tous les composants de la membrane basale sont essentiels au maintien de sa structure finale c'est pourquoi son assemblage est un processus finement régulé.

Le collagène IV, possédant la propriété de s'auto-assembler en super-structure constitue le composant majoritaire de la membrane basale. Dans la littérature, il est décrit

six chaînes α distinctes ($\alpha 1$ à $\alpha 6$) s'organisant en 3 hétérotrimères différents : $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$, $\alpha 1\alpha 1\alpha 2$ et $\alpha 5\alpha 5\alpha 6$ (Khoshnoodi et al., 2008). L'hétérotrimère $\alpha 1\alpha 1\alpha 2$ est la forme prédominante dans la membrane basale des vaisseaux sanguins. Sans détailler ce mécanisme, l'association de ces hétérotrimères aboutit à la formation d'un échafaudage supramoléculaire et d'un maillage de collagène IV (Timpl et al., 1981; Khoshnoodi et al., 2008) (Figure 18). Le dépôt de collagène IV joue un rôle fonctionnel déterminant au cours du processus d'angiogenèse. En effet, la double délétion des chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ chez la souris conduit à une mortalité embryonnaire causée par des anomalies vasculaires ainsi que de nombreuses hémorragies (Pöschl et al., 2004).

La membrane basale est également constituée de laminine. Les laminines sont composées de chaînes α , β et γ s'assemblant en hétérotrimères et forment ainsi leur propre famille de glycoprotéines. Les chaînes β et γ permettent l'adhésion du nidogène alors que la chaîne α portent des sites d'adhésion cellulaire permettant l'interaction avec les intégrines (Hohenester and Yurchenco, 2013). Les laminines 511 et 411 constituent les isoformes majoritaires retrouvées dans la membrane basale vasculaire. L'invalidation de la chaîne $\alpha 4$ de la laminine conduit à des anomalies vasculaires et des hémorragies survenant lors du développement embryonnaire chez la souris. De plus, les dépôts de collagène IV et de nidogène sont diminués et retardés (Thyboll et al., 2002).

Comme précédemment évoqué, lors de l'assemblage de la membrane basale, les deux principaux réseaux de laminine et de collagène IV sont liés entre eux par d'autres protéines : les nidogènes, le perlecan et l'agrine dont je ne détaillerai pas les caractéristiques. Le perlecan et les nidogènes consolident la membrane basale participant ainsi au maintien de l'intégrité vasculaire.

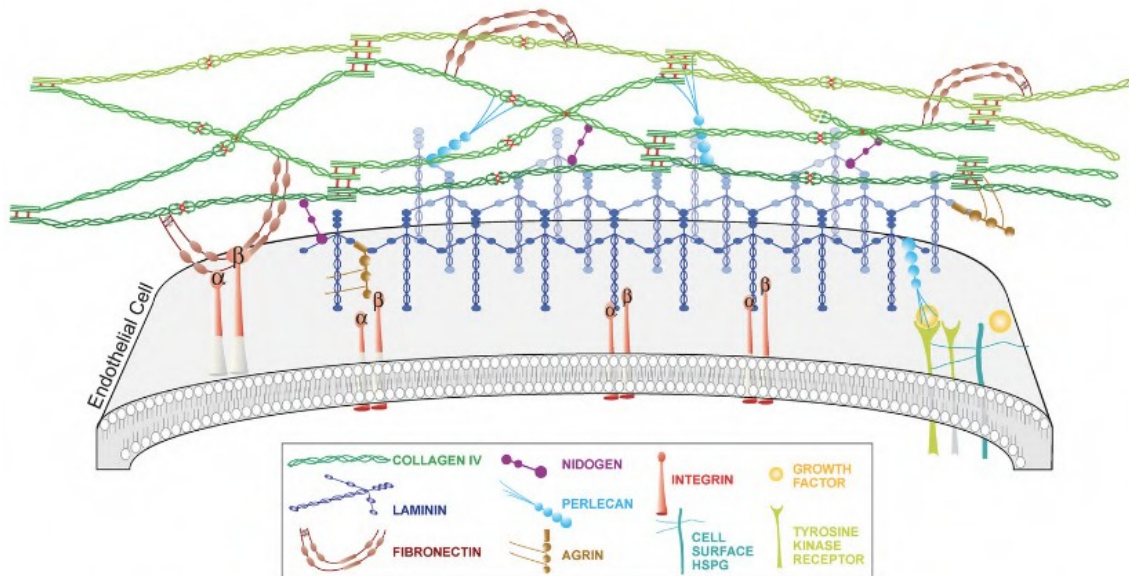


Figure 18 : Organisation structurale de la membrane basale vasculaire

L'assemblage de la membrane basale est polarisé : le réseau de laminine est connecté à l'endothélium directement et par des ponts agrine et perlécan, le réseau de collagène IV est connecté à celui de laminine via le perlécan, le nidogène et l'agrine. La fibronectine se lie au réseau de collagène IV et est associée à l'endothélium via les intégrines. Le réservoir de facteurs de croissance est régulé par les HSPG (Marchand *et al.*, 2019).

B. Angiogenèse tumorale

a. Les caractéristiques

Le développement de la masse tumorale nécessite un apport accru en oxygène et nutriments (Cantelmo *et al.*, 2017; Eelen *et al.*, 2020). Pour répondre à ces besoins, les tumeurs sont vascularisées soit par co-option du système vasculaire préexistant, soit en induisant la formation de nouveaux vaisseaux sanguins par une variété de mécanismes moléculaires et cellulaires brièvement décrits plus bas. L'hypoxie et l'acidose au sein du microenvironnement tumoral sont responsables d'une stimulation de la voie de signalisation du facteur de transcription HIF, mentionné dans divers paragraphes antérieurs. HIF augmente la transcription de gènes pro-angiogéniques codant notamment pour le VEGF, le PDGF-BB, la NO synthase (NOS), les angiopoïétines (Lugano *et al.*, 2020) conduisant à un fort déséquilibre de la balance entre facteurs pro- et anti-angiogéniques en faveur d'une accumulation massive de molécules induisant la formation de néo vaisseaux (Carmeliet and Jain, 2000). Largement décrit dans le cancer, ce processus est appelé le commutateur angiogénique (angiogenic switch) (Hanahan and Folkman, 1996; Lugano *et al.*, 2020)

(Figure 19).

Bien que l'angiogenèse soutienne cette croissance tumorale importante, l'augmentation du flux sanguin est généralement moindre que l'accroissement du réseau vasculaire (Baluk et al., 2005). Ce phénomène s'explique par les multiples anomalies structurales portées par les vaisseaux tumoraux (Carmeliet and Jain, 2000; Baluk et al., 2005; Cantelmo et al., 2017; Eelen et al., 2020). Depuis le début des années 2000, les avancées majeures réalisées dans le domaine de l'imagerie de pointe ont transformé notre compréhension des anomalies cellulaires et moléculaires de la vascularisation tumorale (McDonald and Choyke, 2003). Ces défauts interviennent à plusieurs niveaux : le réseau vasculaire et l'endothélium, la membrane basale et la couverture péricytaire.

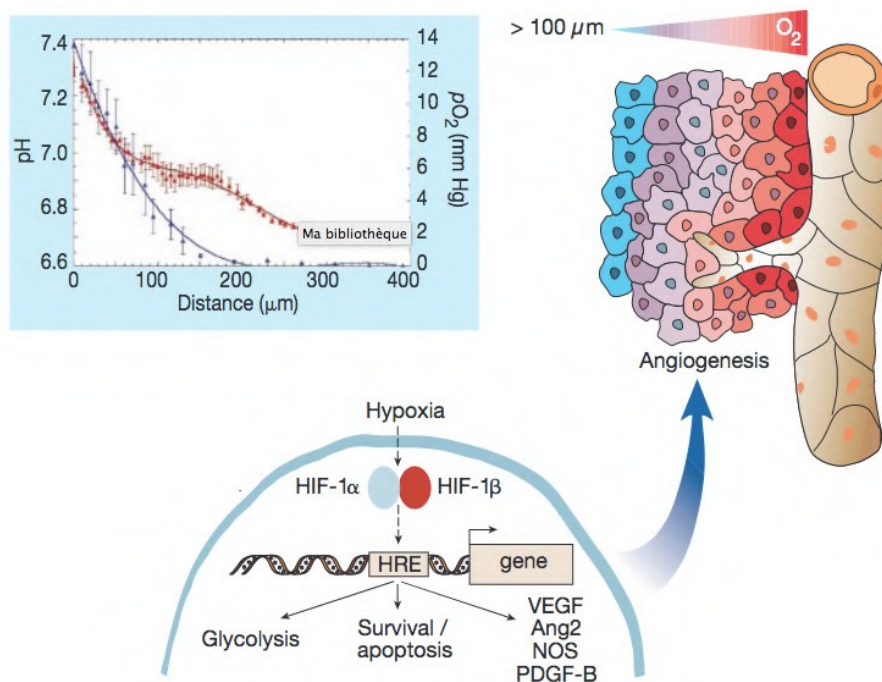


Figure 19 : Rôle de l'hypoxie dans l'angiogenèse tumorale

Les cellules tumorales localisées à plus de 100 µm (la limite de diffusion de l'oxygène) des vaisseaux sanguins et deviennent hypoxiques (le gradient rouge et bleu indique la progression de l'hypoxie). Les cellules tumorales survivent aux fluctuations de l'oxygène, notamment parce que les clones sélectionnés dans les régions hypoxiques ont un phénotype pro-angiogénique. HIF augmente la transcription de gènes codant pour des facteurs pro-angiogéniques (comme le VEGF, le PDGF-BB et NOS). HIF affecte aussi les voies de survie et d'apoptose cellulaire. Relation entre la distance des cellules tumorales des vaisseaux et leur degré d'hypoxie (symbole bleu) et d'acidose (symbole rouge) (Carmeliet and Jain, 2000).

- Le réseau vasculaire et l'endothélium

Le réseau de vaisseaux tumoraux, composé de ramifications excessives et nombreux shunts ne présente pas une hiérarchie vasculaire dite « normale » (Figure 19) : les caractéristiques largement décrites des artérioles, capillaires ou veinules ne sont pas retrouvées. En effet, ces vaisseaux sont tortueux, dilatés, en impasse et perméables (Carmeliet and Jain, 2000; Baluk et al., 2005; Eelen et al., 2020). L'endothélium vasculaire présente des jonctions cellule-cellule plus lâches et de nombreuses fenestrations (Carmeliet and Jain, 2000; Hashizume et al., 2000). De plus, les cellules endothéliales ont une forme anormale et se multiplient de façon excessive, en s'accumulant puis en se superposant (Hashizume et al., 2000 ; Carmeliet and Jain, 2000), pouvant ainsi obstruer le flux sanguin (Cantelmo et al., 2017). Comme mentionné dans la partie I, les cellules endothéliales tumorales présentent un profil transcriptomique particulier. Notamment, elles surexpriment l'intégrine $\alpha_5\beta_1$, récepteur de la fibronectine (Magnussen et al., 2005; Parsons-Wingarter et al., 2005).

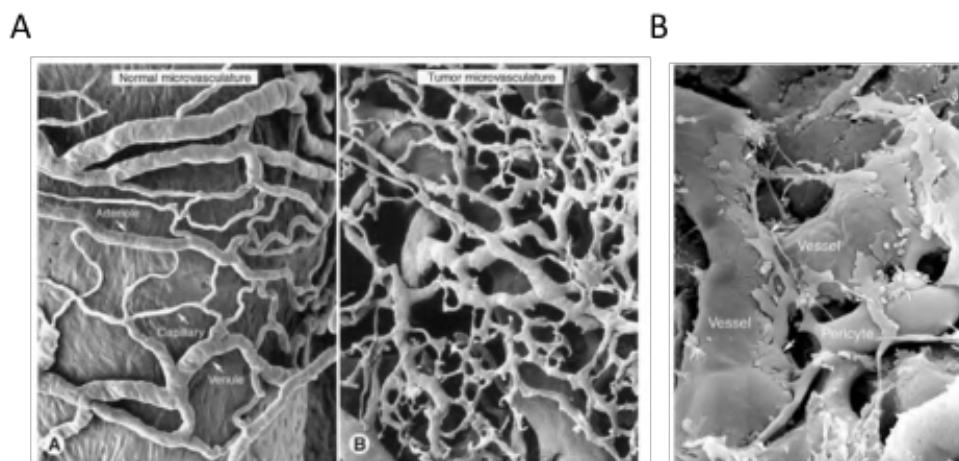


Figure 20 : Anomalies structurales des vaisseaux tumoraux

(A) Imagerie au microscope électronique à balayage d'un moulage en polymère d'une microvascularisation normale, montrant une disposition simple et organisée des artérioles, des capillaires et des veinules. Vasa vasorum du sinus carotidien du rat (**gauche**). Image au microscope électronique à balayage du moulage de la microvascularisation tumorale, montrant la désorganisation et l'absence de hiérarchie conventionnelle des vaisseaux sanguins. Les artérioles, les capillaires et les veinules ne sont pas identifiables en tant que tels. Image d'une xénogreffe de tumeur humaine chez la souris (**droite**).

(B) Microscopie électronique montrant des péricytes à la surface d'un capillaire tumoral dans un modèle de souris RIP-Tag2. Comme le reflet de leur faible association avec les vaisseaux tumoraux, le corps cellulaire du péricytes n'est pas localisé sur la paroi vasculaire (Baluk, Hashizume et McDonald, 2005).

- Les péricytes

Les vaisseaux tumoraux présentent des défauts de couverture péricytaire. En effet, ceux-ci sont faiblement associés à l'endothélium vasculaire et dans certains cas sont absents (*Cantelmo et al., 2017*). Morikawa et coll. décrivent dans 3 modèles tumoraux murins, que 73 à 92 % des vaisseaux sanguins présentent une couverture péricytaire. Cependant, ces péricytes sont faiblement associés aux cellules endothéliales et présentent des extensions cytoplasmiques dans le stroma, ne couvrant pas l'endothélium (*Morikawa et al., 2002*) (*Figure 20*). Les anomalies de la couverture péricytaire dans les tumeurs semblent dues à des sources endothéliales et non-endothéliales de PDGF-B, qui influence le recrutement péricytaire et la morphologie des vaisseaux (*Abramsson et al., 2002*).

- La membrane basale

Les travaux princeps de Baluk et coll. ont apporté une caractérisation fine de la composition, de l'étendue et de l'intégrité structurale de la membrane basale dans le cancer (*Baluk et al., 2003*). En s'appuyant sur l'étude de 3 modèles murins spontanés ou induits de cancers du pancréas, sein ou poumon (spontaneous RIP-Tag2 pancreatic islet tumors, MCA-IV mammary carcinomas, and Lewis lung carcinomas), ils ont démontré que 99,9 % des vaisseaux tumoraux sont couverts d'une membrane basale. Cependant, cette membrane basale présente de nombreuses anomalies structurales (*Figure 21*), présentant une association lâche avec l'endothélium vasculaire et de larges extensions dans le stroma tumoral. Elle peut être composée de plusieurs couches, d'épaisseur irrégulière, parfois excessivement épaisse ou au contraire très fine. Dans la plupart des cas, celle-ci est discontinue voire absente (*Baluk et al., 2003; Cantelmo et al., 2017*). Dans le microenvironnement tumoral, la membrane basale est loin d'être inerte puisque, liant des facteurs de croissance, elle est une source majeure de présentation de molécules pro et anti-angiogéniques.

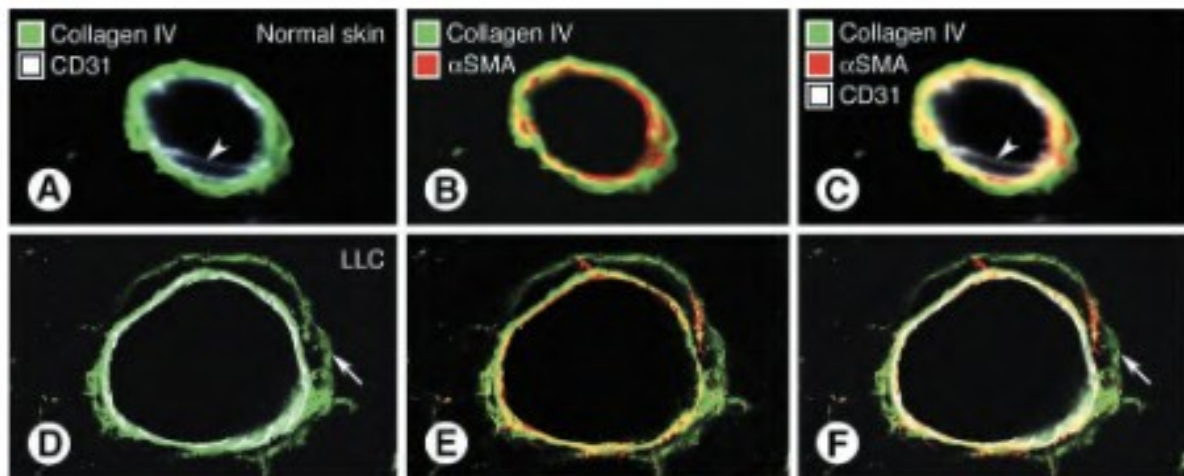


Figure 21 : La membrane basale des vaisseaux tumoraux présente des anomalies structurales

Sections optiques réalisées au microscope confocal montrant les parois de vaisseaux murins normaux (A-C) ou tumoraux (dans un modèle murin du carcinome pulmonaire Lewis) (D-F). Un triple marquage pour le CD31 (blanc), l'alpha-SMA (rouge) et le collagène IV (vert) a été réalisé (Baluk et al., 2003).

L'ensemble des anomalies structurales décrites ci-dessous fragilise les vaisseaux tumoraux et entraîne des défauts fonctionnels (Figure 22). Les vaisseaux tumoraux présentent une forte perméabilité vasculaire responsable de nombreuses fuites et hémorragies (Carmeliet and Jain, 2000; Baluk et al., 2005; Cantelmo et al., 2017). Cette perméabilité vasculaire accrue favorise l'extravasation des protéines du plasma (Baluk et al., 2005) participant ainsi à l'augmentation de la pression interstitielle et perturbant le flux sanguin. Celui-ci est chaotique et fluctuant : il peut être très rapide dans certains vaisseaux et stagner dans d'autres (Carmeliet and Jain, 2000; Cantelmo et al., 2017). De plus, la perméabilité vasculaire accrue est responsable d'une forte extravasation de cellules immunitaires comme les leucocytes et les monocytes pouvant contribuer à la progression tumorale par la production de cytokines proinflammatoires, de facteurs de croissance et d'enzymes (Baluk et al., 2005). En parallèle, cette perméabilité importante favorise l'intravasation des cellules tumorales et donc la dissémination métastatique (Baluk et al., 2005). La combinaison d'une faible perfusion et l'augmentation de la pression du fluide interstitiel entretient la présence de régions hypoxiques et acides dans les tumeurs créant des environnements qualifiés « d'hostiles » favorisant la sélection de cellules tumorales invasives (Carmeliet and Jain, 2000; Cantelmo et al., 2017). Enfin, l'altération du flux sanguin

et de la perméabilité altèrent la délivrance optimale des traitements (*Baluk et al., 2005*). La combinaison de ces caractéristiques participe largement à la malignité globale des tumeurs.

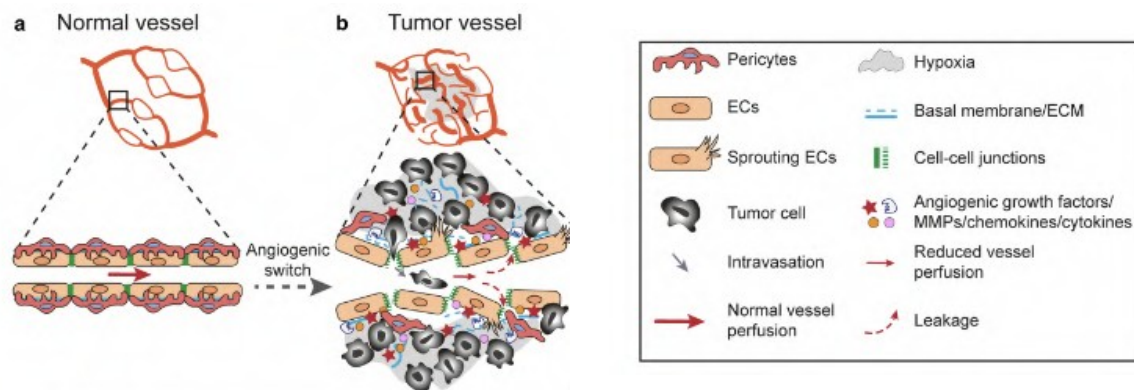


Figure 22 : Les caractéristiques morphologiques et fonctionnelles des vaisseaux tumoraux par rapport aux vaisseaux "normaux"

(a) La vascularisation normale présente un schéma de ramifications organisées et hiérarchisées composé d'artères, de veines et de capillaires. Dans les vaisseaux sains, les cellules endothéliales, étroitement liées entre-elles par des jonctions cellule-cellule, sont soutenues par une couverture péricytaire et une membrane basale continue.

(b) Les vaisseaux tumoraux sont morphologiquement et fonctionnellement différents des vaisseaux normaux. Ils présentent une organisation anarchique, une perturbation des jonctions endothéliales, une couverture péricytaire et une membrane basale anormales. Ces anomalies s'accompagnent d'une diminution du flux sanguin et d'une fuite accrue entraînant notamment une intravasation des cellules tumorales (*Lugano et al., 2020*).

b. Les mécanismes cellulaires

Les mécanismes cellulaires et moléculaires aboutissant à la formation d'un réseau vasculaire chaotique sont multiples et dépendent fortement du type de tumeur. Il est décrit que l'angiogenèse par bourgeonnement ou par intussusception, la co-option, le mimétisme vasculaire et enfin l'activation de progéniteurs endothéliaux sont des processus participant à la formation d'un réseau vasculaire tumoral, de manière concomitante ou séquentielle. Dans la littérature, l'étude de la plupart de ces processus a été négligée, au profit des connaissances de l'angiogenèse par bourgeonnement, qui est le mécanisme majoritaire (*Kuczynski et al., 2019; Lugano et al., 2020*). Cependant, la pluralité de ces mécanismes peut être une première explication à la grande diversité des vascularisations tumorales observée dans les microenvironnements tumoraux.

- **Angiogenèse par intussusception**

L'angiogenèse par intussusception implique le développement de piliers tissulaires transluminaux au sein de vaisseaux matures et leur fusion aboutit au remodelage du plexus vasculaire et à la naissance de néo-vaisseaux (*Lugano et al., 2020*) (*Figure 23*). En 1996, l'angiogenèse par intussusception est identifiée pour la première fois dans le cancer par l'observation de la croissance *in vivo* d'un adénocarcinome colique humain (*Patan et al., 1996*). Aujourd'hui, les mécanismes moléculaires impliqués demeurent méconnus, mais le processus peut être induit par des facteurs de croissance tels que le VEGF, le PDGF et l'érythropoïétine (*Crivellato et al., 2004; Lugano et al., 2020*). La méconnaissance des mécanismes sous-jacents s'explique par le manque de modèles pertinents pour étudier l'intussusception (*Vimalraj et al., 2019*). Ce phénomène n'a jamais été reporté dans le ccRCC.

- **La co-option vasculaire**

La co-option vasculaire se définit comme un processus non-angiogénique par lequel les cellules tumorales utilisent directement le système vasculaire pré-existant, qu'elles colonisent (*Kuczynski et al., 2019; Kuczynski and Reynolds, 2020; Latacz et al., 2020*) (*Figure 23*). Les cellules cancéreuses migrent le long de la surface abluminale des vaisseaux préexistants, et/ou infiltrent l'espace tissulaire entre les vaisseaux préexistants, conduisant finalement à l'incorporation de ces vaisseaux dans la tumeur (*Kuczynski et al., 2019*). Bien que la distinction entre angiogenèse et co-option vasculaire soit établie uniquement sur des caractéristiques morphologiques, des propriétés spécifiques des cellules tumorales ont été proposées dans le contexte de la co-option : 1 - Elles remplacent les cellules épithéliales normales; 2 - Elles envahissent le stroma qui entoure les vaisseaux sanguins (*Latacz et al., 2020*). Les cellules endothéliales dans les vaisseaux co-optés présentent une prolifération limitée par rapport aux cellules endothéliales des tumeurs angiogéniques et les vaisseaux co-optés expriment faiblement les marqueurs angiogéniques tels que l'intégrine $\alpha\beta3$, pour les vaisseaux co-optés du poumon ou CD34 pour les vaisseaux co-optés du foie. La co-option vasculaire se produit dans un large éventail de tumeurs humaines à divers sites anatomiques et détermine l'évolution du cancer. Notamment, des études histologiques décrivent l'incorporation de structures vasculaires pré-existantes, incluant des vaisseaux recouverts de péricytes dans des tumeurs primaires de ccRCC suggérant un processus de co-option vasculaire (*Kuczynski and Reynolds, 2020*). De plus, la co-option vasculaire a été plus

largement décrite dans les métastases pulmonaires de ccRCC; en effet, 62 % des métastases pulmonaires de ccRCC conservent l'architecture vasculaire des alvéoles (*Bridgeman et al., 2017*). La co-option reste aujourd'hui un phénomène peu connu et controversé dans la littérature.

- **Le mimétisme vasculaire**

Le mimétisme vasculaire implique 3 caractéristiques : 1 - L'augmentation de la plasticité des cellules tumorales caractérisée par la TEM et l'acquisition d'un comportement similaire aux cellules souches, permettant ainsi aux cellules tumorales d'adopter le phénotype de cellules endothéliales; 2 - La formation par les cellules tumorales similaires aux cellules endothéliales de réseaux tubulaires riches en protéines matricielles; 3 - La connexion du réseau tumoral local à la microcirculation alentour résultant en une vascularisation mosaïque constituée de cellules endothéliales et non endothéliales (*Eelen et al., 2020*) (*Figure 23*). *Silvestri et coll.* ont récemment développé un modèle *in vitro* 3D avec flux permettant d'étudier la formation de vaisseaux mosaïques, c'est-à-dire composés à la fois de cellules tumorales et endothéliales. Ils ont démontré que les cellules tumorales mammaires peuvent rapidement remodeler et s'intégrer au sein de l'endothélium vasculaire (*Silvestri et al., 2020*). Enfin, en plus de l'ensemble de ces phénomènes, il a été reporté que les cellules souches tumorales peuvent se différencier en cellules endothéliales (*Eelen et al., 2020*).

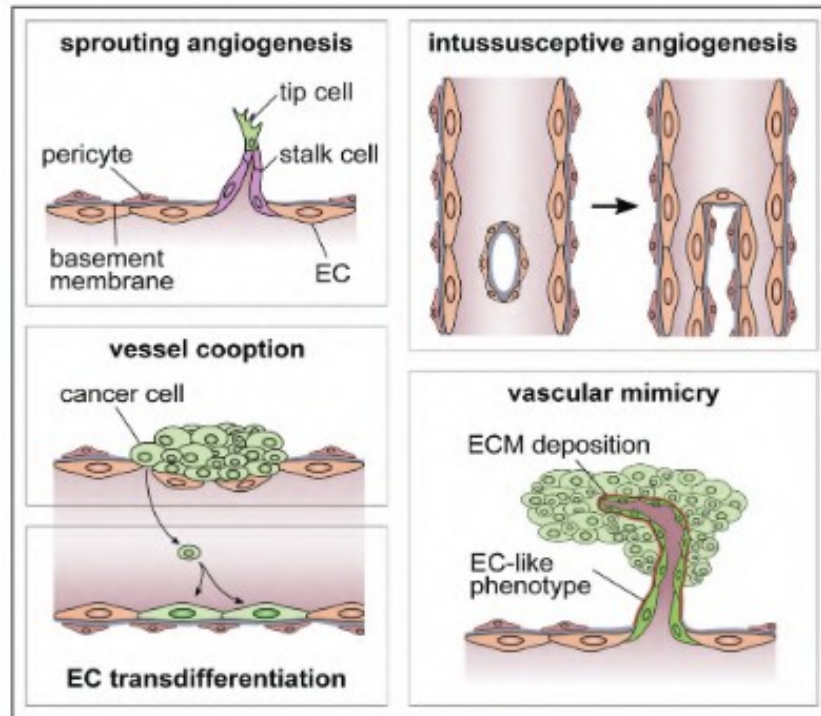


Figure 23 : La vascularisation tumorale implique différents processus cellulaires

Schématisation de l'angiogenèse par bourgeonnement et par intussusception, de la co-option vasculaire, de la transdifférentiation des cellules endothéliales et du mimétisme vasculaire (Eelen et al., 2020)

IV. Le carcinome du rein à cellules claires

Les carcinomes rénaux (RCC), comptant parmi les 10 cancers les plus fréquents dans le monde, regroupent un ensemble de sous-types dérivés des cellules tubulaires rénales. Ces deux dernières décennies, des avancées majeures dans la caractérisation histopathologique et moléculaire de ce cancer ont permis de proposer de nouvelles classifications et de nouvelles stratégies thérapeutiques que nous aborderons au sein de cette partie.

A. Epidémiologie

a. Incidence et mortalité

Le carcinome du rein touche environ 400 000 personnes par an dans le monde (*Sung et al., 2021*). L'âge du diagnostic est approximativement de 60 ans et les hommes sont deux fois plus touchés que les femmes (*Sung et al., 2021*). Parmi les personnes touchées, environ 70 % d'entre elles sont diagnostiquées pour un carcinome du rein à cellules claires (ccRCC). Bien que le ccRCC soit une maladie détectée tôt et traitée avec succès par des stratégies chirurgicales ou ablatives, un tiers des cas diagnostiqués présenteront des métastases.

b. Facteurs de risque

Le risque de contracter le RCC comporte une dimension multifactorielle, avec des causes génétiques et environnementales. Les personnes ayant des antécédents familiaux de cancer du rein ont un risque deux fois plus élevé de développer un RCC. Des études menées sur ces RCC familiaux ont permis d'identifier des mutations sur 11 gènes appelés *VHL*, *BAP1*, *FLCN*, *FH*, *ME*, *PTEN*, *SDHB*, *SDHC*, *SDHD*, *TSC1* et *TSC2* et certains d'entre eux sont impliqués dans le développement sporadique du ccRCC. Je reviendrai plus en détail sur ces événements mutationnels dans la sous-partie « Gènes et voies de signalisation ». L'âge et le sexe sont aussi des facteurs de risque puisque l'incidence du RCC augmente avec l'âge et celle-ci est plus élevée pour les hommes que pour les femmes. Le surpoids, l'hypertension ainsi que les comportements tels que la consommation excessive de tabac et d'alcool constituent des facteurs de risque du ccRCC. En effet, 50 % des patients diagnostiqués dans une étude américaine présentaient l'un de ces facteurs. De plus, une autre étude américaine conclut que 9 % des cas de RCC pourraient être évités par une augmentation de l'activité

physique. Enfin, les kystiques rénales acquises, les maladies rénales chroniques, le diabète, l'hémodialyse, et les transplantations rénales sont également des facteurs de risque du ccRCC.

B. Les différents carcinomes rénaux et leurs caractéristiques histologiques

Les carcinomes rénaux majoritaires, avec une incidence supérieure à 5 % sont les carcinomes du rein à cellules claires (ccRCC), papillaires (pRCC) et chromophobes (chRCC) (*Hsieh et al., 2017*). La communauté scientifique dans ce domaine évite délibérément le terme

« sous-type », qui fait référence à un groupement subordonné au sein d'une classification générale. Il désigne plutôt ces cancers comme des entités indépendantes (*Jonasch et al., 2014*). Leur classification repose sur des critères histologiques. Le RCC papillaire est caractérisé par des cellules tumorales au cytoplasme basophile et la présence d'histiocytes mousseux. Le RCC chromophile possède des cellules tumorales au cytoplasme largement vide, présentant généralement une clairance périnucléaire et un faible taux de mitose. Le RCC à cellules claires est défini par des cellules tumorales au cytoplasme claire causée par la forte accumulation de glycogène (*Jonasch et al., 2014*). Ces cellules tumorales sont organisées en amas imbriqués entourés d'un réseau dense de vaisseaux sanguins (*Hsieh et al., 2017*).

Mes travaux de thèse portent exclusivement sur le ccRCC, le sous-type le plus mortel et le plus représenté du cancer du rein. Des études génomiques ont révélé une hétérogénéité intra- et inter-tumorale dans le ccRCC, qui contribueraient à des différences entre les patients dans l'évolution de la maladie et la réponse aux traitements (*Hsieh et al., 2017*).

C. Gènes et voies de signalisation

a. Mutation du gène suppresseur de tumeur VHL

Dans le ccRCC, l'inactivation du gène suppresseur de tumeur Von Hippel-Lindau (VHL) constitue un événement initiateur fondamental dans le développement de la maladie. Pour les cas familiaux de la maladie de Von Hippel-Lindau, l'altération du gène *VHL* se transmet de manière autosomale dominante et les individus touchés développent, le plus souvent, des ccRCC bilatéraux et multifocaux (*Jonasch et al., 2021*). Pour les cas de ccRCC

sporadiques, l'altération du gène VHL est observée chez 80 % des patients et survient le plus souvent dans l'adolescence (*Jonasch et al., 2021*). Pour le ccRCC sporadique, l'altération du gène est causée dans 91 % des cas par des mutations intragéniques, la perte complète du fragment chromosomique 3p et/ou des événements épigénétiques comme la méthylation du promoteur (*Elias et al., 2020; Jonasch et al., 2021*).

La perte du fragment chromosomique 3p, identifiée en 1987, a longtemps été considérée comme l'événement initiateur du ccRCC. Cependant, il a récemment été reporté, pour un sous-ensemble de cas, que le remaniement massif du fragment chromosomique 3p par chromothrypsis est l'événement initiateur du ccRCC, suivi par des mutations et/ou des modifications épigénétiques sur le second allèle de *VHL* (*Elias et al., 2020*). La chromothrypsis ne se caractérise pas par une perte du chromosome mais par de multiples réarrangements aboutissant à la formation d'un chromosome fortement remanié. Le gène *VHL* code pour une petite protéine de 213 acides aminés, pVHL, qui est un régulateur clef de la réponse cellulaire à l'hypoxie. En effet, pVHL est le principal régulateur de la dégradation d'HIF- α en normoxie. pVHL appartient au complexe E3 de type ubiquitine-ligase responsable de l'ubiquitination d'HIF-1 α et HIF-2 α et, par conséquent, de leur dégradation par le protéasome, selon un mécanisme décrit dans la partie III. En l'absence de pVHL, HIF-1 α et HIF-2 α s'accumulent en normoxie induisant ainsi l'expression constitutive des gènes cibles d'HIF régulant l'angiogenèse, la glycolyse et le remodelage de la MEC. Il en résulte la formation de tumeurs riches en glycogènes et très vascularisées. Il a été décrit que la réintroduction de l'expression de VHL sauvage dans la lignée du ccRCC, 786-O invalidée pour VHL diminue la formation de tumeurs chez la souris (*Elias et al., 2020*). Cependant, la perte de VHL seule est insuffisante pour induire le ccRCC. En effet, chez certains patients, le ccRCC se développe uniquement une trentaine d'année après l'altération des deux allèles du gène *Vhl* et la perte de cette protéine a été observée dans des kystes préneoplasiques, constituant des lésions bénignes (*Elias et al., 2020; Jonasch et al., 2021*). De plus, l'inactivation de *Vhl* chez la souris n'est pas suffisante pour induire le ccRCC, même lorsque les deux allèles de *Vhl* sont inactivés spécifiquement dans les cellules rénales (*Elias et al., 2020*). Ces résultats démontrent donc sans équivoque que d'autres événements génétiques et épigénétiques sont nécessaires au développement du ccRCC.

b. Evènements additionnels génétiques ou épigénétiques

Ces dernières années, de nombreuses études transcriptomiques ont permis de révéler 3 autres gènes nommés *PBRM1*, *SETD2* et *BAP1* comme étant délétés à une forte fréquence dans le ccRCC (*Jonasch et al., 2021*). Ces 3 gènes présentent une forte promiscuité puisqu'ils sont tous localisés sur le fragment chromosomique 3p et ils jouent un rôle dans la régulation épigénétique de l'expression des gènes (*Elias et al., 2020*) (*Figure 24*).

PBRM1 est le gène le plus fréquemment muté dans le ccRCC après VHL, avec une incidence de 30 à 40 % (*Jonasch et al., 2021*). Ce gène code pour la protéine PBRM1 (Polybromo 1), composante du complexe de remodelage de la chromatine nommé PBAF (polybromo- associated BRG1-associated factor). PBAF régule la structure et le positionnement des nucléosomes ainsi que la transcription des gènes. La perte de PBRM1 et de l'activité de PBAF altèrent significativement la structure de la chromatine et perturbe la transcription des gènes. Le plus souvent, la mutation de *PBRM1* précède la mutation de *SETD2* (SET domain containing 1A/B), impliqué dans la modification des histones, suggérant que ces mutations séquentielles participent à l'évolution tumorale sous-clonale. Plusieurs études révèlent les conséquences de la perte de *PBRM1/ PBAF* dans le ccRCC. En effet, Gao et coll. démontrent que le déficit en PBRM1 est associé à l'augmentation de la croissance cellulaire et à la signature transcriptionnelle d'HIF (*Jonasch et al., 2021*). Une étude menée par Nargund et coll. révèle que le déficit en PBRM1 induit l'accumulation d'HIF1alpha et de STAT3, de façon dépendante de VHL, et augmente la signalisation mTOR induisant le développement de lésions rénales dans un modèle transgénique murin (*Jonasch et al., 2021*). La double invalidation de *Pbrm1* et *Vhl* spécifiquement dans les cellules du tubule rénal d'un modèle murin abouti au développement d'un ccRCC possédant des caractéristiques de bas grade, y compris une taille modérée du cytoplasme, une faible accumulation de lipides et de glycogènes et l'absence d'atypie nucléaire. La perte de *Pbrm1* induit donc l'augmentation de la signalisation de l'hypoxie, la modulation du stress de réplication, l'altération de la régulation du cycle cellulaire par p53, l'inhibition de la réponse aux interférons et l'instabilité génétique. Cependant, dans le RCC, en absence d'une mutation additionnelle sur *SETD2*, ces changements résultent uniquement en le développement de tumeurs faiblement agressives, présentant un potentiel angiogénique élevé et l'absence d'un infiltrat immunitaire (tumeur froide) (*Jonasch et al., 2021*).

Bap 1 code pour la BRCA1-associated protein 1 (BAP1), une déubiquinase agissant sur la lysine 119 des histones H2A afin d'inverser la répression génique réalisée par le complexe protéique Polycomb (PcG) (Elias et al., 2020). BAP1 est mutée dans 10 à 20 % des ccRCC (Turajlic et al., 2018). Comme pour PBRM1, la perte de BAP1 entraîne une instabilité chromosomique accrue (Peng et al., 2015). Cependant, la survie des patients présentant une mutation BAP1 est plus faible que pour ceux possédant une mutation PBRM1 (Elias et al., 2020). La souris invalidée spécifiquement dans les cellules des tubules rénaux par une stratégie Cre-LoxP (Pax8-Cre) pour Vhl (F/F) et Bap1 (F/+) produit des lésions rénales néoplasiques avec du pléomorphisme nucléaire, une proéminence nucléolaire, une atypie et l'expression élevée de phospho-S6. Chez les patients traités avec des thérapies ciblées, la présence de la mutation BAP1 est associée à un résultat plus défavorable.

SETD2 est mutée dans 10 à 20 % des cas de ccRCC. SETD2 code pour une méthyltransférase agissant sur la lysine 36 des histones H3. Dans le ccRCC, la mutation SETD2 peut survenir de manière indépendante ou en conjugaison avec la mutation PBRM1 (Turajlic et al., 2018). Aujourd'hui, il n'existe aucune modèle expérimental animal connu d'inactivation de SETD2 dans le ccRCC (Jonasch et al., 2021).

De par leurs fonctions, les pertes de PBRM1, BAP1 ou SETD2 résultent en une instabilité génomique accrue et une aneuploïdie (Brownlee et al., 2014). D'autres mutations additionnelles et des altérations somatiques du nombre de copie (somatic copy number alterations, SCNA) ont été identifiées dans le ccRCC et comprennent : 1 - des mutations activatrices dans des protéines de la voie mTOR; 2 - des mutations inactivatrices dans des gènes modifiant la conformation de la chromatine; 3 - la perte de TP53 (tumor protein p53); 4 - les délétions de fragments des chromosome 14 et 9 (Elias et al., 2020). Puisque les mutations BAP1 et PBRM1 sont associées à des résultats cliniques distincts (différences de phénotypes, survie et réponses aux thérapies), ces observations constituent une première preuve de la présence de sous-groupes moléculaires distincts au sein des ccRCC.

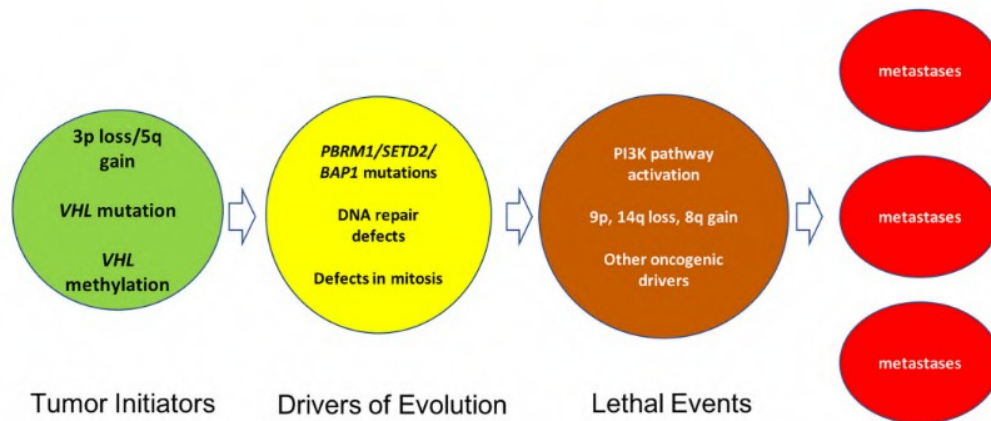


Figure 24 : Les évènements moléculaires clés dans le ccRCC

Les évènements initiateurs impliquent la perte du fragment chromosomique 3p et les mutations *VHL*. L'évolution est conduite par les défauts de réparation de l'ADN et des erreurs dans la mitose créant une aneuploïdie additionnelle. La perte ou le gain de fragments chromosomiques clés, des mutations dans la voie de signalisation PI3K confèrent un potentiel létal aux clones intratumoraux et augmentent la probabilité de développer des métastases (Jonasch *et al.*, 2021).

c. Classifications et spécificités du ccRCC : les critères moléculaires

Une étude prospective multi-centrique anglaise, nommée TRACERx Renal, rassemblant 101 patients et réalisée sur 1206 régions de ccRCC primaires, a permis d'identifier les caractéristiques déterministes de l'évolution de ce cancer (*Turajlic et al., 2018*). En effet, cette étude a permis de définir 7 sous-types clonaux évolutifs rassemblant les divers phénotypes cliniques dans le ccRCC : VHL monodriver (1), PBRM1-SETD2 (2), PBRM1-somatic copy number alteration (SCNA) (3), PBRM1-PI3K (4), VHL wildtype (5), multiple clonal driver (6), and BAP1 driven (7). Ces sous-types présentent des distinctions génomiques et une hétérogénéité de pronostic. L'ensemble de ces sous-groupes possède une altération du gène VHL à l'exception du sous-groupe « VHL wildtype ».

Plusieurs déterminants ont été évalués au sein de ces sous-groupes :

- L'indice pondéré d'instabilité génomique (wGII), qui est une mesure de la fraction du génome tumoral affectée par SCNA;
- Le pourcentage de cellules prolifératives, positives pour Ki67;
- L'indice d'hétérogénéité intratumorale (ITH) se définissant comme le nombre de sous-clones divisé par le nombre de clones;
- La structure clonale;
- Les paramètres cliniques.

Le sous-groupe (1) « VHL monodriver » concerne de petites tumeurs, associées à un faible niveau d'ITH, de wGII et de ki67. Elle représente des tumeurs temporellement plus précoces ou des tumeurs qui ne présenteront pas d'évènements létaux additionnels. Au contraire, le sous-groupe (6) « multiple clonal driver » a été caractérisé par la co-occurrence de deux mutations conductrices qui sont mutuellement exclusives (*BAP1* et *PBRM1*; *BAP1* et *SETD2*). Ce sous-groupe présente des niveaux élevés de wGII et de Ki67 mais des niveaux relativement faibles d'ITH montrant ainsi que l'apparition simultanée d'un petit nombre de clones est suffisante pour créer un fort avantage sélectif dans le ccRCC. Le sous-groupe (7) « BAP1 driven » présente exclusivement une mutation dans les gènes *VHL* et *BAP1*. La majorité des tumeurs n'ont aucune autre mutation conductrice détectable suggérant que les mutations *BAP1* combinées à des SCNA entraînent une expansion clonale robuste. À l'autre extrémité du spectre évolutif, les tumeurs du sous-groupe (2) "PBRM1/SETD2" présentent une ramification étendue, un ITH élevé et une prépondérance pour l'évolution parallèle. Le regroupement

spatial des mutations *SETD2* suggère un rôle potentiel pour la sélection spécifique à une niche, voire la construction de niches par les sous-clones mutants *SETD2*.

Les mutations *PBRM1* sont fortement enrichies en tant qu'événement précoce dans le ccRCC, comme en témoignent leur caractère clonal dans 74 % des cas, mais aussi les sous- groupes évolutifs « *PBRM1* / *PI3K* » et « *PBRM1* / *SCNA* ».

Cette étude a donc permis d'identifier pour la première fois jusqu'à 30 événements pilotes par tumeur et de montrer que la diversification sous-clonale est associée à des paramètres pronostiques connus. Ainsi, la diversité génétique et la complexité chromosomique constituent des éléments déterminants de la réponse des patients. En effet, la survie sans progression est plus élevée pour les patients présentant un indice pondéré d'instabilité génomique (wGI) faible. Le potentiel évolutif est donc proposé par les auteurs comme biomarqueur pour la réponse aux traitements et la surveillance thérapeutique.

D'autre part, afin d'identifier des marqueurs moléculaires prédictifs de la réponse des patients au sunitinib, inhibiteur des récepteurs à activité tyrosine kinase (TKI) qui sera détaillé ultérieurement, une étude clinique française a été menée sur 53 individus atteints d'un ccRCC primaire présentant des métastases et traités en première ligne par ce traitement anti-angiogénique (Beuselinck et al., 2015). Ces travaux ont consisté en une analyse transcriptomique globale ainsi qu'en la détermination des aberrations du nombre de copies des chromosomes, le statut de méthylation et les mutations dans les gènes *VHL* et *PBRM1*. Les données moléculaires ont été corrélées avec les taux de réponse, la survie sans progression et la survie globale. Cette analyse a permis l'identification de 4 sous-groupes du ccRCC nommés *ccrcc1* (*MYC.UP*), *ccrcc2* (*Classical*), *ccrcc3* (*Normal like*) et *ccrcc4* (*Immun.UP/MYC.UP*).

Tableau 1 : Résumé des caractéristiques des sous-groupes moléculaires du ccRCC (Beuselinck et al., 2015)

Subgroup (frequency)	ccrcc1 (33%)	ccrcc2 (41%)	ccrcc3 (11%)	ccrcc4 (15%)
Outcome under sunitinib				
Early PD	22.22%	2.78%	0.00%	26.67%
PR	40.74%	52.78%	70.00%	20.00%
Median OS (month)	24	35	50	14
Median PFS (month)	13	19	24	8
Clinical characteristics				
IMDC				
Good prognosis	6%	21%	18%	7%
Intermediate prognosis	69%	60%	64%	60%
Poor prognosis	25%	18%	18%	33%
MSKCC				
Good prognosis	10%	24%	27%	0%
Intermediate prognosis	58%	50%	63%	93%
Poor prognosis	32%	26%	9%	7%
Molecular characteristics				
Pathology characteristics				
Mean inflammation intensity (scale 0–3)	1.3	1.2	0.8	2.2
Mean sarcomatoid differentiation (%)	7.5	3.7	1.7	24.6
Mutations				
VHL	46.67%	62.50%	20.00%	20.00%
PBRM1	46.67%	37.50%	20.00%	0.00%
Upregulated pathways	MYC targets	Glycolysis		Immunity
	Glycolysis	Hypoxia		Apoptosis
	Hypoxia			Chemotaxis
				MYC targets
				Glycolysis
				Hypoxia
MYC expression level	++	+	-	++
Methylation status	Hypermethylated +			Hypermethylated ++
Polycomb stem-cell phenotype	++		-	+++
Copy number amplification				2p12/2p22.3/8q21.13
Proposal for names	MYC.UP	Classical	Normal like	Immun.UP/MYC.UP

Comme récapitulé dans le tableau 1, ces 4 sous-groupes présentent des différences dans les caractéristiques pathologiques, le statut mutationnel de *VHL* et *PBRM1*, le niveau d'expression de MYC, le statut de méthylation et dans la régulation à la hausse de voies de signalisation. Le sous-groupe ccrcc3 rassemble des tumeurs ne présentant que dans 20 % des cas une mutation *VHL* ou *PBRM1*, caractérisées par l'absence de la surexpression de voies de signalisation et ne montrant aucune caractéristique pathologique particulière. D'après une analyse OMIC, ce sous-groupe correspondrait à un stade précoce de la maladie. Le sous- groupe le plus représenté est le ccrcc2 ayant une mutation dans les gènes *VHL* et *PBRM1* ainsi qu'une régulation à la hausse des voies de signalisation de l'hypoxie et de la glycolyse. Ces deux sous-groupes (ccrcc2 et ccrcc3) présentent les plus grandes proportions de répondeurs au sunitinib et la survie globale et sans progression la plus importante (Tableau 1).

Le sous-groupe ccrcc4 se distingue par la surexpression de gènes impliqués dans la réponse immunitaire, la chimiotaxie et l'apoptose. Ces résultats sont associés à une forte expression des marqueurs de l'inflammation comme les membres de la famille TNF ainsi que par un infiltrat immunitaire riche en lymphocytes B et T. Ces tumeurs présentent donc des

caractéristiques pathologiques spécifiques se traduisant par un phénotype sarcomatoïde et inflammatoire. Ce sous-groupe est associé à une faible réponse au sunitinib.

Ces découvertes sont en accord avec plusieurs publications rapportant l'impact négatif d'un niveau élevé de la protéine C-réactive (CRP), marqueur de l'inflammation, et de la présence de la différenciation sarcomatoïde dans les mcrRCC traités avec un traitement anti-angiogénique. Les sous-groupes ccrcc1 et 4 sont décrits comme non-répondeurs au sunitinib et sont caractérisés par une faible survie globale et sans progression. Ils partagent comme caractéristiques communes la surexpression des cibles de MYC, un statut d'hyperméthylation et la présence de cellules souches.

Ce travail correspond non seulement à la première étude génomique intégrative du ccRCC métastatique mais a aussi permis l'identification des caractéristiques moléculaires des tumeurs résistantes au sunitinib et associées à une faible survie. Cette classification est donc un outil puissant pour la prise en charge des patients. En effet, puisque les patients dont les tumeurs sont classées dans le sous-groupe ccrcc4 ont une survie sans progression courte sous traitement par sunitinib, les agents hypométhylants ciblant les défauts épigénétiques ou les anticorps immunomodulateurs doivent être proposés préférentiellement.

D. EMT et invasion des cellules tumorales

L'inactivation de *VHL* est responsable d'un changement phénotypique des cellules épithéliales rénales se traduisant par la TEM (*Kaelin, 2007*) (*Figure 25*). La réexpression de pVHL sauvage dans les cellules du ccRCC présentant une mutation perte de fonction pour VHL (786-O) injectées en sous-cutanée chez la souris induit une inhibition de la croissance tumorale (*Iliopoulos et al., 1995*). Dans la littérature, il existe de nombreuses preuves que la voie de signalisation de l'hypoxie VHL-HIF régule l'expression de l'E-cadhérine qui est la protéine majoritaire des jonctions cellulaires épithéliales. En effet, l'altération du gène VHL ou l'hypoxie réduit fortement l'expression de la E-cadhérine (*Esteban et al., 2006*). En m'appuyant sur les données de la littérature, répertoriées dans un tableau en Annexe 1, j'ai pu montrer que la perte de VHL dans 3 lignées du ccRCC était associée à l'acquisition de marqueurs de la TEM comme : - l'augmentation de l'expression de facteurs de transcription Snail et SIP1; - une diminution de l'expression de l'E-cadhérine; - une augmentation de l'expression de la vimentine; - une augmentation de l'expression d'enzymes de remodelage matricielle TG2 (transglutaminase 2) et LOXL2; - une augmentation de l'expression de

protéines matricielles comme le collagène I (chaîne $\alpha 1$); - une augmentation de l'expression des MMP-2 et -9; - une augmentation des intégrines $\alpha 5$, $\alpha 3 \beta 1$ et $\alpha v \beta 1$; - une diminution de l'expression de protéines pro-apoptotiques Bax/Bcl-2 (*Annexe 1*). Ainsi, l'ensemble de ces modifications induites par la perte d'expression de VHL confère aux cellules tumorales du ccRCC des capacités invasives importantes (*Figure 25*) (*Annexe 1*).

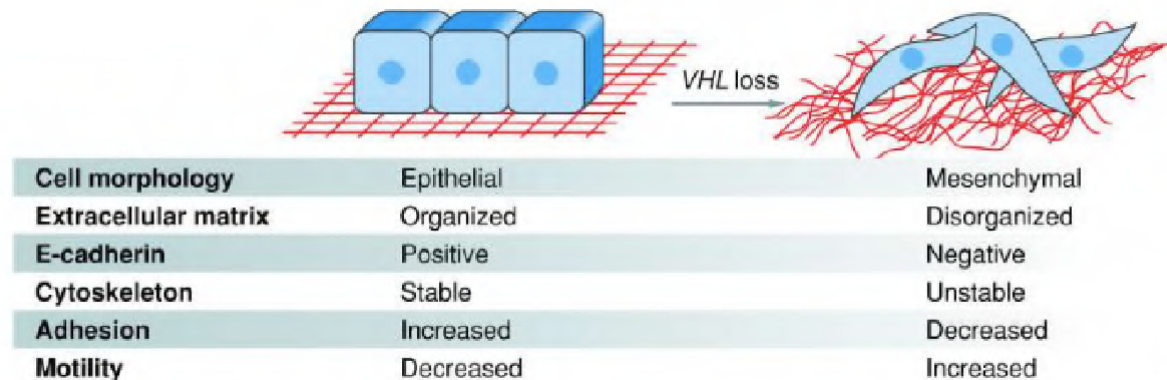


Figure 25 : Induction de la transition épithéliale/mésenchymateuse par la perte d'expression de pVHL dans le ccRCC

Les cellules tumorales n'exprimant plus la protéine VHL passent d'un phénotype épithélial à un phénotype mésenchymateux dont les caractéristiques sont : une matrice désorganisée, la perte de jonctions épithéliales, le remodelage du cytosquelette, une perte d'adhésion et l'augmentation de la migration (*Kaelin, 2007*).

E. Vascolarisation dans le ccRCC

a. Densité microvasculaire (MVD)

L'hypervascularisation a été démontrée comme un facteur de pronostic pertinent dans de nombreux cancers. D'après les bases de données de « THE HUMAN PROTEIN ATLAS » (<https://www.proteinatlas.org>), l'expression du CD31 est un marqueur de mauvais pronostic dans le cancer du rein. De plus, l'observation de coupes marquées au CD31 permet de constater une forte concentration de structure CD31+ dans le ccRCC par rapport au rein contrôle (*Figure 26*). L'hypervascularisation est évaluée par la mesure de la densité microvasculaire (MVD) correspondant au rapport de la surface vasculaire par unité de volume de tissu de la tumeur. En 1996, pour la première fois, ce paramètre est évalué comme marqueur de pronostic dans le ccRCC (*Köhler et al., 1996*). Dans cette première étude, Köhler et coll. démontrent que la densité vasculaire diminue avec l'augmentation du

grade de Fuhrman (Kohler et al., 1996). Depuis, de nombreuses études cliniques contradictoires, portant sur le lien entre la survie, le grade et la densité vasculaire ont été publiées. En effet, des études montrent une corrélation positive entre la survie et la densité microvasculaire (Rioux-Leclercq et al., 2001; Schraml et al., 2002; Imao et al., 2004; Sabo et al., 2001). D'autres études montrent au contraire une corrélation négative entre le grade et la densité microvasculaire (Yoshino et al., 1995; Nativ et al., 1998). Enfin, certaines études montrent l'absence d'une quelconque corrélation (MacLennan and Bostwick, 1995; Minardi et al., 2005).

La contradiction de ces données souligne l'insuffisance de la densité microvasculaire pour être utilisée comme un outil pronostic dans le ccRCC. En effet, le paramètre de densité vasculaire ne permet pas de rendre compte de la complexité de la vascularisation observée dans le ccRCC. La dimension fractale du micro-vaisseau (« microvessel fractal dimension (MFD) ») est un autre paramètre qui a été utilisé pour caractériser la vascularisation dans le ccRCC, permettant de rendre compte de la complexité de l'architecture microvasculaire. Un article montre en effet une corrélation positive entre cette MFD et la survie du patient (Sabo et al., 2001).

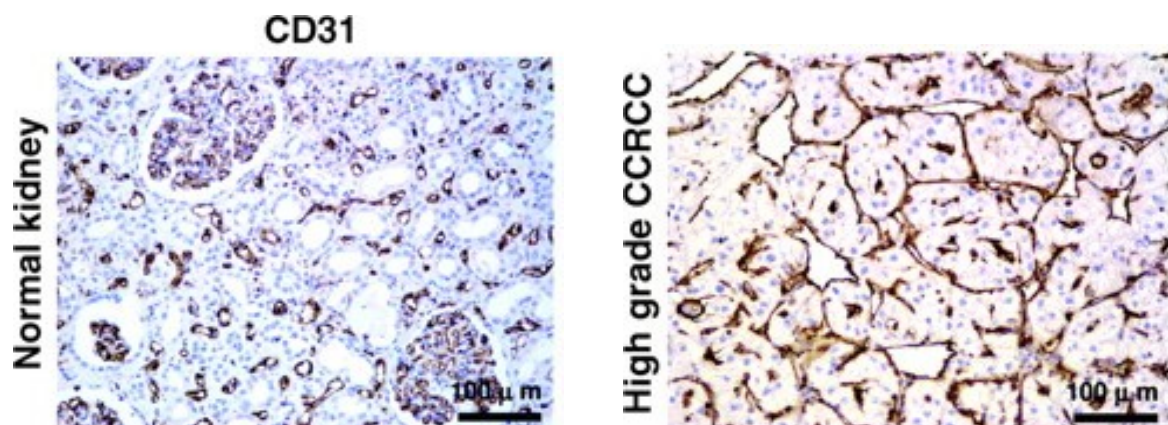


Figure 26 : Vascularisation du ccRCC par rapport à un rein sain

Le ccRCC présente une hypervascularisation par rapport au rein contrôlé. De plus, son réseau vasculaire est composé de structures longues et fines ou grande et dilatées (D'après Yao et al., 2007).

b. Classification actuelle des types de vaisseaux

- Critères morphologiques

D'après une étude publiée dans *Clinical Cancer Research* en 2007, il existe deux types distincts de vaisseaux identifiés dans le ccRCC : indifférenciés (CD31+/CD34-) et différenciés (CD34+) (Yao *et al.*, 2007). Une augmentation de la densité microvasculaire de vaisseaux indifférenciés corrèle significativement avec un grade élevé et une diminution de la survie des patients. Au contraire, l'augmentation de la densité vasculaire des vaisseaux différenciés est corrélée avec une tumeur de bas grade et une augmentation de la survie (Yao *et al.*, 2007). Une classification plus récente, basée sur la morphologie des vaisseaux a été proposée (Ruiz-Saurí *et al.*, 2018). Celle-ci implique l'utilisation de paramètres comme le diamètre maximum et minimum, l'axe majeur et mineur, le périmètre, le ratio du rayon et la circularité. Cette étude a permis l'identification de 4 motifs vasculaires dont deux sont majoritairement représentés dans le ccRCC, pseudoacinaire et fasciculaire (Figure 27). Le motif pseudoacinaire est formé par des vaisseaux ronds et allongés présentant une lumière qui occasionnellement peut être obstruée ou collapsée. Les connexions entre les capillaires sont abondantes et s'organisent autour des masses tumorales évoquant une structure glomérulaire ou acinaire. Ces morphologies vasculaires sont associées à une densité vasculaire élevée, un stade peu avancé du développement de la tumeur et donc un bon pronostic (Ruiz-Sauri *et al.*, 2018). Le pattern fasciculaire présente des vaisseaux allongés avec une lumière collapsée ou bouchée, présentant de nombreuses connexions (Figure 27). Ce motif est associé à une densité vasculaire élevée, à un stade plus avancé du développement de la tumeur et donc à un mauvais pronostic.

La présence de ces structures vasculaires aberrantes, associées à une faible ou forte densité vasculaire, pourrait expliquer pourquoi le paramètre de densité vasculaire n'est pas un bon marqueur de pronostic dans le ccRCC. De plus, en utilisant la base de données en ligne

« THE HUMAN PROTEIN ATLAS », j'ai réalisé une comparaison de coupes marquées pour le CD31 d'une douzaine de carcinomes différents et constaté que ces structures vasculaires longues et fines ou larges et dilatées sont spécifiques du ccRCC. Cependant, malgré ces travaux, l'architecture tridimensionnelle de ces structures vasculaires uniques restent inconnues.

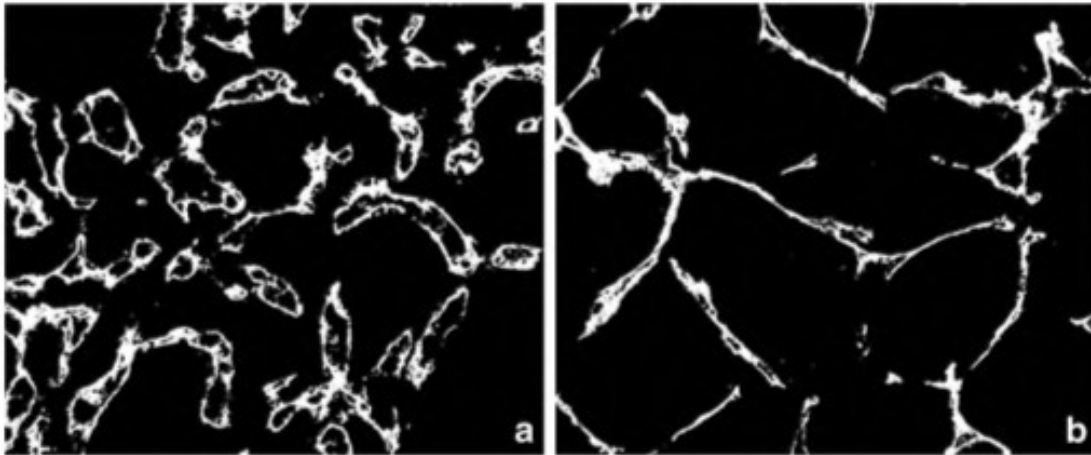


Figure 27 : Masques représentatifs des différents patterns vasculaires dans le ccRCC

(a) Pattern pseudoacinaire; (b) Pattern fasciculaire (Ruiz-Sauri et al., 2018).

- Critères moléculaires

Une récente étude consistant en des analyses transcriptomiques sur cellule unique de ccRCC a permis pour la première fois d'identifier deux sous-populations de cellules endothéliales dans ce cancer (Su et al., 2021) (Figure 28). Malgré l'expression des marqueurs classiques endothéliaux comme PECAM1, Cdh5/VE-cadhérine et VEGFR2/KDR dans ces deux types de cellules endothéliales, une certaine hétérogénéité a été observée. Un des deux types présente des caractéristiques de fibroblastes, exprimant le collagène III (COL3A1) et la périostine (POSTN) (Figure 28). Il est à noter aussi qu'il exprime un niveau plus faible de VEGFR2 que l'autre type. Bien que la TEM dans les CAF ait été reportée dans de précédentes études, ces cellules n'expriment pas de marqueurs de CAF. Ces cellules endothéliales n'ont jamais été observées précédemment et pourraient donc être spécifiques du microenvironnement du ccRCC.

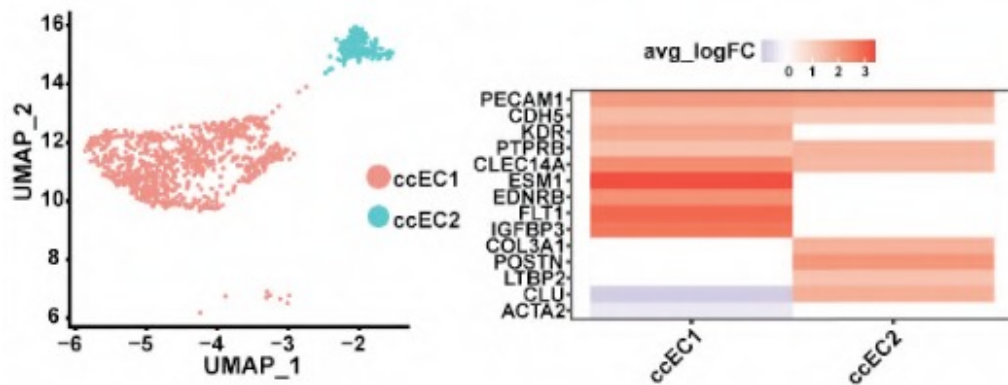


Figure 28 : 2 sous-populations de cellules endothéliales identifiées dans le ccRCC par RNAseq

Représentation UMAP de 2 types de cellules endothéliales dans le ccRCC (**gauche**). Gènes exprimés de manière différentielle par ces 2 types de cellules endothéliales (**droite**) (Adapté d'après Su et al., 2021).

F. Les traitements

Le ccRCC avancé s'est avéré résistant à la radiothérapie, à l'hormonothérapie et aux chimiothérapies conventionnelles. Ces vingt dernières années, les agents ciblant l'angiogenèse sont apparus comme des options de première intention efficaces et sont devenus le pilier du traitement des patients atteints de ccRCC (Zarrabi and Wu, 2018).

a. Les thérapies anti-angiogéniques

Ce carcinome richement vascularisé a été pris en charge par les thérapies anti-angiogéniques ciblant la voie de signalisation du VEGF. Ces thérapies incluent les inhibiteurs des récepteurs à activité tyrosine kinase (TKI) de première, deuxième et troisième génération démontrant une forte affinité pour VEGFR2. Le rôle prometteur du sunitinib dans le RCC métastatique a conduit à un essai clinique historique de phase III débutant en 2006 (Motzer et al., 2009). Motzer et coll. ont étudié le rôle du sunitinib chez les patients non traités par rapport aux patients traités par l'interféron- α (IFN- α) qui était alors la thérapie standard et historique du RCC. Cet essai a révélé une survie globale supérieure de 26,4 mois ainsi qu'une survie sans progression de 11 mois pour les patients traités au sunitinib. Un deuxième TKI, ciblant aussi le VEGF, le pazopanib, a été examiné chez des patients non traités dans une étude de 2010 (VEG105192) (Sternberg et al., 2010). Dans cet essai

clinique de phase III, le pazopanib a démontré une survie sans progression et une survie globale prolongée chez les patients lorsqu'il était utilisé comme traitement de première ligne. En 2013, a été mené un essai randomisé de phase III nommé COMPARZ dans lequel le sunitinib ou le pazopanib était utilisé comme agent de première intention dans le RCC métastatique (*Motzer et al., 2013*). Les deux agents ont démontré une survie sans progression médiane (mPFS) prolongée ainsi que la survie globale mais l'efficacité globale de l'un de ces deux agents n'était pas perceptible. Dès 2014, ces deux thérapies, le sunitinib et le pazopanib, ont donc été approuvées par le National Comprehensive Cancer Network (NCCN) et l'association européenne d'urologie comme première ligne thérapeutique dans le traitement du ccRCC avancé (*Ljungberg et al., 2015*). Pendant plusieurs années, le sunitinib a été largement utilisé chez les patients non traités antérieurement en tant qu'agent de première ligne selon un schéma d'alternance 4/2 (4 semaines de traitement/2 semaines de repos) (*Zarrabi and Wu, 2018*).

Le bevacizumab, anticorps monoclonal recombinant dirigé contre le VEGF-A, a aussi été proposé comme traitement anti-angiogénique dans le ccRCC. Son efficacité a été évaluée dans l'essai clinique AVOREN (*Escudier et al., 2010*) suivie de CALBG (*Rini et al., 2010*). Ces deux études cliniques ont consisté à traiter des patients avec l'IFN- α associé à un placebo ou au bevacizumab. Il a été démontré une meilleure survie globale et survie sans progression chez les patients traités par la combinaison bevacizumab et IFN- α (*Escudier et al., 2010; Rini et al., 2010*). Ces résultats encourageants ont conduit la NCCN à proposer cette combinaison bevacizumab/IFN- α comme première ligne thérapeutique au même titre que le sunitinib et le pazopanib. Cependant, cette thérapie combinée a rapidement perdu de sa popularité parmi les cliniciens, car les toxicités de l'IFN- α sont importantes et l'administration, par injection intramusculaire, plus délicate que celles des TKI oraux (*Zarrabi and Wu, 2018*).

Le cabozantinib est un inhibiteur oral ciblant plusieurs récepteurs à activité tyrosine kinase, dont le VEGFR, c-MET et AXL (*Atkins and Tannir, 2018*). Les récepteurs MET et AXL sont surexprimés au même titre que le VEGFR en conséquence de l'inactivation de VHL et de manière intéressante, leur expression est corrélée à l'agressivité et à la faible survie dans le RCC. De plus, cibler ces récepteurs constitue une stratégie pour outrepasser la résistance liée à l'inhibition du VEGFR. L'essai clinique de phase II CABOSUN a permis de comparer le cabozantinib au sunitinib chez des patients atteints d'un RCC métastatique présentant des signes pronostiques défavorables selon l'IMDC (International Metastatic Renal Cell

Carcinoma Database Consortium) (*Choueiri et al., 2017*). Cet essai a démontré une réduction de 31 % du taux médian de la progression et du décès pour les patients traités au cabozantinib par rapport au groupe recevant le sunitinib. De plus, cette étude a révélé que la survie sans progression était significativement plus importante pour un traitement cabozantinib en comparaison avec le sunitinib et qu'une réduction de 31 % était observé pour le taux médian de progression et de décès (*Choueiri et al., 2017*). Après des analyses complémentaires, le cabozantinib se révèle donc plus favorable que le sunitinib au sein des sous-groupes présentant un intérêt clinique incluant le risque IMDC, la charge tumorale, les sites métastatiques et le statut d'expression de MET. De manière intéressante, l'analyse de l'expression de MET par les cellules tumorales révèlent un bénéfice plus important du cabozantinib chez les patients MET+ par rapport aux patients MET- (*Atkins and Tannir, 2018*). Le sorafenib et l'axitinib, deux TKI plus spécifiques du VEGFR que le sunitinib ont été proposés comme seconde ligne dans le traitement du RCC métastatique dans les essais cliniques TARGERT, INTORESECT et AXIS.

b. Les thérapies ciblant la voie de signalisation mTOR

Des stratégies thérapeutiques ciblant à la fois les cellules tumorales et l'angiogenèse ont aussi été proposées. Le temsirolimus, un inhibiteur de la voie de signalisation mTOR, ciblant mTORC1, a été approuvé pour le traitement de première intention du ccRCC avancé. Comme discuté dans la partie précédente, certains ccRCC présentent une mutation dans des protéines de la voie de signalisation mTOR. Cette approbation par la Food and Drug Administration (FDA) était fondée sur une étude clinique de phase III dans laquelle le temsirolimus administré en monothérapie a été comparé à l'IFN- α sur des patients présentant un RCC métastatique (*Hudes et al., 2007*). Dans cette étude, le temsirolimus a montré un prolongement de la survie globale (10,9 à 7,3 mois, respectivement) et de la survie sans progression par rapport à l'IFN- α (3,8 à 1,9 mois, respectivement). Cependant, le temsirolimus, présentant une toxicité systématique, et nécessitant une administration intraveineuse contraignante, n'a jamais été largement utilisé dans la prise en charge de la première ligne du RCC métastatique et du ccRCC (*Zarrabi and Wu, 2018*).

c. Les immunothérapies

Les inhibiteurs de checkpoint ciblent spécifiquement les récepteurs ou ligands des checkpoints immunitaires, perturbant ainsi les mécanismes utilisés par les cellules tumorales pour échapper à la réponse immunitaire et restaurent la capacité des lymphocyte T cytotoxiques à établir une réponse anti-tumorale (*Jalalvand et al., 2021*). Les cibles comprennent le récepteur PD-1 (programmed cell death 1) et ses ligands PD-L1/L2 et le récepteur CTLA-4 (cytolytic T-lymphocyte-associated protein 4) et ses ligands CD80/86 (*Jalalvand et al., 2021*). La liaison des ligands PD-L1/L2, exprimés par les cellules tumorales au récepteur PD-1 présent sur les lymphocytes T inhibe la prolifération des lymphocytes T et la production de cytokines par les lymphocytes auxiliaires Th1. La régulation positive de PD-L1/L2 se produit dans de nombreuses tumeurs et peut contribuer à l'inhibition de la surveillance active des lymphocytes T. Il a été démontré que le blocage de ces interactions augmente l'activation et la prolifération y compris des cellules effectrices infiltrant les tumeurs (*Atkins and Tannir, 2018*). En parallèle, l'activation de CTLA-4 par ses ligands à la surface des lymphocytes T régulateurs entraîne l'acquisition des fonctions immunosuppressives de ce dernier.

Le nivolumab et l'ipilimumab sont respectivement des inhibiteurs des checkpoints PD-1 et CTLA-4. L'efficacité du nivolumab dans le traitement du RCC avancé a été évaluée par une étude clinique de phase III CheckMate 025 publiée en 2015 et complétée en 2020 (*Motzer et al., 2015, 2020*). Cette étude démontre une efficacité supérieure du nivolumab par rapport à l'everolimus, inhibiteur de la voie mTOR, avec une amélioration significative de la survie globale (25,8 mois vs 19,7 mois), de la survie sans progression et du taux de réponse (94 (23 %) sur 410 vs 17 (4 %) sur 411) (*Motzer et al., 2020*). Le nivolumab a donc démontré sa supériorité sur l'everolimus comme seconde ligne thérapeutique pour les patients atteints du ccRCC (*Atkins and Tannir, 2018*). Dans un essai clinique de phase II, l'ipilimumab n'a démontré qu'une efficacité modeste dans le traitement du ccRCC avancé (*Yang et al., 2007*). L'efficacité d'un traitement combiné nivolumab et ipilimumab a été évaluée dans l'essai clinique de phase III CheckMate 214 où des patients atteints d'un ccRCC avancé ont été traités soit par cette nouvelle combinaison soit par du sunitinib (*Motzer et al., 2018, 2020*). Dans la population des RCC avancés à faible ou risque intermédiaire, ce traitement combiné augmente la survie globale des patients en comparaison avec le

sunitinib (HR 0,63, 99,8 % CI 0,44–0,89; $P < 0.001$) (Motzer et al., 2018, 2020). D'autres inhibiteurs sont apparus dans les différentes études de combinaisons dont le pembrolizumab (anti-PD1), avelumab (anti-PD-L1), décrites ci-dessous.

d. Les thérapies combinées : La première ligne thérapeutique actuelle

Ces dernières années, les traitements de première ligne du ccRCC ont fortement évolués, avec l'ajout récent du cabozantinib et du nivolumab/ipilimumab. De récentes études proposent des traitements combinés entre inhibiteurs de checkpoint et agents anti-angiogéniques (Song et al., 2020). La pertinence de ces combinaisons repose sur la réciprocity des mécanismes impliqués. En effet, les traitements anti-angiogéniques modifient fortement le microenvironnement tumoral en le rendant plus permissif au système immunitaire. De plus, les inhibiteurs de checkpoint ont des effets anti-angiogéniques par la diminution de l'expression du VEGF et de l'hypoxie (Song et al., 2020).

Le succès de l'essai clinique CheckMate 214 a conduit à de nombreuses autres études cliniques afin d'évaluer l'effet de combinaisons entre inhibiteurs de checkpoints ou inhibiteurs de checkpoint et TKI. Parmi celles-ci, on remarque notamment les études JAVELIN Renal 101 (axitinib (TKI) et avelumab (PD-L1) versus sunitinib), KEYNOTE-426 (axitinib et pembrolizumab (PD-1) versus sunitinib), CheckMate 9ER (nivolumab et ipilimumab versus sunitinib) et CLEAR (lenvatinib (TKI) et pembrolizumab) (Motzer et al., 2019, 2021; Rini et al., 2019; Choueiri et al., 2020, 2021; Powles et al., 2020). Les résultats de ces essais cliniques se sont avérés positifs, montrant la supériorité des combinaisons de deux immunothérapies ou d'une immunothérapie et une thérapie ciblée TKI par rapport au sunitinib administré en monothérapie. Selon une mise à jour récente, des directives européennes, la combinaison lenvatinib et pembrolizumab rejoint d'autres combinaisons ciblées par un inhibiteur du VEGFR et PD-1, tels que axitinib et pembrolizumab ou cabozantinib et nivolumab, à recommander pour le traitement de première ligne du ccRCC avancé (Vano et al., 2021) (Figure 29). Cependant, selon la figure 29, ces recommandations varient en fonction du risque, la combinaison d'immunothérapies n'étant recommandée que pour les patients à risque pauvre ou intermédiaire, ce qui constitue environ 80 % des patients atteints d'un ccRCC avancé (Vano et al., 2021).

Face à cette multitude de traitements et combinaisons, un article récent propose un algorithme permettant de choisir la meilleure option pour le traitement du ccRCC avancé

patients présentant un ccRCC métastatique. Il est donc recommandé, pour tous ces patients, les combinaisons pembrolizumab et axitinib (ou lenvatinib), nivolumab et cabozantinib, nivolumab et ipilimumab (*Vano et al., 2021*).

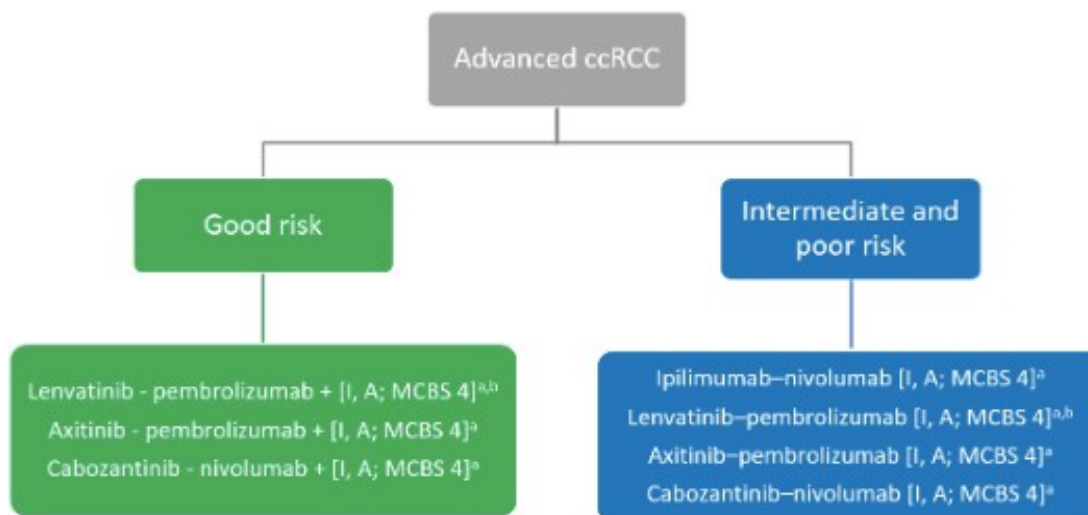


Figure 29 : Nouvelles recommandations pour la première ligne thérapeutique du ccRCC

EMA, Agence européenne des médicaments ; ESMOMCBS, European Society for Medical Oncology-Magnitude of Clinical Benefit Scale; FDA, Food and Drug Administration; IMDC, consortium international de bases de données RCC métastatiques; MCBS, ESMO- v1.1 pour une nouvelle thérapie/indication approuvée par l'EMA ou la FDA. Le score a été calculé par le groupe de travail ESMO-MCBS et validé par le comité des lignes directrices de l'ESMO; b Approuvé par la FDA; pas actuellement approuvé par l'EMA (*Vano et al., 2021*).

G. Les modèles d'étude du ccRCC

a. Les lignées cellulaires du ccRCC

Les lignées cellulaires tumorales immortalisées sont les plus fréquemment utilisées pour étudier la biologie du cancer (*Wolf et al., 2020*). Celles-ci ont permis l'acquisition de nombreuses connaissances génétiques et moléculaires sur le ccRCC, notamment sur le rôle de l'axe VHL-HIF. En effet, le faible coût, la facilité pour maintenir ces cellules en culture et leur capacité de réplication infinie les ont rendues très attractives. L'ensemble des lignées utilisées dans l'étude du ccRCC ainsi que leurs caractéristiques phénotypiques et moléculaires sont synthétisées dans le tableau 2. Avec des caractéristiques plus ou moins proches, celles-ci s'élèvent au nombre de 9 (*Tableau 2*). La lignée du ccRCC la plus largement rapportée dans la littérature est la lignée 786-O. Elle figure parmi les premières générées et

demeurent la plus fréquemment citée. Les COSMIC Cell Lines Project (https://cancer.sanger.ac.uk/cell_lines) et CCLE (Cancer Cell Line Encyclopedia, <https://sites.broadinstitute.org/ccle>) reportent une délétion p.G104fs dans l'exon 1 du gène codant pour VHL entraînant un décalage du cadre de lecture, associée à une augmentation de l'expression d'HIF-2 α et de l'expression du VEGF (*Tate et al., 2019*). De plus, cette lignée possède une mutation sur PTEN et TP53 (*Tableau 2*). Histologiquement, les cellules 786-O ne présentent pas de cytoplasme clair dans les modèles de xénogreffe de souris. En culture, elles possèdent des caractéristiques sarcomatoïdes : des cellules mal différenciées en forme de fuseau (*Sinha et al., 2017*).

Le rôle de régulateur négatif de l'axe VHL HIF a été démontré pour la première fois dans les cellules 786-O. La restauration de VHL sauvage entraîne une inhibition de la croissance tumorale *in vivo*. Par la suite, ce résultat a été démontré avec de nombreuses autres lignées du ccRCC dont la lignée RCC4, largement rapportée aujourd'hui dans la littérature. Plus récemment, des cellules 786-O ont été utilisées pour déterminer le rôle de la résistance induite par l'hypoxie au TKI spécifique des VEGFR, le sorafenib, par l'intermédiaire de la voie HIF-2 α -Cox2, illustrant ainsi un mécanisme potentiel de résistance aux médicaments (*Wolf et al., 2020*). A498 et ACHN sont les deux autres lignées du ccRCC les plus citées dans la littérature.

Dans mon travail de thèse, j'ai utilisé la lignée cellulaire RCC4 (Cell Line Passport: SIDM01851; Cellosaurus RRID: CVCL_0498; NCIT C4033; *Maxwell et al., 1999*) pour le développement de micro-tumeurs rénales vascularisées. Cette lignée est un don de Patrick H. Maxwell et Peter Radcliffe (prix Nobel de médecine 2019 avec Gregg L. Semenza et William Kaelin Jr.). Isolée à partir d'une tumeur primaire du ccRCC, elle présente une mutation homozygote perte de fonction à la position c.194C4G p.Ser65Trp sur le gène VHL (*Perier et al., 2011*). Cette mutation est à une position fréquemment mutée dans le cancer du rein, et correspond au domaine Beta de VHL, requis pour la liaison à HIF (*Perier et al., 2011*). Il en résulte une augmentation de l'expression d'HIF1 α et HIF2 α . Dans la littérature aucune donnée n'est publiée sur d'autres possibles mutations portées par cette lignée.

Tableau 2 : Les lignées du ccRCC les plus citées dans la littérature et leurs principales caractéristiques (Wolf et al., 2020)

Cell line	Classification	Sub classification ¹⁰ (Sinha et al., 2017)	Histological features	3p status ¹⁰ (Sinha et al., 2017)	VHL status ^{66,67} (Barretina et al., 2012)	CCLE mutations ^{66,67} (Barretina et al., 2012)
786-O	ccRCC	ccB	Poor differentiation with sarcomatoid features ¹⁰ (Sinha et al., 2017)	Deleted	Null	<i>PTEN, TP53, TSC2, MLL3</i>
A-498	ccRCC	ccB	Compact nests of tumor cells with clear cytoplasm ¹⁰ (Sinha et al., 2017)	Deleted	Null	<i>MLL3, SETD2</i>
ACHN	pRCC	Unknown	Poor differentiation with sarcomatoid features ¹⁰ (Sinha et al., 2017)	Deleted	Wildtype	<i>PBRM1, NF2</i>
CAKI-1	ccRCC	ccB	Poor differentiation ⁷¹ (Korhonen et al., 1994)	Not Deleted	Wildtype	<i>MET, MLL3, SETD2</i>
RCC-4	ccRCC	Unknown	Unknown	Deleted	Null	NA
A-704	ccRCC	ccA	Not tumorigenic in immunocompromised mice ⁷³ (Giard et al., 1973)	Deleted	Null	<i>MLL3, TP53, PBRM1, SETD2</i>
SN12C	Unknown	Unknown	Clear cell combined with granular morphology ⁷⁴ (Sanchez et al., 1994)	Not Deleted	Wildtype	<i>TP53, BAP1, NF2</i>
CAKI-2	ccRCC	ccB	Well differentiated clear cell ⁷¹ (Korhonen et al., 1994)	Deleted	Wildtype	<i>PBRM1</i>
769-P	ccRCC	ccA	Unknown	Deleted	Null	<i>BAP1, TSC2</i>
TK-10	Unknown	Unknown	Unknown	Deleted	Wildtype	<i>PIK3CA, TP53</i>
UMRC-2	ccRCC	ccA	Unknown	Deleted	Null	NA
OS-RC-2	ccRCC	ccB	Unknown	Deleted	Null	<i>PTEN, TP53, PBRM1</i>
CAL-54	pRCC	Unknown	Well differentiated with papillary structures ⁷⁵ (Gioanni et al., 1996)	Deleted	Wildtype	<i>FH, MLL3</i>

b. Les modèles murins pré-cliniques

Jusqu'à récemment, les modèles murins du ccRCC étaient limités aux xénogreffes dérivées de lignées cellulaires (cell-derived xenograft, CDX) ou dérivés de tumeurs humaines (patient-derived xenograft, PDX) (Wolf et al., 2020). Les nouvelles avancées dans le développement des modèles murins génétiquement modifiés (GEMM) ont permis de générer des souris présentant une invalidation conditionnelle pour VHL spécifique des cellules rénales associés à au moins une autre invalidation dans un gène co-driver (Wolf et al., 2020).

- Les modèles de xénogreffes

Les modèles murins du ccRCC (PDX ou CDX) sont établis dans des souris, par implantation orthotopique dans la région sous-capsulaire du rein ou par implantation hétérotopique dans les régions sous-cutanée, intra-péritonéale ou intramusculaire. Le fort taux du rejet de greffe peut être diminué par l'utilisation de souris immunodéficientes (*Bousquet and Janin, 2016*). Les modèles de xénogreffes ont montré un maintien de l'histologie du patient, de l'expression de gènes, des altérations dans le nombre de copies de l'ADN, dans le profil mutationnel et dans la réponse aux traitements (*Grisanzio et al., 2011; Pavía-Jiménez et al., 2014*). De plus, il a été démontré une forte densité vasculaire associée à ces xénogreffes (*Rojas et al., 2019*). Les modèles de xénogreffe du ccRCC sont utilisés comme outils pré-cliniques pour la découverte et le développement de nouvelles thérapies. Par exemple, il a été testé l'efficacité d'un nouvel inhibiteur d'HIF2 α (PT2399) en comparaison avec le sunitinib sur des modèles PDX issus de 22 patients. Grâce à ce modèle, il a été montré que PT2399 diminue la croissance tumorale de 60 % en moyenne alors que le sunitinib ne la diminue que de 40 % (*Lee and Motzer, 2017*). Plus récemment, Wang et coll. démontrent que l'inhibition de PRMT1 (proteine arginine méthyltransferase 1), régulateur épigénétique surexprimé dans le ccRCC, par un inhibiteur spécifique DCPT1061 inhibe non seulement la croissance tumorale mais a aussi sensibilisé les cellules du ccRCC au sunitinib par l'atténuation de la surexpression induite par le sunitinib de la voie de signalisation Lipocaline 2-AKT-protéine du rétinoblastome (rb) (*Wang et al., 2021*). Les modèles PDX ont aussi permis de proposer de nouvelles méthodes d'analyses de la vascularisation dans le ccRCC en réponse aux traitements. Il a notamment été proposé une méthode de quantification par ultrason de la densité vasculaire pour évaluer la réponse au traitement anti-angiogénique (*Rojas et al., 2019*). Ainsi, la diminution de cette densité vasculaire a permis de prédire une diminution du volume tumoral en réponse au sunitinib une

semaine avant qu'il ne soit visible (Rojas et al., 2019). Grâce à ces modèles PDX et CDX, il est aussi possible d'explorer les caractéristiques hémodynamiques de néovaisseaux par résonance magnétique (RM) à marquage de spin artériel (ASL) (Schor-Bardach et al., 2009). Une étude a notamment permis de montrer, sur des modèles CDX utilisant des lignées cellulaires 786-O, A498 et CAKI-1, des changements dans les débits sanguins tumoraux en corrélation avec la résistance au traitement anti-angiogénique sorafenib (Schor-Bardach et al., 2009). Les modèles PDX ont aussi été utilisés pour étudier la résistance aux traitements anti-angiogéniques, pour en comprendre les mécanismes sous-jacents et pour proposer de nouveaux schémas thérapeutiques. Adelaiye et coll. ont démontré que la résistance au sunitinib est associée à une augmentation transitoire de la vascularisation tumorale malgré l'accumulation du sunitinib à forte dose dans la tumeur (Adelaiye et al., 2015). Ils ont montré que cette résistance est associée à l'expression de la méthyltransférase EZH2. De plus, l'augmentation progressive des doses de sunitinib, dans des gammes tolérables par les patients, a permis d'obtenir à nouveau une sensibilité (Adelaiye et al., 2015). Une autre approche de xénogreffes de RCC métastatique a mis en évidence la génération de mécanismes de résistance au sunitinib, induite par l'hypoxie dans les zones périnécrotiques, où résident un grand nombre de cellules souches tumorales (Varna et al., 2015). Des analyses transcriptomiques ont été menées sur des modèles PDX du ccRCC afin de proposer des candidats impliqués dans les mécanismes de résistance au temsirolimus (Sakamoto et al., 2021). Les auteurs ont pu associer à cette résistance certaines mutations génétiques comme ANKRD12 et DNMT1, associées à un profil d'hypométhylation de certains promoteurs induisant la surexpression de plusieurs molécules de la voie de signalisation mTOR (Sakamoto et al., 2020). De façon générale, les études menées sur les modèles PDX ont permis de fournir des informations diagnostiques et mécanistiques précieuses.

- **Les modèles génétiquement modifiés**

De nombreuses études ont montré qu'une altération du gène *Vhl* n'était pas suffisante pour induire des lésions du ccRCC chez la souris. En effet, comme discuté dans la partie précédente, l'altération du gène *Vhl* est indispensable pour induire le développement du ccRCC mais celle-ci n'est pas suffisante (Jonasch et al., 2021). Ainsi, en 2001, est publiée pour la première fois une souris invalidée hétérozygote pour *Vhl*, développant des hémangiomes caverneux correspondant à des tumeurs bénignes du foie associées à une

stéatose et à une accumulation locale de petits vaisseaux (*Haase et al., 2001*). Cependant, ces souris ne développent aucune affection rénale. De plus, les efforts pour créer des souris portant une invalidation homozygote pour *Vhl* n'ont pas non plus permis de reproduire les lésions du ccRCC en dépit de la grande variété de promoteurs spécifiques du rein utilisés, incluant une *Actb-Cre* (*Ma et al., 2003*), *Pepck-Cre* (*Rankin et al., 2012*), *Pax8-Cre* (*Schietke et al., 2012; Mathia et al., 2013*) ou *Thp-Cre* (*Schley et al., 2004*). À la suite de ces travaux, l'inactivation du gène *Vhl* a été combinée avec l'inactivation d'autres gènes conducteurs potentiels de RCC.

Plusieurs modèles animaux transgéniques utilisant la serine/threonine-protein kinase Ksp1.3 spécifique du tubule proximal ont été utilisés pour piloter une CRE recombinase et inactiver des gènes appariés ou multiples d'une manière spécifique du rein. L'inactivation combinée du suppresseur de tumeur *Pten* et de *Vhl* a généré des kystes (*Frew et al., 2008*) tandis que l'inactivation combinée de *Trp53* et *Vhl* a induit des kystes simples, des kystes atypiques et des néoplasmes présentant l'activation de mTORC1 et une expression élevée de *Myc* (*Albers et al., 2013*). En 2017, une souris doublement invalidée pour *Vhl* et *Pbrm1* dans les cellules tubules rénales a été générée, développant des carcinomes multifocaux, mimant le ccRCC humain (*Espana-Agusti, 2017*). Cependant, de façon étonnante, dans l'ensemble de ces articles, la vascularisation de ces lésions tumorales n'est pas abordée, bien que ce soit l'une des caractéristiques majeures de ce cancer. Un des modèles murins du ccRCC le plus récemment généré implique une inactivation conduite par Ksp1-3-Cre de *Trp53*, *Vhl* et de la protéine du rétinoblastome (*Rb1*) qui produit des lésions néoplasiques, démontrant des caractéristiques histologiques et transcriptomiques du ccRCC humain (*Harlander et al., 2017*). En effet, il est observé dans ce modèle une activation de la voie de signalisation HIF-1 et mTORC1. 60 % des tumeurs générées sont composées de cellules tumorales présentant un phénotype de cellules claires, spécifique du ccRCC. De manière intéressante, l'ensemble des tumeurs générées présentent un réseau vasculaire riche composé de cellules endothéliales exprimant CD31 et le facteur de von Willbrand (vWF). Les vaisseaux composant ce réseau présentent une organisation particulière qualifiée de pseudoacinaire puisqu'ils enveloppent des amas de cellules tumorales (*Harlander et al., 2017*). Comme discuté dans la partie précédente, ces morphologies vasculaires sont caractéristiques du ccRCC. Enfin, ce modèle ne démontre pas de potentiels métastatiques. Actuellement, aucun modèle murin du ccRCC génétiquement induit ne développe de

métastase. Les récentes découvertes sur les mutations dans les gènes de remodelage de la chromatine comme Bap1 ou Prmb1 (voir partie précédente) ont conduit à la création de nouveaux modèles fondés sur des approches polygéniques qui miment davantage les caractéristiques du ccRCC (*Gu et al., 2017; Nargund et al., 2017*). Le double mutant murin Pax8-Cre;Vhl F/F;Pbrm1 F/F spécifique des cellules rénales induit la formation de petites tumeurs rénales, composées de petites cellules cancéreuses imbriquées les unes avec les autres, formant de petits amas entouré d'un fin réseau vasculaire (*Gu et al., 2017*). Le double mutant Pax8-Cre;Vhl F/F;Bap1 F/+ présente des lésions tumorales rénales caractérisées telles que des masses kystiques expansible avec une prolifération épithéliale et une cavité centrale incluant dans certains cas du liquide séreux. Entre ces masses kystiques, se présente un réseau vasculaire au motif caractéristiques du ccRCC humain (*Gu et al., 2017*).

Bien que l'ensemble de ces modèles aient permis une meilleure compréhension de la biologie du ccRCC, ceux-ci ont apportés peu d'informations sur l'architecture tridimensionnelle du réseau vasculaire spécifique de ce cancer.

V. Les modèles *in vitro* 3D d'étude des interactions entre cellules tumorales et capillaires

Au cours de mon doctorat, j'ai eu l'opportunité d'écrire une revue intitulée « *In vitro* 3D systems to model tumor angiogenesis and interactions with stromal cells » publiée en novembre 2020 dans *Frontiers in Cell and Developmental Biology* (Annexe 2). Ce travail bibliographique m'a offert une vision globale des avancées dans le développement des modèles *in vitro* 3D d'angiogenèse tumorale. Ainsi, j'ai pu situer et orienter le développement de mon propre modèle en fonction de l'état de l'art. Dans cette dernière partie de l'introduction, une grande majorité des points discutés sont abordés dans cette revue (Brassard-Jollive et al., 2020) (Annexe 2).

A. Les limites des modèles actuels

L'angiogenèse, physiologique ou tumorale, a longtemps été évaluée *in vitro* par l'utilisation du « tube formation assay ». Ce test, rapide et peu onéreux, consiste en l'ensemencement de cellules endothéliales à la surface d'un revêtement de Matrigel™ extrait de membrane basale de cellules tumorales murines Engelbreth-Holm-Swarm (EHS). Longtemps considéré comme le test *in vitro* de référence pour évaluer l'angiogenèse, il est aujourd'hui reconnu par la communauté scientifique spécialiste dans ce domaine, son insuffisance à mimer la morphologie des capillaires et leurs mécanismes de formation (Simons et al., 2015; Nowak-Sliwinska et al., 2018). De plus, de nombreuses cellules mésenchymateuses, incluant les cellules musculaires lisses ou les fibroblastes, s'organisent en des réseaux similaires en réponse à des alignements de matrice prouvant ainsi que cette organisation particulière n'est pas un processus vasculaire (Vernon et al., 1992). Malgré le succès commercial, face à l'insuffisance de ces tests pour mimer la complexité de l'angiogenèse, il a été indispensable de développer des modèles *in vitro* tridimensionnels plus pertinents. Comme discuté dans la partie III, l'angiogenèse se découpe en multiples étapes pouvant être individuellement évaluées et quantifiées par un grand nombre de tests *in vitro*, *ex vivo* comme les anneaux aortiques (Suarez-Carmona et al., 2015) et *in vivo* adéquats présentés dans Nowak-Sliwinska et al., 2018. Je ne reviendrai pas sur ces différents tests puisque durant mon travail de thèse, je me suis concentrée sur les modèles *in vitro* 3D permettant de mimer les interactions entre les cellules tumorales et les capillaires.

Afin d'être des outils pertinents, ces modèles doivent récapituler toutes les étapes de l'angiogenèse en incluant la migration et la prolifération des cellules endothéliales, la formation de la lumière, l'anastomose et les branchements (*Nakatsu et al., 2003; Nakatsu and Hughes, 2008*). Aujourd'hui, il existe un besoin crucial de développer ces technologies 3D afin de combler le manque entre des modèles *in vitro* 2D trop simplistes et des modèles *in vivo* coûteux, compliqués et ne reflétant parfois que trop peu la physiopathologie humaine. Ainsi, ces modèles *in vitro* 3D constituent des outils indispensables dans l'élucidation de mécanismes cellulaires, dans la découverte de nouveaux traitements et dans la transition vers la médecine personnalisée (*Brassard-Jollive et al., 2021*). La diversification des méthodes de culture *in vitro* 3D incluant le support de culture, les cellules ainsi que les méthodes d'imagerie et de quantification ont conduit à une grande diversité de modèles. Les méthodes fondées sur l'angiogenèse ou la vasculogenèse permettent la formation de capillaires fonctionnels révélant des jonctions adhérentes et serrées contenant le complexe de VE-cadhérine/ β -caténine et ZO-1, respectivement ainsi qu'une polarité apico-basale caractérisée par le dépôt en position abluminale de constituants de la membrane basale incluant la laminine et le collagène IV (*Nowak-Sliwinska et al., 2018; Marchand et al., 2019*). De plus, dans le contexte de l'angiogenèse tumorale, il semble primordial que ces modèles reproduisent la morphologie aberrante qui caractérise les capillaires tumoraux. Le développement de ce modèle a nécessité de nombreux choix sur les cellules tumorales ou endothéliales, le polymère, le processus de formation de capillaire, le support de culture, le milieu, les méthodes d'acquisition et de quantification des résultats.

B. Les cellules endothéliales

L'utilisation de cellules endothéliales pour la formation de capillaires *in vitro* demeure encore aujourd'hui un défi expérimental. En effet, aucune cellule endothéliale tumorale, d'origine humaine ou murine, n'a été rapportée comme capable de générer des capillaires *in vitro*, en co-culture avec des cellules tumorales ou non. De plus, l'origine de ces cellules a une importance capitale puisque seules les cellules endothéliales d'origine humaine sont utilisées pour former des capillaires en 3D. En effet, bien que l'isolation et la culture des cellules endothéliales murines aient été développées depuis plusieurs années, leur capacité à former des capillaires *in vitro* reste à prouver (*Nowak-Sliwinska et al., 2018*).

Face à l'ensemble de ces contraintes, les cellules les plus communément utilisées, et que nous avons également choisies, sont les cultures primaires de cellules endothéliales humaines issues de veine cordon ombilical (HUVEC) (Nowak-Sliwinska et al., 2018). D'autres sources primaires de cellules endothéliales notamment artérielles, issues de cordons ombilicaux, et microvasculaires, dérivées le plus souvent de la peau, définies comme des cellules endothéliales microvasculaires humaines du derme (HDMEC) ont aussi été largement rapportées dans la littérature comme capables de s'engager dans un processus de morphogenèse vasculaire *in vitro*. Plus rarement, des progéniteurs endothéliaux (EPC) obtenues à partir de cellules formant des colonies endothéliales à partir du sang de cordon ombilical sont aussi utilisées dans le développement de modèles d'angiogenèse tumorale. Cependant, les EPC isolées à partir du sang périphérique adulte présentent un potentiel de prolifération limité (Ferratge et al., 2017).

C. Les méthodes impliquant angiogenèse par bourgeonnement et vasculogénèse

Les expériences de billes de Cytodex et de sphéroïdes endothéliaux constituent des modèles *in vitro* 3D pertinents pour étudier l'angiogenèse par bourgeonnement. Dans le premier essai, les cellules endothéliales sontensemencées sur des billes de polysaccharides (Cytodex) avant l'inclusion en hydrogel et la co-culture avec des fibroblastes ou en présence de leur milieu conditionné, aboutissant au bourgeonnement et à la formation de capillaires possédant une lumière en quelques jours (Nowak-Sliwinska et al., 2018). Ces capillaires sont conduits par des tip cells, alors que les stalk cells sont polarisées et organisent la membrane basale. Dans le second test, les sphéroïdes de cellules endothéliales sont inclus en hydrogel, cultivés en présence de VEGF et développent des capillaires bourgeonnants, présentant une lumière parfois irrégulière. Ces modèles ont été utilisés pour étudier l'implication des facteurs sécrétés par les cellules tumorales et stromales sur la formation ou la stabilisation des capillaires mais aussi l'impact de traitements anti-angiogéniques (Walti et al., 2011; Ramer et al., 2014; Hernandez-Fernaud et al., 2017). Ces modèles ont été utilisés par notre équipe pour étudier le rôle de protéines matricielles, régulées par l'hypoxie, telles que LOXL2, TG2 ou ANGPTL4 (angiopoïetin-like 4) dans le bourgeonnement endothélial (Bignon et al., 2011; Beckouche et al., 2015; Liabotis et al., 2022) (Figure 30). De plus, nous avons développé des outils de quantification 3D de ces réseaux vasculaires (Figure 30). Ces modèles, bien que pertinents pour évaluer l'effet des facteurs paracrines et des traitements

anti-angiogéniques ne constituent pas les méthodes les plus adaptées pour étudier les interactions entre les cellules tumorales et les capillaires.

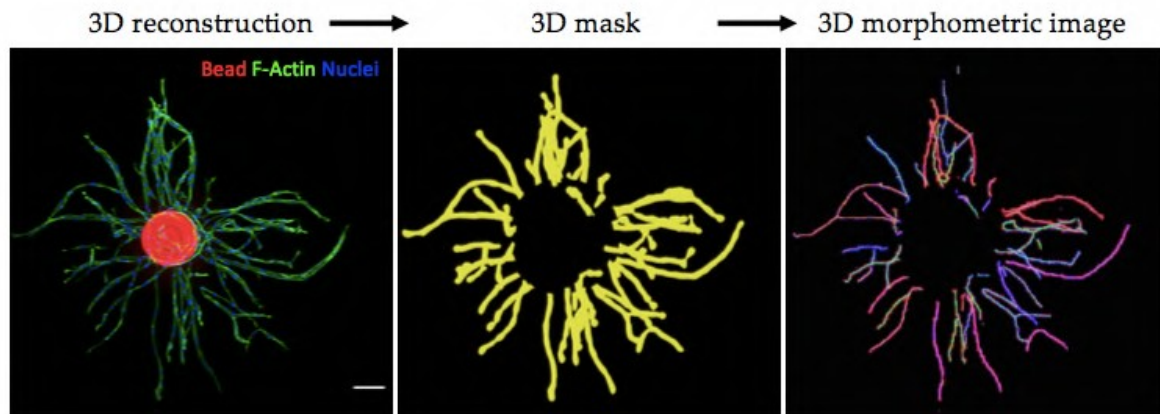


Figure 30 : Analyse morphométrique d'un réseau de capillaires 3D bourgeonnant à partir d'une bille de cytodex en hydrogel de fibrine

A partir d'une image en 3D (représentée en vue 2D sur l'image de gauche), un masque 3D (image centrale) est généré après l'ajout d'une sphère centrale recouvrant la bille et la dépassant de 25 μm . Une image morphométrique des capillaires est générée à partir du masque 3D (panneau de droite). Plusieurs paramètres pour chaque perle sont quantifiés à partir de l'image morphométrique 3D, nombre de points terminaux (voxel avec moins de deux voisins), nombre de points de branchements (voxel avec plus de deux voisins), nombre de capillaires, longueur totale des capillaires et diamètre des capillaires. Barre d'échelle : 100 μm (Liabotis et al., 2022).

Un modèle de morphogenèse vasculaire récapitulant le processus de vasculogénèse repose sur la capacité des cellules endothéliales à s'auto-assembler en un réseau vasculaire 3D, dans un microenvironnement favorable. Par exemple, des cellules endothéliales sontensemencées en hydrogel de collagène I et cultivées en présence de VEGF, FGF-2 ou de milieu conditionné de fibroblastes permettant ainsi la formation de capillaires possédant une lumière en 4 à 5 jours (Nowak-Sliwinska et al., 2018) (Figure 31). Contrairement aux modèles de Cytodex ou sphéroïdes endothéliaux, les modèles de vasculogénèse 3D sont appropriés pour étudier les interactions entre cellules tumorales et capillaires ainsi que pour développer des micro-tumeurs vascularisées (Chen et al., 2013a; Kim et al., 2013a; Bray et al., 2015; Jeon et al., 2015; Chen et al., 2016; Sobrino et al., 2016a; Taubenberger et al., 2016a).

De plus, la co-culture avec des péricytes en hydrogel mime les étapes clés du recrutement périvasculaire lors de la morphogenèse vasculaire (Baudino, 2013). Ce modèle est adapté à l'étude de l'angiogénèse tumorale lorsque les cellules tumorales ou les sphéroïdes sont co-inclus avec des cellules endothéliales isolées en hydrogel. De manière

intéressante, le nombre et la forme des capillaires peuvent être régulés par la modulation de la densité du microenvironnement en collagène ou en fibrine (Ghajar et al., 2008).

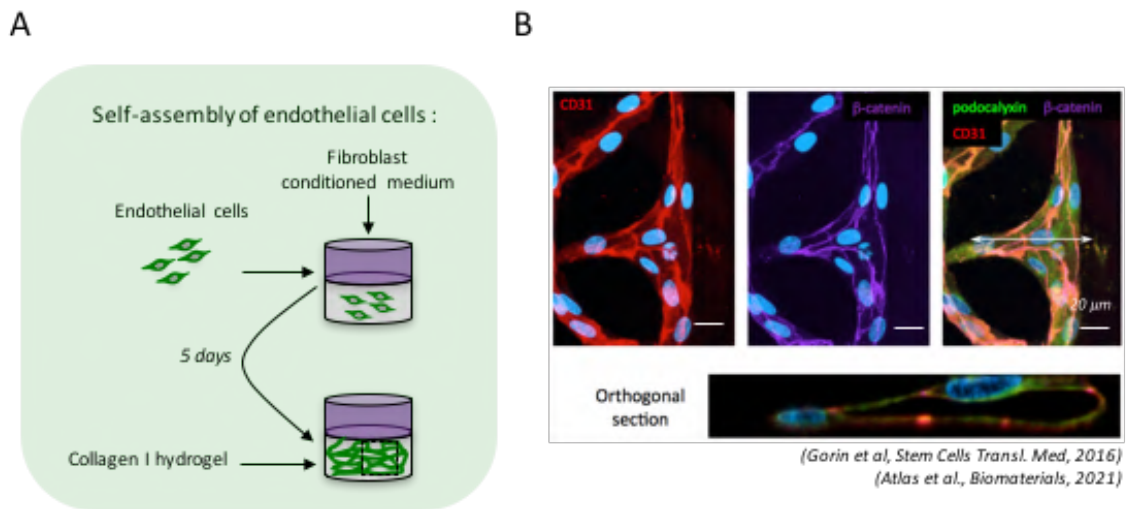


Figure 31 : Formation d'un réseau de capillaires *in vitro* 3D par vasculogenèse en hydrogel de collagène I

A : Schématisation du protocole expérimental de l'auto-assemblage de cellules endothéliales en capillaires. Les cellules endothéliales sont incluses en hydrogel de collagène I et cultivées pendant 5 jours en présence de milieu conditionné par les fibroblastes (MC NHDF).

B : Exemple de capillaires formés par cette approche. Les contacts cellule-cellule sont visualisés par un marquage CD31, la maturation des jonctions par un marquage B-caténine, la polarité des cellules endothéliales par un marquage podocalyxine et une vue orthogonale permet d'apprécier la présence d'une lumière. Echelle= 20 μm (Adapté à partir de Gorin et al., 2016).

D. Les cellules tumorales

Les cellules tumorales utilisées dans les modèles 3D sont principalement des lignées issues de cancers mammaire, pancréatique, colorectal, cutané, pulmonaire ou hépatique cultivées seules ou en sphéroïdes. Bien que l'isolation et le maintien en culture de cellules tumorales primaires restent un défi, Miller et coll. ont développé un système de culture à flux dirigé incorporant des cellules primaires humaines de ccRCC isolées à partir de 6 patients afin d'étudier la signalisation angiogénique entre cellules de ccRCC et cellules endothéliales (Miller et al., 2018). Les lignées tumorales, bien que présentant une moindre pertinence physiopathologique que les cultures primaires, permettent de développer un modèle calibré, standardisé et reproductible dans lequel il est ensuite possible d'incorporer des cultures primaires voire des explants de tumeurs.

E. Les propriétés biophysiques et biochimiques du microenvironnement tumoral contrôlées en hydrogel 3D

Afin de mimer le microenvironnement tumoral *in vitro*, une variété de matériaux naturels ou synthétiques a été utilisée pour former des échafaudages 3D (Song et al., 2014).

Un point important de ces structures est leur capacité à supporter simultanément la prolifération et l'invasion des cellules tumorales ainsi que la formation de capillaires endothéliaux. De nombreux hydrogels ont la capacité de reproduire beaucoup de paramètres de la MEC native concernant leur composition (simple ou composée), leurs propriétés physiques (rigidité, taille des pores, longueur des fibres), leurs fonctions biologiques (biodisponibilité des facteurs de croissance, machinerie de l'adhésion cellulaire) (Li and Kumacheva, 2018). La modulation de ces paramètres n'induit pas seulement des changements globaux de l'échafaudage 3D mais aussi des modifications locales de la topologie du microenvironnement cellulaire (Yamada and Sixt, 2019). La sélection des structures et l'association avec le milieu de culture adéquat est une étape cruciale dans la conception de micro-tumeurs *in vitro* et de leur vascularisation.

a. Les polymères naturels pour hydrogel

Les hydrogels naturels reposent sur des composants simples purifiés de protéines matricielles, incluant la fibrine ou le collagène I ou des extraits de matrices naturelles (Song et al., 2014; Li and Kumacheva, 2018). Les extraits de membrane basale comme le Matrigel™ ont été largement utilisés ces dernières années, permettant la croissance de nombreuses lignées tumorales (Song et al., 2014). Les tests combinant la culture 3D de sphéroïdes tumoraux en hydrogel avec des cellules endothéliales à la surface ont aussi été réalisés mais ne reproduisent pas l'angiogenèse (Benton et al., 2015). De plus, le Matrigel™ a été rapporté comme induisant la formation de tubes multicellulaires qui présentent une polarité luminale et abluminale inversée avec un dépôt de membrane basale représentée par la laminine $\alpha 4$ dans la lumière (Kučera et al., 2009). De manière surprenante, l'utilisation d'un mélange de Matrigel™ et de polymères naturels comme la fibrine semble notablement améliorer la formation de capillaires et résulte en une anastomose avec la vascularisation de l'hôte et la perfusion sanguine dans le cas d'implantation dans la souris (Laib et al., 2009).

La polymérisation de la fibrine survient lors du clivage du fibrinogène par la thrombine et est contrôlée par les ions calciques, la température et la concentration en fibrinogène. Les hydrogels de fibrine ont été largement utilisés pour évaluer l'angiogenèse en 3D puisque l'architecture nano- et microscopique des fibres mime la MEC native. Ils apportent un support robuste pour l'angiogenèse et la vasculogenèse. Ghajar et coll. ont montré que les hydrogels de fibrine, à la concentration de 2,5 mg/ml induisent la formation

d'un réseau de capillaires. En utilisant le modèle de Cytodex, les mêmes auteurs ont démontré que l'augmentation de la densité de la fibrine de 2,5 à 10 mg/ml altère la formation de capillaires. Les hydrogels de fibrine à une densité de 1 mg/ml et présentant une rigidité de 90 Pa, sont optimaux pour la formation de sphéroïdes et la prolifération des cellules tumorales en comparaison à des gels plus rigides (*Liu et al., 2012*). Certaines études indiquent que les hydrogels de fibrine apportent un échafaudage 3D pertinent pour étudier les micro-tumeurs *in vitro* et leur vascularisation.

Le collagène I, constituant protéique majeur de la MEC interstitiel, comme cela a été abordé dans la première partie de ce manuscrit, est un matériel biocompatible et biodégradable qui possède des capacités intrinsèques à s'auto-assembler en hydrogels sous certaines conditions physiologiques (*Sorushanova et al., 2019*). Les gels de collagène I peuvent aussi être produits en utilisant de multiples méthodes de réticulation résultant en la formation d'une architecture fibrillaire similaire à la MEC native. Les études *in vitro* ont démontré que la densité des gels de collagène I et leur porosité sont modulées par le pH, la température et la concentration en collagène par la modulation de la fibrillogenèse, offrant des méthodes pour contrôler les propriétés structurales (*Doyle et al., 2015; Sapudom et al., 2015*) (*Figure 32*). Les hydrogels de collagènes fournissent un microenvironnement bioactif soutenant les processus cellulaires, contenant les sites d'adhésion cellulaires, les sites protéolytiques dégradables et de réticulation de la MEC (*Laib et al., 2009*). Plusieurs études *in vitro* ont démontré que les hydrogels de collagène I permettent la formation d'un réseau de capillaires en utilisant les modèles de vasculogenèse 3D ou de sphéroïdes endothéliaux (*Heiss et al., 2015; Blache and Ehrbar, 2017*). Le collagène I supporte l'invasion et la croissance d'un grand nombre de lignées (*Jeong et al., 2016*). Les cellules du cancer du sein MDA-MB 231 cultivées dans les hydrogels de collagène I sous la forme de sphéroïdes présentent un cœur hypoxique et nécrotique (*Szot et al., 2011; Song et al., 2014*). En utilisant le collagène I de diverses origines (bovine, humaine ou de rat), Wolf et coll. ont démontré que la migration des cellules tumorales indépendante des MMP dépend à la fois de la déformation des noyaux et de la porosité de l'échafaudage en réponse aux contraintes spatiales sans corrélation avec la rigidité (*Wolf et al., 2013*).

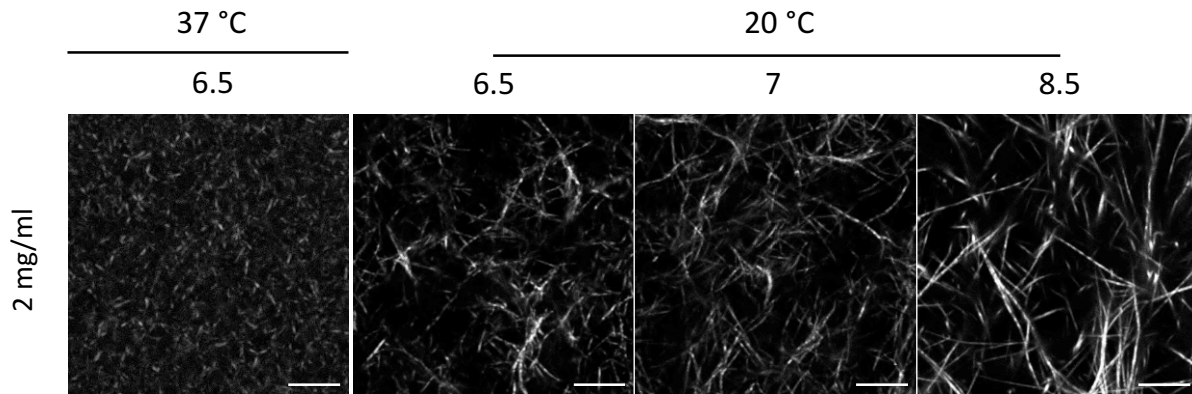


Figure 32 : Les propriétés structurales des hydrogels de collagène I sont modulées par la température et le pH

Les propriétés structurales des hydrogels de collagène I (2 mg/ml) sont évaluées par émission de seconde harmonique (SHG) en utilisant un microscope bi-photon. Les hydrogels ont été préparés dans les mêmes conditions et incubés à la température indiquée pour 60 minutes avant d'être incubés à 37 °C en ECM2. La longueur et le diamètre des fibres augmentent aux pH plus élevés. A pH équivalent, les hydrogels formés à 37 °C (Atlas, Bidault *et al.*, article en préparation).

b. Les polymères synthétiques

Parmi les biomatériaux synthétiques reportés pour la culture de cellules en 3D, le polyéthylène glycol-héparine (PEG) est l'un des plus communément utilisés pour le développement de micro-tumeurs (Bray *et al.*, 2015; Chwalek *et al.*, 2015; Roudsari *et al.*, 2016; Taubenberger *et al.*, 2016a). Les hydrogels de PEG ont pour but de mimer la MEC naturelle et de fournir un contrôle de sa synthèse et de sa conception (Lutolf, 2005; Blache and Ehrbar, 2017). Les échafaudages sont générés en utilisant du PEG et de l'héparine par addition cytotocompatible de type Michael et sont capables d'inclure des cellules en 3D (Chwalek *et al.*, 2015). Un avantage majeur de ces échafaudages synthétiques est la possibilité de découpler les propriétés biochimiques des propriétés biomécaniques. En effet, l'augmentation de la concentration en PEG permet de contrôler les propriétés mécaniques sur une large gamme, tout en maintenant la concentration constante en héparine. De plus, les gels de PEG peuvent être fonctionnalisés pour : - permettre la liaison réversible de multiples facteurs de croissance (VEGF, FGF-2, SDF-1), - permettre la conjugaison covalente de ligands d'adhésion cellulaire (motifs RGD par exemple), - ajouter des sites protéolytiques (Kraehenbuehl *et al.*, 2008; Bray *et al.*, 2015; Chwalek *et al.*, 2015; Blache *et al.*, 2016; Taubenberger *et al.*, 2016; Blache and Ehrbar, 2017). Les hydrogels de PEG permettent la formation d'un réseau de capillaires *in vitro*. En effet, dans plusieurs études, la co-culture de cellules endothéliales et mésenchymateuses conduit à la formation de capillaires présentant une lumière, le dépôt de membrane basale (laminine ou collagène IV) et la localisation

périvasculaire de cellules mésenchymateuses (*Blache et al., 2016; Blache and Ehrbar, 2017b*). Les vaisseaux récapitulent les principales caractéristiques de l'angiogenèse et sont similaires à ceux formés dans les hydrogels naturels. De plus, les hydrogels de PEG permettent la formation de sphéroïdes en 3D et la croissance de lignées cellulaires d'hépatocarcinomes (HCC) (*Liang et al., 2011*) et d'une variété d'autres lignées tumorales, par exemple du sein, de la prostate ou du poumon (*Bray et al., 2015; Roudsari et al., 2016; Taubenberger et al., 2016a*). Cet échafaudage 3D est donc compatible avec la réalisation de micro-tumeurs 3D et de leur vascularisation.

F. Les modèles statiques de co-culture 3D

Dans la littérature, deux types d'approches sont le plus souvent décrites, reposant sur des sphéroïdes vascularisés en hydrogels 3D (*Figure 33*) ou des constructions tissulaires vascularisées. Dans cette introduction, je n'aborderai que les stratégies permettant la formation des sphéroïdes vascularisés, les autres méthodes étant reportées en Annexe 2.

a. Les sphéroïdes vascularisés en hydrogel pour étudier :

- Les interactions cellulaires

Pour mimer les interactions entre cellules tumorales et les capillaires, des sphéroïdes multicellulaires sont composés de cellules tumorales et endothéliales. Une grande variété de lignées cellulaires de cancer du poumon, du colon (*Ehsan et al., 2014*) et de glioblastome (*Tatla et al., 2021*) ont été utilisées. De façon intéressante, Eshan et coll. montrent que ce modèle récapitule les capacités pro-angiogéniques spécifiques de chaque type de cellules tumorales. En effet, les lignées cellulaires du cancer du sein présentent un plus grand nombre de capillaires que les lignées tumorales du poumon ou du colon. Des cellules de glioblastome isolées à partir de patients ont été utilisées pour former des sphéroïdes multicellulaires tumoraux/endothéliaux (*Tatla et al., 2021*). En hypoxie, les cellules primaires de glioblastomes co-localisent fortement avec les cellules endothéliales pour former un réseau vasculaire par bourgeonnement, évènement qui a aussi été rapportée *in vivo*.

Bray et coll. s'intéressent aussi aux interactions entre cellules tumorales et la vascularisation par une autre approche (*Bray et al., 2015*). La première phase consiste en la croissance de sphéroïdes tumoraux en hydrogel pendant 7 jours de culture. Les sphéroïdes

sont ensuite extraits par traitement à la collagénase et ensemencés dans un hydrogel contenant des cellules endothéliales et des cellules souches mésenchymateuses isolées. Ce protocole récapitule les premières étapes de la croissance tumorale. Contrairement au modèle décrit par Eshan et coll. ou Tatla et coll., les capillaires bourgeonnent vers le sphéroïde mais établissent seulement quelques contacts à la surface du sphéroïde. Dans ce cas, on ne peut donc pas vraiment assimiler ce phénomène à une vascularisation de la masse tumorale.

- Les interactions avec la MEC

Les modèles de sphéroïdes vascularisés en hydrogel naturel récapitulent efficacement les interactions cellulaires dans un environnement 3D mais sont limités pour étudier les interactions entre les cellules tumorales et des protéines spécifiques de la MEC. Les interactions entre les cellules et la MEC jouent un rôle dans la croissance tumorale, l'invasion et l'angiogenèse. Les protéines matricielles comme le collagène I, la fibronectine et les laminines sont des composants majeurs du microenvironnement stromal, comme cela a été abordé dans la partie I (*Provenzano et al., 2006; Schedin and Keely, 2011*). Comme mentionné précédemment, les hydrogels synthétiques fonctionnalisés comprenant des domaines d'adhésion cellulaire spécifique des protéines matricielles sont des outils très utiles pour reproduire les interactions avec la MEC. Taubenberger et coll. s'intéressent à l'implication des domaines d'adhésion cellulaire sur les interactions entre les sphéroïdes tumoraux et les capillaires (*Taubenberger et al., 2016*). Pour cela, un domaine de liaison aux intégrines (RGD) présent sur la fibronectine et la vitronectine, le peptide 111 dérivé de la laminine (IKVAV) ou le domaine de liaison aux intégrines présent sur le collagène I (GFOGER) sont conjugués à l'hydrogel de PEG. La formation de sphéroïdes tumoraux ainsi que leur co-inclusion avec des cellules endothéliales et des cellules souches mésenchymateuses dans des hydrogels fonctionnalisés ont été effectuées comme dans l'étude de Bray et coll. (*Bray et al., 2015*). Bien que des interactions entre cellules tumorales et capillaires aient été observées dans toutes les conditions, l'invasion des cellules tumorales et les interactions entre cellules tumorales et endothéliales au centre du sphéroïde sont plus importantes dans les hydrogels fonctionnalisés avec IKVAV et GFOGER. Ce modèle de co-culture constitue donc un outil intéressant pour disséquer l'effet des interactions avec la MEC sur la croissance et l'invasion tumorale et sur l'angiogenèse. La composition mais aussi la densité de la MEC sont des

paramètres cruciaux pouvant réguler la prolifération cellulaire, l'invasion et l'angiogenèse.

Pour moduler la densité de la MEC, une stratégie nommée « compression plastique » consiste à retirer l'eau de l'hydrogel de collagène contenant les cellules tumorales (Magdeldin *et al.*, 2017; Pape *et al.*, 2019). Cette masse tumorale dense artificielle (ACM, artificial cancer mass) est ensuiteensemencée en hydrogel de collagène supplémenté en laminine et contenant des fibroblastes et des cellules endothéliales, mimant le compartiment stromal, suivi d'une nouvelle compression. L'invasion est ainsi régulée par la compression plastique modulant la densité de la MEC et différentes concentrations de laminine changeant la composition de la MEC. Une forte densité de collagène I est associée à l'augmentation de l'invasion tumorale. De plus, la présence de laminine stimule à la fois l'invasion tumorale et la formation d'un réseau vasculaire. Les auteurs ont montré que les cellules endothélialesensemencées dans le compartiment stromal forment un réseau vasculaire « sain » ou « tumorigène » en absence ou en présence de cellules tumorales du cancer colorectal.

b. Conclusion sur les modèles statiques de co-culture

La culture de sphéroïdes vascularisés en hydrogel est adaptée pour mimer les interactions entre les cellules tumorales et les capillaires. De plus, en utilisant des échafaudages synthétiques fonctionnalisés, les co-cultures en hydrogel 3D permettent d'étudier l'impact des protéines matricielles sur l'angiogenèse tumorale. L'amélioration de ces modèles consistera à l'inclusion de différents types de cellules stromales. En effet, alors que les fibroblastes jouent un rôle majeur dans ces modèles, beaucoup d'autres types de cellules stromales comme les macrophages, les cellules souches ou les fibroblastes associés au cancer pourraient également être utilisés pour mimer des propriétés plus complexes du microenvironnement tumoral. De plus, l'un des intérêts majeurs d'inclure des péricytes dans les sphéroïdes tumoraux vascularisés est de mimer les défauts de la couverture péricytaire observée dans les cancers. Un autre facteur majeur impliqué dans le processus de vascularisation provient du flux sanguin et des forces de cisaillement. Ces paramètres requièrent l'utilisation de systèmes micro-fluidiques, que je n'aborderai pas dans cette introduction mais qui sont décrites en Annexe 2.

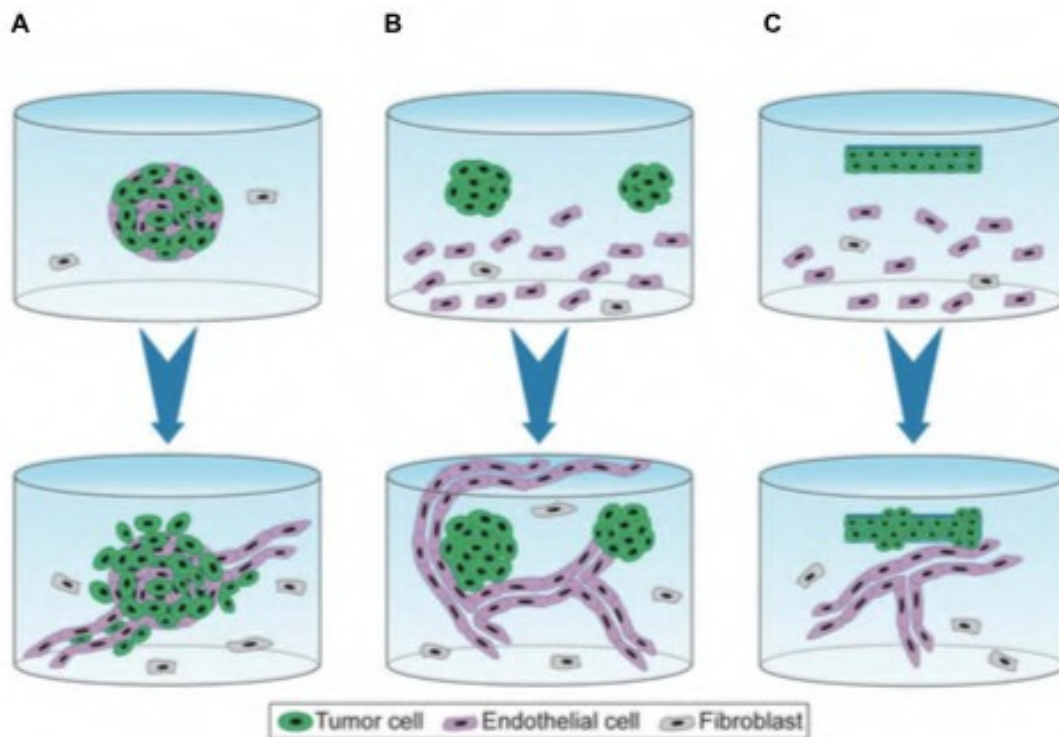


Figure 33 : Protocoles expérimentaux pour la formation de capillaires et la croissance tumorale

Ces systèmes de co-culture sont réalisés à 7 jours (A), 7-10 jours (B), et 10-21 jours (C). (A) Les sphéroïdes contenant des cellules endothéliales et tumorales sont inclus en hydrogel de fibrine contenant des fibroblastes en suspension. Les capillaires sont formés par un processus mimant l'angiogenèse par bourgeonnement et croient loin de la masse tumorale (Ehsan et al., 2014; Tatla et al., 2021). (B) Les sphéroïdes sont inclus au sein d'un hydrogel fonctionnalisé dérivé du PEG contenant des cellules endothéliales et fibroblastes en suspension. Les capillaires sont formés par vasculogenèse à proximité de la masse tumorale mais ne la vascularise pas (Bray et al., 2015; Taubenberger et al., 2016). (C) Une masse cancéreuse dense artificielle (ACM) est obtenue par une compression plastique des hydrogels de collagène I contenant les cellules tumorales. L'ACM est ensuite incluse dans un hydrogel de collagène contenant des cellules endothéliales et fibroblastes en suspension. Ce système est de nouveau compressé. Les capillaires sont formés par vasculogenèse (Magdelin et al., 2017; Pape et al., 2019). (Brassard-Jollive et al., 2020).

G. Défis et futures applications

Depuis 50 ans, la culture 2D de lignées tumorales a été largement utilisée pour permettre le screening de nouveaux traitements. Cependant, des études réalisées à partir des années 2000 ont mis en évidence une plus grande fiabilité des modèles cellulaires 3D pour prédire la réponse aux traitements. En effet, les sphéroïdes tumoraux cultivés en suspension ou inclus en hydrogel de collagène I ont été proposés pour combler le manque entre la culture 2D considérée comme trop simpliste et les expérimentations *in vivo*. De plus, la vascularisation aussi bien que la co-culture avec les cellules stromales confèrent un grand intérêt pour évaluer la délivrance des traitements. Comme décrit dans Brassard-Jollive et coll., les micro-tumeurs vascularisées cultivées dans des hydrogels, les constructions tissulaires ainsi que les systèmes microfluidiques sont des plateformes puissantes pour la

découverte de nouveaux traitements et le screening (*Brassard-Jollive et al., 2020*). Cependant, dans la plupart des cas, elles mettent en évidence des preuves de concept et ne sont pas conçues pour le screening haut débit. Le groupe de Christopher Hugues a développé un modèle de micro-tumeurs vascularisées en plaques 96 puits, compatible avec des lecteurs de fluorescence et robotique permettant de créer des essais reproductibles et standardisés (*Sobrino et al., 2016b; Phan et al., 2017*). Comme une preuve de concept, les auteurs ont évalué l'efficacité, en aveugle, de 10 molécules anti-tumorales approuvées par la FDA sur les micro-tumeurs vascularisées. Les anti-angiogéniques, les anti-tumoraux et les placebo ont été discriminés selon leurs effets respectifs sur les cellules tumorales et/ou la vascularisation. Plus récemment, conscients du besoin de développer des essais standardisés, d'autres groupes ont mis au point une plateforme microfluidique compatible avec le screening de traitements haut débit d'anti-tumoraux sur des micro-tumeurs vascularisés (*Ko et al., 2019; Meng et al., 2019*). De manière intéressante, Meng et coll. ont exploité les avantages de la bioimpression 3D pour positionner de manière extrêmement précise des amas de cellules tumorales, stromales et endothéliales dans leur système (*Meng et al., 2019*).

Les modèles 3D constituent des plateformes intéressantes pour évaluer l'effet, la cinétique et la localisation d'agents nanothérapeutiques. En effet, Goodarzi et coll. développent un modèle 3D de micro-puits d'agarose permettant la formation d'une centaine de sphéroïdes de manière reproductible, associée à une microscopie optique à haute résolution *in situ* (*Goodarzi et al., 2021*). Pour preuve de concept, ils étudient la pénétration et la distribution des nanoparticules AGuiX[®], senseurs de radiothérapie, au sein de sphéroïdes de cancers colorectaux. Contrairement aux modèles *in vivo*, cette approche permet de déterminer, de manière précise, une localisation subcellulaire au sein des lysosomes et des mitochondries (*Goodarzi et al., 2021*). Ces nouvelles plateformes partagent des caractéristiques similaires telles qu'une fabrication simple et rapide, un format miniature, un seul sphéroïde vascularisé par puits et une imagerie automatisée.

Objectifs du travail de thèse

Notre équipe de recherche étudie le rôle de l'hypoxie et des protéines matricielles au cours de l'angiogenèse physiologique et associée à des pathologies ischémiques ou tumorales, ainsi que dans le cadre de travaux d'ingénierie tissulaire à des fins d'application en médecine régénératrice. L'équipe conduit depuis de nombreuses années des études sur :

- i)** le ccRCC, identifiant notamment la protéine ANGPTL4, induite par l'hypoxie et associée à la matrice extracellulaire, comme un marqueur diagnostique de cette tumeur primaire (*Le Jan et al., 2003; Verine et al., 2010; Varna et al., 2015*);
- ii)** les modèles *in vitro* 3D d'étude de l'impact du microenvironnement sur les processus d'angiogenèse (*Cazes et al., 2006; Bignon et al., 2011; Beckouche et al., 2015; Gorin et al., 2016; Umana-Diaz et al., 2020; Atlas et al., 2021; Liabotis et al., 2022*);
- iii)** la contribution de LOXL2 à la régulation de l'angiogenèse (*Bignon et al., 2011; Umana-Diaz et al., 2020*), au remodelage matriciel dans la progression tumorale (*Vallet et al., 2020*) et de façon plus générale aux modifications des propriétés mécaniques et structurales du microenvironnement.

Dans ce contexte, mon travail de thèse a eu pour objectifs d'étudier : i) la vascularisation aberrante du ccRCC en interaction avec des cellules tumorales invasives; ii) la sensibilité de ces structures vasculaires aux traitements anti-angiogéniques; iii) le rôle des propriétés du microenvironnement tumoral sur les stratégies d'invasion et sur la formation de la vascularisation aberrante.

Pour atteindre ces objectifs et fort de l'expertise de l'équipe, j'ai mis au point un modèle *in vitro* 3D de micro-tumeurs vascularisées. Mes travaux s'articulent donc autour de 2 axes :

- Les micro-tumeurs du ccRCC révèlent une vascularisation aberrante résistante aux traitements anti-angiogéniques.

L'objectif de ce travail a été d'étudier l'architecture 3D des structures vasculaires spécifiques du ccRCC, leur formation au sein de la masse tumorale et leur réponse aux traitements. Ce travail a été réalisé en collaboration avec l'équipe du Pr. Guilhem Bousquet, oncologue à l'hôpital Avicenne à Bobigny et le Pr. Mathilde Sibony, anatomo-cytopathologiste au département de pathologie de l'hôpital Cochin à Paris. Nous avons effectué

une caractérisation tridimensionnelle de la vascularisation du ccRCC fondée sur des critères morphologiques, à partir d'échantillons de patients et de xénotransplantes issues d'un modèle PDX en souris. Ces travaux ont permis de mettre en évidence la présence de structures vasculaires aux formes et dimensions aberrantes. Par le développement de micro-tumeurs *in vitro* 3D, nous avons reproduit cette vascularisation spécifique du ccRCC afin d'en étudier sa formation et sa réponse aux traitements. Comme preuve de concept, les micro-tumeurs vascularisées ont révélé la spécificité de traitements de première ligne du ccRCC, ciblant avec une plus forte affinité l'invasion tumorale ou la morphogénèse vasculaire, selon le traitement appliqué. De plus, nous avons mis en évidence pour la première fois la résistance de ces structures vasculaires aberrantes au traitement anti-angiogénique par le sunitinib.

Dans le ccRCC, cette vascularisation aberrante entoure les îlots tumoraux, révélant d'étroites interactions entre cellules endothéliales et tumorales invasives. De plus, les propriétés physiques et mécaniques de la MEC sont fortement altérées, j'ai notamment observé la présence d'une forte accumulation de fibres de collagène I au contact des structures vasculaires aberrantes. Dans ce contexte, les micro-tumeurs *in vitro* 3D constituent un outil puissant pour aborder le deuxième axe de ce travail :

- Les stratégies d'invasion et la vascularisation spécifique du ccRCC sont déterminées par les propriétés de la MEC

Par des approches de sphéroïdes tumoraux inclus en hydrogels de collagène I peu ou fortement fibrillés, ce travail a permis de mettre en évidence que les propriétés physiques et mécaniques de la MEC déterminent les stratégies d'invasion des cellules tumorales du ccRCC pouvant être individuelle ou collective. De plus, par des interactions cellulaires hétérotypiques, des cellules du ccRCC non invasives sont capables de migrer par un mécanisme meneur-suiveur, processus également régulé par les propriétés de la MEC. Ces changements de stratégies d'invasion sont associés à l'activation de la voie de signalisation YAP. Ce travail souligne la capacité des cellules tumorales du ccRCC à s'adapter à leur microenvironnement par l'activation de voies de mechanotransduction relayées par YAP.

Au sein de micro-tumeurs, nous avons démontré que l'invasion tumorale et la formation de la vascularisation aberrante sont réciproquement dépendantes. En effet, au contact de la vascularisation du ccRCC, les cellules tumorales changent leur stratégie d'invasion. De plus, l'altération de la mechanotransduction des cellules tumorales inhibe la

Les objectifs du travail de thèse

formation des structures vasculaires aberrantes. La formation de cette vascularisation spécifique du ccRCC semble donc déterminée par le remodelage de la MEC associé à l'invasion des cellules tumorales. Ces travaux de thèse sont présentés ci-après sous forme de deux articles en préparation dont je suis respectivement co-premier auteur et premier auteur.

Résultats

- I. Les micro-tumeurs du ccRCC révèlent une vascularisation aberrante résistante aux traitements anti-angiogéniques

ccRCC Micro-Tumors Reveal Aberrant Vasculature Resistant to Anti-Angiogenic Treatment

Noémie Brassard-Jollive^{1,2*}, Yoann Atlas^{1,2*}, Camille Compère^{1,2}, Corinne Ardidie-Robouant¹, Philippe Mailly¹, Morad El Bouchtaoui³, Virginie Lelarge^{1,2}, Guillaume Blot¹, Stéphanie De Oliveira⁴, Christophe Helary⁴, Christophe Leboeuf³, Mathilde Sibony⁵, Guilhem Bousquet^{3,6,7}, Stéphane Germain¹⁺, Laurent Muller¹⁺, Catherine Monnot¹⁺.

¹ Center for Interdisciplinary Research in Biology (CIRB), College de France, CNRS, INSERM, Université PSL, Paris, France.

² Sorbonne Université, Collège doctoral, Paris, France

³ Université Paris Cité, INSERM, UMR_S942 MASCOT, Paris, France.

⁴ Laboratoire de Chimie de la Matière Condensée de Paris (LCMCP), Sorbonne Université, CNRS, 75005 Paris, France

⁵ Hôpital Cochin, Université Paris Cité, Department of Pathology, Paris, France.

⁶ Université Sorbonne Paris Nord, Villetaneuse, France.

⁷ AP-HP, Hôpital Avicenne, Oncologie Médicale, Bobigny, France.

* and + : Contributed equally to this work

Corresponding Authors: laurent.muller@college-de-france.fr; catherine.monnot@inserm.fr

ABSTRACT

Within the tumor microenvironment, hypoxia-induced vascular endothelial growth factor (VEGF) triggers the formation of a chaotic vascular network. Clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) is mainly caused by alterations of the Von Hippel Lindau protein, leading to the epithelial-mesenchymal transition, tumor invasion and hypervascularization characterized by an aberrant vascular architecture partially described in the literature. Previous conflicting studies on the potential correlation between the ccRCC grade and the microvascular density unveil the inadequacy of the parameter to characterize these vascular structures. Furthermore, first-line therapy of metastatic ccRCC targeting the VEGF axis increases progression-free survival but also shows patient resistance.

The goal of this study is to investigate the tridimensional architecture of the ccRCC-specific vascular structures, their formation into the tumor mass and their responses to treatments. For this purpose, we analyzed the vascular architecture of human ccRCC samples and patients- derived xenografts in mouse. Using 3D microscopy and reconstruction on clarified samples, we identified the specific features of the ccRCC vascular structures, presenting peculiar dimensions and shapes. Using innovative approaches, we engineered 3D *in vitro* vascularized spheroids, which recapitulated these aberrant vascular structures, provided determinant clues of their formation process and revealed event-time course between invasion and capillary formation by dynamic analysis. Sensitivity of the 3D vascularized spheroids to first- line treatments was assessed and revealed resistance to anti-angiogenic therapy. The 3D *in vitro* model highlights the specific features of the ccRCC vasculature, its formation process and the resistance mechanism. This model holds great promise for relevant assessment of each patient response to accurate therapy.

Significance: A co-culture-engineered model integrating the tumor spheroid invasion and the vascular morphogenesis recapitulates the ccRCC-specific endothelial structures and their responses to treatments.

Key-words: ccRCC, tumor vascularization, 3D models, anti-angiogenic therapy.

Introduction

The hypoxic microenvironment of solid tumors is composed of heterogeneous cell populations in a remodeled extracellular matrix (ECM) and constitutes a niche for tumor cell invasion (*Polyak et al., 2009; Dvorak et al. 2011; Kai, Drain, and Weaver, 2019*). Hypoxia-induced expression of angiogenic factors including vascular endothelial growth factor (VEGF) strongly stimulates endothelial cells and results in the formation of a chaotic vascular network displaying tortuous and dead-end capillaries (*Baluk et al., 2005; McIntyre and Harris, 2015*). Clear cell renal cell carcinoma (ccRCC), the most prevalent subtype of the renal carcinomas, constituting approximately 80% of all cases is highly aggressive, can rapidly lead to metastasis and poor clinical prognosis. The ccRCC is mainly caused by alteration of the von Hippel-Lindau (VHL) tumor suppressor gene (*The Cancer Genome Atlas Research Network, 2013*), inducing persistent high levels of the Hypoxia-Inducible Factors (HIF) and subsequent elevated transcription of many genes such as vascular endothelial growth factor (VEGF), hepatocyte growth factor (HGF), mesenchymal-epithelial transition factor (MET) (*Ciamporcero et al., 2015; Hsieh et al., 2017*). The HIF-induced pseudo-hypoxia leads on one hand to epithelial- mesenchymal transition (EMT), facilitating tumor cell migration and invasion, therefore supporting the aggressive tumor progression and metastasis (*Thiery and Sleeman, 2006*) and on the other hand to hypervascularization revealed by the high intratumoral microvessel density (MVD) (*Hlatky, Hahnfeldt, Folkman, 2002*). However, ccRCC vasculature seems complex and distinct from the vascular network reported in other solid tumors. Indeed, many conflicting studies report controversial correlation between MVD and the Furhman grade or the clinical outcome of ccRCC patient structures (*Anastassiou et al., 1996; Sabo et al., 2001; Rioux-Leclercq et al., 2001; Baldewijns et al., 2007; Minardi et al., 2005*). Interestingly, Qian and coll. described differentiated and undifferentiated features of blood vessels in ccRCC and reported that tumors with a high density of the latter type have a poor prognosis (*Qian et al., 2009*). However, there are growing evidences that the microvessel architectural complexity would be behind the mismatch between the MVD and ccRCC clinical assessment. Consistent with this hypothesis, the microvessel fractal dimension has been proposed as a parameter of microvascular complexity and positively correlated with RCC patient survival (*Sabo et al., 2001*). More recently, a study based on the quantification of morphometric parameters revealed two distinct vascular patterns in ccRCC (*Ruiz-Sauri et al., 2018*).

Despite these intriguing reports on the pattern specificity of the ccRCC microvessels, the tridimensional morphology of these structures remains unknown. This is all the more necessary as the ccRCC treatments are still defective in many cases. Indeed, therapies targeting the VEGF or mTOR signaling axis such as sunitinib and temsirolimus, respectively, were approved as the first-line setting for the treatment of metastatic RCC for many years (*Hsieh et al., 2017*). However, whereas approximately 50% of the patients responded to sunitinib and 43% displayed a disease stabilization, 7% had progressive disease at first evaluation due to intrinsic resistance. Moreover, most of the patients with clinical benefit acquired resistance and relapse (*Motzer et al., 2007*). However, the anti-angiogenic

treatments preserve an important part in the clinical care of ccRCC, even when associated with immunotherapy (*Motzer et al., 2022*).

The goal of this study was to engineer a pertinent and innovative 3D *in vitro* model mimicking the ccRCC-specific vasculature and providing a platform for assessing its sensitivity to current and future treatments (*Brassard-Jollive et al., 2020*). Since the fibroblasts constitute an active cell compartment in ccRCC and abundantly secrete collagen I (*Bond et al., Cancers, 2021; Meylan et al., 2022*), we recapitulated the tumor microenvironment by embedding tumor and endothelial cells in collagen I hydrogel and culturing them in fibroblast-conditioned medium. We used a human invasive ccRCC cell line, RCC4 defective for VHL, displaying EMT features or its corresponding VHL-restored line, RCC4-VHL, displaying epithelial-like hallmarks and the primary culture of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). The model relevancy proceeds from the concomitant events occurring during the invasive growth of the ccRCC and the morphogenesis of the endothelial network. In our model, capillaries form and converge towards the spheroid mass which invades the collagen I-containing microenvironment.

Interestingly, based on a 3D morphological analysis, we identified and characterized specific-ccRCC endothelial structures, named ponds and occasionally connected to sheets, in human samples and in a xenograft model. For the first time, we mimic these aberrant vascular structures *in vitro* and we demonstrated the low sensitivity of this vasculature to sunitinib.

Materials and Methods

Human and mouse samples

Human ccRCC sample engraftment, growth and CD31 immunohistostaining were performed as previously described (*Varna et al., 2015*). For 3D reconstruction, xenografts were fixed with 4% paraformaldehyde solution and sectioned into 500 µm slices using vibratome (HM 650 V, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Sections were then washed 3 times with PBS and permeabilized for 2 days in PBS containing 2% triton-X-100 (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Mo, USA). Immunostaining and fluorescent labeling were performed in PBS-Triton-X-100 0.01%. Endothelial structures were stained with CD31 antibody (550274, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) for 1 day, followed for some sections by Collagen IV staining. Nuclei were stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Invitrogen, Carlsbad, Ca, USA). Stained sections were then clarified using RapiClear®1.52 solution (SunJin Lab, Taïwan). Acquisitions of 3D tiles were performed using a LSM 980 confocal-Airyscan 2. Tiles were stitched in Zen software and 3D reconstructions were performed with Imaris software.

Cell lines and culture

pVHL-defective cell lines derived from sporadic ccRCC (RCC4) and corresponding cell lines in which wild-type pVHL was stably expressed (RCC4-VHL) were a gift from Patrick H. Maxwell (Cambridge Institute for Medical, UK). Fluorescent RCC4 and RCC4-VHL clones were generated by stably expressing cytosolic fluorescent protein GFP or fluorescent reporter of filamentous actin LifeAct-Ruby (LAR), respectively and sorted by FACS analysis. Among many clones growing from single cell culture and characterized, two were routinely used for 3D studies, i.e. GFP-1, GFP-2 for RCC4 cells and LAR-1, LAR-2 for RCC4-VHL cells. Cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Invitrogen) supplemented with fetal bovine serum (Invitrogen). Adult normal human dermal fibroblasts (NHDF, PromoCell, Heidelberg, Germany) were grown in fibroblast growth medium 2 (FGM2, PromoCell). Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were prepared from cords provided by AP-HP, Hôpital Saint- Louis, Unité de Thérapie Cellulaire, CRB-Banque de Sang de Cordon, Paris, France (authorization number AC-2016-2759) (*Liabotis et al., 2022*) and grown as previously described (*Bignon et al., 2011*) in endothelial cell growth medium 2 (ECGM2, PromoCell). Experiments were performed between passages 1 and 5 for each primary cell culture.

Conditioned media (CM) of RCC4, RCC4-VHL and NHDF cells were prepared in ECGM2 depleted of VEGF₁₆₅ (hereafter called VEGF) with confluent cells. After two days, media were refreshed and then collected every day.

Immunoblotting and ELISA assay

Confluent ccRCC cell lines grown for 3 days were lysed in 25 mM Tris pH 7.5, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.5% DOC, 0.5% NP40, and protease inhibitor cocktail, centrifuged for 30 minutes at 15 000g. Supernatants were treated with Laemmli buffer. Proteins were separated by SDS- PAGE and transferred to PVDF membranes. As primary antibody, anti-SNAIL monoclonal antibody (1/1000, Merck Millipore, Darmstadt, Allemagne), anti-LOX monoclonal antibody (1/1000, Abcam), anti-LOXL2 monoclonal antibody (1/500, Cell Signaling) and anti-

actin polyclonal antibody (1/5000, Abcam, Cambridge, UK) were used. Immunologic detection was performed with alkaline phosphatase–conjugated secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch, Ely, Cambridgeshire, UK), using Pierce ECL Western (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) as a substrate. According to similar culture conditions, cell- derived CM were centrifuged at 4°C for 10 minutes at 0.9 rpm to eliminate cellular debris. The VEGF concentration was determined by ELISA according to the manufacturer's instructions (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Total proteins were used as control. The experiment was performed in duplicate.

Collective migration and proliferation assays

Collective migration of ccRCC cell lines or HUVEC were monitored by live-cell imaging system (IncuCyte Zoom, Essen BioScience, Ann Harbor, MI, USA). Cells (15000 cells/well for RCC4 and 20000 cells/well for HUVEC) were seeded in a 96 well-plate (Corning, NY, USA) containing Oris stoppers (Platypus Technologies, Madison, WI, USA). Stoppers were removed the day after and complete growth medium was replaced by serum-depleted medium (2% FBS) for ccRCC cell lines or by ccRCC cell line-CM for HUVEC. The assay was monitored for 24 hours with acquisition every 6 hours for ccRCC cell lines or every 2 hours for HUVEC, under 4x magnification. Data were analyzed using the IncuCyte analysis software, which quantified cell surface area coverage as confluence values. For ccRCC cell lines and HUVEC, migration rate was calculated using IncuCyte analysis software and ImageJ respectively.

Proliferative behaviors of ccRCC cell lines were monitored by live cell imaging system (IncuCyte Zoom). Cells (1000 cells/well) were seeded in a 96 well-plate (Corning) in DMEM supplemented with 7.5% FBS. The assay was monitored for 72 hours with acquisition every 3 hours, under 20x magnification. Data were analyzed using the IncuCyte analysis software, which quantified cell surface area coverage as confluence values. The growth curve $f(t)=\ln(\text{confluence mask } \%)$ was drawn and a linear regression was established. The generation time (G) which is the time interval required for the cells to divide have been determined from the slope (μ_{expo}) of this linear regression and from this formula: $G = \ln(2)/\mu_{\text{expo}}$.

Spheroid formation and invasion assay

Spheroids were formed using the hanging drop assay. Briefly, cells were seeded at 250, 500 or 1000 cells per 25 μL drop of DMEM medium containing 0.06% of methylcellulose (Sigma-Aldrich) and supplemented with 17.5% of fetal bovine serum (Invitrogen). Drops were led onto the inner side of petri dish lid, turned upside down on top of the petri dish filled with PBS and then placed into incubator during 48 hours.

Spheroid invasion assays were performed using the fluorescent clones RCC4-GFP and RCC4-VHL-LAR. Spheroids (500 cells) were embedded in 2 mg/mL home-made collagen I solution (*Gobeaux et al., 2008*), mixed with M199 10x solution (Sigma-Aldrich) buffered at pH6.5 at 20°C by NaHCO_3 solution. Spheroids were grown in FB96 phenoplates (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) for 3 days in various media: either DMEM, or in endothelial medium depleted (ECGM2) in epidermal growth factor (EGF), basic fibroblast growth factor,

insulin-like growth factor, VEGF and hydrocortisone ($\Delta 5$) or containing EGF ($\Delta 5$ +EGF) or depleted in VEGF only (Δ VEGF) or in NHDF-CM.

Capillary formation assays

3D angiogenesis assays were performed using two different approaches. Conditioned media were changed every day in both models. The first approach consists in encapsulating HUVEC at 1.5×10^6 cells/mL in 2 mg/mL pH 7 collagen hydrogel, as for the spheroid invasion assay. Cells were cultured for 5 days in presence of different conditioned media (*Atlas et al., 2021*). For capillary stabilization assay, capillary network was formed for 5 days in presence of NHDF-CM supplemented with VEGF at 10 ng/mL and further cultured for 4 days in presence of different conditioned media.

The second approach, using angiogenesis assay from Cytodex beads has been previously described (*Liabotis et al., 2022*). Capillary sprouts were cultured for 4 days in different conditioned media supplemented with 5 ng/mL VEGF.

Vascularized spheroid model

HUVEC were co-encapsulated at 1.5×10^6 cells/mL with RCC4 or RCC4-VHL spheroids (500 cells) in 2 mg/ml collagen hydrogel. Collagen hydrogel is formed as described above. Cells were cultured for 4 to 7 days in presence of fibroblast-conditioned medium (NHDF-CM).

To assess the drug responses, RCC4 spheroids, HUVEC cells or both were treated by temsirolimus (5, 10 or 25 μ M), crizotinib (0.05 or 0.5 μ M) or sunitinib (0.05, 0.5 or 5 μ M). Drugs were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO). For drug effects on tumor invasion and capillary formation, vehicle (DMSO), temsirolimus, crizotinib or sunitinib were added into the cell-containing hydrogels before polymerization. The medium containing the same drugs was changed after one day culture. Hydrogels were fixed at 2 days culture.

For sensitivity of the pre-existing structures, vascularization of spheroids was promoted for 5 days in presence of NHDF-CM before the sunitinib treatment (0.05 or 0.5 μ M). Medium was changed every day.

For kinetic analysis, fluorescent HUVEC-LAR or HUVEC-GFP were respectively co-encapsulated at 1.5×10^6 cells/mL with RCC4-GFP or RCC4-VHL-LAR spheroids (500 cells) in 2 mg/mL collagen I hydrogel. Cells were cultured for 6 days in presence of NHDF-CM and confocal acquisitions of the same spheroid were performed every 10 or 12 hours.

Immunostaining

Hydrogels were fixed with 4% paraformaldehyde for 30 minutes, washed 3 times with PBS and permeabilized for 30 minutes in PBS containing 0.5% triton-X-100 (Sigma-Aldrich). Immunostaining and fluorescent labeling were performed in PBS-Triton-X-100 0.01%. Actin was stained with Phalloidin coupled to Alexa Fluor 488 or Alexa Fluor 555 (1/200, Invitrogen). Nuclei were stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Invitrogen). In the vascularized spheroid model, endothelial cells were stained with primary antibody directed against CD31 coupled to Alexa Fluor 647 (1/200, 215912, Abcam).

Image acquisition and quantifications

Capillary network formation and stabilization were investigated by a Zeiss Observer Apotome II using 10x/0.45 and 40x/1.1 objective lenses. Basement membrane deposition and multicellular spheroid invasion were investigated by a Zeiss spinning-disk confocal W1 using 25x/0.8 and 40x/1.1 objective lenses.

2-dimension time-lapse acquisitions were performed using the Incucyte device placed in a CO2 incubator. RCC4 cells (3000 cells/cm²) were seeded in a μ -Slide 8 Well (ibidi, Gräfelfing, Germany). The assay was monitored for 72 hours with acquisition every 30 minutes, under 20x magnification.

For capillary network quantification, image segmentation and masks quantification were process with home-made software developed on Matlab (Matworks, Natick MA USA) and using MIJ (<http://bigwww.epfl.ch/sage/soft/mij/>) to interact with ImageJ (NIH, Bethesda MD, USA) (<http://www.imagej.nih.gov/ij>). The software is based on the Matlab function Skel2Graph3D (*Kerschnitzki et al., 2013*) and ImageJ functions *Skeletonized* and *Analyze Skeleton* (*Arganda-Carreras et al., 2010*) to create and analyze the 3-dimensional vessel skeleton parameters. Connectivity index is adapted from the graph theory and calculated by the following formula: (branch number – skeleton number)/ branch number.

Statistical Analysis

Statistical analyses were conducted using Prism software version 8.0 (GraphPad Prism). All data provide from at least three independent experiments (n=3). Numerical variables are expressed as the mean \pm SEM. The normality of the distribution was tested with the D'Agostino-Pearson Normality test and Shapiro Wilks Normality test. When the distribution of the data for each group respected the normality law and the variance of the group was homogeneous, a one-way ANOVA were performed to compare two group means. When the distribution of at least one of the groups did not follow the normality law or is too small to be tested, comparison between groups were performed with the nonparametric Kruskal-Wallis test. Differences were considered significant at p<0.05.

RESULTS

Aberrant endothelial structures infiltrate the ccRCC microenvironment

The ccRCC samples are characterized by specific features revealed by immunohistological analysis. Tumor cells displayed clear cytoplasm due to loss of cytoplasmic lipid and glycogen during the tissue processing and were organized in compact nests or large columns delimited by an abundant microvasculature, revealed by the CD31 immunostaining (Fig.1A). Although the high level of intra-tumoral microvascular density (MVD) in ccRCC provides a matter for conflicting debate, our precise analysis highlighted some peculiar microvascular patterns that have rarely been studied up to now. Indeed, samples revealed very long CD31⁺ structures extending over several hundred micrometers through tissue section and containing narrow or collapsed lumen as revealed by high magnification (Fig.1A, left panels) as well as large and irregular CD31⁺ structures presenting a lumen diameter of more than 100 micrometers and occasionally containing red blood cells (Fig.1A, right panels). Xenografts of human ccRCC samples subcutaneously implanted in nude mice provided further characterization of these intra-tumoral microvascular patterns (Fig.1B). Tumor cells piled up in dense masses delineated by abundant CD31⁺ structures, either long and thin or dilated and irregular, strikingly similar to those observed in human ccRCC samples (Fig.1B left and right panels, respectively). According to the intra-tumoral heterogeneity, xenograft sections displayed a whole diversity of microvascular patterns, some of them only containing the long structures, some only the dilated ones and some the interconnecting two types of structures. Many previous works reported that the MVD assessment from ccRCC sections provided controversial parameters for determining the tumor grades and prognosis (Yao *et al.*, 2007; Ruiz-Sauri *et al.*, 2018).

We here performed for the first time the 3D morphometric analyses of the CD31⁺ structures, since the outlier dimensions observed in the tissue sections suggested even higher volumes and aberrant shapes in the tumor microenvironment. For this purpose, 500 µm-thick sections of the ccRCC-derived xenografts were stained for CD31 and nuclei and clarified. Mosaic imaging of a representative xenograft sample associated with 3D reconstruction revealed the large and interconnecting network of dilated and long endothelial structures (Fig.1C and Movie 1). The parallel, long and thin structures were separated by a tumor mass containing a high density of nuclei and which one of them was connected to two dilated vesicles. These endothelial structures dramatically differed from the capillaries both for their dimensions and 3D patterns. We therefore defined the flat endothelial structure being hundreds of µm long as a “sheet” and the irregularly dilated endothelial structure being hundreds of µm long and large as a “pond”, characterized by a nucleus-free cavity, as revealed by the orthogonal view of the 3D reconstruction (Fig.1C). Optical sections focused on a sheet showed the endothelial cells continuously aligned and delineated by two regular lines of basement membrane, revealed by collagen IV immunostaining. The corresponding orthogonal view further confirmed the flattened and wide pattern (Fig.1D). Optical sections focused on a pond showed a large and irregular cavity delineated by an endothelial cell monolayer, surrounded by a continuous polarized basement membrane (Fig.1E). The pond cavity appeared similar to the lumen of the CD31⁺ structure observed in human ccRCC (Fig.1A). Interestingly, some ponds contained a high density of red blood cells, revealed by autofluorescence, uniformly distributed in the cavity but also aggregated in the narrow

connection to other endothelial structures suggesting a defective perfusion (Supplementary Fig.S1 and Movie 2).

Our results demonstrate for the first time that human ccRCC samples and ccRCC-derived xenografts subcutaneously implanted in mice consistently display aberrant endothelial structures characterized by outlier dimensions and 3D patterns. These structures defined as ponds interconnected by sheets infiltrate the tumor mass.

Spheroid invasiveness induced by defective VHL in RCC4 cell line is regulated by factors secreted in the tumor microenvironment

Since deciphering the formation of the aberrant ccRCC endothelial structures was a major issue, we set up 3D *in vitro* models using fluorescent RCC4 (GFP) and RCC4-VHL (LAR) clones. EMT features of the clones (GFP-1 or -2 and LAR-1 or -2) and the corresponding parental cell lines (RCC4 and RCC4-VHL, respectively) were first analysed in 2D culture for HIF target gene expression, cell behavior, proliferation and migration. While VHL-deficient RCC4 cell line and clones expressed the transcription factor SNAIL1, hallmark of the EMT signature (Fabbri et al., 2020), restoration of VHL suppressed SNAIL1 expression for both RCC4-VHL cell line and clones (Supplementary Fig.S2A). Lysyl oxidase (LOX) and lysyl oxidase-like 2 (LOXL2), two hypoxia-targeted ECM-modifying enzymes up-regulated in ccRCC (Germain et al., 2010; Di Stefano et al., 2016; Hase et al., 2014), were massively detected by immunoblot in the whole lysates of RCC4 cell line and clones grown in normoxic or hypoxic conditions, according to the regulatory pathway of VHL-induced pseudo-hypoxia (Supplementary Fig.S2B and C). On the contrary, LOX and LOXL2 amounts were very low in normoxia but slightly increased in RCC4-VHL cell line and clones grown in hypoxia. Furthermore, LOXL2 amount was strongly increased in the secretion medium of RCC4 cell line and clones grown in normoxic or hypoxic conditions when compared to similar media of RCC4-VHL cell line and clones (Supplementary Fig.S2B and D). Consistent with these results, immunofluorescence analysis revealed that LOXL2 accumulated in a dense structure partially covering the nucleus and corresponding to the Golgi apparatus whereas it was barely detectable in RCC4-VHL cells (Supplementary Fig.S2E).

EMT features were also revealed by behavior of cells cultured on plastic (Supplementary Fig.S2F) or collagen I coating (Supplementary Fig.S2G). RCC4 cells were isolated and homogeneously distributed, whereas RCC4-VHL cells displayed a cohesive organization in clusters, providing an epithelium-like appearance, independently of the coating. While RCC4 and RCC4-VHL cell lines or clones displayed similar generation times (Supplementary Fig.S2H), cell migration of RCC4-VHL cell lines or clones was significantly decreased when compared to those of RCC4 cells, as revealed by the time-lapse quantification of the collective migration assay (Supplementary Fig.S2I and J). Furthermore, the parental cell line and their corresponding fluorescent clones of RCC4 or RCC4-VHL respectively, displayed statistically similar proliferation and migration rates. These results indicate that VHL gene alteration in the ccRCC-derived cell line or corresponding fluorescent clones leads to the loss of the epithelial features and promotes the EMT features.

The behaviors of the RCC4 or RCC4-VHL cells were then assessed in 3D settings using the fluorescent clones. Spheroids of either 250, 500 or 1000 cells were formed in hanging drops for two days (Supplementary Fig.S2K). Their compaction was surprisingly slightly higher for RCC4 than for RCC4-VHL cells. We further investigated the 500 cell-spheroids, for convenience of microscopy analysis. RCC4 or RCC4-VHL spheroids were embedded in collagen I hydrogel

and analyzed either immediately after (0 hour) or 6 hours later (Fig.2A). Within these first 6 hours, the RCC4-VHL spheroids tightly compacted whereas the RCC4 spheroids protruded, revealing the cohesive or invasive behavior, respectively, consistent with our data on the 2D cell features. Since the suitable medium for tumor growth and capillary formation may contain soluble molecules, cytokines and growth factors secreted by the tumor and stromal cells, spheroid growth was performed in RCC4-culture medium (DMEM), or in endothelial medium depleted (ECGM2-) in growth factors ($\Delta 5$) or containing epidermal growth factor ($\Delta 5$ +EGF) or depleted in VEGF only (Δ VEGF) or in normal human dermal fibroblast-conditioned medium (NHDF-CM). In order to characterize the invasive capacities, spheroid area, perimeter and circularity index were measured after 3 days of culture (Fig.2B-C). RCC4-VHL spheroids did not invade the hydrogel and supported a circular shape, with exception of the fibroblast- conditioned medium which induced sparse and short protrusions. Moreover, optical section at the spheroid center showed a regular organization of the RCC4-VHL cells around a lumen revealing a cyst-like structure (Fig.2D). Its formation was regulated by secreted molecules and growth factors since fibroblast-conditioned medium shaped the spheroids displaying thin cell layers, surrounded by a regular and dense ring of cortical actin and delimiting a large cavity (Fig.2E). On the contrary, RCC4 spheroids exhibited a highly invasive behavior and numerous long and multicellular protrusions, which are revealed by a dramatically increase of spheroid area and perimeter and by a collapsed circularity index when compared to similar parameters for RCC4-VHL spheroids (Fig.2B-C). The invasive capacities of the RCC4 spheroids were regulated by EGF and soluble factors secreted by fibroblasts, as revealed by the statistically significant increase of spheroid area and perimeter cultured in ECGM2- $\Delta 5$ +EGF, ECGM2- Δ VEGF or NHDF-CM, when compared to similar parameters for spheroids cultured in DMEM (Fig.2C). Optical section at the spheroid center revealed the growing protrusions around the nucleus-free print of the former spheroid. This invasive pattern was similar in DMEM and NHDF-CM (Fig.2D).

Our results demonstrate that the RCC4 spheroids display the EMT hallmarks and highly invasive capacities, stimulated by paracrine factors, present in the tumor microenvironment, such as EGF and fibroblast secreted-factors. RCC4 spheroids grown in fibroblast growth medium are appropriate to decipher the role of tumor cells in the formation of the ccRCC- specific vasculature.

RCC4-secreted factors alter capillary morphogenesis and integrity

We first assessed the paracrine effects of RCC4 cells on endothelial cells. According to the upregulation of VEGF mRNA (*Maxwell et al., 1999*) and increase of VEGF secretion in RCC4 compared to RCC4-VHL (*Perier et al., 2011*) previously reported, we observed a two-fold increased amount of secreted VEGF by RCC4 cells when compared to those of RCC4-VHL cells (Supplementary Fig.S3A). The RCC4-conditioned medium stimulated the 2D collective migration of primary culture of human endothelial cells (HUVEC) more than 4-fold higher than the RCC4-VHL-conditioned medium, as revealed by the time-lapse assay performed over 20 hours (Supplementary Fig.S3A). Effect of RCC4- or RCC4-VHL-conditioned medium was then assessed on the formation of capillary network in collagen I hydrogel, using a 3D assay, as we recently described (*Atlas et al., 2021*) (Fig.3A). Human endothelial cells were cultured in presence of various cell-derived conditioned media. Fibroblast-conditioned medium was used as reference as we previously reported it favorable content in cytokines and growth factors for endothelial capillary growth, polarization and lumen formation (*Gorin et al., 2016*).

Interestingly, we showed that RCC4- or RCC4-VHL-conditioned medium alone was not sufficient to induce capillary formation (Fig.3A). Addition of fibroblast-conditioned medium stimulated the formation of the capillary network, although presenting statistically decreased capillary length, branch point number and connectivity index, when compared to fibroblast- conditioned medium alone (Fig.3B). Furthermore, mixing fibroblast- and RCC4-VHL- conditioned media induced a capillary network displaying a statistically higher degree of capillary connectivity than those obtained with mixed fibroblast- and RCC4-conditioned media.

The use of a 3D angiogenesis assay allowing the sprouting of polarized and lumen-containing capillaries out of fluorescent beads embedded in hydrogel (*Atlas et al., 2021; Liabotis et al., 2022*) contributed to further decipher the endothelial cell migration in the hydrogel (Supplementary Fig.S3B). While fibroblast-conditioned medium stimulated the formation of long and branched capillaries, RCC4-conditioned medium alone stimulated 3D endothelial cell migration without inducing capillary formation (Supplementary Fig.S3B-C). Interestingly, mixed fibroblast- and RCC4-conditioned media induced the capillary sprouting although to a less extent than the fibroblast-medium alone. In order to further characterize the growing capillaries, we investigated the basement membrane deposition by 3D reconstruction (Supplementary Fig.S3D) and optical section (Supplementary Fig.S3E). Fibroblast-conditioned medium induced the formation of branched and polarized capillaries containing a lumen, delimited by an endothelial monolayer and wrapped in a continuous basement membrane. Strikingly, the mixed fibroblast- and RCC4-conditioned media induced the formation of discontinuous capillaries, displaying some segments stained for collagen IV but lacking in CD31 staining, consisting in empty sleeves of basement membrane. These data corroborate previous *in vivo* findings demonstrating that capillaries regress in a systematic sequence of events including apoptosis of endothelial cells and formation of empty basement membrane sleeves after inhibition of VEGF signaling (*Baffert et al., 2006*). We here report for the first time using the 3D *in vitro* models that the tumor-secreted factors counteract the paracrine angiogenic effect of the fibroblasts, either by inducing endothelial cell apoptosis or migration out of the basement membrane track. These data demonstrate that the RCC4- secreted factors stimulate the endothelial migration both in 2D and 3D settings but is not sufficient to trigger 3D capillary morphogenesis. Moreover, the tumor-secreted factors inhibit the formation of dense and highly connected capillary network induced by the fibroblast- secreted factors.

To assess the paracrine effect of RCC4 cell lines on capillary stabilization, pre-existing stable capillary network induced by fibroblast-conditioned medium was treated by the cell- derived conditioned media and compared to the network maintained in the fibroblast- condition medium (Fig.3C). RCC4- and RCC4-VHL-conditioned media induced a statistical reduction of capillary length and branch point number when combined with fibroblast- conditioned medium and even a further reduction when applied alone (Fig.3D). These media however did not affect the capillary number and the connectivity index, with the exception for the RCC4-conditioned medium alone. Our data therefore show that RCC4 and RCC4-VHL- conditioned media induced capillary regression and that RCC4-secreted factors strongly destabilize the fibroblast-induced capillary network. Furthermore, we here provide evidence that the paracrine regulation by tumor and fibroblast-secreted factors is involved in the capillary morphogenesis and integrity and is not sufficient to induce the ccRCC-specific microvasculature.

Vascularized micro-tumors recapitulate the ccRCC-specific endothelial structures

We therefore engineered a pertinent 3D co-culture model of human tumor spheroids and endothelial cells co-embedded in collagen I hydrogel and cultured for 4 to 7 days in fibroblast- conditioned medium (Fig.4A). RCC4- and RCC4-VHL spheroids both displayed an invasive behavior in the collagen I hydrogel (Fig.4B), showing that the presence of the endothelial cells highly stimulated the cell migration. They strongly impacted the RCC4-VHL spheroid, switching from the cyst-like structure, as observed in Fig.2B to an invading mass containing many multicellular protrusions coming out of the compact multicellular core. However, the presence of endothelial cells induced a higher invasive behavior for the RCC4 spheroids, displaying longer multicellular extensions and many individual cells migrating far away from the scattered core of the spheroid. Since the endothelial capillaries were formed in close contact with RCC4 or RCC4-VHL spheroids, their networks clearly differed, being sparsely and weakly organized around the RCC4-VHL spheroid while being densely accumulated around the core of the RCC4 spheroid. The 3D morphometric analysis demonstrated that the RCC4 spheroids displayed longer and more branched capillaries organized into a highly connected network, than the RCC4-VHL spheroids (Fig.4C). According to the pro-angiogenic impact of the alteration of the VHL pathway reported in patients and in *in vivo* models (*Hakimi et al., 2016; Hsieh et al., 2017*), our data using *in vitro* 3D models provided further striking clues to the ccRCC biology. Three optical sections performed respectively at the bottom, middle and top levels of the spheroid showed that the RCC4-VHL spheroid core displayed similar cyst-like structure to those described in Fig.2B, and that capillaries were in close contact with the external side of the spheroid without penetrating the cohesive cell layers (Fig.4D). In contrast, small cavities detected at the bottom and top levels converged on a wide and irregular cavity settled in the RCC4 spheroid core (Fig.4D and Movie 3). Remarkably, continuous monolayer of endothelial cells lined these inner cavities, therefore mimicking the pond structure identified in patient samples and mouse xenografts in Fig.1 (red triangle, Fig.4D). Col IV immunostaining revealed that the pond was delineated by a continuous polarized basement membrane associated to the endothelial monolayer (Fig.4E). Higher magnification of pond areas focused on the tight interactions between this luminal endothelial monolayer, the basement membrane and tumor cells. Contrary to the endothelial cells, tumor cells were not spread on the basement membrane suggesting distinct types of interactions. Moreover, the pond cavity contained isolated dying endothelial cells partially embedded in their basement membrane and displaying fragmented nucleus, whereas the endothelial cell monolayer and the tumor cells displayed unaltered nuclei. These data therefore suggest a dynamic process for shaping the pond involving homotypic endothelial and heterotypic endothelial-tumor cells interactions associated with cell migration and survival. These results demonstrate for the first time that a relevant 3D co-culture model recapitulates the ccRCC-specific endothelial ponds. We strongly suggest that its formation requires the VHL gene alteration, invasive tumor cells and thigh cell-cell interactions.

Deciphering the pond formation associated with the time-courses of tumor invasion and capillary morphogenesis was then the next issue. Time-lapse confocal imaging was performed every 10-12 hours for 140 hours, using fluorescent RCC4 or RCC4-VHL and endothelial cells in the 3D co-culture model (Fig.5). According to its limited invasive capacities, RCC4-VHL spheroid slowly moved on an irregular core bearing some protrusions and reached a plateau at 92 hours (Fig.5A). The endothelial cells homogeneously distributed in the collagen I hydrogel slowly extended and fused to each other, without any intense migration and progressively

formed growing capillary sections in the hydrogel up to 44 hours. From 68 hours, capillaries converged towards the spheroid and then set in close interaction with it. On the contrary, the rapid and massive invasive behavior of the RCC4 cells led to the spheroid scattering, which initial core became undetectable from 20 hours and to abundant multicellular protrusions from 20 to 44 hours, progressively replaced by increasing spreading of the individual migrating cells in the microenvironment from 92 hours (Fig.5B). In parallel, the endothelial cell behavior strongly differed than in presence of RCC4-VHL spheroids. Indeed, from 10 hours, the endothelial cells formed growing sections and highly migrated towards the RCC4 spheroid from 20 hours, according to the paracrine regulation by the tumor-secreted factors reported in the Supplementary Fig.S3A. From 32 hours, the converging capillary sections accumulated in the area corresponding to the former spheroid core, and fused from 44 hours. The endothelial network rapidly expanded in this area, in close proximity with invading tumor cells, and increasingly connected to many converging capillaries. Optical sections at higher magnification provided clues on the pond remodeling and stabilization. Indeed, anastomosis of the endothelial cavities in the scattering RCC4 spheroid remodeled the pond which progressively expanded up to 116 hours (Fig.5C). During the remodeling, isolated dying endothelial cells left behind by regressing capillary segments were observed in the cavities, as previously observed in Fig.4E. The pond stabilization occurred from 116 to 140 hours, strengthened by angiogenesis. Indeed, a sprouting capillary led by a migrating tip cell detected in the pond cavity at 128 hours further grew and anastomosed with an adjacent pond wall at 140 hours (yellow arrow in Fig.5C).

Our relevant 3D *in vitro* model of co-culture recapitulates the endothelial pond, a specific ccRCC-microvascular structure. The pond formation, remodeling and stabilization require the co-culture with tumor cells in addition to the fibroblast-induced paracrine regulation and occurs concomitantly to the tumor spheroid invasion. Knowledge of these pond formations cues provide an interesting tool to decipher drug responses.

Aberrant tumor vasculature is resistant to anti-angiogenic treatment

Further investigation of the ccRCC biological features associated with drug responses (Motzer *et al.*, 2022) was performed by treating the *in vitro* 3D model with receptor tyrosine kinase inhibitors targeting VEGF or HGF/SF/c-met pathways such as sunitinib or crizotinib, respectively or with temsirolimus, targeting the mTOR pathway (Fig.6). Drug treatments were performed on collagen I hydrogel containing either endothelial cells (Fig.6A-B), RCC4 spheroids (Fig.6C-D) or both (Fig.6E-G). Their impacts were assessed on capillary formation using the 3D morphometric analysis (Fig.6B-F) and on tumor invasion using the quantification of spheroid area and perimeter (Fig.6D-G). Whereas previous studies deciphered the impact of either temsirolimus (Mahalingam *et al.*, 2009), crizotinib (Ciamporcero *et al.*, 2015) or sunitinib (Huang *et al.*, 2010; Lichner *et al.*, 2019; Fabbri *et al.*, 2020) on the induction of apoptosis or inhibition of proliferation of the ccRCC tumor cells mainly in 2D or *in vivo* models, there was no evidence of their effect on invasive capacities of the tumor cells associated with the capillary morphogenesis in the 3D microenvironment. Temsirolimus dramatically reduced capillary length, branch point number and connectivity index at any dose (5, 10 and 25 μM) when compared to vehicle treatment, supporting the expected anti-angiogenic effect of the molecule (Fig.6A-B). Moreover, temsirolimus (5 and 10 μM) statistically reduced spheroid area and perimeter when compared to vehicle treatment and abolished the spheroid invasion at the highest dose (25 μM) supporting the expected anti-invasive effect (Fig.6C-D). Moreover,

tumor and endothelial cells respond to temsirolimus at the same concentration range. Crizotinib (0.05 μM) did not affect the capillary formation (Fig.6A-B) whereas it statistically reduced spheroid area and perimeter when compared to vehicle treatment (Fig.6C-D). Moreover, the inhibition of the spheroid invasion was statistically stronger than the inhibition of capillary formation at the higher concentration (0.5 μM). These data reveal for crizotinib its higher anti-invasive than anti-angiogenic capacities. Sunitinib reduced capillary length at any dose (0.05, 0.5 and 5 μM) and connectivity index at two doses (0.5 and 5 μM) (Fig.6A-B). These two high doses also altered spheroid area and perimeter, revealing the anti-invasive effect of the molecule targeting with high affinity more than 60 distinct tyrosine or serine-threonine kinases (*Karaman et al., 2008*) (Fig.6C-D). Altogether, these dose-responses show that sunitinib or crizotinib firstly targets capillary morphogenesis or tumor spheroid invasion, respectively.

In the co-culture model, the dramatic effect of temsirolimus on capillary formation was similar to those obtained in absence of tumor spheroids, at any dose (Fig.6E-F). In contrary, the inhibition of spheroid invasion observed in absence of endothelial cells was shifted to the highest concentrations (10 and 25 μM) (Fig.6E and G). Similar results were obtained for crizotinib and sunitinib where the dose-dependent inhibition of capillary formation was not altered by the co-culture whereas the lowest doses, inhibiting the spheroid invasion in absence of endothelial cells did not affect it in the co-culture (Fig.6E-G). Moreover, at the highest concentrations, sunitinib was less efficient than temsirolimus for reducing the connectivity index of the capillary network, indicator of the endothelial pond initiation (Fig.6F- G). The 3D *in vitro* co-culture model shows that the presence of endothelial cells reduced the sensitivity of RCC4 cells to temsirolimus, crizotinib or sunitinib.

Related to the clinical issues, sensitivity to sunitinib was then assessed on the pre-existing ponds and capillaries. Consistent with our time-course data determining the pond stabilization from 116 hours (Fig.5C), sunitinib treatment occurred on the 5-day vascularized spheroids. The 3D acquisitions of the vascularized spheroid displaying a large and stable pond connected to many converging capillaries, hereafter called proximal capillaries on a hand and on the capillaries formed in the same hydrogel but distant from the spheroid the on the other hand were first performed on the 5-day vascularized spheroids before treatment (Fig.7A). Vehicle or sunitinib (0.5 or 5 μM) was then applied for 2 days (Fig.7 B). Sensitivity of capillaries and ponds was assessed by quantification of the vascular area (Fig.7C). Sunitinib induced significant regression of the distant capillaries in a dose-dependent manner. Remarkably, the vascular areas of ponds and proximal capillaries were not significantly altered by the treatment at the two doses, leading to their increasing proportion among the whole vascular network (Fig.7D). Our findings demonstrate for the first time that the ccRCC-specific endothelial ponds stably settled in the invasive tumor mass are resistant to sunitinib treatment. Our 3D *in vitro* model accurately recapitulates the formation and the architecture of the microvascular structures in ccRCC and therefore leads to relevant cellular responses, in the context of therapeutic treatments.

FIGURE 1

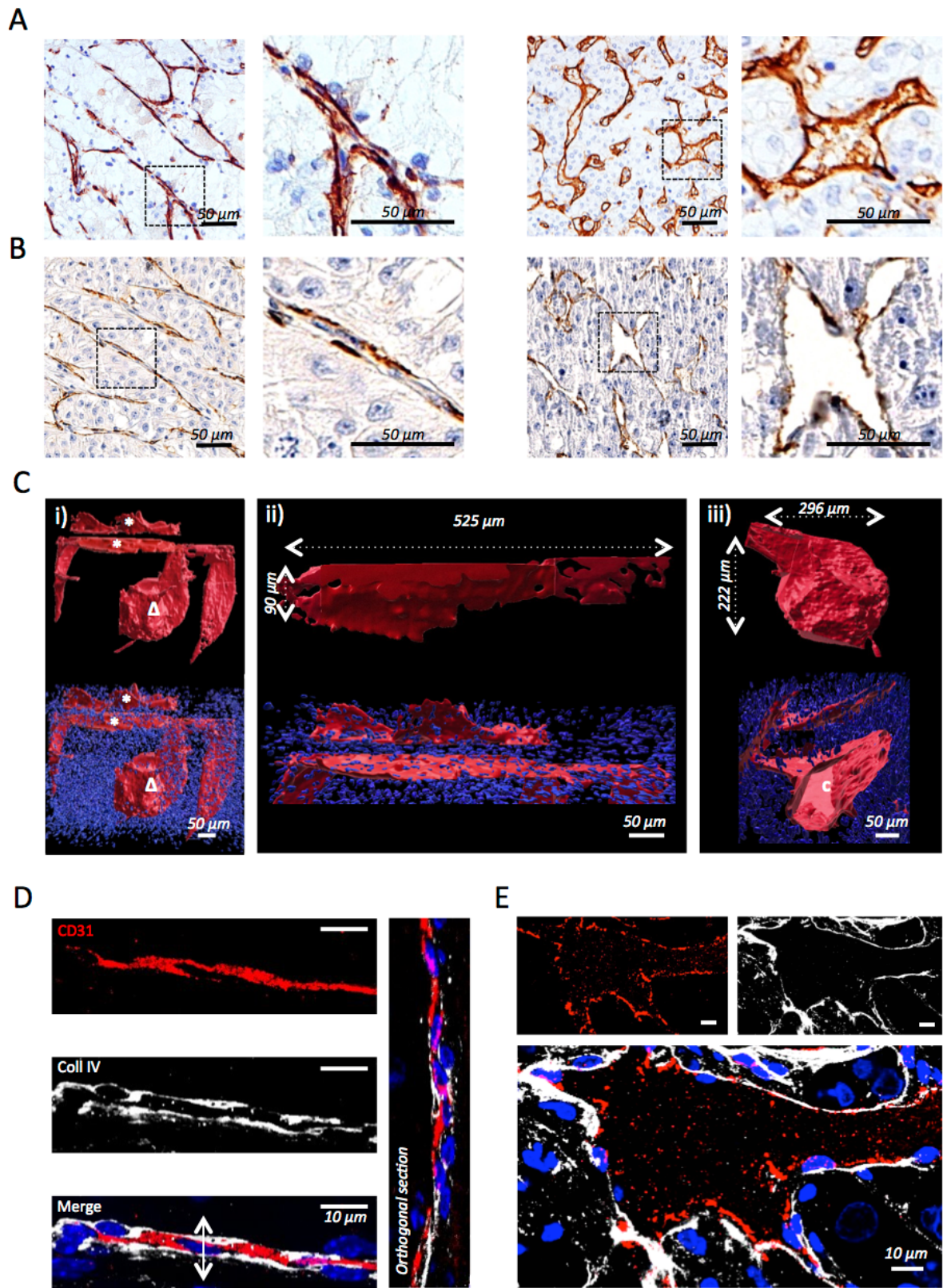


Figure 1. ccRCC samples contain aberrant endothelial structures infiltrating the tumor mass. Representative sections of human ccRCC samples (A) or ccRCC-derived xenografts in nude mouse (B), immunohistochemically stained for human (A) or mouse (B) CD31. Higher magnifications of aberrant microvascular structures were performed by imaging specified area (black-dotted frames) by a 2.3x zoom. Scale bar: 50 μm . (C-E) 500 μm -thick sections of ccRCC-derived xenograft stained for CD31 (red) and nuclei (blue in bottom panels) and clarified for imaging. (C) Images treated with Imaris for surface rendering and 3D reconstruction highlight the shape and dimensions of the aberrant vasculature containing two parallel sheets (white star), whose one connected to a pond (white triangle) (i). Zoomed in images of the inferior sheet (top panel, length and height dimensions on white-dotted lines) and the two parallel sheets inserted in the tumor cells (nuclei in bottom panel) (ii) and of the pond (top panel, dimensions on white-dotted lines) and the 3D section of the pond inserted in the tumor cells (nuclei) and displaying a nucleus-free cavity (white c) (bottom panel) (iii). (D-E) Immunofluorescence of endothelial basement membrane associated with endothelial sheet (D) or pond (E) were performed using mouse anti-Collagen IV (ColIV, white) and anti- CD31 (red) antibodies and DAPI for nuclei (blue). Optical sections were acquired with a LSM 980 Confocal AiryScan 2 at 63x/1.1. Orthogonal view (y-z) was performed along the white arrow presented on the confocal image (D). Scale bar: 10 μm .

FIGURE 2

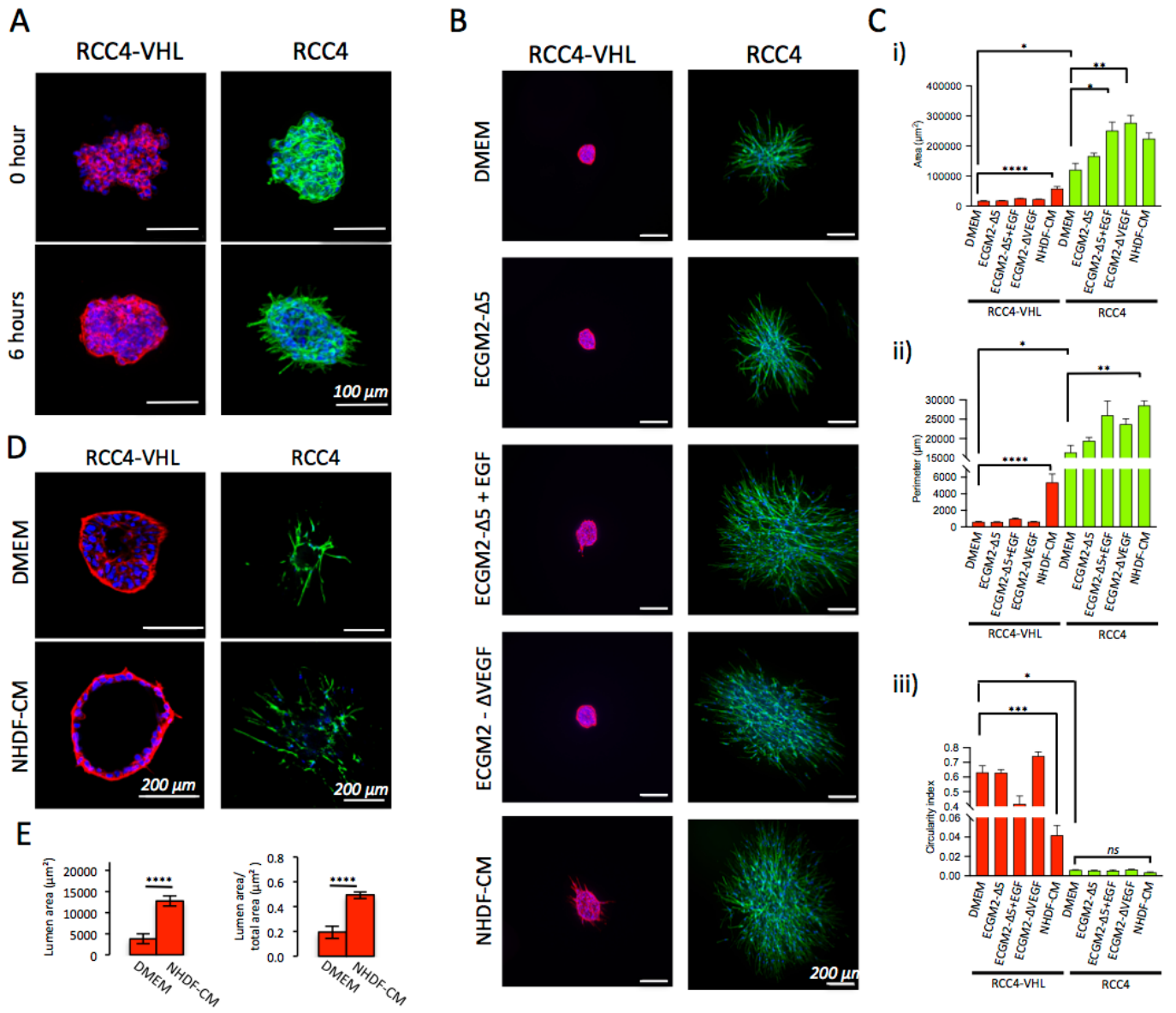


Figure 2. ccRCC-derived spheroid invasiveness induced by defective VHL is stimulated by growth factors secreted in the tumor microenvironment.

(A) Spheroids containing 500 fluorescent RCC4 or RCC4-VHL cells embedded in collagen I hydrogel and cultured in complete DMEM for 0 or 6 hours. Images were acquired by a Zeiss spinning disk confocal W1 at 25x/0.8. Scale bar: 100 μ m. Actin and nuclei were stained by phalloidin (red for RCC4-VHL or green for RCC4) and DAPI (blue). (B) RCC4 or RCC4-VHL spheroids were embedded in collagen I and cultured in complete DMEM, growth factor-depleted ECGM2 (ECGM2- Δ 5) or supplemented with EGF (ECGM2- Δ 5+EGF), VEGF-depleted ECGM2 (ECGM2- Δ VEGF) or fibroblast-conditioned medium (NHDF-CM) for 3 days. Actin and nuclei were stained by phalloidin (green) and DAPI (blue). Images were acquired by a Zeiss Observer Apotome II (10x/0.45). Scale bar: 200 μ m. (C) Spheroid invasion was quantified on z-stack projections, for spheroid area (i), perimeter (ii) and circularity index (iii). (D) Images on optical section localized at the spheroid center (highest diameter size) of RCC4 or RCC4-VHL cultured in complete DMEM or fibroblast-conditioned medium (NHDF-CM) for 3 days were acquired with a Zeiss Observer Apotome II at 40x/1.1 (RCC4-VHL) or 10x/0.45 (RCC4). Scale bar: 200 μ m. (E) Lumen of RCC4-VHL spheroid was assessed for its area (left panel) and area over the total spheroid area (right panel). (C and E) Graphs represent the mean of 3 independent experiments +/- SEM. Statistical analyses were performed using Kruskal-Wallis test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.0001$) (C) or Welch's t test (**** $p < 0.0001$) (E).

FIGURE 3

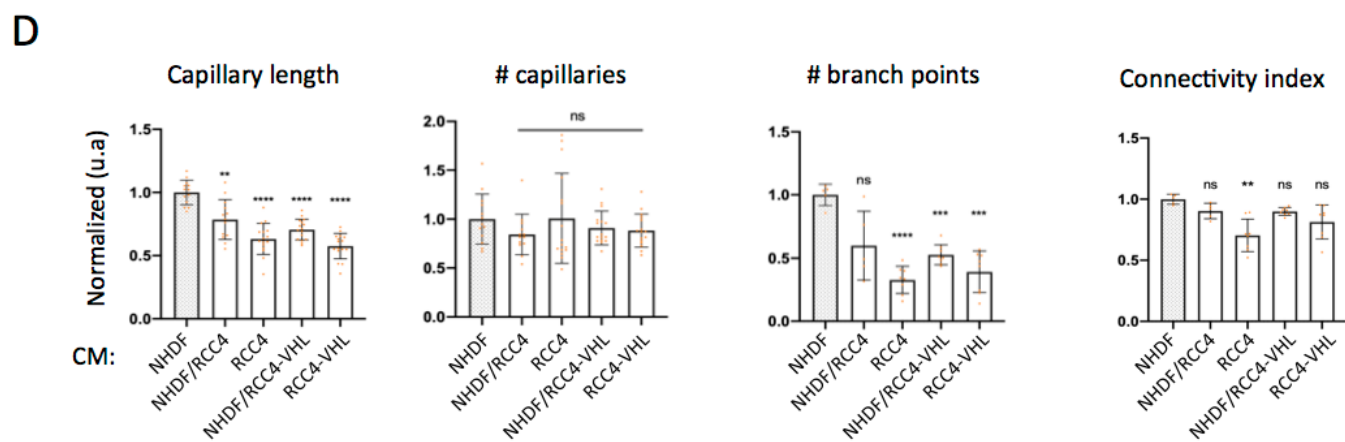
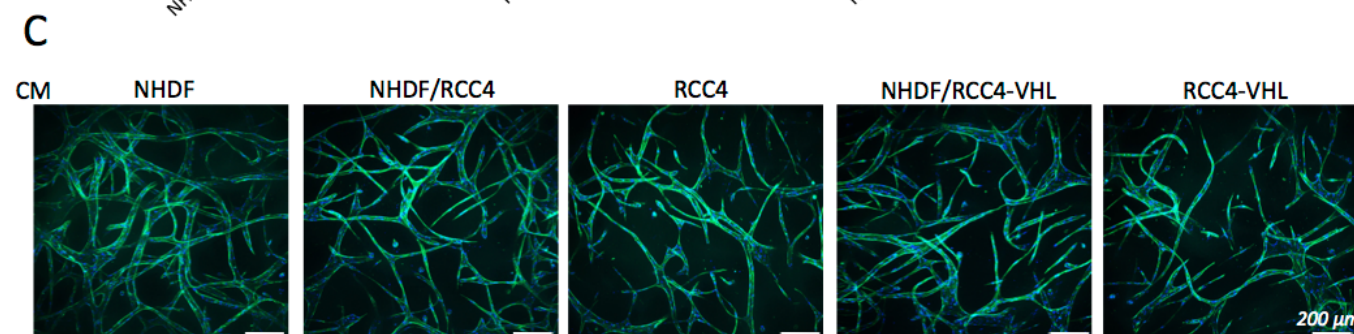
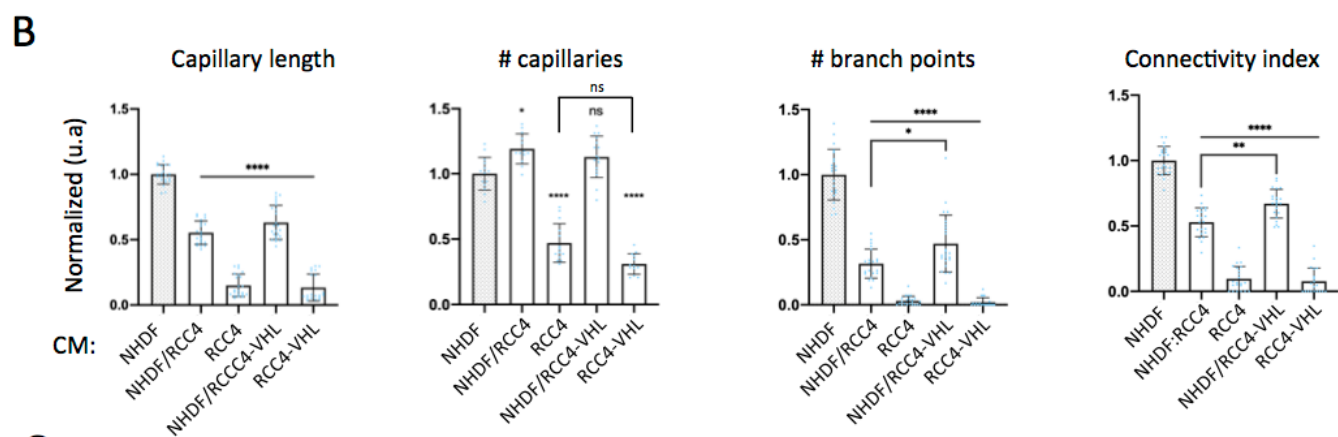
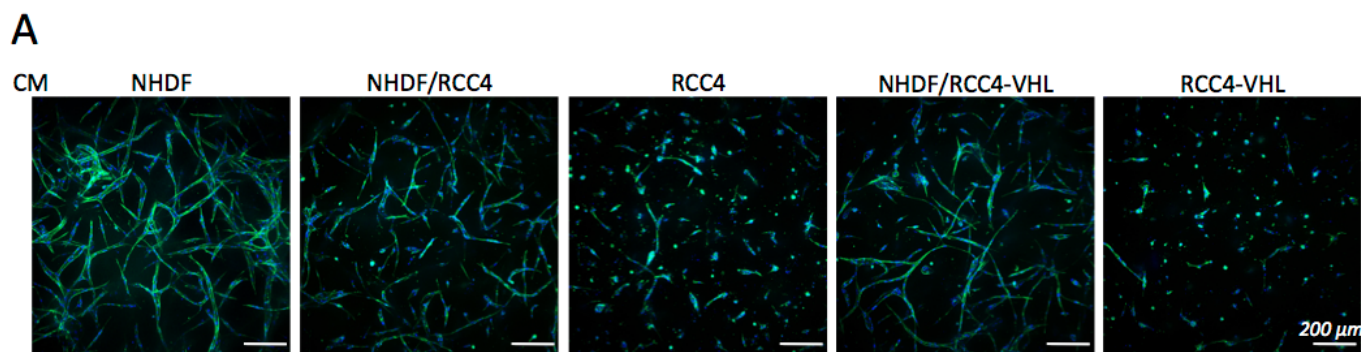
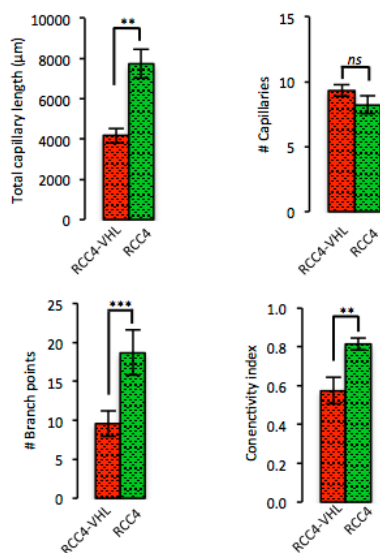
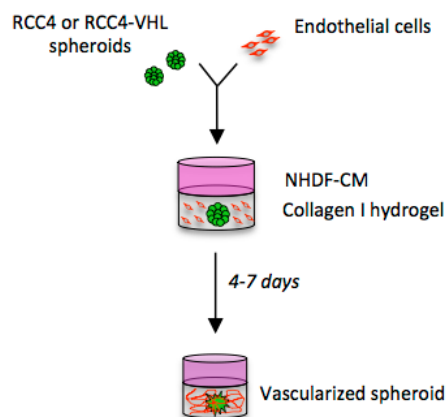


Figure 3. Tumor secreted factors alter capillary formation and integrity.

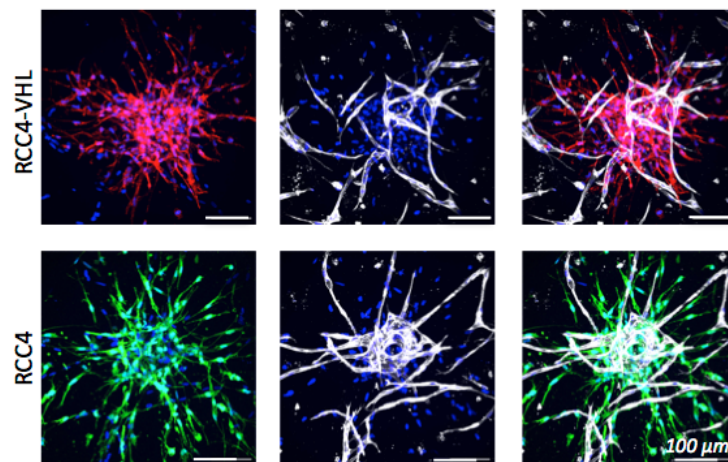
(A-B) Regulation of capillary formation by cell-derived conditioned medium. HUVEC seeded in collagen I hydrogel were cultured for 5 days in conditioned medium (CM) from fibroblast (NHDF), RCC4, RCC4-VHL cells or 1:1 mixture of CM (NHDF/RCC4 or NHDF/RCC4-VHL). Actin and nuclei were stained by phalloidin (green) and DAPI (blue). Images were acquired by a Zeiss Observer Apotome II (10x/0.45). Maximum intensity projections of 260 μm z-stacks are shown. Scale bar: 200 μm (A). Capillary network was analyzed by 3D quantifications of total capillary length, capillary number, branch point number and connectivity index. Results were normalized to control condition, performed with NHDF-CM (B). (C-D) Regulation of capillary stabilization by cell-derived CM. Capillaries formed and grown for 5 days in NHDF-CM were further treated for 4 days by the various CM described in A. Images were performed as in A (C). Impact on capillary network was quantified as in B (D). Graphs represent the mean of 3 independent experiments \pm SEM. Statistical analyses were performed using Brown-Forsythe and Welch ANOVA tests ($p > 0.05$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$).

FIGURE 4

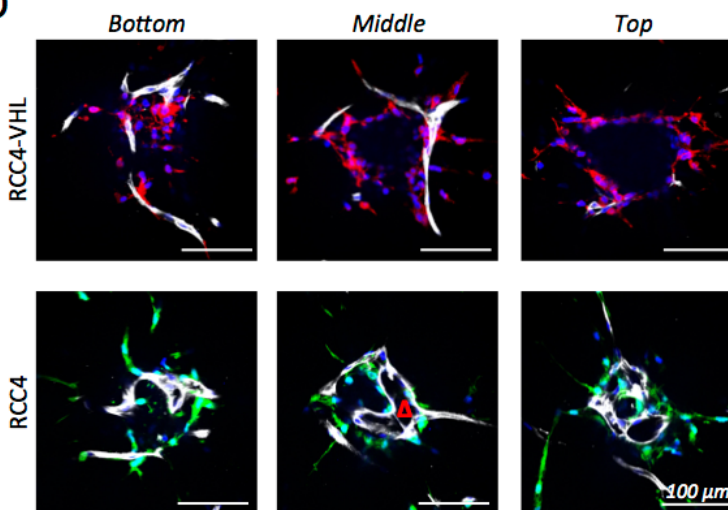
A



B



D



E

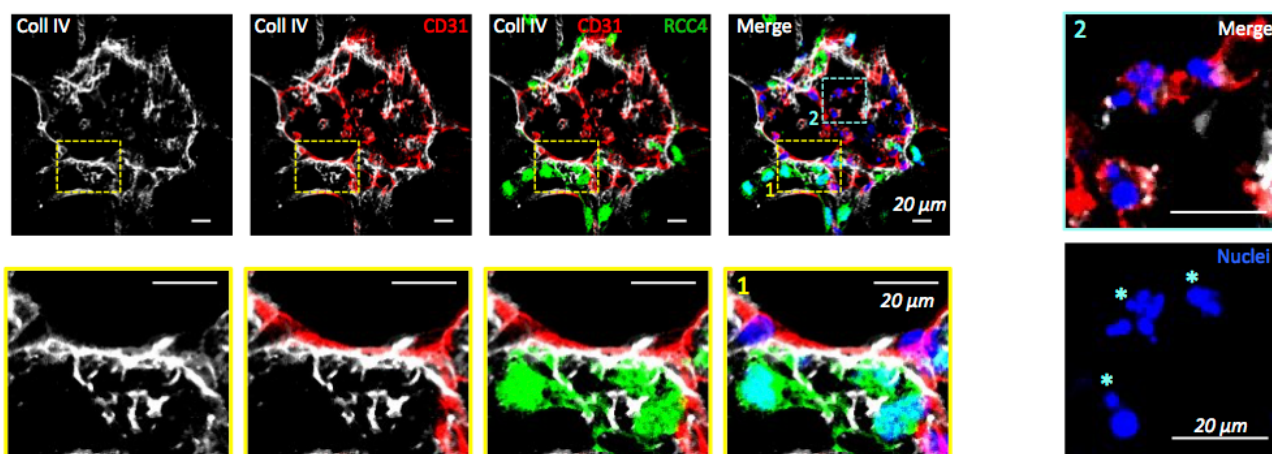


Figure 4. Highly invasive tumor spheroids trigger the pond formation.

(A) Schematic representation of the 3D co-culture model. Spheroids of fluorescent RCC4 or RCC4-VHL were co-embedded in collagen I hydrogel with HUVEC in suspension and cultured for 4 to 7 days in fibroblast-conditioned medium (NHDF-CM). (B-E) Vascularized spheroids of RCC4 (green) and RCC4-VHL (red) grown for 4 days. Immunofluorescence of endothelial capillaries was performed using anti-CD31 antibody (white). Nuclei were stained by DAPI (blue). Images were acquired by a Zeiss spinning disk confocal W1 (25x/0.8) and maximal z-stack projections (B) or optical sections performed at three different levels of each spheroid (D) are shown. Scale bar: 100 μ m. (C) Capillary network was analyzed by 3D quantifications of total capillary length, capillary number, branch point number and connectivity index. Graph represents the mean of 3 independent experiments +/- SEM. Graphs represent the mean of 3 independent experiments +/- SEM. Statistical analyses were performed using Mann-Whitney test (ns $p > 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). (E) Optical sections at the spheroid center reveal endothelial basement membrane immunostained with anti-Collagen IV (Coll IV) antibody (white), associated with endothelial immunostaining by CD31 (red), fluorescent RCC4 (green) and nuclei staining (blue). Images were acquired by LSM 980 Confocal, AiryScan 2. Higher magnifications of the areas 1 and 2 delineated by yellow- or blue-dotted frames respectively highlight the tumor-endothelial cell interactions at the pond periphery and endothelial necrosis in the pond cavity (E). Scale bar: 20 μ m.

FIGURE 5

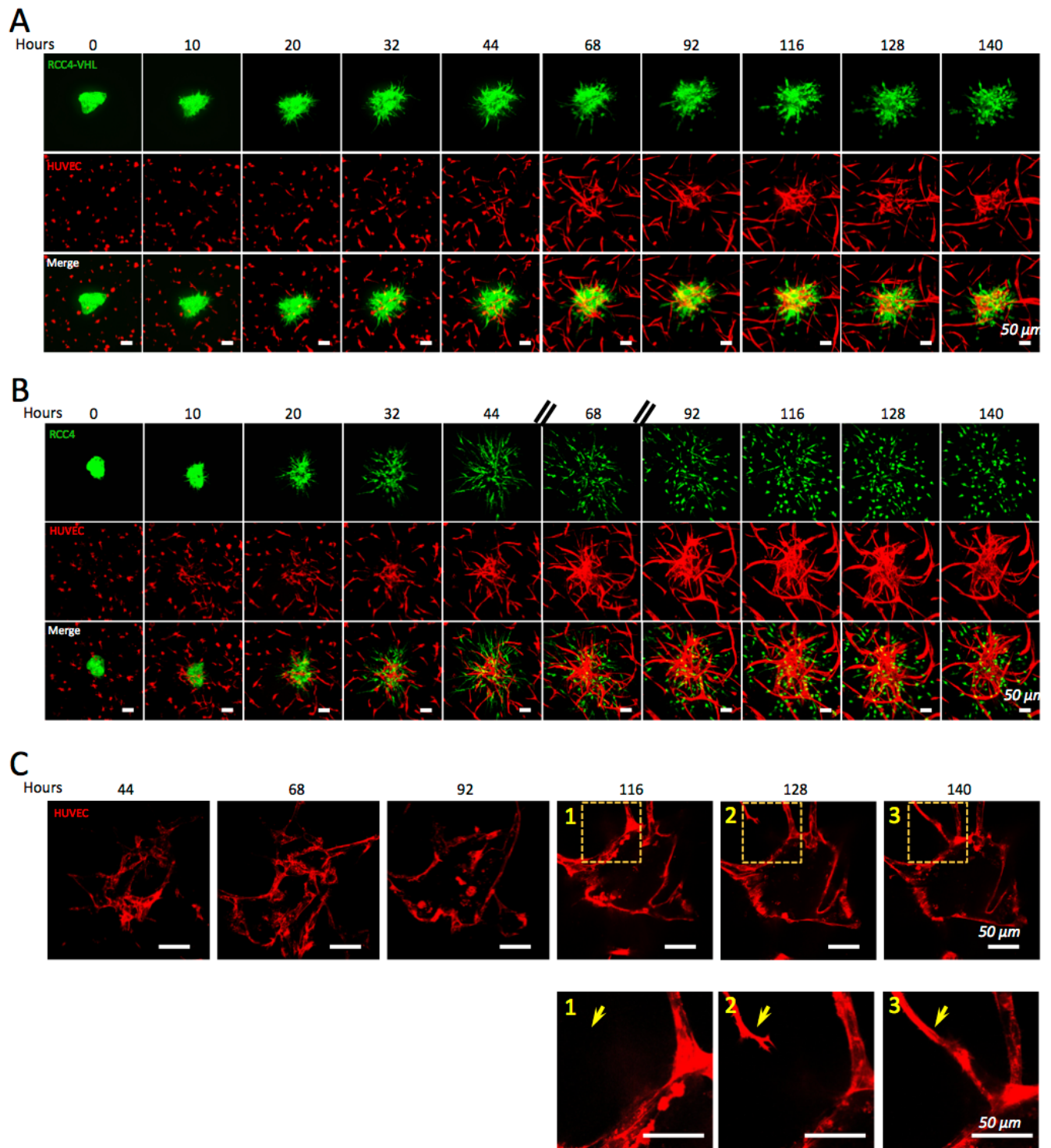


Figure 5. The dynamic stages of the pond formation involve concomitant spheroid invasiveness and sprouting angiogenesis.

(A-B) Kinetic analysis of vascularized spheroids of RCC4-VHL (A) or RCC4 (B). Fluorescent spheroids (green) were co-embedded with fluorescent HUVEC (red) i.e. HUVEC-LAR (A) or HUVEC-GFP (B), respectively, in collagen I hydrogel and cultured for 6 days in fibroblast-conditioned medium. Images of the same spheroid were acquired every 10 to 12 hours by a Zeiss spinning disk confocal W1 (20x/0.8) and maximal z-stack projections are shown. Scale bar: 50 μm . (C) Remodeling processes of the endothelial pond in a RCC4 spheroid. Fluorescent images of HUVEC-LAR were acquired (40x/1.2) between 44 and 140 hours of culture and optical sections were shown (**upper panels**). Higher magnifications of the areas 1,2 and 3 delineated by yellow-dotted frames at 116, 128 and 140 hours respectively, performed by a 2.5x zoom reveals a sprouting capillary growing over time (**lower panels**) Scale bar: 50 μm .

FIGURE 6

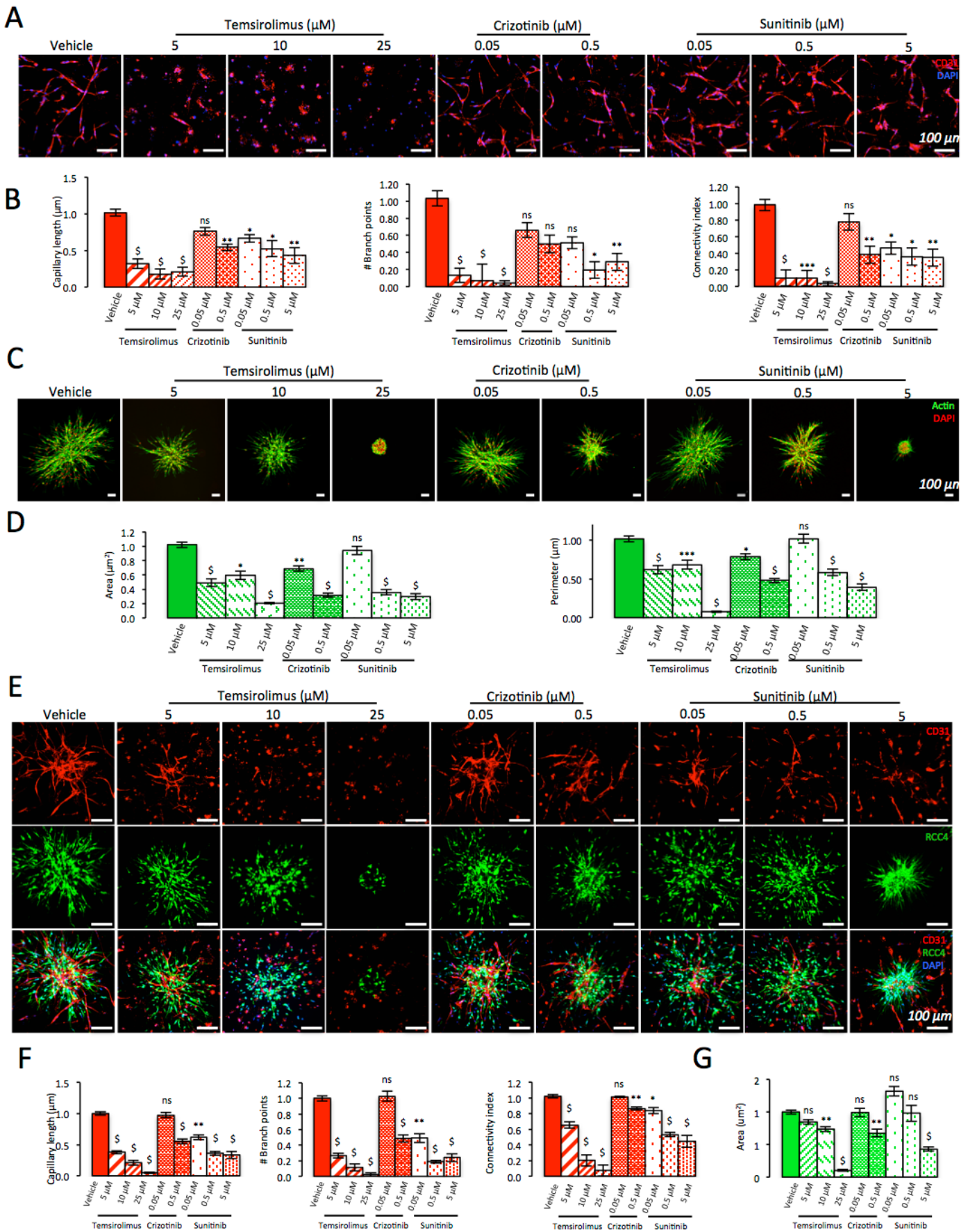
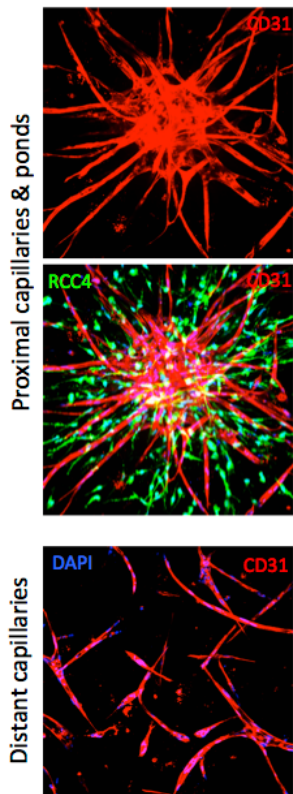


Figure 6. FDA-approved treatments of ccRCC inhibit tumor invasiveness and capillary formation in vascularized spheroids.

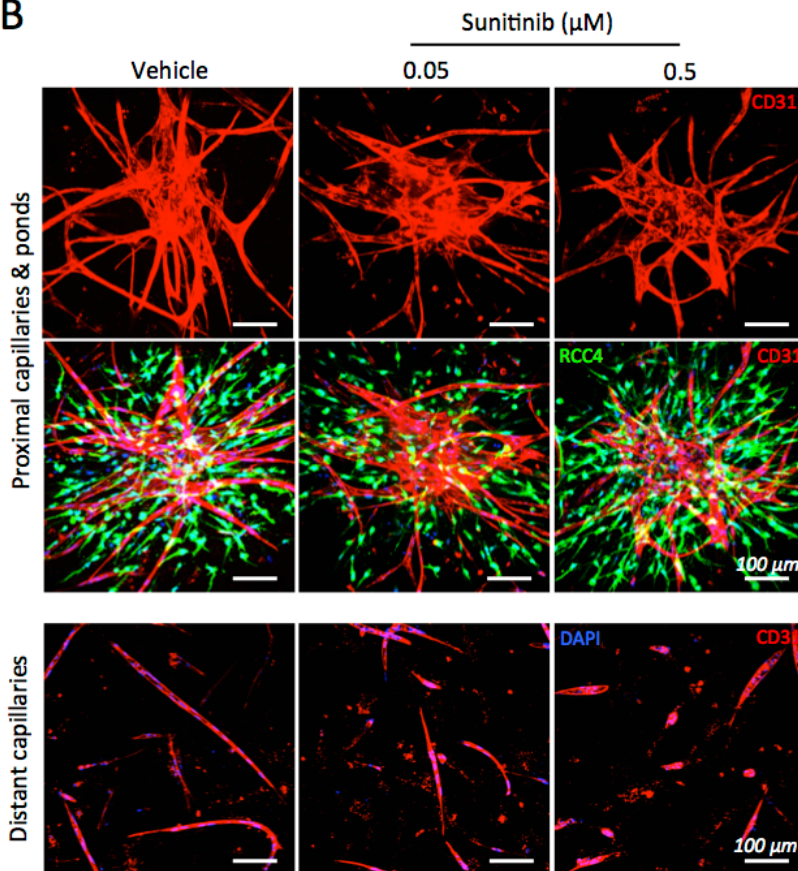
Temsirolimus (5, 10 or 25 μM), crizotinib (0.05 or 0.5 μM), sunitinib (0.05, 0.5 or 5 μM) or vehicle were added in collagen I hydrogel containing HUVEC (A-B), RCC4 spheroids (C-D) or co- culture of HUVEC and RCC4 spheroids (E-G). Treatment was applied for 2 days of culture. (A) Immunofluorescence of endothelial capillaries was performed using anti-CD31 antibody (red). Nuclei were stained by DAPI (blue). Fluorescent images were acquired by a Zeiss spinning disk confocal W1 (25x/0.8). Z-stack projections are shown. Scale bar: 100 μm . (B) Capillary network was analyzed by 3D quantifications of total capillary length, capillary number and connectivity index. (C) Immunofluorescence of RCC4 spheroids was performed using phalloidin (green). Nuclei were stained by DAPI (red). Fluorescent images were acquired by a Zeiss spinning disk confocal W1 (10x/0.45). Z-stack projections are shown. Scale bar: 100 μm . (D) Spheroid invasion was assessed by quantification of spheroid area and perimeter on z-stack projections. (E) Vascularized RCC4 spheroids were imaged using CD31 immunostaining (red for upper and lower panels) and fluorescent RCC4 (green for middle and lower panels). Nuclei were stained by DAPI (blue for lower panels). Images were acquired by a Zeiss spinning disk confocal W1 (20x/0.8). Z-stack projections are shown. Scale bar: 100 μm . (F) Capillary network was analyzed by 3D quantifications of total capillary length, capillary number and connectivity index. (G) Spheroid invasion was assessed by quantification of spheroid area on z-stack projections. Graphs represent the mean of 3 independent experiments \pm SEM. Statistical analyses were performed using Kruskal-Wallis test (ns $p > 0.05$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, \$ $p < 0.0001$ in comparison with the control condition).

FIGURE 7

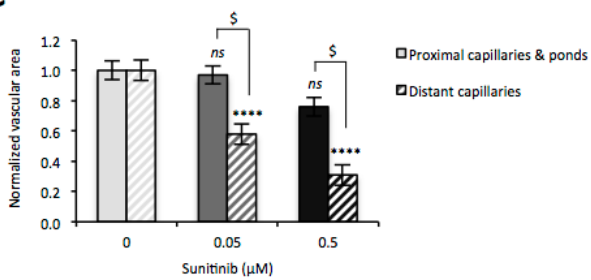
A



B



C



D

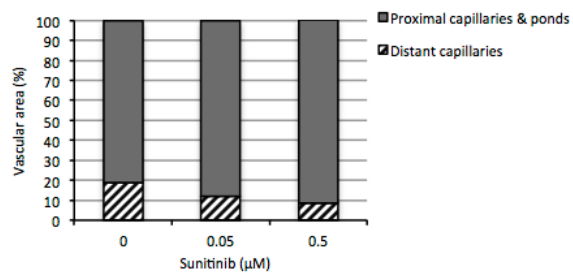
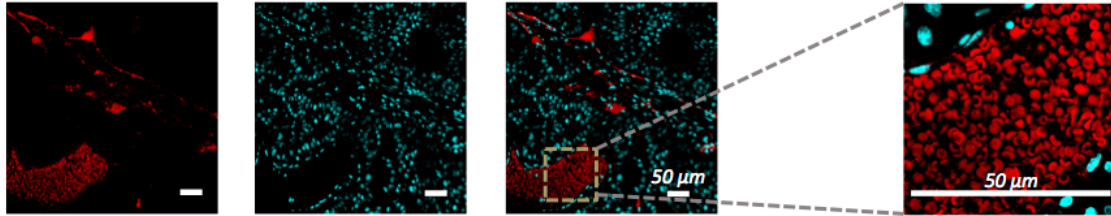


Figure 7. Endothelial ponds are resistant to anti-angiogenic treatment of ccRCC in vascularized spheroids.

(A-B) Vascularized RCC4 spheroids and capillaries were imaged using CD31 immunostaining (red) and fluorescent RCC4 (green). Nuclei were stained by DAPI (blue). Fluorescent images of spheroid-centered (top and middle panels) or spheroid-adjacent (bottom panel) fields were acquired by a Zeiss spinning disk confocal W1 (20x/0.8). Maximal z-stack projections are shown. Spheroid-centered images show the endothelial pond and the converging proximal capillaries whereas the spheroid-adjacent images show the capillaries growing in the tumor cell-free microenvironment. Vascularization of RCC4 spheroids was promoted for 5 days (A) before vehicle or sunitinib treatment (0.05 or 0.5 μ M) added to the culture medium (B). (C-D) Sensitivity of sunitinib of endothelial capillaries and ponds was assessed by quantification of vascular area on z-stack projections (C) and of relative ratio between the vascular areas constituted by proximal capillaries and ponds and by distant capillaries (determined as percentage). Graphs represent the mean of 3 independent experiments \pm SEM. Statistical analyses were performed using ANOVA test (ns $p > 0.05$, \$ $p < 0.0001$ in comparison with the control condition).

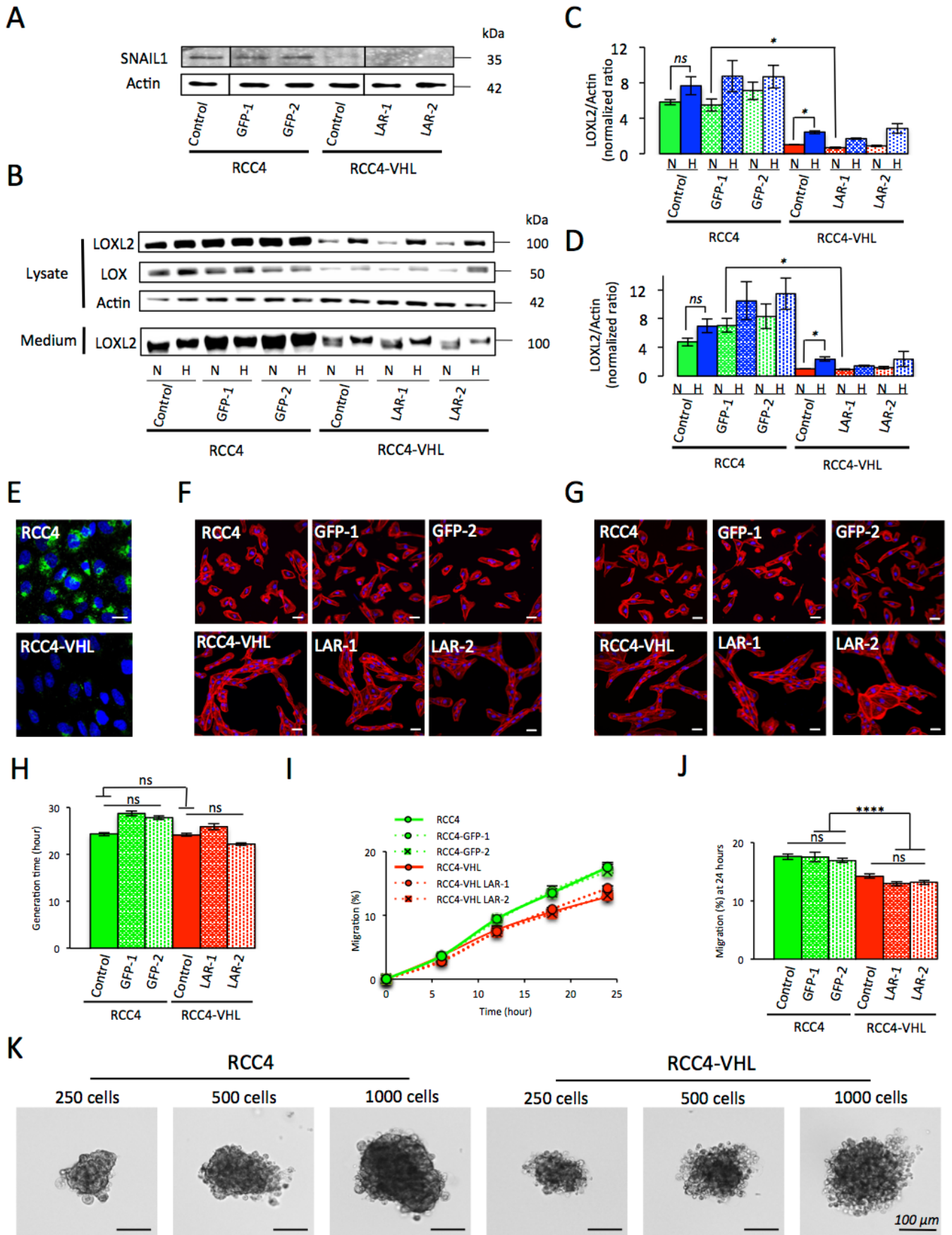
SUPPLEMENTAL FIGURE 1



Supplementary Figure S1. Endothelial ponds contain red blood cells.

Thick section (500 μm) of ccRCC-derived xenograft stained for CD31 (red) and nuclei (blue) and clarified for imaging. Red blood cells were revealed by auto-fluorescence. Images were acquired with a LSM 980 Confocal AiryScan 2 at 63x/1.1 and optical sections are represented. Scale bar: 50 μm .

SUPPLEMENTAL FIGURE 2



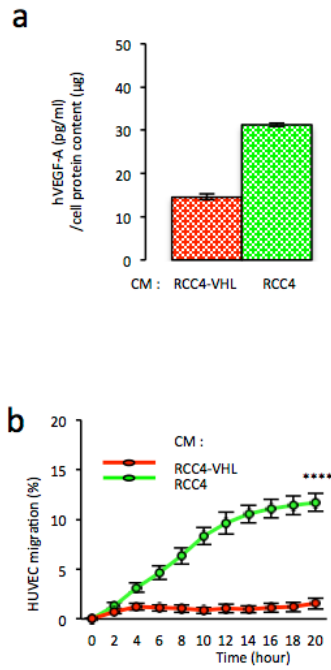
Supplementary Figure S2. Fluorescent clones of ccRCC cell lines display the hallmarks of the VHL status associated to epithelio-mesenchymal transition (EMT).

EMT properties were investigated for parental RCC4 cell line (RCC4) and corresponding GFP-expressing clones (GFP-1 and -2) and for parental VHL-expressing RCC4 cell line (RCC4-VHL) and corresponding LAR-expressing clones (LAR-1 and -2). (A-K) Cells were cultured for 2 days in normoxia (A) and in normoxia (N) or hypoxia (H) (B-D). Proteins were extracted from cell lysate and analyzed by immunodetection for SNAIL1 expression (A) or from cell lysate and secretion medium and analyzed by immunodetection for LOXL2 and LOX amount (B). Actin was used as a loading control. The amount ratio of LOXL2 over actin was quantified in the cell lysate (C) and secretion medium (D) from 3 independent experiments performed in duplicate.

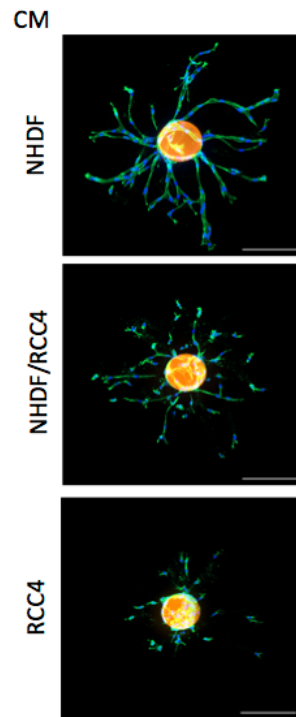
(E) RCC4 and RCC4-VHL cells were cultured for 3 days and immunostained for LOXL2 (green). Nuclei (blue) were stained by DAPI. Scale bar: 10 μm . (F-G) RCC4 and RCC4-VHL cell lines or clones were cultured for 2 days on plastic (F) or collagen I coating (G) and stained for actin (red) by phalloidin and for nuclei (blue) by DAPI. Scale bar: 50 μm . (H-J) Proliferation and collective migration were monitored by live-cell imaging. Proliferation was assessed by generation time determined after 96 hour-culture (H). Migration was quantified over 24 hour- culture (I) and endpoints were plotted at 24 hour (J). Graphs represent the mean of 3 independent experiments \pm SEM (H-J). ns $p > 0.05$ (Kruskal-Wallis test) (H) and ns $p > 0.05$, **** $p < 0.0001$ (ANOVA one-way) (J). (K) Formation of RCC4 and RCC4-VHL spheroids. 250, 500 or 1000 RCC4-GFP (RCC4) cells or RCC4-VHL-LAR (RCC4-VHL) cells were seeded in hanging drop and imaged after 48 hours in brightfield with Leica DMi1 and MC170HD camera at 10x/0.3. Scale bar: 100 μm .

SUPPLEMENTAL FIGURE 3

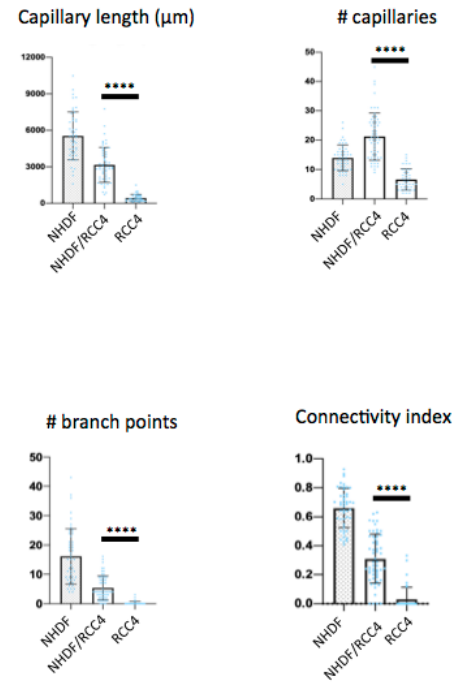
A



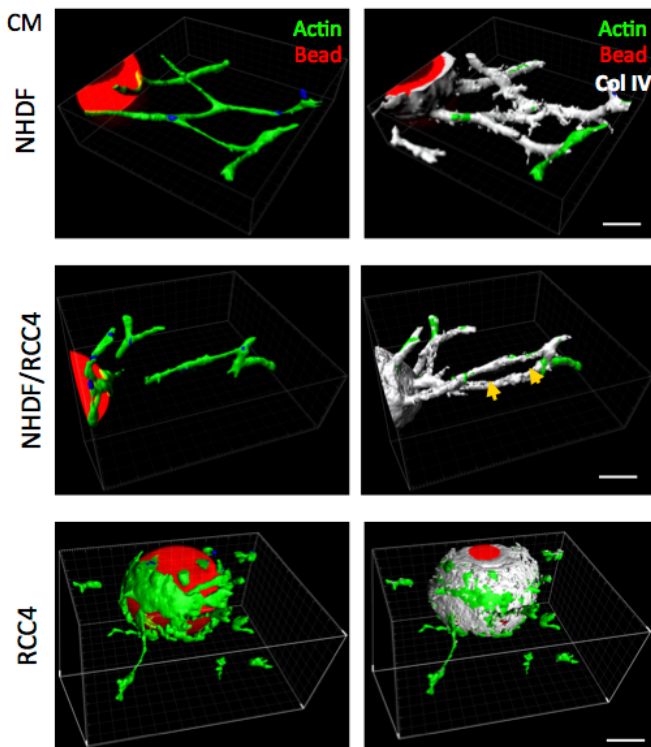
B



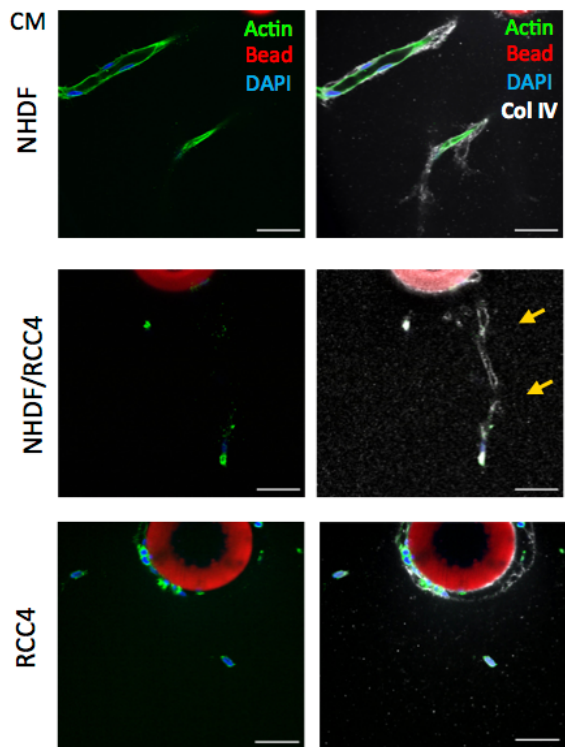
C



D



E



Supplementary Figure S3. Tumor secreted factors alter angiogenesis and capillary integrity.

(A) Conditioned media (CM) of RCC4 or of RCC4-VHL cells were analyzed for their VEGF amount (a) and their ability to induce endothelial cell migration (b). HUVEC migration was monitored over 20 hours of culture by live-cell imaging. Graphs represent the mean of 3 independent experiments \pm SEM. **** $p < 0.0001$ (One-Way ANOVA). (B-E) Angiogenesis assay using fluorescent Cytodex beads (orange in B and red in D-E) covered by HUVEC monolayer embedded in fibrin hydrogel and cultured for 4 days in conditioned medium (CM) of fibroblast (NHDF) or of RCC4 cells or of a 1:1 mixture of CM (NHDF/RCC4). Actin (green) and nuclei (blue) are stained by phalloidin and DAPI. Z-stack projections of fluorescent images were acquired with a Zeiss Observer Apotome II at 10x/0.45. Scale bar: 200 μ m (B). Capillary network was analyzed by 3D quantifications of total capillary length, capillary number, branch point number and connectivity index (C). Graphs represent the mean of 3 independent experiments \pm SEM. **** $p < 0.0001$ (Kruskal-Wallis test) (C). Images of 3D reconstruction of capillary network sprouting from the bead (D) or of one optical section (E) are shown. Immunofluorescence of endothelial basement membrane was performed using anti-Collagen IV (ColIV) antibody (white). Empty sleeves of basement membrane (yellow arrows) were observed in the mixture of NHDF- and RCC4-conditioned media. Fluorescent images were acquired with a Zeiss spinning disk confocal W1 at 40x/1.1 and surfaces were visualized in 3D with Imaris software. Scale bar: 50 μ m.

Supplementary Material

Movie 1. Aberrant ccRCC vasculature in patient-derived heterotopic xenografts.

Three-dimensional reconstruction of endothelial structures immunostained by CD31 (red) and nuclei by DAPI (blue).

Movie 2. Red blood cells accumulated in pond.

Z-stack movie where endothelial structures were immunostained by CD31 (red), red blood cells were stained by autofluorescence (red) and nuclei by DAPI (blue).

Movie 3. 3D reconstruction of a vascularized RCC4 spheroid.

The vascularized RCC4 spheroid was cultured for 5 days in collagen I hydrogel. The spheroid of 500 RCC4 cells (green) displayed abundant protrusions. The capillaries of HUVEC (red) converged towards the spheroid center to anastomose into a pond whose cavity was detectable on the sectioned view.

DISCUSSION

The structure abnormalities of the tumor blood vessels have been reported for more than two decades now, displaying high variability in size, shape and connectivity (*Baluk et al., 2005*). The micro-vascularization occurring in the tumor environment is indeed a complex process, leading to a high intra-tumoral heterogeneity but also to many distinct patterns depending on the tumor type and history. The detailed analyses of the microvasculature in the three dimensions using fluorescence and confocal microscopy of large pieces of tissues allows the reconstitution of the microvascular architecture inserted into the tumor microenvironment. More generally, there are growing evidences of peculiar three-dimensional architectures in many solid tumors where cellular structures are organized and interconnected in specific patterns. Recapitulating the 3D architecture of the ccRCC is therefore of main importance to fully understand the biology of this tumor. For this purpose, the *in vivo* and *in vitro* approaches have to be considered. We demonstrated here that the formation of the ccRCC-specific aberrant vascular structures persists in the mouse xenografts whereas it is known that the replacement of human tumor stroma in the primary grafted tumor by murine stroma occurs after successive passages (*Bousquet et al., 2016*). This interesting finding suggests that the human tumor cells are able to instruct the endothelial cells of mouse origin in the xenograft as well as the RCC4 cells instruct the primary culture of HUVEC in the *in vitro* 3D model. This tumor cell-driven conditioning is probably very complex, driven both by paracrine regulation of the endothelial cells but also other microenvironmental actors such as the fibroblasts and by the heterotypic cell-cell interactions.

The interesting relevancy of the *in vivo* model for forming aberrant endothelial structure has been also reported in a mouse model bearing combined renal epithelium-specific deletion of Vhl, Trp53 and developing ccRCC (*Harlander et al., 2017*). All tumors displayed a dense network of CD31+ thin-walled structures, either long and thin or irregular and delineating a wide cavity, similar to respectively the sheets and ponds we report in the present study. These *in vivo* models of ccRCC seem therefore relevant enough for recapitulating the specific features of the endothelial structures. However, these models contain many limitations due to heavy, complex and expensive approach for both mechanistic investigation and preclinical development of new therapies. Individual xenografts from metastatic ccRCC samples do not seem a manageable tool for *in situ* assessment of treatment efficacy.

The main first issue of our *in vitro* 3D model was then to recapitulate the ccRCC vascularization. Indeed, it seems more and more obvious that the microvascular network in ccRCC cannot be easily summed up by its density since it displays highly specific features. Indeed, many conflicting reports have been published regarding the degree of vascularization in ccRCC, mainly revealed by the MVD associated with the differentiation grade or the Fuhrman grade or with the patient survival (*Qian et al., 2009*). Facing this lack of correlation, some studies then focused on the vessel maturity. Yao and coll. reported that the MVD of undifferentiated (CD31+/CD34-) and of differentiated (CD34+) vessels were inversely correlated with tumor grade and patient survival (*Yao et al., 2007*). However, up to now the undifferentiated status of the blood vessels did not allow to determine some precise clinical characterization of the patient outcome. More interestingly, the authors displayed immunohistological sections of a high-grade ccRCC presenting a higher density of CD31+ (and also of CD34+) aberrant structures (both ponds and sheets) than a low-grade

one. We therefore consider that the 3D architecture of the ccRCC microvasculature may be taken into consideration for potential association with the tumor grade. Although their studies did not investigate up to the spatial 3D organization of the endothelial structures, Baldewijns and coll. assessed the morphometric parameters of the vessel area in ccRCC and concluded that high- grade tumors have a different angiogenic pattern than low-grade ones (*Baldewijns et al., 2007*). More recently, two types of microvessel patterns have been identified in ccRCC (*Ruiz- Sauri et al., 2018*): the “pseudoacinar” one formed by both round and elongated vessels with large lumens which, occasionally, are narrowed, this pattern is associated with low tumor grades; - The “fascicular” one, presenting elongated vessels with either narrow or collapsed lumens, which branch widely to interconnect with each other. This pattern is related to higher tumor grades.

Our study investigates for the first time the 3D architecture the ccRCC-specific aberrant microvasculature revealing the striking shapes and dimensions of some endothelial structures. Further extensive clinical investigations would be necessary to establish the correlation between the presence of the endothelial ponds or sheets and the tumor grade, since the previous studies reported above suggest that the ponds could be preferentially associated with the low grade. Using the *in vitro* 3D model, we demonstrated that the pond formation and the tumor spheroid invasion are concomitant processes. This raises now the question whether the pond would progressively remodel into sheets or whether ponds and sheets are formed through two distinct mechanisms. Our current model is there reaching the experimental limitation and needs higher tumor cell density and/or time-course to further investigate the evolution of the endothelial structures.

However, we demonstrated that this 3D co-culture model of the RCC4 spheroids with the endothelial cells lead to pond formation, remodeling and stabilization whereas the RCC4-secreted factors alone are not sufficient to induce the capillary morphogenesis and even alter the integrity of the pre-existing capillaries. This study demonstrates that the tumor cells secrete angiogenic factors that destabilize the growing capillaries and induce endothelial cell migration. The capillary morphogenesis occurs when both tumor and fibroblast-secreted factors are present in the tumor microenvironment. Our study therefore highlights the cooperative involvement of the tumor-and fibroblast-secreted factors on the capillary morphogenesis, recapitulating the first major attractive effect of the tumor mass on the surrounding capillaries. As the capillaries contact the invading tumor mass, the major remodeling of the endothelial structures occurs, leading to the pond formation. Consistent with previous study describing a co-culture engineered model of mosaic microvessels in breast cancer (*Silvestri et al., 2020*), we here demonstrate the main significance of the co-culture model for accurately shaping the physiopathological microvessels. Our 3D model is therefore pertinent to further analyze the impact of the heterotypic interactions between tumor and endothelial cells not only on the pond formation but also on the responses to drug treatments. Indeed, we report here for the first time that the ccRCC microenvironment composed of tumor cells, fibroblast-secreted factors and collagen I favors the presence of specific endothelial structures weakly sensitive to sunitinib. A main issue is now to further understand the molecular mechanisms underlying the low sensitivity to sunitinib. Several recent works using single cell-RNA sequencing performed on ccRCC samples revealed two major endothelial clusters, one having higher expression of VEGF receptors 1 and 2 mRNAs compared with the other (*Zhang et al., 2021; Young et al., 2018; Su et al., 2021*). The first study interestingly mentioned that the second endothelial cluster may evade angiogenesis

inhibitors. We therefore suggest that the pond may be composed of endothelial cells of the second cluster, providing a decreased sensitivity to sunitinib.

Altogether, we provide an innovative and relevant approach for combining the requirements of the cancer biology and of the 3D model of vascularized tumor spheroid and recapitulate the spatial shapes and polarization of the endothelial and tumor structures and the responses to approved treatments of the metastatic ccRCC.

Acknowledgements

We thank members of the Orion imaging facility of the Center for Interdisciplinary Research in Biology, Estelle Anceaume for access to the microtome, Julien Dumont and Tristan Piolot for access to confocal microscopes. We thank members of AP-HP, Hôpital Saint-Louis, Unité de Thérapie Cellulaire, CRB-Banque de Sang de Cordon, Paris, France for providing human umbilical cords. We thank Patrick H. Maxwell (Cambridge Institute for Medical Research, University of Cambridge, Cambridge, UK) for kindly providing the RCC4 and RCC4- VHL cell lines.

Noémie Brassard-Jollive was supported by Sorbonne Université and by Fondation ARC Jeunes Chercheurs. Yoann Atlas was supported by La Ligue Contre le Cancer. The work was supported by the Gefluc and by the Fondation ARC (PJA 20161205085).

References

- Anastassiou, G., Duensing, S., Steinhoff, G., Zorn, U., Grosse, J., Dallmann, I., ... & Atzpodien, J. (1996). Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1): a potential prognostic marker involved in leukocyte infiltration of renal cell carcinoma. *Oncology*, *53*(2), 127-132.
- Arganda-Carreras, I., Fernández-González, R., Muñoz-Barrutia, A., & Ortiz-De-Solorzano, C. (2010). 3D reconstruction of histological sections: Application to mammary gland tissue. *Microscopy research and technique*, *73*(11), 1019-1029.
- Atlas, Y., Gorin, C., Novais, A., Marchand, M. F., Chatzopoulou, E., Lesieur, J., ... & Muller, L. (2021). Microvascular maturation by mesenchymal stem cells *in vitro* improves blood perfusion in implanted tissue constructs. *Biomaterials*, *268*, 120594.
- Baffert, F., Le, T., Sennino, B., Thurston, G., Kuo, C. J., Hu-Lowe, D., & McDonald, D. M. (2006). Cellular changes in normal blood capillaries undergoing regression after inhibition of VEGF signaling. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, *290*(2), H547- H559.
- Baldewijns, M. M., Thijssen, V. L., Van den Eynden, G. G., Van Laere, S. J., Bluekens, A. M., Roskams, T., ... & Vermeulen, P. B. (2007). High-grade clear cell renal cell carcinoma has a higher angiogenic activity than low-grade renal cell carcinoma based on histomorphological quantification and qRT-PCR mRNA expression profile. *British journal of cancer*, *96*(12), 1888-1895.
- Baluk, P., Hashizume, H., & McDonald, D. M. (2005). Cellular abnormalities of blood vessels as targets in cancer. *Current opinion in genetics & development*, *15*(1), 102-111.
- Bignon, M., Pichol-Thievend, C., Hardouin, J., Malbouyres, M., Bréchet, N., Nasciutti, L., ... & Germain, S. (2011). Lysyl oxidase-like protein-2 regulates sprouting angiogenesis and type IV collagen assembly in the endothelial basement membrane. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, *118*(14), 3979-3989.
- Bond, K. H., Chiba, T., Wynne, K. P., Vary, C. P., Sims-Lucas, S., Coburn, J. M., & Oxburgh, L. (2021). The Extracellular Matrix Environment of Clear Cell Renal Cell Carcinoma Determines Cancer Associated Fibroblast Growth. *Cancers*, *13*(23), 5873.
- Bousquet, G. & Janin A. (2016). Patient-Derived Xenograft: An Adjuvant Technology for the Treatment of Metastatic Disease. *Pathobiology*, *83*(4):170.
- Brassard-Jollive, N., Monnot, C., Muller, L., & Germain, S. (2020). *In vitro* 3D systems to model tumor angiogenesis and interactions with stromal cells. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 1206.
- Cancer Genome Atlas Research Network. (2013). Comprehensive molecular characterization of clear cell renal cell carcinoma. *Nature*, *499*(7456), 43.

Ciamporcero, E., Miles, K. M., Adelaïye, R., Ramakrishnan, S., Shen, L., Ku, S., ... & Pili, R. (2015). Combination strategy targeting VEGF and HGF/c-met in human renal cell carcinoma models. *Molecular cancer therapeutics*, 14(1), 101-110.

Di Stefano, V., Torsello, B., Bianchi, C., Cifola, I., Mangano, E., Bovo, G., ... & Perego, R. A. (2016). Major action of endogenous lysyl oxidase in clear cell renal cell carcinoma progression and collagen stiffness revealed by primary cell cultures. *The American journal of pathology*, 186(9), 2473-2485.

Dvorak, H.F., Weaver, V.M., Tlsty, T.D. & Bergers, G. (2011). Tumor microenvironment and progression. *Journal of surgical oncology*, 103(6):468-74.

Fabbri, L., Dufies, M., Lacas-Gervais, S., Gardie, B., Gad-Lapiteau, S., Parola, J., ... & Mazure, N. M. (2020). Identification of a new aggressive axis driven by ciliogenesis and absence of VDAC1- Δ C in clear cell Renal Cell Carcinoma patients. *Theranostics*, 10(6), 2696.

Germain, S., Monnot, C., Muller, L., & Eichmann, A. (2010). Hypoxia-driven angiogenesis: role of tip cells and extracellular matrix scaffolding. *Current opinion in hematology*, 17(3), 245-251.

Gobeaux, F., Mosser, G., Anglo, A., Panine, P., Davidson, P., Giraud-Guille, M. M., & Belamie, E. (2008). Fibrillogenesis in dense collagen solutions: a physicochemical study. *Journal of molecular biology*, 376(5), 1509-1522.

Gorin, C., Rochefort, G. Y., Bascetin, R., Ying, H., Lesieur, J., Sadoine, J., ... & Germain, S. (2016). Priming dental pulp stem cells with fibroblast growth factor-2 increases angiogenesis of implanted tissue-engineered constructs through hepatocyte growth factor and vascular endothelial growth factor secretion. *Stem cells translational medicine*, 5(3), 392-404.

Hakimi, A. A., Reznik, E., Lee, C. H., Creighton, C. J., Brannon, A. R., Luna, A., ... & Hsieh, J. J. (2016). An integrated metabolic atlas of clear cell renal cell carcinoma. *Cancer cell*, 29(1), 104-116.

Harlander, S., Schöenberger, D., Toussaint, N. C., Prummer, M., Catalano, A., Brandt, L., ... & Frew, I. J. (2017). Combined mutation in Vhl, Trp53 and Rb1 causes clear cell renal cell carcinoma in mice. *Nature medicine*, 23(7), 869-877.

Hase, H., Jingushi, K., Ueda, Y., Kitae, K., Egawa, H., Ohshio, I., ... & Tsujikawa, K. (2014). LOXL2 status correlates with tumor stage and regulates integrin levels to promote tumor progression in ccRCC. *Molecular cancer research*, 12(12), 1807-1817.

Hlatky, L., Hahnfeldt, P., & Folkman, J. (2002). Clinical application of antiangiogenic therapy: microvessel density, what it does and doesn't tell us. *Journal of the national cancer institute*, 94(12), 883-893.

Hsieh, J. J., Purdue, M. P., Signoretti, S., Swanton, C., Albiges, L., Schmidinger, M., ... & Ficarra, V. (2017). Renal cell carcinoma. *Nature reviews Disease primers*, 3(1), 1-19.

Huang, D., Ding, Y., Zhou, M., Rini, B. I., Petillo, D., Qian, C. N., ... & Teh, B. T. (2010). Interleukin-8 mediates resistance to antiangiogenic agent sunitinib in renal cell carcinoma. *Cancer research*, 70(3), 1063-1071.

Kai, F., Drain, A. P., & Weaver, V. M. (2019). The extracellular matrix modulates the metastatic journey. *Developmental cell*, 49(3), 332-346.

Karaman, M. W., Herrgard, S., Treiber, D. K., Gallant, P., Atteridge, C. E., Campbell, B. T., ... & Zarrinkar, P. P. (2008). A quantitative analysis of kinase inhibitor selectivity. *Nature biotechnology*, 26(1), 127-132.

Kerschnitzki, M., Kollmannsberger, P., Burghammer, M., Duda, G. N., Weinkamer, R., Wagermaier, W., & Fratzl, P. (2013). Architecture of the osteocyte network correlates with bone material quality. *Journal of bone and mineral research*, 28(8), 1837-1845.

Liabotis, A., Ardidie-Robouant, C., Maily, P., Besbes, S., Gutierrez, C., Atlas, Y., ... & Monnot, C. (2022). Angiotensin-like 4-Induced 3D Capillary Morphogenesis Correlates to Stabilization of Endothelial Adherens Junctions and Restriction of VEGF-Induced Sprouting. *Biomedicines*, 10(2), 206.

Lichner, Z., Saleeb, R., Butz, H., Ding, Q., Nofech-Mozes, R., Riad, S., ... & Yousef, G. M. (2019). Sunitinib induces early histomolecular changes in a subset of renal cancer cells that contribute to resistance. *The FASEB Journal*, 33(1), 1347-1359.

Mahalingam, D., Medina, E. C., Esquivel, J. A., Espitia, C. M., Smith, S., Oberheu, K., ... & Nawrocki, S. T. (2010). Vorinostat enhances the activity of temsirolimus in renal cell carcinoma through suppression of survivin levels. *Clinical cancer research*, 16(1), 141-153.

Maxwell, P. H., Wiesener, M. S., Chang, G. W., Clifford, S. C., Vaux, E. C., Cockman, M. E., ... & Ratcliffe, P. J. (1999). The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature*, 399(6733), 271-275.

McIntyre, A., & Harris, A. L. (2015). Metabolic and hypoxic adaptation to anti-angiogenic therapy: a target for induced essentiality. *EMBO molecular medicine*, 7(4), 368-379.

Meylan, M., Petitprez, F., Becht, E., Bougoüin, A., Pupier, G., Calvez, A., ... & Fridman, W. H. (2022). Tertiary lymphoid structures generate and propagate anti-tumor antibody-producing plasma cells in renal cell cancer. *Immunity*, 55(3), 527-541.

Minardi, D., Lucarini, G., Mazzucchelli, R., Milanese, G., Natali, D., Galosi, A. B., ... & Muzzonigro, G. (2005). Prognostic role of Fuhrman grade and vascular endothelial growth factor in pT1a clear cell carcinoma in partial nephrectomy specimens. *The Journal of urology*, 174(4), 1208-1212.

Motzer, R. J., Jonasch, E., Agarwal, N., Alva, A., Baine, M., Beckermann, K., ... & Motter, A. (2022). Kidney Cancer, Version 3.2022, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 20(1), 71-90.

Motzer, R. J., Hutson, T. E., Tomczak, P., Michaelson, M. D., Bukowski, R. M., Rixe, O., ... & Figlin, R. A. (2007). Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma. *New England Journal of Medicine*, *356*(2), 115-124.

Perier, A., Fregni, G., Wittnebel, S., Gad, S., Allard, M., Gervois, N., ... & Caignard, A. (2011). Mutations of the von Hippel–Lindau gene confer increased susceptibility to natural killer cells of clear-cell renal cell carcinoma. *Oncogene*, *30*(23), 2622-2632.

Polyak, K., Haviv, I., & Campbell, I. G. (2009). Co-evolution of tumor cells and their microenvironment. *Trends in genetics*, *25*(1), 30-38.

Qian, C. N., Huang, D., Wundergem, B., & Teh, B. T. (2009). Complexity of tumor vasculature in clear cell renal cell carcinoma. *Cancer*, *115*(S10), 2282-2289.

Rioux-Leclercq, N., Epstein, J. I., Bansard, J. Y., Turlin, B., Patard, J. J., Manunta, A., ... & Moulinoux, J. P. (2001). Clinical significance of cell proliferation, microvessel density, and CD44 adhesion molecule expression in renal cell carcinoma. *Human pathology*, *32*(11), 1209-1215.

Ruiz-Saurí, A., García-Bustos, V., Granero, E., Cuesta, S., Sales, M. A., Marcos, V., & Llombart-Bosch, A. (2018). Distribution of vascular patterns in different subtypes of renal cell carcinoma. A morphometric study in two distinct types of blood vessels. *Pathology & Oncology Research*, *24*(3), 515-524.

Sabo, E., Boltenko, A., Sova, Y., Stein, A., Kleinhaus, S., & Resnick, M. B. (2001). Microscopic analysis and significance of vascular architectural complexity in renal cell carcinoma. *Clinical Cancer Research*, *7*(3), 533-537.

Silvestri, V. L., Henriët, E., Linville, R. M., Wong, A. D., Searson, P. C., & Ewald, A. J. (2020). A tissue-engineered 3D microvessel model reveals the dynamics of mosaic vessel formation in breast cancer. *Cancer research*, *80*(19), 4288-4301.

Su, C., Lv, Y., Lu, W., Yu, Z., Ye, Y., Guo, B., ... & Mo, Z. (2021). Single-Cell RNA Sequencing in Multiple Pathologic Types of Renal Cell Carcinoma Revealed Novel Potential Tumor-Specific Markers. *Frontiers in oncology*, *11*.

Thiery, J. P., & Sleeman, J. P. (2006). Complex networks orchestrate epithelial–mesenchymal transitions. *Nature reviews Molecular cell biology*, *7*(2), 131-142.

Varna, M., Gapihan, G., Feugeas, J. P., Ratajczak, P., Tan, S., Ferreira, I., ... & Bousquet, G. (2015). Stem cells increase in numbers in perinecrotic areas in human renal cancer. *Clinical cancer research*, *21*(4), 916-924.

Yao, X., Qian, C. N., Zhang, Z. F., Tan, M. H., Kort, E. J., Yang, X. J., ... & Teh, B. T. (2007). Two distinct types of blood vessels in clear cell renal cell carcinoma have contrasting prognostic implications. *Clinical Cancer Research*, *13*(1), 161-169.

Young, M. D., Mitchell, T. J., Vieira Braga, F. A., Tran, M. G., Stewart, B. J., Ferdinand, J. R., ... & Behjati, S. (2018). Single-cell transcriptomes from human kidneys reveal the cellular identity of renal tumors. *Science*, 361(6402), 594-599.

Zhang, Y., Narayanan, S.P., Mannan, R., Raskind, G., Wang, X., Vats, P., ...& Chinnaiyan, A.M. (2021) Single-cell analyses of renal cell cancers reveal insights into tumor microenvironment, cell of origin, and therapy response. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(24):e2103240118.

- II. Les stratégies d'invasion et la vascularisation spécifique du ccRCC sont déterminées par les propriétés de la MEC

Formation of ccRCC-specific microvasculature requires tumor invasion associated with ECM remodeling in 3D spheroid models

Noémie Brassard-Jollive^{1,2}, Yoann Atlas^{1,2}, Camille Compère^{1,2}, Corinne Ardidie-Robouant¹, Philippe Mailly¹, Stéphane Germain^{1*}, Laurent Muller^{1*}, Catherine Monnot^{1*}.

¹ Center for Interdisciplinary Research in Biology (CIRB), College de France, CNRS, INSERM, Université PSL, Paris, France.

² Sorbonne Université, Collège doctoral, Paris, France

*: Contributed equally to this work

Corresponding Authors: laurent.muller@college-de-france.fr; catherine.monnot@inserm.fr

ABSTRACT

The hypoxic tumor stroma is characterized by a chaotic vascularization in a remodeled extracellular matrix (ECM). In clear cell renal cell carcinoma (ccRCC), mutation of the tumor suppressor protein Von Hippel Lindau induces stabilization of the hypoxia-inducible factor leading to a pseudo-hypoxic context promoting tumor invasion, hypervascularization and ECM remodeling. Tumor cell invasion is an adaptive process which depends upon coordinated cell interaction with the environment, influencing cell–matrix and cell–cell adhesion, cytoskeletal dynamics and extracellular matrix remodeling (*Odenthal et al., 2016*). Our team recently characterized aberrant endothelial structures called ponds, presenting specific features of dimensions and shapes in both ccRCC human samples and ccRCC-derived xenografts in mouse. Moreover, using *in vitro* 3D co-culture models of vascularized ccRCC microtumors, we previously demonstrated that pond formation and tumor invasion are concomitant processes. On the one hand, we investigated the impact of ECM mechanical properties on tumor invasive strategies, heterotypic interactions and the vascular pond formation. On the other hand, we assessed the impact of mechanotransduction alteration of tumor spheroids on the pond formation. Using ccRCC microtumors, we either modified the mechanical properties of the collagen I hydrogel through the pH-regulated polymerization. We here demonstrated that ECM mechanical properties govern tumor invasion strategies associated with YAP-mediated mechanotransduction. In co-culture, tumor invasion and vascular pond formation are driven by the reciprocal relationship between endothelial cells and tumor spheroids associated with ECM remodeling. We revealed that the alteration of the spheroid mechanotransduction through cytochalasin E treatment inhibits the pond formation. Altogether, the vascular pond formation requires the tumor spheroid invasion associated with ECM remodeling. This result strongly suggest that the migrating tumor cells remodeled a favorable niche for the pond formation.

Keywords: ccRCC, microvasculature, ECM mechanical properties, tumor invasion, *in vitro* 3D models.

Introduction

Clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) is the most common but also aggressive subtype among the renal cell carcinomas. Approximately 20% of RCC patients display primarily metastatic disease and one third of patients will develop distant metastases (*Capitani et al., 2016*). In ccRCC, mutation of the tumor suppressor protein Von Hippel Lindau (VHL) induces stabilization of the hypoxia-inducible factor leading to a pseudo-hypoxic context promoting hypervascularization, tumor invasion and ECM remodeling. This intense angiogenic microenvironment, actively interacting with stromal and tumor cells.

We previously reported that human ccRCC samples consistently display aberrant microvascular structures revealing outlier dimensions and 3D patterns infiltrating the tumor mass (*Brassard-Jollive et al., in preparation*). In the ccRCC aberrant microvasculature, irregularly dilated CD31+ structures containing a nucleus-free cavity were defined as ponds.

In this previous study, we engineered *in vitro* 3D vascularized microtumors containing spheroids of a fluorescent VHL-defective cell line derived from sporadic ccRCC (RCC4) or corresponding cell line in which wild-type VHL was stably expressed (RCC4-VHL) and primary culture of endothelial cells (HUVEC) embedded in collagen I hydrogel.

We demonstrated then that the vascularized spheroids of RCC4 cells recapitulated the ccRCC-specific endothelial ponds unlike the RCC4-VHL spheroids. Furthermore, the RCC4 spheroids displayed the epithelio-mesenchymal transition (EMT) hallmarks and highly invasive capacities, stimulated by paracrine factors, present in the tumor microenvironment. Some publications report that biomechanical cues of the extracellular matrix (ECM) associated with the mechanical interactions of cells and the resulting ECM remodeling impacts the formation of the tumor vasculature and shapes its specific features (*Bonnans et al., 2014; Pickup et al., 2014*). This ECM remodeling involves abnormal and excessive secretion of collagen I as well as structural rearrangement by lysyl oxidase like 2 (LOXL2) leading to an increased stiffness (*Barker et al., 2013*). In this complex tumor microenvironment, mechano- sensing and -transductions of the tumor cells lead to the adaptation of their migratory behavior and of their ECM remodeling capacities (*Odenthal et al., 2016*). After malignant transformation induced by sporadic mutations, tumor cells establish cellular and molecular interactions with neighboring cells and with ECM therefore generating a local remodeling of microenvironment. The progressive extension of this remodeling process leads to the formation of the microenvironmental niche (*Borovski et al., Cancer Res., 2011*), which then strongly contributes to the metastatic dissemination (*Sleeman et al., 2012*).

We here hypothesized that the local environment of ccRCC tumor cells presenting the EMT features with high invasive capacities are able to induce the endothelial pond formation in a remodeled microenvironment. On the one hand, we investigated the impact of ECM mechanical properties on tumor invasive strategies, heterotypic interactions and the vascular pond formation. On the other hand, we assessed the impact of mechanotransduction alteration of tumor spheroids on the pond formation.

Using ccRCC microtumors, we either modified the mechanical properties of the collagen I hydrogel through the pH-regulated polymerization. We here demonstrated that ECM mechanical properties govern tumor invasion strategies associated with YAP-mediated mechanotransduction. In co-culture, tumor invasion and vascular pond formation are driven by the reciprocal relationship between endothelial cells and tumor spheroids associated with ECM remodeling. We revealed that the alteration of the spheroid mechanotransduction through cytochalasin E treatment inhibits the pond formation.

Les résultats - Article « Formation of ccRCC-specific microvasculature requires tumor invasion associated with ECM remodeling in 3D spheroid models »

Altogether, the vascular pond formation requires the tumor spheroid invasion associated with ECM remodeling. This result strongly suggest that the migrating tumor cells remodeled a favorable niche for the pond formation.

Materials and Methods

Cell culture

Fluorescent GFP-RCC4 and LAR-RCC4-VHL were established as previously described (*Brassard-Jollive et al., in preparation*) from pVHL-defective cell line derived from sporadic ccRCC (RCC4) and corresponding cell line in which wild-type pVHL was stably expressed (RCC4- VHL) (*Maxwell et al., 1999*). Cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium 4.5 g/L D-Glucose (DMEM high glucose; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 7.5% fetal bovine serum (Invitrogen). Adult normal human dermal fibroblasts (NHDF; PromoCell, Heidelberg, Germany) were grown in fibroblast growth medium 2 (FGM2; PromoCell). Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were prepared from cords provided by AP-HP, Hôpital Saint-Louis, Unité de Thérapie Cellulaire, CRB-Banque de Sang de Cordon, Paris, France (authorization number AC-2016-2759) (*Liabotis et al., 2022*) and grown as previously described (*Bignon et al., 2011*) in endothelial cell growth medium 2 (ECGM2; PromoCell). Experiments were performed between passages 1 and 5 for each primary cell culture. Conditioned media (CM) of RCC4, RCC4-VHL and NHDF cells were prepared in ECGM2 depleted of VEGF₁₆₅ (hereafter called VEGF) with confluent cells. After two days, media were refreshed and then collected every day.

Collagen hydrogels

Collagen was acid-extracted from rat tails as previously described (*Brassard-Jollive et al., in preparation*). Hydrogels were prepared by diluting collagen to 2 mg/ml in 20 mM acetic acid. Concentrated (10X) M199 culture medium (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) was added and pH was raised to 6.5, 7 or 8.5 by addition of NaHCO₃ on ice. Gelation was performed at 20°C during 40 minutes. In some experiments, human home-made purified LOXL2 (325 U/ml) was added upon neutralization of collagen I (pH 6.5 or 7), at the initiation of gelation at 20°C.

Spheroid formation and invasion assay

Spheroids of 500 cells were formed using the hanging drop method. Heterotypic spheroids were formed using 25% of RCC4 and 75% of RCC4-VHL cells, unless otherwise specified. RCC4, RCC4-VHL or heterotypic spheroids were embedded in the collagen I hydrogels and cultivated in FB96 phenoplates (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) for 3 days. Culture medium was changed every day.

Time-lapse imaging of heterotypic spheroids

Heterotypic spheroids were included in collagen I hydrogel and cultured in presence of complete DMEM. Acquisitions were performed with a Zeiss spinning-disk confocal W1 using 20x/0.8 objective lenses every 30 minutes.

Spheroid vascularization assay

HUVEC were co-embedded at 1.5×10^6 cells/mL with RCC4-GFP spheroids of 500 cells in collagen I hydrogels and cultivated in FB96 phenoplates for 1 to 5 days. Culture medium was changed every day.

Experimental design for single or co-culture of spheroids and endothelial cells

RCC4 or RCC4-VHL spheroids were embedded in collagen I hydrogel (polymerization at pH 6.5) with endothelial cells (1.5×10^6 cells/mL) seeded in separate hydrogel or in common hydrogel using μ -Slide 2 Well co-culture (ibidi GmbH, Gräfelfing, Germany) and cultured in fibroblast conditioned-medium (NHDF-CM) for 1 to 3 days. Medium was changed every day.

Cytochalasin E pre-treatment of spheroids

Spheroids were pre-treated by vehicle (DMSO, 1/1000^e) or by cytochalasin E from *Aspergillus clavatus* (C2149, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA) at 10 μ g/mL. After treatment, spheroids were washed 3 times. Pre-treated spheroids were then co-embedded with endothelial cells in collagen I hydrogel (polymerization at pH6.5) and analyzed after 1 or 2 days of culture in presence of NHDF-CM. Medium was changed every day.

Immunostaining

Hydrogels were fixed with 4% paraformaldehyde for 30 minutes. Immunostaining and fluorescent labeling were performed in PBS-Triton-X-100 0.01%. Actin was stained with phalloidin coupled to Alexa Fluor 488 (Invitrogen, A12379, 1/2000) or Alexa Fluor 555 (Invitrogen, A34055, 1/2000). Anti- YAP and anti-Ki67 were respectively purchased from Santa Cruz (SC-101199, 1/200) and Abcam (196907, 1/200). Secondary antibodies coupled to Alexa fluor dyes were purchased from Thermo Fisher Scientific. Nuclei were stained with 4',6- diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Invitrogen). In the co-culture model, endothelial cells were stained by anti-CD31 antibody coupled to Alexa Fluor 647 (Abcam, 215912, 1/200).

Image acquisition and quantifications

Fluorescent images were acquired by a Zeiss Observer Apotome II using 10x/0.45 and 40x/1.1 objective lenses or by a Zeiss spinning-disk confocal W1 using 20x/0.8, 25x/0.9 or 40x/1.1 objective lenses. For assessment of collagen I remodeling, images were acquired with a Leica SP5-MP confocal microscope equipped with a Leica HCX PL APO X25 objective lens, (water immersion, 0.95 NA) (Leica, Wetzlar, Germany). Multiphoton excitation was performed using a Maitai SP laser (Newport Corporation, Irvine, CA, USA). Second harmonic generation (SHG) signal was collected by external non-descanned detector at 440 nm, using laser excitation at 880 nm. RCC4 or RCC4-VHL spheroid invasion was assessed by quantification of spheroid area, perimeter and circularity index on Z-stack projections (Fiji). RCC4 spheroid invasion was assessed by 3D quantification of sholl analysis of nuclei, total number of objects, and their distance to centroid using a plugin developed by Orion's imaging facility (Imaris 8.2, Bitplane, Belfast, UK and F).

Statistical Analysis

Statistical analysis were conducted using Prism software version 8.0 (GraphPad Prism). All data provide from at least three independent experiments (n=3). Numerical variables are expressed as the mean \pm SEM. The statistical analyses were performed using Prism software version 8.0 (GraphPad software, Paris Descartes). The normality of the distribution was tested with the D'Agostino-Pearson Normality test and Shapiro Wilks Normality test. When the distribution of the data for each group respected the normality law and the variance of the group was homogeneous, a t test was performed to compare two groups or a one-way Anova to compare several group means. When the distribution of at least one of the groups did not follow the normality law or is too small to be tested, comparison between 2 groups was performed with the nonparametric Welch's test and comparison between several groups was performed with the nonparametric Kruskal-Wallis test. Differences were considered significant at $p < 0.05$.

RESULTS

Invasion strategies of RCC4 are driven by ECM mechanical properties and associated with the YAP-mediated mechanotransduction

We previously reported the 3D invasive capacities of the human ccRCC cell line RCC4, defective for VHL and the corresponding VHL-restored cell line RCC4-VHL using a 3D *in vitro* model of tumor spheroids grown in collagen I hydrogel, in various growth media (*Brassard-Jollive et al., in preparation*). Whereas RCC4-VHL spheroids displayed a cyst organization similar to an epithelium, RCC4 spheroids exhibited a highly invasive behavior, revealed by long and numerous protrusions in DMEM, further enhanced in NHDF-CM. We then concluded that VHL gene alteration induced spheroid invasion, stimulated by paracrine factors, present in the tumor microenvironment, such as the fibroblast secreted-factors.

To assess effect of ECM mechanical properties on tumor migration, we designed spheroid invasion assays with varying collagen fibrillogenesis (Fig.1). As modifying physicochemical parameters, such as pH, while keeping constant the collagen I concentration, allows the tailored formation of the fibers (*Coradin et al., 2020*), we generated low (LF), intermediate (IF) or high (HF) fibrillogenesis by polymerizing collagen I at pH 6.5, 7 or 8.5, respectively. Structural organization of collagen I hydrogel was analyzed by second harmonic generation (SHG) imaging revealing short, weakly detectable and homogeneously spread fibrils in LF, longer detectable fibers in IF and thick and abundant fibers, occasionally organized in bundles in HF (Fig.1A). Spheroids embedded in collagen I hydrogels were cultured for 3 days in either DMEM or NHDF-CM and assessed for area, perimeter and circularity index. RCC4-VHL spheroids did not display any invasive capacities when cultured in DMEM whatever the collagen fibrillogenesis and displayed a very subtle invasive behavior, revealed by the significant increase of area and perimeter, as well as the presence of sparse protrusions (Fig.1B-C). Optical section at the spheroid center showed a regular organization of the RCC4-VHL cells around a lumen revealing a cyst-like structure whatever the culture medium and fibrillogenesis rate (Fig.1D). Interestingly, the epithelial feature of the RCC4-VHL spheroid was strongly regulated by the fibroblast-secreted molecules, as we previously reported (*Brassard-Jollive et al., in preparation*) and additional slightly shaped by the increased fibrillogenesis of the hydrogel (Fig.1E). RCC4 spheroids exhibited a highly invasive behavior revealed by numerous invasion strands of aligned cells in LF- and IF- contexts and by a huge amount of migrating individualized cells in HF-context in both DMEM and NHDF-CM (Fig.1F). Quantification of the invasion parameters demonstrated that the invasive capacities are statistically increased in associated with fibrillogenesis rate. Moreover, the paracrine factors secreted by fibroblasts strongly supported very high invasion capacities (Fig.1G). Optical section at the spheroid center revealed the growing protrusions around the nucleus-free print of the former spheroid in the LF- and IF- contexts whereas the individual cells abundantly migrated out of the former spheroid core in the HF-context (Fig.1H).

The dichotomy between the two invasive modes depending on the hydrogel properties was similarly observed in DMEM and NHDF-CM. In order to further characterize these invasive modes, 3D morphological Sholl analyzes were performed on RCC4 spheroids (Fig.1I-K). The distance between the tumor cell nuclei and the spheroid center was not only dramatically increased in NHDF-CM compared to DMEM but also the number of distant nuclei is statistically higher in the HF-context than in the LF- and IF-contexts (Fig.1I). Although the number of individualized cells, counted as objects was similar in IF- and HF-

contexts compared to LF-context, in both DMEM and NHDF-CM (Fig.1J), the distance between the individualized cells and the spheroid center was significantly higher in HF-context than in IF-context (Fig.1K). Altogether, these results demonstrated that the ECM mechanical properties drive the spheroid invasion intensity and strategy. As the shift to individual migration is revealed in particular by an increase of the object number, we further analyzed the tumor cell proliferation by Ki67 staining. The RCC4-VHL spheroids were similarly proliferating when grown in DMEM or NHDF-CM in the 3 hydrogel types (Supplementary Fig.S1A). Interestingly, cell proliferation in the RCC4 spheroids was significantly increased by NHDF-CM compared with DMEM and further significantly enhanced by the increased fibrillogenesis of the hydrogels (Supplementary Fig.S1B-C).

Our results demonstrate that the intensity of the invasive capacities of the ccRCC-derived spheroids are mainly determined by the paracrine factors present in the tumor microenvironment whereas the invasive strategies are driven by the ECM mechanical properties. Moreover, the progressive shift from collective to individual invasion is associated with an increasing proliferation.

As ECM mechanical properties regulate invasive strategies and proliferation, we aimed to further analyze the activation of mechanotransduction signaling pathway. In order to decipher the tumor cell mechanotransduction underlying the invasion modes, *in situ* YAP subcellular localization was analyzed by immunofluorescence staining in the LF-, IF or HF-context of the 3D invasive model (Fig.2). Interestingly, YAP was uniformly detected throughout the whole invading spheroid in the LF-hydrogel. High magnification revealed its cytoplasmic and nuclear localization of the aligned cells in the invasive strands both at the vicinity or extremity of the spheroid core (Fig.2A-B, top panels). YAP localization was more heterogeneous in the spheroid expanding in the IF-hydrogel, occasionally restricted into the nuclei of some cells or cytoplasm of others (Fig.2A, middle panels). The subcellular YAP localization was exclusively detected in the nuclei of the cells individually migrating out of the spheroid in the HF- hydrogel, whether they were in the proximity or at distance from the core (Fig.2A, bottom panels).

These results demonstrate for the first time that the intensity of the collagen fibrillogenesis tunes the YAP-mediated mechanotransduction associated with the invasive strategies of the tumor cells in a 3D microenvironment.

The leader-follower invasive process is driven by ECM mechanical properties

As EMT in cancer is a reversible transition process involving multiple intermediate stages known as partial, we assessed the behavior of epithelial and tumor cells co-existing in the same microenvironment (Vilchez Mercedes *et al.*, 2021). The 2D culture of various ratios of RCC4/RCC4-VHL cells firstly demonstrated the specific patterning of the two distinct cell populations (Fig.3A). From 25% of RCC4 cells, they organized either individually or in small clusters whereas the RCC4-VHL cells maintained a very cohesive organization of clusters even when reaching the low ratio of 25%. We next analyzed the spatial organization of the two cell populations in the 3D spheroid model in IF-hydrogel. Increasing ratio of RCC4 spheroids induced increasing invasion of the heterotypic spheroid (Supplementary Fig.S2A). Studies were further performed with 25% of the RCC4 cells in order to maintain moderate invasion of the heterotypic spheroids. Acquisitions of the fixed heterotypic spheroids were performed between 0 to 3 days of culture (Fig.3B). The spheroids displayed some distinct patterns of the two populations at the initial stage with a cohesive spheroid core composed of RCC4-VHL cells maintained over time whereas the RCC4 cells migrated out of the spheroid

either individually or inserted in homotypic invasion strand. Concomitantly to the RCC4 cell migration, the spheroid composed of RCC4-VHL lost its circular shape as some protrusions stretched it out. Time-lapse microscopy between 2 to 3 days associated with higher magnification provided a better visualization of these concomitant events (Fig.3C and Movie1). Several radial RCC4 cells stuck out the regular surface of the RCC4-VHL spheroid and moved forward and backward along the same axis for the 20 hour-imaging. Interestingly, the RCC4 cell pulled the RCC4-VHL cell (59.5 h) which maintained permanent cohesive contact with the spheroid. Overlapping with the RCC4 cell, the RCC4-VHL tip passed it (60.5 h), pulled the spheroid surface and then moved backward (66 h) forming a large, short and stable protrusion at the spheroid surface (69 h). Meanwhile, the RCC4 cell body detached from the spheroid (66.5 h) and then moved backward along the same axis establishing new contact with the RCC4-VHL cell (69 h). The leader RCC4 cell therefore created a linear path and steered the follower RCC4-VHL cells, in a dynamic process previously observed for the cancer-associated fibroblasts and tumor-associated macrophages (*Vilchez Mercedes et al., 2021*). We demonstrated that tumor cells displaying a VHL gene alteration were able to induce migration of non-invasive cells through a leader-follower mechanism. We therefore suggest that this process would contribute to an increased aggressive feature of the ccRCC tumor.

As the RCC4-secreted molecules were insufficient to induce RCC4-VHL invasion (Supplementary Fig.S2B) and as the ECM mechanical properties drive the invasion strategies, we then deciphered the impact of collagen I fibrillogenesis on the leader-follower process.

This leader-follower process was observed in the three hydrogel types and the two culture media where the RCC4 cells invaded the microenvironment whereas the spheroid was mainly if not totally composed of RCC4-VHL (Fig.3D). Consistent with the behavior of the homotypic spheroids (Fig.1F), the RCC4 cell individualization increased with the fibrillogenesis rate. Furthermore, Ki67 staining revealed proliferative RCC4-VHL and RCC4 cells either individualized or integrated in invasion strands (Supplementary Fig.S3).

The invading cell morphology was also dramatically affected by the variation of the microenvironment. In LF context, the RCC4 cells were uniformly elongated along linear track and presented orientated filopodia upstream this track whereas in HF context, the RCC4 cell shapes were diverse and irregular, presenting many cell body extensions. This feature was amplified in the NHDF-CM, as we previously described its ability to increase the RCC4 invasion capacities compared to DMEM (*Brassard-Jollive et al., in preparation*). Moreover, the RCC4-VHL spheroid circularity disappeared when the fibrillogenesis increased, suggesting a high number of rapid pulling processes.

Altogether, these data demonstrate that the RCC4 cells can act as leader cells transiently interacting with the follower RCC4-VHL cells and coordinating the motion of the spheroid strands. The RCC4 leader cells are therefore able to promote collective motion of the RCC4-VHL follower cells which would be unable to invade the microenvironment if alone. Interestingly, the variation of the rate of the collagen I fibrillogenesis also suggested that the leader cells remodel the ECM to create a low-resistance path for the follower cells.

In order to provide an alternative relevant model for varying the ECM mechanical properties, we performed a biomimetic cross-linking approach, using the home-made purified active recombinant human lysyl oxidase-like 2 (LOXL2) (*Schmelzer et al., 2019; Umana-Diaz et al., 2020*) (Fig.4). LOXL2 is an ECM-remodeling enzyme, which cross-links the collagen I (*Schilter et al., J.Cell Mol.Med., 2019*) and is overexpressed in ccRCC (*Hase et al., 2014; Ahluwalia et al., 2021*). SHG imaging showed that adding LOXL2 modulated fiber length and increased pore size (Fig.4A). The heterotypic spheroids were grown in DMEM in order to

maintain moderate migration capacities of the RCC4 cells (Fig.4B). LOXL2 treated-matrices enhanced the leader-follower process, by increasing the number of elongated migrating RCC4 cells upstream to the RCC4-VHL strands. The 3D quantification revealed a significant increase of both invading RCC4 cells and RCC4-VHL strands whereas the area of the spheroid constituted by the RCC4-VHL cells was not altered by LOXL2 treatment of the ECM (Fig.4C). These data suggest that the LOXL2-induced ECM remodeling favors the invasive capacities of the RCC4 and the track formation allowing the RCC4 motion through the strands.

These results demonstrate that the ECM mechanical properties regulate the invasion intensity and strategies of the RCC4 and the leader-follower process involving the RCC4-VHL strands. These data suggest an ECM remodeling by the RCC4 cells allowing the formation of non-resistant tracks for RCC4-VHL motion.

The reciprocal relationship between endothelial cells and tumor spheroids drives tumor invasion and vascular pond formation.

As ECM remodeling during tumor growth provides dysregulations of angiogenesis (*Kretschmer et al., 2021*), we addressed the question of the involvement of the reciprocal relationship between endothelial and tumor cells on the spheroid invasion and pond formations that we previously reported (*Brassard-Jollive et al., in preparation*). For this purpose, we performed co-culture of RCC4 or RCC4-VHL spheroids and HUVEC embedded in adjacent or common LF-collagen I hydrogels. The complete surface of the well is covered by NHDF-CM allowing the diffusion of the paracrine factors in the hydrogels (Fig.5A). Consistent to the time-course previously reported (*Brassard-Jollive et al., in preparation*), we observed limited invasive capacities of the RCC4-VHL spheroid, induced by the co-culture with endothelial cells at 24 hours since the corresponding spheroid did not invade in the setting of adjacent hydrogels. In contrast, the RCC4 spheroid invaded in the same setting although to a less extent than in co-culture setting (Fig.5B). In parallel, the capillary morphogenesis strongly differed in presence of RCC4-VHL or RCC4 spheroids both at 24 and 72 hours (Fig.5B-C). At the early stage, rare capillary sections were formed at the RCC4-VHL contact whereas a high number of capillaries converged towards the RCC4 spheroid.

At the later stage, the sparse endothelial network around the RCC4-VHL spheroid was composed of short and weakly connected capillaries whereas numerous converging capillaries towards the RCC4 spheroid led to a dense and interconnected network, previously characterized as an endothelial pond (*Brassard-Jollive et al., in preparation*). On the contrary, the adjacent hydrogels did not display any pond formation. These results highlight that paracrine factors are not sufficient to induce tumor invasion and vascular pond formation. Moreover, the co-culture of endothelial and RCC4 cells, at various concentrations, in suspension in the LF-collagen I hydrogel did not allow the pond formation (Supplementary Fig.S4). This result reveals the involvement of spheroid architecture for the pond formation.

These data highlight a complex reciprocal process between endothelial cells and tumor spheroids, driving tumor invasion and vascular pond formation.

As the co-culture with endothelial cells induced or increased the RCC4-VHL or RCC4 spheroid invasion, respectively, we further analyzed the effect of endothelial cells on tumor invasion strategies. The culture setting was identical to those described above. Whereas no protrusion was detectable in RCC4-VHL spheroids even at high magnification in the adjacent hydrogels, cell protrusions sprouted out of the spheroid in the co-culture (Fig.6A; top panel). The co-culture of the RCC4 spheroids with endothelial cells shifted the invasion strands

composed of several aligned cells towards invading individualized cells presenting a mesenchymal appearance (Fig.6A; bottom panel). This shift was further assessed by the 3D quantification of the invasion parameters (Fig.6B-D) revealing a significant increase of the number of individualized RCC4 cells in the co-culture setting. Co-culture of tumor spheroids and endothelial cells shifts the invasion strategy from collective to individual migration.

These data suggest the involvement of the ECM mechanical properties and remodeling in the invasion strategies. SHG imaging in the adjacent setting further revealed that the RCC4- VHL spheroid slightly remodeled the collagen I fibers whereas the invasion strands sprouting from the RCC4 spheroid pulled the fibers along the migratory axis (Fig.6E). In the co-culture model, the endothelial cells additionally remodeled and packed the fibers, therefore establishing tracks between them and the spheroid protrusions, either from RCC4 or RCC4- VHL cells. The reciprocal relationship between endothelial cells and tumor spheroids associated with ECM remodeling drives tumor invasion and vascular pond formation.

The vascular pond formation requires the tumor spheroid invasion associated with ECM remodeling

To assess whether the ECM mechanical properties affect the pond formation, we performed the co-culture model of endothelial and RCC4 cells in the LF, IF or HF contexts (Fig.7) for analyzing the pond initiation after 2 days culture (Fig.7A-C) or the pond stabilization after 5 days culture (Fig.7D-F), according to the time-course previously described in the LF-collagen I hydrogel (*Brassard-Jollive et al., in preparation*). At the initial stage, the endothelial capillaries converged towards the visible spheroid core of the RCC4 cells in LF and IF contexts, whereas small capillaries sections were spread in the microenvironment, which uniformly contained individualized migrating RCC4 cells in the HF context (Fig.7A). Consistent with these observations, quantification of the vascular area revealed a significant decrease in the HF context compared to LF- and IF- ones (Fig.7B). SHG imaging combined with endothelial and tumor cells stainings revealed a cavity at the spheroid center delineated by a polarized border constituted by luminal endothelial monolayer, packed collagen I fibers and basal RCC4 cells in the LF- and IF-contexts. In contrast, the barely detectable cavity was not delineated by a similar polarized structure in the HF-context (Fig.7C). At 5 days, while the individualized migrating RCC4 cells were uniformly spread in the microenvironment in any context, the pond was detectable only in the LF-and IF-collagen I hydrogels, as revealed by the quantification of the vascular area, significantly decreased in the HF-context (Fig.7D-E). Similar remodeling as two days was observed in close contact to the pond cavity in the LF- and IF-contexts (Fig.7F). On the contrary, the border and the lumen cavity were not detectable in the HF-context. The ECM mechanical properties allowing an active remodeling process by the endothelial and invading tumor cells drive the pond formation. We therefore hypothesized that the ECM remodeling induced by capillary morphogenesis and tumor spheroid invasion supports the pond formation process.

Inhibiting the actin polymerization by pretreating the RCC4 spheroids with cytochalasin E provided an alternative approach for tuning its invasion capacities and associated-ECM remodeling. Indeed, as the biomechanical variations of the hydrogels also impacted the capillary formation (Supplementary Fig.S5), we aimed to specifically targeted the spheroid invasive capacities. For this purpose, the vehicle- or cytochalasin E-treated spheroids were immediately embedded in the LF-collagen I hydrogel, co-cultured with endothelial cells and analyzed after 1 or 2 days of culture (Fig.8). Analysis of the spheroid

invasion capacities associated with ECM remodeling were performed after 1 day of culture by SHG imaging (Fig.8A-B). Whereas an intense remodeling and compaction of the collagen I fibers were associated to the spheroid protrusions and surface, the cytochalasin E-pretreated spheroid dramatically lacked of consistent remodeling (Fig.8A). Moreover, the ECM remodeling performed by the endothelial cells in the spheroid proximity was maintained (Fig.8B). To conclude, the alteration of the spheroid mechanotransduction inhibits its invasion and ECM remodeling capacities while maintaining the ECM remodeling abilities of the endothelial cells. We further observed that the cytochalasin E-treated spheroids did not invade the hydrogel after 1 day and displayed a delayed invasion after 2 days, when compared to the corresponding vehicle-treated spheroids (Fig.8C-D). Remarkably, the pond initiation was similarly delayed, in absence of any accumulation of the endothelial cells at the spheroid center. A significant decrease of the invasion and vascular area in the cytochalasin E condition at 1 and 2 days was revealed by quantifications (Fig.8E-F). Furthermore, the invasive and vascular areas were two robustly correlated data (Fig.8G). We clearly demonstrated that the alteration of the spheroid mechanotransduction inhibits the pond formation.

In conclusion, the vascular pond formation requires the tumor spheroid invasion associated with ECM remodeling. This result strongly suggest that the migrating tumor cells remodeled a favorable niche for the pond formation.

FIGURE 1

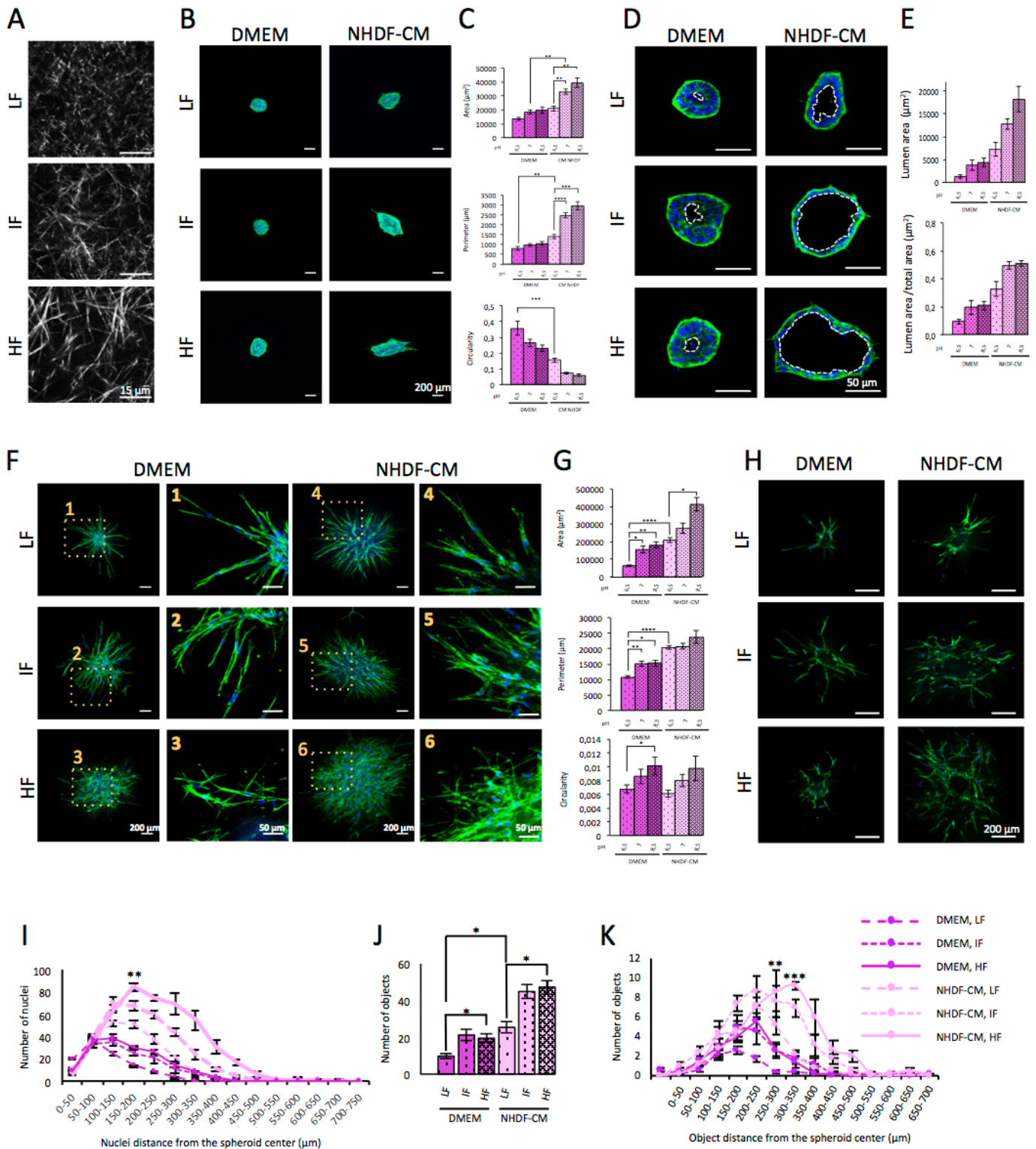
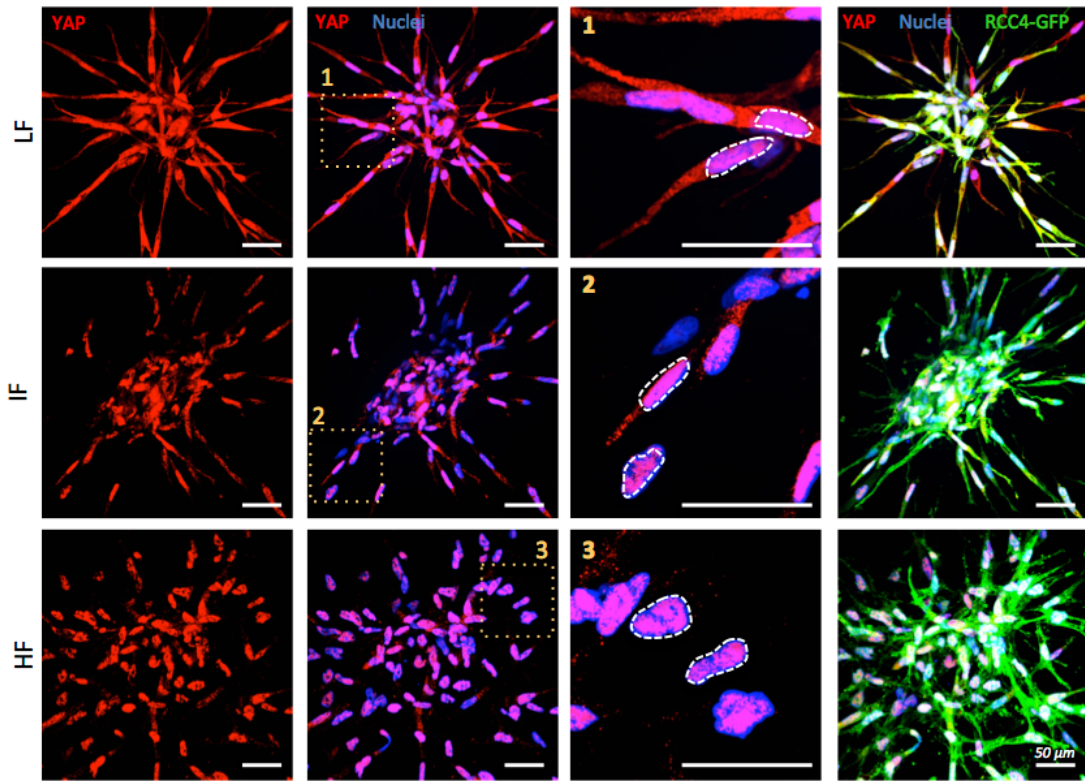


Figure 1. Invasion strategies are driven by ECM mechanical properties.

ECM properties of collagen I (2 mg/mL) hydrogels were modulated by tuning the pH (6.5, 7 or 8.5) during polymerization at 20°C leading to low (LF), intermediate (IF) or high (HF) fibrillogenesis. (A) Collagen I fibers were visualized in the hydrogels by second harmonic generation (SHG) using an inverted Leica SP5 a 25x/0.9. Scale bar: 15 μ m. (B-H) Spheroids of RCC4-VHL (B and D) or RCC4 cells (F and H) were embedded in collagen I hydrogel and cultured in DMEM or NHDF-CM for 3 days. Images were acquired using a Zeiss Observer Apotome II at 10x/0.45 (B, F and H) or a Zeiss spinning disk confocal W1 at 25x/0.9 (D). Z-stack projections are represented (B and F). Scale bar: 200 μ m (B, F panels with low magnification and H). Higher magnifications of cell invasion of RCC4 spheroid were obtained (1-6 orange dotted frames) with 3.5x zoom. Scale bar: 50 μ m (F panels with high magnification). Cyst lumen of RCC4-VHL spheroid or loss of RCC4 spheroid integrity was detected on optical section performed in the middle of the spheroids (D or H, respectively). White dot lines delineated the cyst cavity of the RCC4-VHL spheroid (D). Scale bar: 50 μ m. Cyst lumen was analyzed by quantification of the lumen area and lumen area over the total spheroid area on optical section (E). (C, G and I-K) Spheroid invasion was assessed by quantification of the spheroid area, perimeter and circularity index on Z-stack projections (C and G) or by 3D quantification for RCC4 spheroids of Sholl analysis of nuclei (I), total number of objects (J) and their distance to the spheroid center (K). Graphs represent the mean of 3 independent experiments +/- SEM (C, E, I-K). Statistical analyses were performed using Brown-Forsythe and Welch ANOVA tests (* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$) (C for Perimeter, G for Area and Perimeter), Kruskal- Wallis test (** $p < 0.01$, *** $p < 0.0001$) (C for Area and Circularity index) or ordinary one-way.

FIGURE 2

A



B

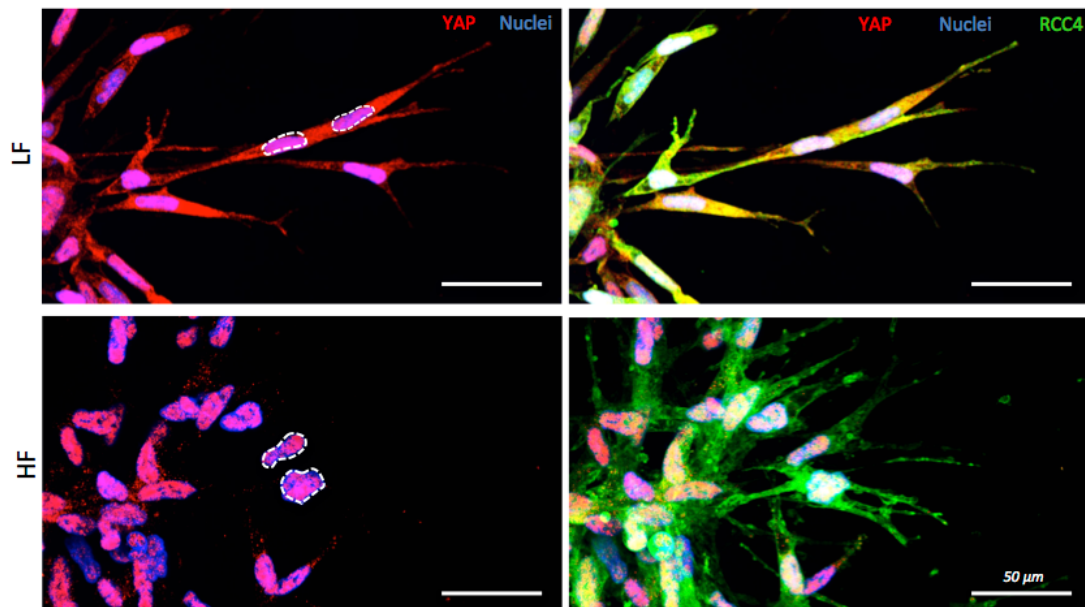


Figure 2. Invasion strategies are associated with YAP-dependent mechanotransduction.

(A-B) Spheroids of RCC4 cells (green) were embedded in LF-, IF or HF-collagen I hydrogels and cultured in DMEM for 3 days. Subcellular localization of YAP protein was analyzed by anti-YAP immunostaining (red) associated with nuclei staining (blue). Images of the whole spheroid **(A)** or of the invasive front **(B)** were acquired using a Zeiss spinning disk confocal W1 at 40x/1.1 and Z-stack projections are represented. Higher magnifications of RCC4 cells (1-3 orange dotted frames) were obtained with 3.4x zoom **(A)**. White dot lines highlight nucleus borders. Scale bar: 50 μm .

FIGURE 3

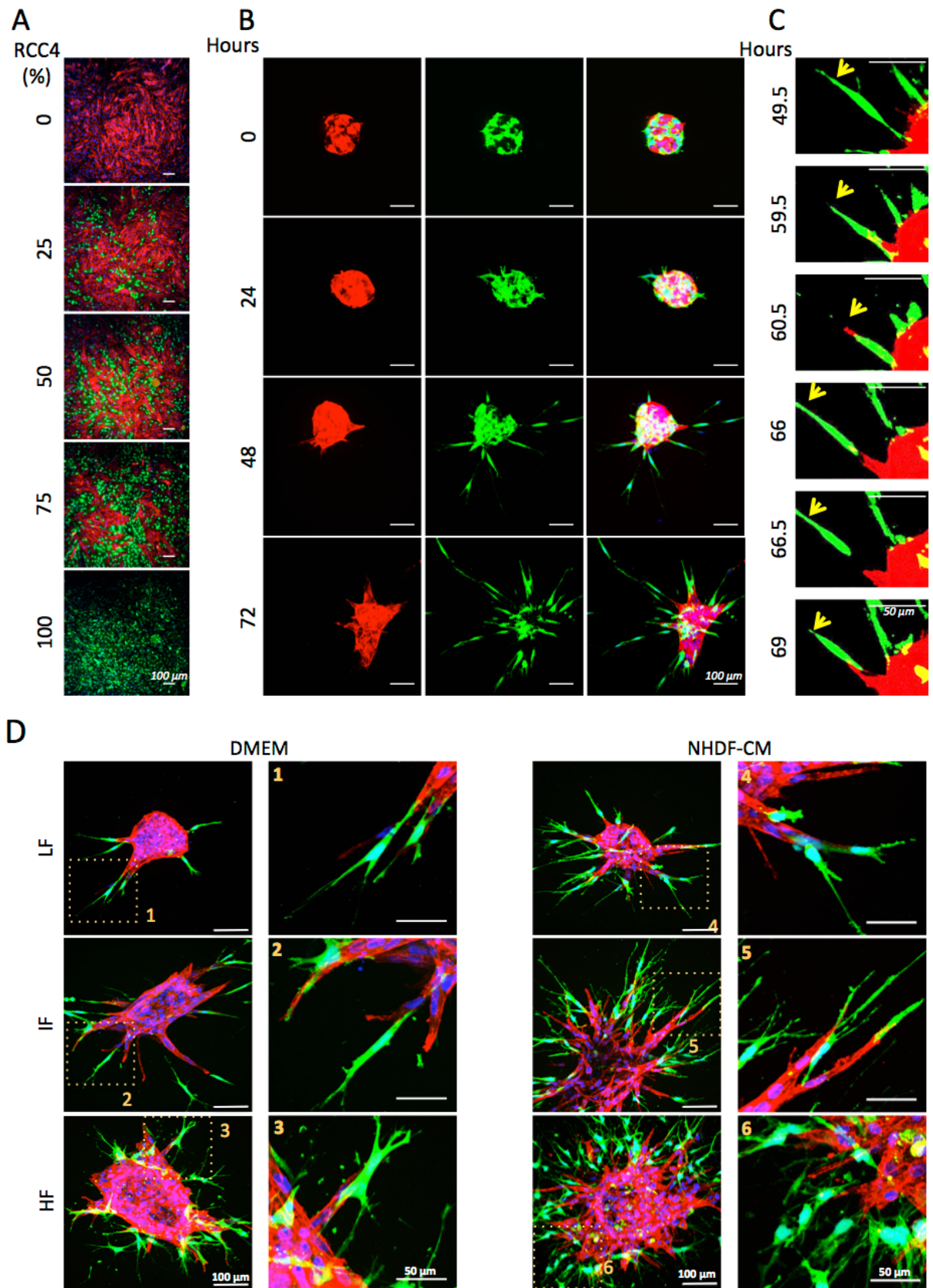


Figure 3. Leader-follower invasive mechanisms are induced by VHL loss of function and regulated by ECM mechanical properties.

(A) Heterotypic 2D co-culture of RCC4 (green) and RCC4-VHL (red) cells, were performed in various proportions ranking from 0% to 100% of RCC4 cells, for 3 days in presence of DMEM. **(B-C)** Heterotypic spheroids of 25% RCC4 (green) and 75% of RCC4-VHL (red) cells were cultured in LF-collagen I hydrogel in presence of DMEM for 0, 24, 48 and 72 hours **(B)**. Time-lapse of the invasive front was performed by image acquisitions every 30 minutes between 49.5 and 69 hours. The follow-up of a RCC4-invasive strand was labelled by a yellow arrowhead **(C)**. **(D)** Heterotypic spheroids were cultured in LF-, IF- or HF-collagen I hydrogels in presence of DMEM or NHDF-CM for 3 days. Images were acquired using a Zeiss spinning disk confocal W1 at 10x/0.45 **(A)**, 20x/0.8 **(B and C)** or 25x/0.9 **(D)**. Scale bar: 50 **(C and D panels with high magnification)** or 100 μm **(D panels with low magnification)**.

FIGURE 4

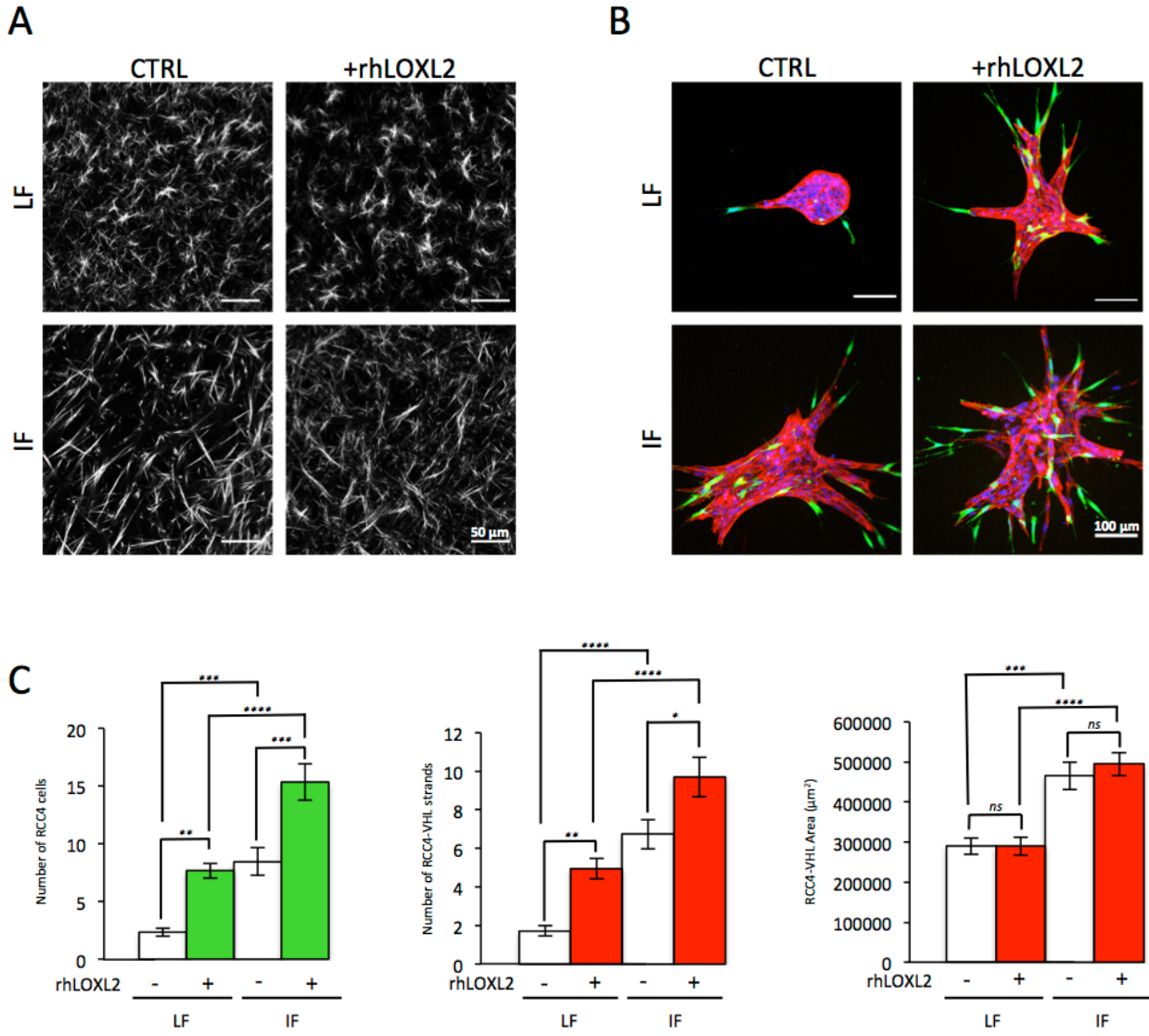


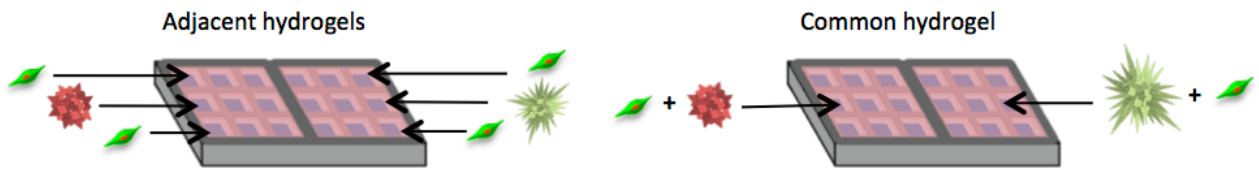
Figure 4. ECM mechanical properties modulated by LOXL2 stimulate leader-follower invasive mechanisms.

ECM properties were modulated by adding recombinant human active (+LOXL2) protein during the polymerization of the LF- or IF-collagen I hydrogels. **(A)** Collagen I remodeling was visualized by SHG using an inverted Leica SP5 at 25x/0.9. Scale bar: 50 μm . **(B)** Heterotypic spheroids of 25% of RCC4 cells (green) and 75% of RCC4-VHL (red) were cultured in the LF- or IF-collagen I hydrogels in DMEM for 3 days. Images were acquired using a Zeiss spinning disk confocal W1 at 25x/0.8. Z-stack projections are represented. Scale bar: 100 μm . **(C)** Leader-follower process was analyzed by 3D quantification of number of RCC4 cells, of RCC4-VHL strands and area of RCC4-VHL spheroids. Graphs represent the mean of 3 independent experiments. Statistical analysis was performed using ordinary one-way ANOVA (ns $p > 0.05$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$).

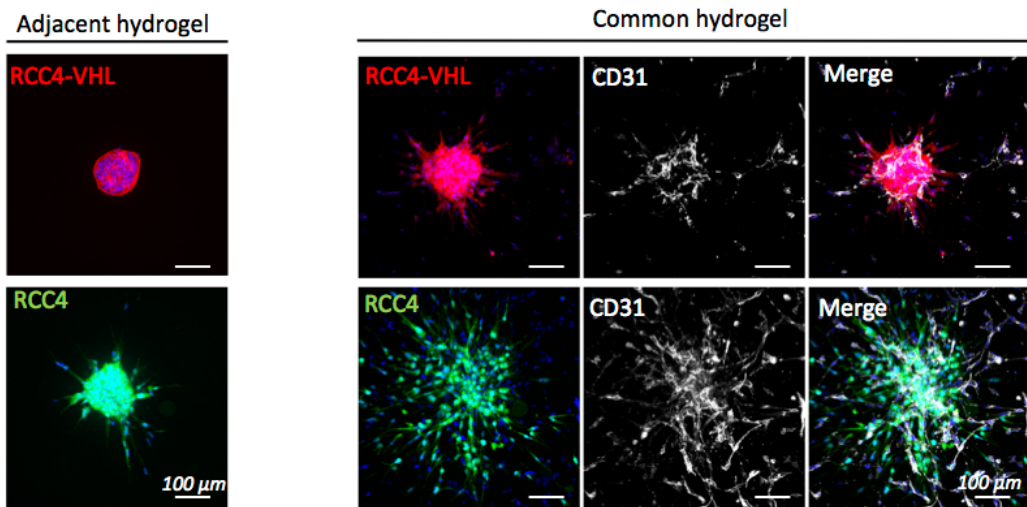
FIGURE 5

A

Culture of tumor spheroids and HUVEC embedded in :



B



C

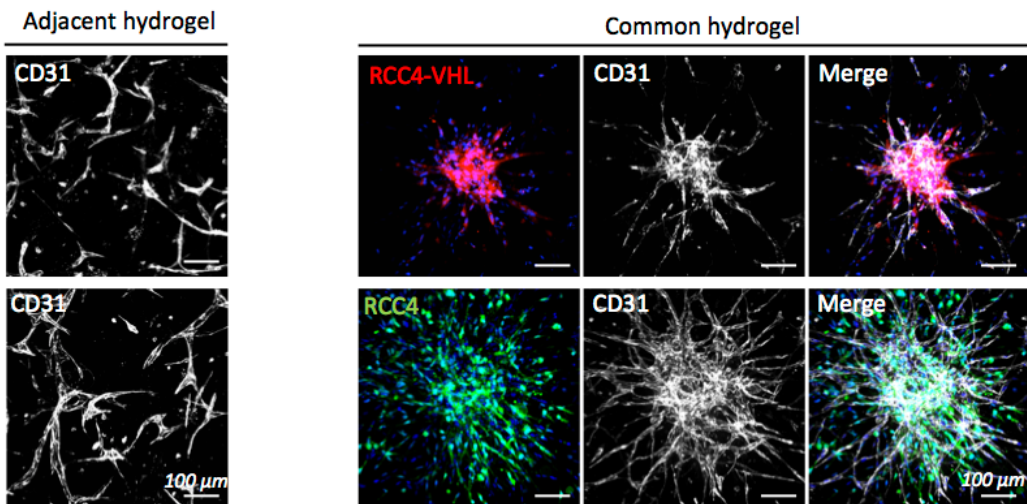
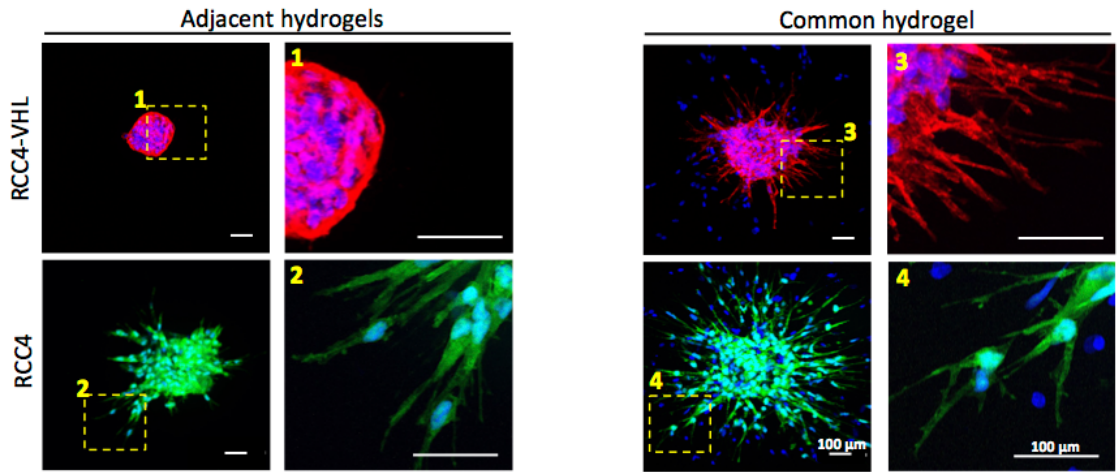


Figure 5. Co-culture of endothelial and tumor cells induces endothelial pond formation and tumor spheroid invasion.

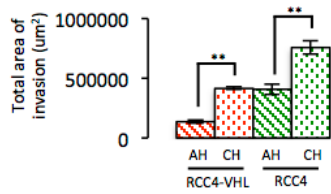
(A) Experimental design of simple or co-culture of endothelial cells (green) and spheroids of RCC4 (green) or RCC4-VHL (red) allowed to dissociate paracrine and mechanical properties. **(B and C)** RCC4 (green) or RCC4-VHL (red) spheroids were embedded in LF-collagen I hydrogels with endothelial cells seeded in separate hydrogel (left panel) or in the same hydrogel (right panel) and cultured in NHDF-CM. Immunofluorescence of endothelial capillaries was performed using anti-CD31 antibody (white). Nuclei were stained by DAPI (blue). Tumor invasion was visualized at 24 hours **(B, left panel)** and capillary morphogenesis at 72 hours **(C, left panel)**. Images were acquired using a Zeiss spinning disk confocal W1 at 20x/0.8. Z-stack projections are represented. Scale bar: 100 μm .

FIGURE 6

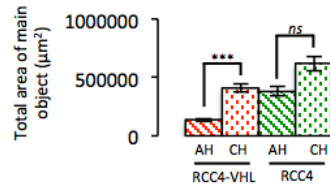
A



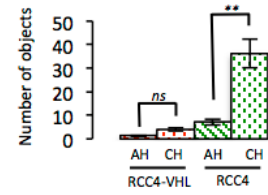
B



C



D



E

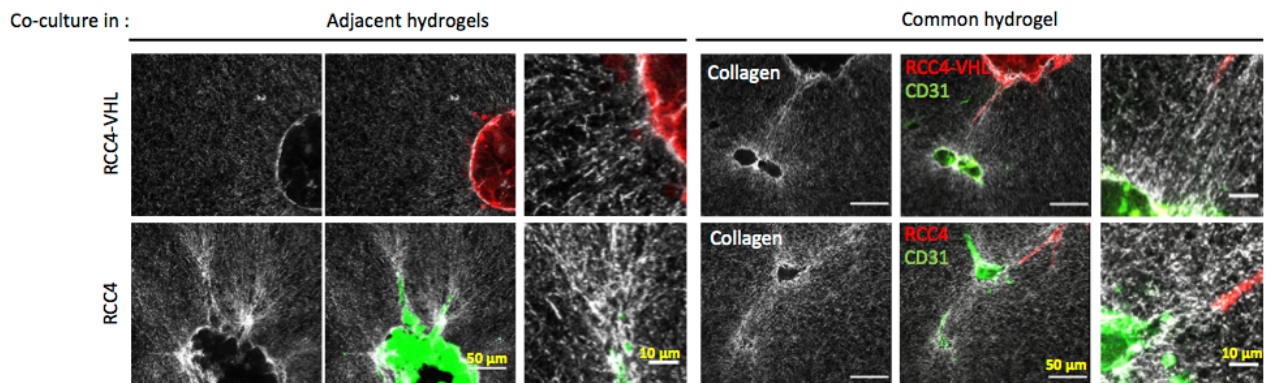


Figure 6. Invasion strategies of tumor cells are modulated by co-culture with endothelial cells.

(A) RCC4 (green) and RCC4-VHL (red) spheroids were embedded in LF-collagen I hydrogel with endothelial cells seeded in separate hydrogel (left panel) or in the same hydrogel (right panel) and cultured for 24 hours in NHDF-CM. Nuclei were stained by DAPI (blue). Fluorescent images were acquired using a Zeiss spinning disk confocal w1 at 25x/0.9 and z-stack projections are represented with exception for higher magnifications (1-4 yellow dotted frames) performed with 3.6x zoom. Scale bar: 100 μ m. Spheroid invasion was analyzed by 3D quantification of several parameters in adjacent hydrogel (AH) or common hydrogel (CH): total area of invasion **(B)**, area of main object **(C)** and total number of objects **(D)**. Graphs represent the mean of 3 independent experiments +/- SEM. Statistical analysis was performed using Kruskal-Wallis test (ns $p > 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). Collagen I remodeling was visualized by SHG using an inverted Leica SP5 at 25x/0.9. Optical sections are represented **(E)** and higher magnification of specific areas are shown **(E, third and sixth columns)**. Scale bar: 10 **(E, third and sixth columns)** or 50 μ m **(E, first, second, fourth and fifth columns)**.

FIGURE 7

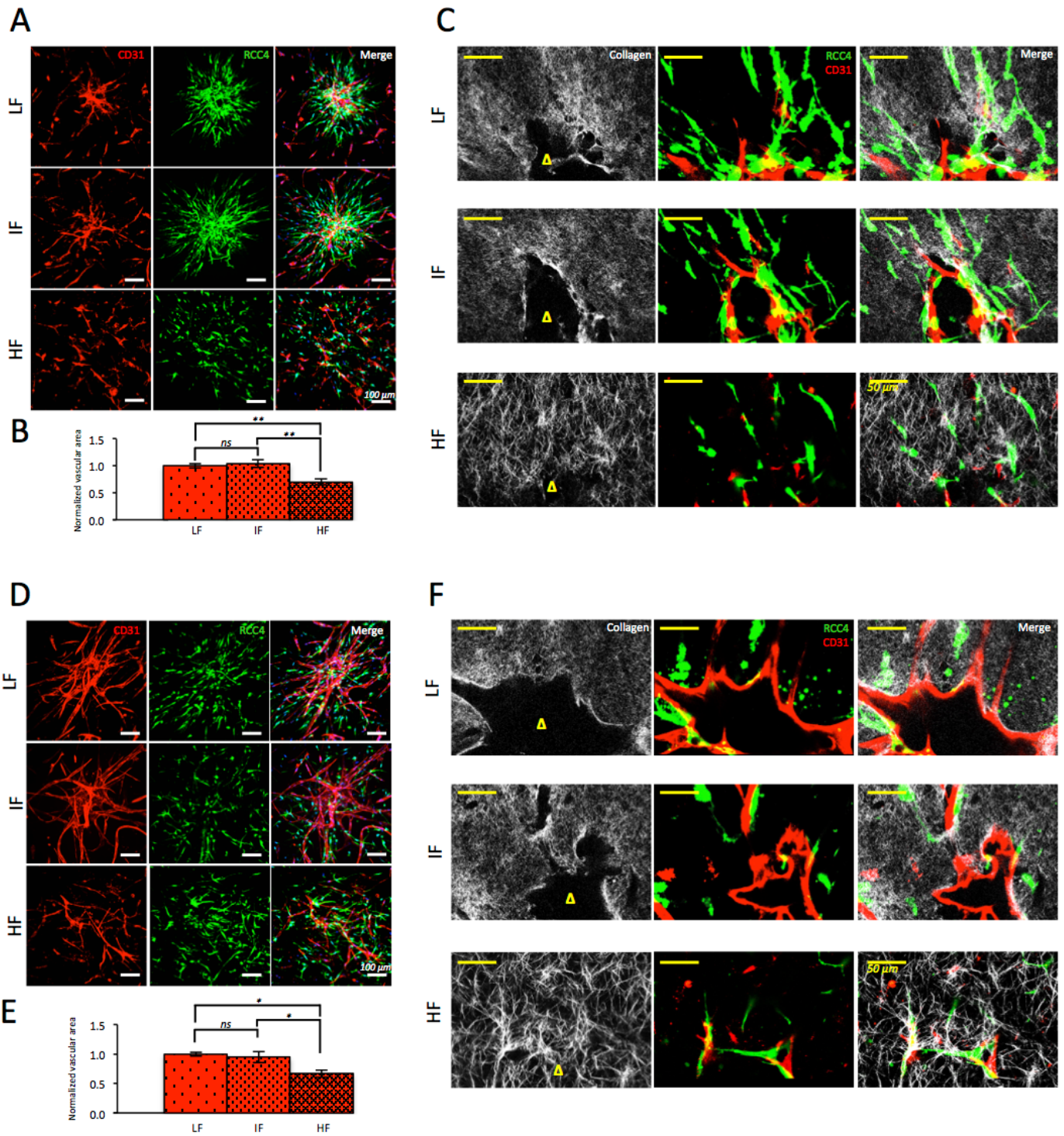


Figure 7. Vasculogenesis and pond formation are driven by ECM mechanical properties. RCC4 spheroids (green) and endothelial cells were co-cultured in LF-, IF or HF-collagen I hydrogel in presence of NHDF-CM for 2 **(A-C)** or 5 days **(D-F)**. **(A and D)** Immunofluorescence of endothelial capillaries was performed using anti-CD31 antibody (red). Nuclei were stained by DAPI (blue). Fluorescent images were acquired using a Zeiss spinning disk confocal w1 at 20x/0.8 and z-stack projections are represented. **(B and E)** Capillary and pond formation was analyzed on Z-stack projections. Graphs represent the mean of 3 independent experiments +/- SEM. Statistical analysis was performed using ordinary one-way ANOVA (ns p>0.05, ** p<0.01) **(B)** or Kruskal-Wallis test (ns p>0.05, * p<0.05) **(E)**. **(C and F)** Collagen I remodeling (white) was detected by SHG using an inverted Leica SP5 at 25x/0.9. RCC4 cells are stained in green and endothelial cells in red. Optical sections are represented. Delta symbol represents the spheroid location. Scale bar: 50 or 100 μ m.

FIGURE 8

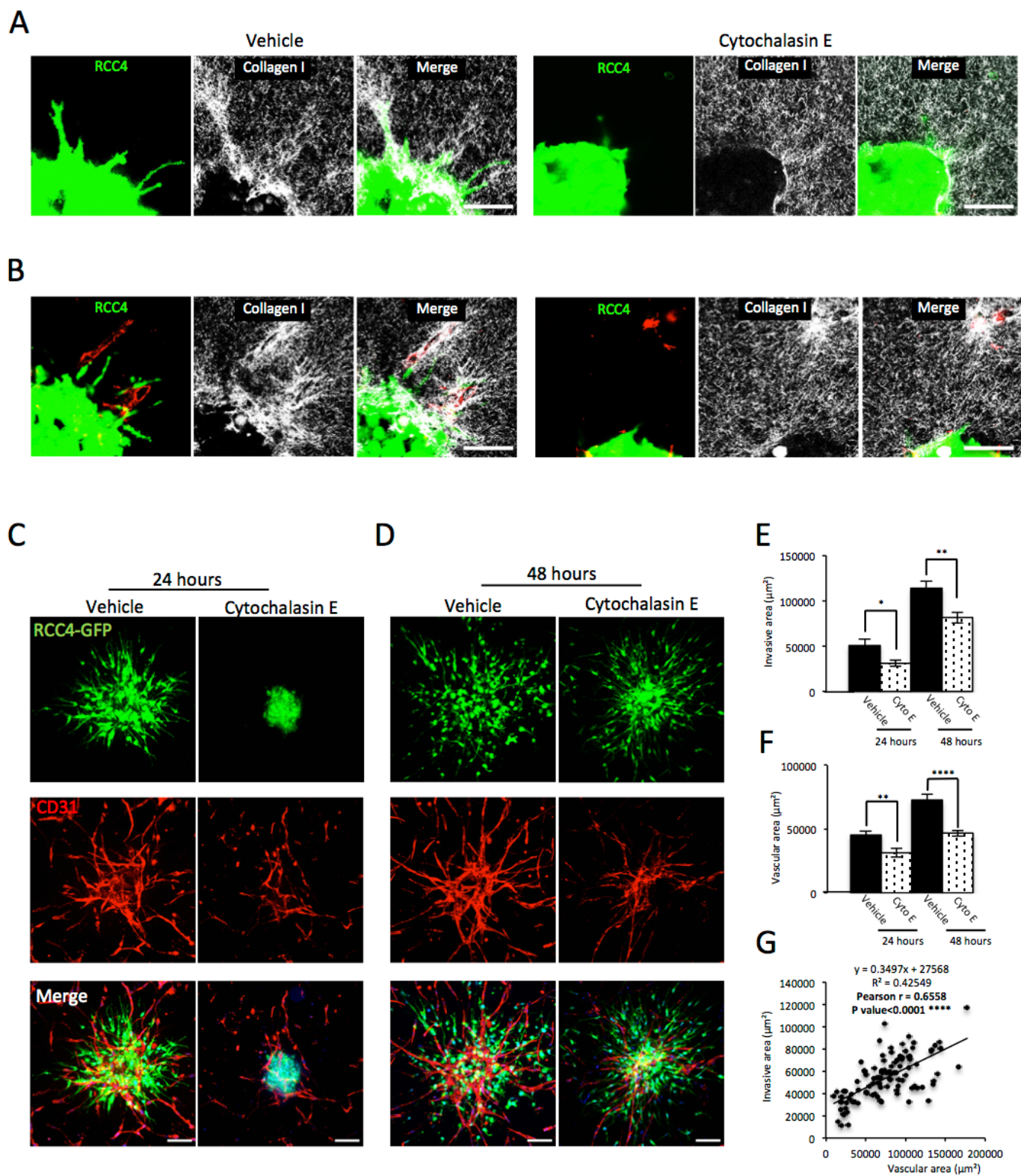
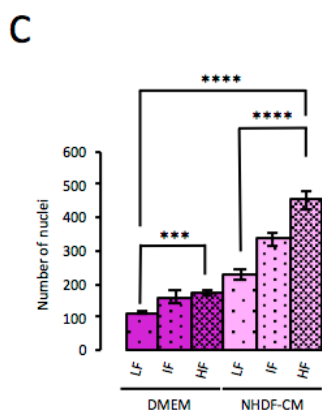
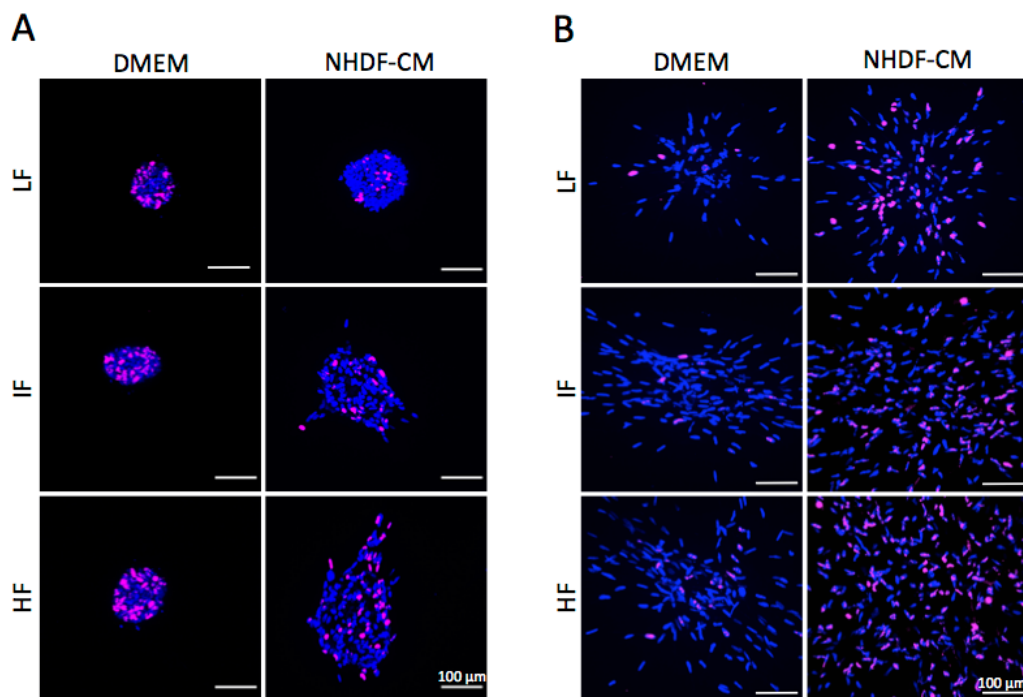


Figure 8. Transient inhibition of tumor spheroid invasion and associated ECM remodeling delays the endothelial pond formation.

Spheroids were pre-treated by vehicle or cytochalasin E. **(A and B)** Endothelial cells and pre-treated-spheroids (green) were co-embedded in LF-collagen I hydrogel for 24 hours. Fluorescent RCC4 cells are in red and endothelial cells stained by anti-CD31 antibody (red). Collagen I remodeling (white) in the vicinity of the spheroid alone **(A)** or co-cultured with endothelial cells **(B)** was detected by SHG using an inverted Leica SP5 at 25x/0.9. Projections of 5 optical sections were represented. Scale bar: 50 μm . **(C and D)** Endothelial cells and pre-treated-spheroids (green) were co-embedded in LF-collagen I hydrogel for 24 **(C)** or 48 hours **(D)**. Fluorescent RCC4 cells are in red and endothelial cells stained by anti-CD31 antibody (red). Nuclei were stained by DAPI (blue). Fluorescent images were acquired using a Zeiss spinning disk confocal w1 at 20x/0.8 and z-stack projections are represented. Scale bar: 50 μm . Spheroid invasion and capillary morphogenesis were analyzed by quantification of several parameters: invasive area **(E)**, vascular area **(F)** and regression line between invasive and vascular area **(G)**. Graphs represent the mean of 3 independent experiments +/- SEM. Statistical analysis were performed using Mann-Whitney test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$) **(E)**, Welch's t test (** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$) **(F)** and log normality test of correlation (**** $p < 0.0001$) **(G)**.

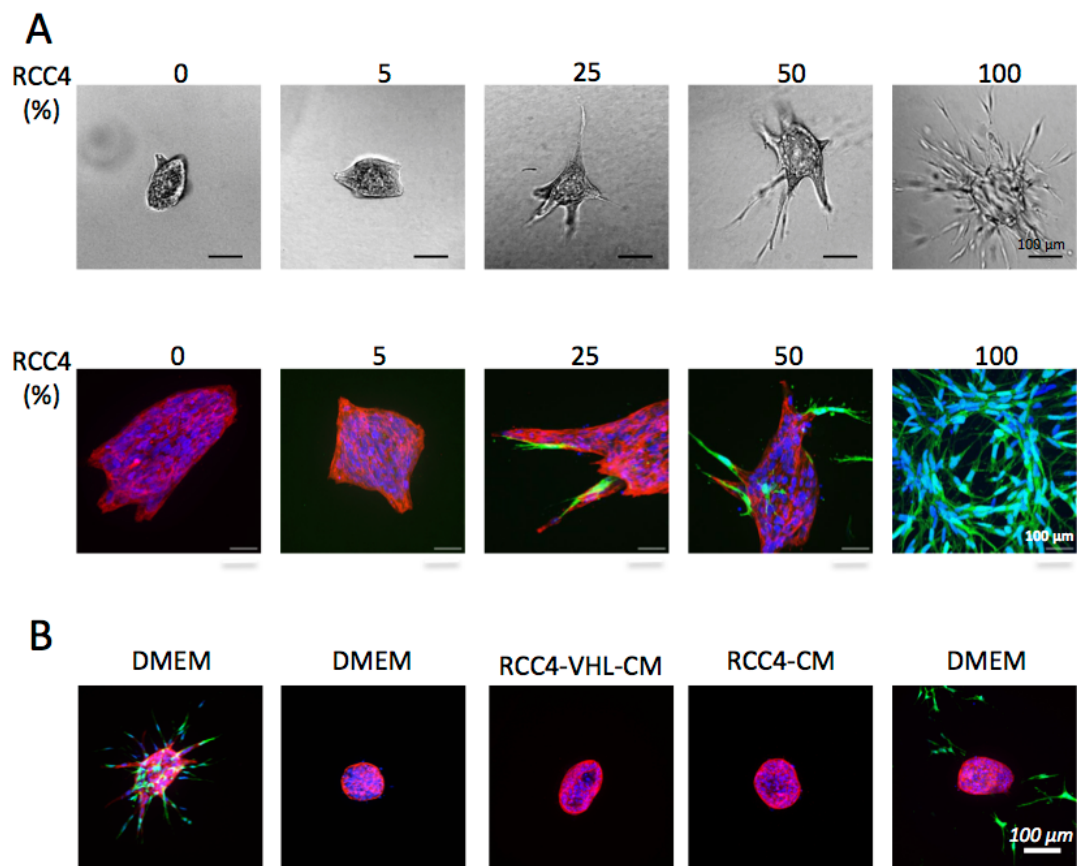
SUPPLEMENTAL FIGURE 1



Supplementary Figure S1. Paracrine factors and ECM mechanical properties govern tumor cell proliferation.

RCC4-VHL **(A)** or RCC4 spheroids **(B)** were cultured in LF-, IF- or HF-collagen I hydrogel in presence of DMEM or NHDF-CM for 3 days. Proliferative cells and nuclei were stained by anti- Ki67 antibody (pink) and DAPI (blue), respectively. Images were acquired using a Zeiss confocal W1 at 25x/0.9 and z-stack projections are represented. Scale bar: 100 μ m. Total number of nuclei was determined by 3D quantification **(C)**. Graph represents the mean of 3 independent experiments +/- SEM. Statistical analysis was performed using Kruskal-Wallis test (** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$).

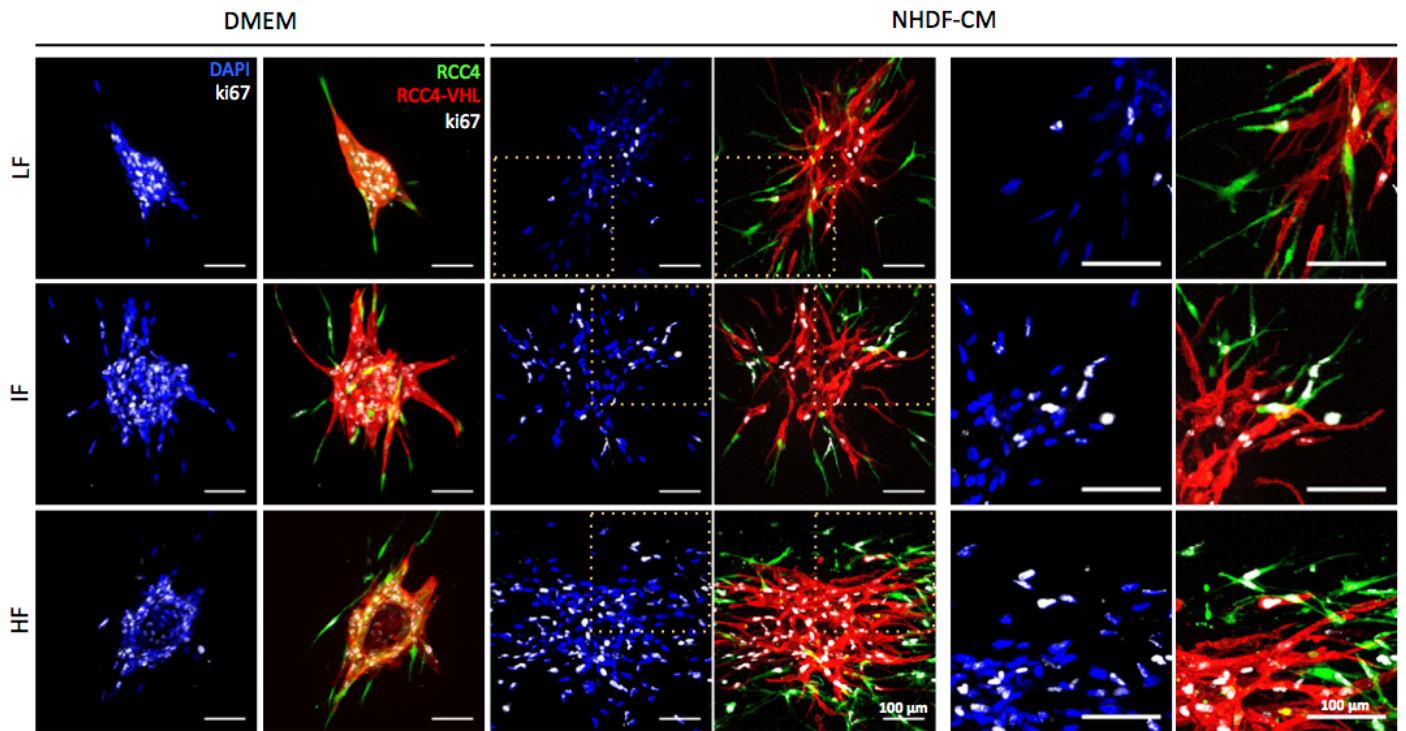
SUPPLEMENTAL FIGURE 2



Supplementary Figure S2. Heterotypic spheroids display an invasive behavior involving a leader-follower mechanism.

(A) Heterotypic spheroids containing various proportions of RCC4 (green) and RCC4-VHL (red) cells, ranking from 0 to 100% were cultured in LF-collagen I hydrogel in presence of DMEM for 3 days. Bright-field images were acquired using a Zeiss Observer Apotome II at 10x/0.45. Scale bar: 100 μm . **(B)** RCC4-VHL spheroids alone were cultured in presence of DMEM, RCC4-VHL- CM or RCC4-CM in LF-collagen I hydrogel for 2 days. Heterotypic spheroids composed of 25% of RCC4 cells (green) and 75% of RCC4-VHL (red) are used as positive control of invasion (left panel). RCC4-VHL spheroids co-cultured with RCC4 cells (green) in suspension revealed the requirement of mechanical interactions for inducing spheroid invasion (right panel). Fluorescent images were acquired using a Zeiss spinning disk confocal w1 at 20x/0.8 or 40x/1.1 and Z-stack projections are represented. Scale bar: 100 μm .

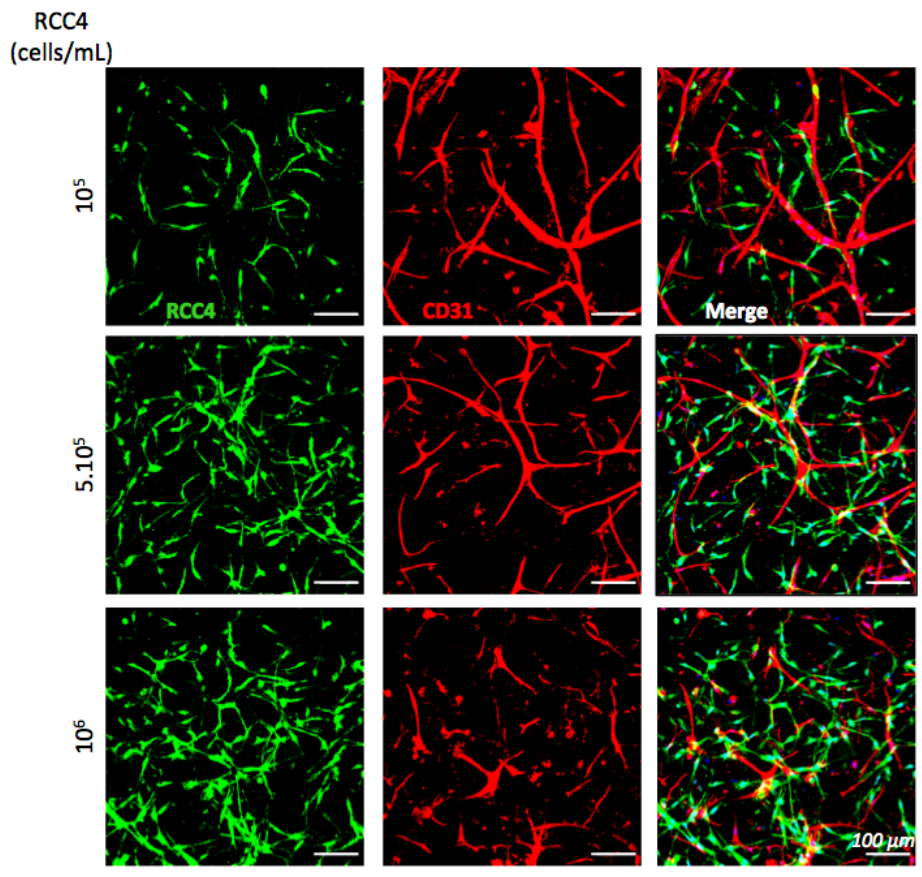
SUPPLEMENTAL FIGURE 3



Supplementary Figure S3. ECM mechanical properties govern heterotypic spheroid proliferation.

Heterotypic spheroids composed of 25% of RCC4 cells (green) and 75% of RCC4-VHL (red)) were cultured in LF-, IF- or HF-collagen I hydrogel in presence of DMEM or NHDF-CM for 3 days. Proliferative cells and nuclei were stained by anti-Ki67 antibody (white) and DAPI (blue), respectively. Images were acquired using a Zeiss confocal W1 at 25x/0.9 and z-stack projections are represented. Higher magnifications of RCC4 cells (yellow dotted frames) were performed with 1.9x zoom. Scale bar: 100 μm .

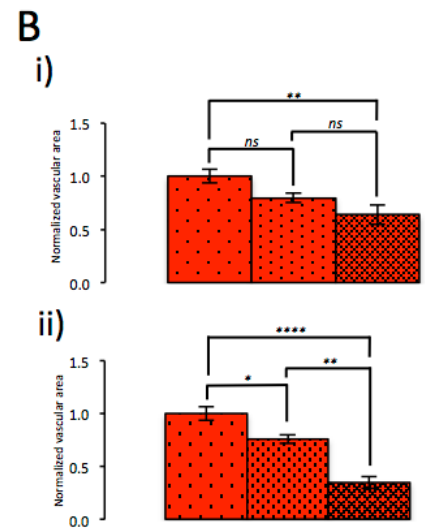
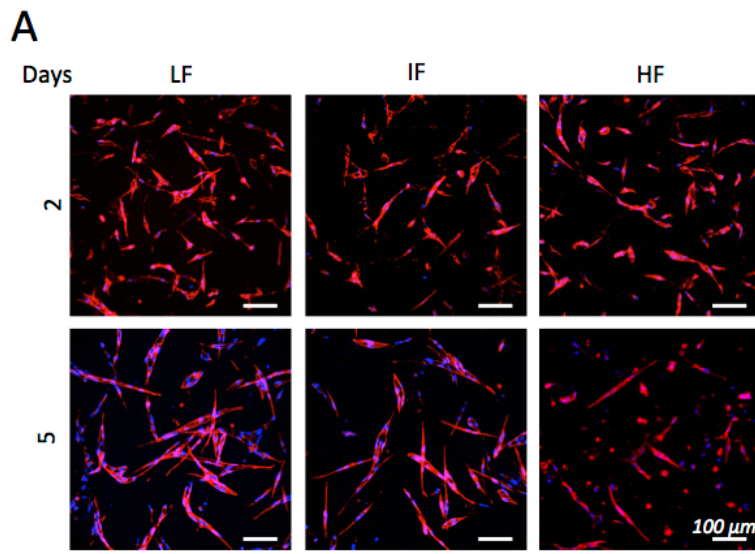
SUPPLEMENTAL FIGURE 4



Supplementary Figure S4. Tumor spheroid architecture is required for recapitulating the pond formation.

Individualized RCC4 cells (green) seeded at 10^6 , $5 \cdot 10^5$ or 10^5 cells/mL and endothelial cells (red) are co-cultured in LF-collagen I hydrogel for 5 days in presence of NHDF-CM. Immunofluorescence of endothelial cells was performed using anti-CD31 antibody (red) and nuclei were stained by DAPI (blue). Fluorescent images were acquired using a Zeiss spinning disk confocal w1 at 20x/0.8 and z-stack projections are represented. Scale bar: 100 μ m.

SUPPLEMENTAL FIGURE 5



Supplementary Figure S5. ECM mechanical properties regulate the vasculogenesis. Endothelial cells cultured in LF-, IF- or HF-collagen I hydrogels in presence of NHDF-CM for 2 or 5 days. **(A)** Immunofluorescence of endothelial cells was performed using anti-CD31 antibody (red) and nuclei were stained by DAPI (blue). Scale bar: 100 μ m. Fluorescent images were acquired using a Zeiss spinning disk confocal w1 at 20x/0.8 and z-stack projections are represented. **(B)** Quantifications of vascular area at 2 (i) or 5 days (ii) were performed on Z-stack projections. Graphs represent the mean of 3 independent experiments +/- SEM. Statistical analysis was performed using ordinary one-way ANOVA (ns $p > 0.05$, ** $p < 0.01$) **(i)** or Kruskal-Wallis test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$) **(ii)**.

Supplementary material

Movie 1. The leader-follower mechanism in the heterotypic spheroid of RCC4/RCC4-VHL cells.

Heterotypic spheroids of 25% RCC4 (green) and 75% of RCC4-VHL (red) cells were cultured in IF-collagen I hydrogel. Time-lapse movie of the invasive front was performed by image acquisitions every 30 minutes between 49.5 and 69 hours.

DISCUSSION

We previously reported the cellular mechanisms underlying the formation of the endothelial ponds, aberrant vascular structures observed in the human ccRCC (*Brassard-Jollive et al., in preparation*), by using *in vitro* models of vascularized micro-tumors.

We here demonstrated that ECM mechanical properties govern tumor invasion strategies associated with YAP-mediated mechanotransduction. In co-culture, tumor invasion and vascular pond formation are driven by the reciprocal relationship between endothelial cells and tumor spheroids associated with ECM remodeling. We revealed that the alteration of the spheroid mechanotransduction through cytochalasin E treatment inhibits the pond formation. Migration and proliferation of the tumor cells associated with the ECM remodeling regulates the first stages of the endothelial pond formation.

Collagen I is one of the major components of the ECM in the tumor microenvironment displaying a wide range of 3D architectures involving either reticular or aligned networks, containing small fibrils, fibers or large bundles of fibers (*Alexander et al., 2011; Weigelin et al., 2012*). The tailored-formation of the fibers in our collagen I hydrogels allowed to demonstrate that the invasion intensity and strategy of the RCC4 spheroids are regulated by the fiber network. Consistent with previous reports (*Provenzano et al., 2006*), we demonstrate here that tumor cells contract and compact collagen I, followed by tumor growth and ECM reorganization to facilitate local invasion. This matrix reorganization requires enhanced contractility and motility of the tumor cells, as the cytochalasin E treatment delays the process. Whereas fibrils and the small fibers observed in the LF- and IF-hydrogels respectively induce the collective migration of the RCC4 cells aligned in multicellular strands, the HF- hydrogel triggers the individualized migration of cells presenting a mesenchymal phenotype. The conversion between collective to individualized migration associated with low to high fibrillogenesis observed in our study is unexpected to a certain extent. Indeed, Iliina and coll. reported that collective tumor invasion occurs within interstitial tissue tracks, containing dense linear collagen bundles, such as in invasive ductal carcinomas (*Iliina, Nat.Cell Biol., 2020*). Using spheroids of invasive tumor cell lines embedded in 3D collagen matrices, the authors further analyzed that the increase of collective migration correlates with the increased density of the collagen bundles as revealed by the scanning electron microscopy. In our set up, increasing pH-dependent polymerization of the collagen hydrogel at low concentration (2 mg/mL) covers the experimental formation of collagen I structures from small fibers to consistent bundles. Consistent with previous data (*Iliina, Nat.Cell Biol., 2020*), in our setting, the RCC4 cells individually migrate in the collagen I hydrogel having undergone high fibrillogenesis, but presenting a network of collagen I fibers without reaching the dimensions of the bundles. We demonstrate that the presence of fibrils and small fibers is favorable for collective migration of the tumor cells organized in aligned strands, as they actively pull on and remodel the collagen fibers in a compact and collective way compatible with the maintenance of cohesive cell-cell interactions. In contrast, the presence of larger fibers limits the remodeling capacities of the tumor cells and increases the EMT features revealed by the individual migration and the associated mesenchymal-like cell shape as previously characterized (*Friedl et al., Nat. Cell Biol., 2012*). Consistent with these changes, the large fibers induce the nuclear translocation of YAP and the increase of cell proliferation. All these data strongly suggest that the increase of collagen I fibers induces a shift from the align collective migration to an individualized migration associated with an increase of the EMT

features of the tumor cells, involving distinct mechanisms that those induced by the collagen bundles.

The impact of the ECM mechanical properties on the tumor cells is further reflected on the formation of the endothelial ponds. Indeed, the potential stochastic movement of the tumor cells in the HF-hydrogel associated with their incapacity to remodel and compact the ECM do not provide the accurate niche for the endothelial cells. In the favorable ECM microenvironment constituted by the LF- or IF-hydrogels, the tumor cells pull the fibers and the endothelial cells at their proximity from the initial stage. Furthermore, the leader-follower process observed with the heterotypic spheroids strongly suggest that the RCC4 build migration tracks which could go down the growing capillaries attracted towards the spheroid, in a second step of the process of pond formation. Meanwhile, the ECM compaction at the spheroid surface organizes a continuous coating delineating the future cavity and provides a 3D envelop allowing the establishment of the endothelial pond. The concomitant migration of the tumor cells out of the spheroid core and the spreading of the endothelial cells on the collagen I coating, coming from the converging capillaries seem therefore crucial steps for the pond formation. Conversely, the inability for the tumor cells to build a coating of remodeled collagen I is associated with the absence of endothelial ponds in the HF-hydrogel.

Altogether, these data bring light on the complex correlation between the aggressiveness of the angiogenic ccRCC and the clinical outcome. In a highly fibrillated ECM, the tumor cells strongly migrate individually, leading to the overall progression of the tumor mass, without inducing the pond formation. Since we previously described that the ccRCC-specific endothelial ponds are resistant to the anti-angiogenic treatments, the individualized tumor cells massively migrating in the fibrillated microenvironment would present on the one hand deleterious EMT features inducing tumor progression and metastasis and on the other hand beneficial inability to form ccRCC-specific microvasculature resistant to first-line treatments. However, the tumor cells collectively migrating in a low fibrillated microenvironment although displaying reduced EMT features would provide low-resistant linear paths allowing the growing capillaries to converge towards the tumor core but also the tumor mass expansion through the leader-follower mechanism. Our study provides here interesting aspect of this process where leader cells arise directly from the tumor cells themselves, instead of from stromal cells, as often reported. These leadership qualities associated with their ability to provide a favorable microenvironmental niche for the endothelial ponds could then explain the extremely poor prognosis of some ccRCC.

Acknowledgements

We thank members of the Orion imaging facility of the Center for Interdisciplinary Research in Biology. We thank members of AP-HP, Hôpital Saint-Louis, Unité de Thérapie Cellulaire, CRB-Banque de Sang de Cordon, Paris, France for providing human umbilical cords and Patrick H. Maxwell (Cambridge Institute for Medical Research, University of Cambridge, Cambridge, UK) for kindly providing the RCC4 and RCC4-VHL cell lines. We thank Christophe Helary for providing rat tail collagen I (Laboratoire de Chimie de la Matière Condensée de Paris, Sorbonne Université, Paris, France).

Noémie Brassard-Jollive was supported by Sorbonne Université and by Fondation ARC Jeunes Chercheurs. Yoann Atlas was supported by La Ligue Contre le Cancer.

References

- Ahluwalia, P., Ahluwalia, M., Mondal, A. K., Sahajpal, N., Kota, V., Rojiani, M. V., ... & Kolhe, R. (2021). Prognostic and therapeutic implications of extracellular matrix associated gene signature in renal clear cell carcinoma. *Scientific reports*, *11*(1), 1-14.
- Alexander, S., Weigelin, B., Winkler, F., & Friedl, P. (2013). Preclinical intravital microscopy of the tumour-stroma interface: invasion, metastasis, and therapy response. *Current opinion in cell biology*, *25*(5), 659-671.
- Barker, H. E., Bird, D., Lang, G., & Erler, J. T. (2013). Tumor-secreted LOXL2 activates fibroblasts through FAK signaling. *Molecular Cancer Research*, *11*(11), 1425-1436.
- Bignon, M., Pichol-Thievend, C., Hardouin, J., Malbouyres, M., Bréchet, N., Nasciutti, L., ... & Germain, S. (2011). Lysyl oxidase-like protein-2 regulates sprouting angiogenesis and type IV collagen assembly in the endothelial basement membrane. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, *118*(14), 3979-3989.
- Bonnans, C., Chou, J., & Werb, Z. (2014). Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nature reviews Molecular cell biology*, *15*(12), 786-801.
- Borovski, T., Felipe De Sousa, E. M., Vermeulen, L., & Medema, J. P. (2011). Cancer stem cell niche: the place to be. *Cancer research*, *71*(3), 634-639.
- Capitani, U., & Montorsi, F. (2016). Renal cancer. *The Lancet*, *387*(10021), 894-906.
- Coradin, T., Wang, K., Law, T., & Trichet, L. (2020). Type I collagen-fibrin mixed hydrogels: preparation, properties and biomedical applications. *Gels*, *6*(4), 36.
- Friedl, P., Locker, J., Sahai, E., & Segall, J. E. (2012). Classifying collective cancer cell invasion. *Nature cell biology*, *14*(8), 777-783.
- Hase, H., Jingushi, K., Ueda, Y., Kitae, K., Egawa, H., Ohshio, I., ... & Tsujikawa, K. (2014). LOXL2 status correlates with tumor stage and regulates integrin levels to promote tumor progression in ccRCC. *Molecular Cancer Research*, *12*(12), 1807-1817.
- Kretschmer, A., van den Bergh, R. C., Martini, A., Marra, G., Valerio, M., Tsaur, I., ... & YAU Prostate Cancer Working Group. (2021). Assessment of Health-Related Quality of Life in Patients with Advanced Prostate Cancer—Current State and Future Perspectives. *Cancers*, *14*(1), 147.
- Liabotis, A., Ardidie-Robouant, C., Mailly, P., Besbes, S., Gutierrez, C., Atlas, Y., ... & Monnot, C. (2022). Angiopoietin-like 4-Induced 3D Capillary Morphogenesis Correlates to Stabilization of Endothelial Adherens Junctions and Restriction of VEGF-Induced Sprouting. *Biomedicines*, *10*(2), 206.

Ilina, O., Gritsenko, P. G., Syga, S., Lippoldt, J., La Porta, C. A., Chepizhko, O., ... & Friedl, P. (2020). Cell–cell adhesion and 3D matrix confinement determine jamming transitions in breast cancer invasion. *Nature cell biology*, 22(9), 1103-1115.

Maxwell, P. H., Wiesener, M. S., Chang, G. W., Clifford, S. C., Vaux, E. C., Cockman, M. E., ... & Ratcliffe, P. J. (1999). The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature*, 399(6733), 271-275.

Odenthal, J., Takes, R., & Friedl, P. (2016). Plasticity of tumor cell invasion: governance by growth factors and cytokines. *Carcinogenesis*, 37(12), 1117-1128.

Pickup, M. W., Mouw, J. K., & Weaver, V. M. (2014). The extracellular matrix modulates the hallmarks of cancer. *EMBO reports*, 15(12), 1243-1253.

Provenzano, P. P., Eliceiri, K. W., Campbell, J. M., Inman, D. R., White, J. G., & Keely, P. J. (2006). Collagen reorganization at the tumor-stromal interface facilitates local invasion. *BMC medicine*, 4(1), 1-15.

Sleeman, J. P. (2012). The metastatic niche and stromal progression. *Cancer and Metastasis Reviews*, 31(3), 429-440.

Schmelzer, C. E., Heinz, A., Troilo, H., Lockhart-Cairns, M. P., Jowitt, T. A., Marchand, M. F., ... & Muller, L. (2019). Lysyl oxidase-like 2 (LOXL2)-mediated cross-linking of tropoelastin. *The FASEB Journal*, 33(4), 5468-5481.

Schilter, H., Findlay, A. D., Perryman, L., Yow, T. T., Moses, J., Zahoor, A., ... & Jarolimek, W. (2019). The lysyl oxidase like 2/3 enzymatic inhibitor, PXS-5153A, reduces crosslinks and ameliorates fibrosis. *Journal of cellular and molecular medicine*, 23(3), 1759-1770.

Umana-Diaz, C., Pichol-Thievend, C., Marchand, M. F., Atlas, Y., Salza, R., Malbouyres, M., ... & Muller, L. (2020). Scavenger Receptor Cysteine-Rich domains of Lysyl Oxidase-Like2 regulate endothelial ECM and angiogenesis through non-catalytic scaffolding mechanisms. *Matrix Biology*, 88, 33-52.

Vilchez Mercedes, S. A., Bocci, F., Levine, H., Onuchic, J. N., Jolly, M. K., & Wong, P. K. (2021). Decoding leader cells in collective cancer invasion. *Nature Reviews Cancer*, 21(9), 592-604.

Weigelin, B., Bakker, G. J., & Friedl, P. (2012). Intravital third harmonic generation microscopy of collective melanoma cell invasion: Principles of interface guidance and microvesicle dynamics. *IntraVital*, 1(1), 32-43.

Conclusion

Mon travail de thèse a eu pour objectifs d'étudier : i) la vascularisation aberrante du ccRCC en interaction avec des cellules tumorales invasives; ii) la sensibilité de ces structures vasculaires aux traitements anti-angiogéniques; iii) le rôle des propriétés du microenvironnement tumoral sur les stratégies d'invasion et la formation de cette vascularisation aberrante.

J'ai démontré pour la première fois la présence de structures vasculaires spécifiques du ccRCC caractérisées par une morphologie tridimensionnelle et des dimensions aberrantes sur des coupes de tumeurs de patients et sur des xénogreffes de ccRCC implantées dans des souris. Cette vascularisation, entourant les îlots tumoraux riches en cellules tumorales gorgées de glycogène, est composée d'étangs vasculaires connectés entre eux par des feuillets vasculaires. Alors que ces structures ont été rapportées par quelques travaux, aucune étude n'a à ce jour caractérisé leur architecture tridimensionnelle, leur formation ou leur sensibilité aux traitements anti-angiogéniques, un des principaux écueils à ces analyses étant l'absence de modèles expérimentaux pertinents. Fort de l'expertise de l'équipe, j'ai mis au point un modèle *in vitro* 3D de micro-tumeurs vascularisées impliquant l'inclusion de sphéroïdes de cellules d'une lignée humaine issue d'un patient atteint de ccRCC, présentant une mutation perte de fonction pour VHL et des cellules endothéliales en hydrogel de collagène I. J'ai d'abord montré que ces sphéroïdes présentent des caractéristiques de la TEM, associées à des capacités hautement invasives stimulées par des facteurs paracrines présents dans le microenvironnement tumoral. La co-culture de sphéroïdes tumoraux et de cellules endothéliales induisent la formation d'un étang vasculaire, mimant la structure vasculaire identifiée sur les coupes de ccRCC humains alors que les facteurs paracrines sécrétés par les cellules tumorales entraînent la formation d'un réseau vasculaire altéré. Ce résultat est novateur puisqu'il constitue la première reproduction de la vascularisation spécifique du ccRCC au sein d'un modèle *in vitro*. De plus, il suggère un rôle important du microenvironnement cellulaire et matriciel dans la mise en place de cette structure. Une analyse cinétique réalisée sur le modèle 3D a permis d'identifier les étapes clés de la formation de l'étang vasculaire impliquant 3 étapes : - l'initiation, résultant en un fort tropisme des cellules endothéliales vers le sphéroïde tumoral; - la progression, caractérisée

Conclusion

par la fusion de plusieurs cavités endothéliales en un étang; - la stabilisation, correspondant à l'arrêt de son remodelage. De plus, ces travaux mettent en évidence une forte concomitance entre invasion tumorale et formation de l'étang vasculaire.

Nous montrons pour la première fois, que cette structure vasculaire aberrante, en contact avec des cellules tumorales invasives, est résistante au sunitinib, traitement anti-angiogénique de première ligne thérapeutique dans le ccRCC, recommandé durant une vingtaine d'années. Ces travaux ont fait l'objet du premier article présenté dans les résultats de ma thèse, très prochainement soumis à *Cancer Research*.

Ces travaux, réalisés sur le modèle *in vitro* 3D ont suggéré un lien entre formation de l'étang vasculaire et invasion des cellules tumorales. De plus, j'ai observé, *in vivo* dans les xénogreffes de ccRCC, la présence d'une forte accumulation de fibres de collagène I au contact des cellules tumorales et des structures vasculaires aberrantes suggérant un fort remodelage matriciel dans le microenvironnement tumoral. En parallèle des travaux décrits ci-dessus, je me suis donc intéressée à l'impact des propriétés de la MEC sur l'invasion tumorale et la formation de l'étang vasculaire. Pour mener cette étude, je me suis appuyée sur des travaux antérieurs de l'équipe, réalisés par Yoann Atlas et Laurent Bidault et dirigés par Laurent Muller, démontrant que la fibrillogenèse du collagène I à pH 6,5 est associée à une rigidité de 200 kPa et à des pores de petite taille (condition LF, de faible fibrillogenèse) alors que celle à pH 8,5 aboutit à des hydrogels d'une rigidité de 1000 kPa possédant des pores de plus grande taille (condition HF, de forte fibrillogenèse). La fibrillogenèse à pH neutre (pH 7) aboutit à des gels aux propriétés physiques intermédiaires (condition IF) associés à une rigidité de 500 kPa. Nos résultats, impliquant la culture de sphéroïdes tumoraux dans ces 3 hydrogels, démontrent que les stratégies d'invasion des cellules tumorales invalidées pour VHL sont déterminées par les propriétés mécaniques de la MEC. Dans le contexte de TEM partielle, reconstituée par l'utilisation de sphéroïdes hétérotypiques, contenant des cellules mutées et non mutées sur VHL, nous démontrons que les cellules tumorales mutées pour VHL sont capables d'induire la migration de cellules tumorales non invasives par un mécanisme de migration appelé meneur- suiveur. De plus, pour la première fois, nous démontrons que le changement de stratégie d'invasion induit par les propriétés mécaniques de la MEC est associé à l'activation de voies de mécanotransduction impliquant le changement de localisation subcellulaire de YAP. Des expériences de co-culture révèlent une relation fonctionnelle réciproque entre les cellules

Conclusion

endothéliales et les sphéroïdes tumoraux, associée au remodelage matriciel. En effet, la co-culture entre ces deux acteurs cellulaires entraîne réciproquement, un changement de stratégie d'invasion de collective à individuelle et la formation d'étangs vasculaires. En altérant les propriétés de mécanotransduction des sphéroïdes tumoraux, nous montrons que la formation de l'étang vasculaire nécessite l'invasion tumorale associée au remodelage matriciel.

Ces données suggèrent fortement que les cellules tumorales invasives remodelent le microenvironnement aboutissant à l'établissement d'une niche favorable à la formation de l'étang vasculaire, spécifique du ccRCC. Ces travaux ont fait l'objet du second article présenté dans les résultats de ma thèse.

Discussion et perspectives

I. Développement de micro-tumeurs vascularisées : Enjeux et limites

A. Parallèle avec l'état de l'art

Afin de mimer la vascularisation du ccRCC *in vitro*, j'ai mis au point un modèle 3D de micro-tumeurs vascularisées impliquant l'inclusion de cellules endothéliales et de sphéroïdes du ccRCC en hydrogel de collagène I, cultivés pendant 4 à 7 jours en milieu conditionné de fibroblastes. Ainsi, une structure vasculaire large et dilatée, recouverte de collagène IV, se forme au centre de la masse tumorale invasive correspondant aux étangs vasculaires identifiés sur les coupes de patients et dans les xénogreffes. De plus, nous reproduisons les interactions entre cellules tumorales et endothéliales également observées sur les coupes de patients. Ce modèle permet des analyses dynamiques à l'échelle cellulaire et la possibilité de moduler les propriétés mécaniques du microenvironnement afin de répondre à des questions biologiques précises. Dans la littérature, par une approche similaire, Silvestri et coll. ont identifié la présence de vaisseaux « mosaïques », composés de cellules tumorales et endothéliales sur des coupes de patients atteint de cancer du sein. Ils ont développé un modèle *in vitro* 3D de co-culture permettant de reproduire ces interactions spécifiques et d'identifier les étapes clés de leur formation (Silvestri et al., 2020). Plusieurs modèles *in vitro* 3D de micro-tumeurs vascularisées ont été développés ces dernières années, mais rares sont ceux permettant de mimer une architecture particulière aberrante (Ehsan et al., 2014; Taubenberger et al., 2016b; Tatla et al., 2021). Dans la littérature, le premier modèle *in vitro* 3D du ccRCC a été développé par Miller et coll. en 2018 (Miller et al., 2018). Ce modèle consiste en l'inclusion de sphéroïdes de cellules de patients du ccRCC en collagène I dans une chambre traversée par une tige. Après polymérisation du collagène I, la tige est retirée de l'hydrogel, permettant ainsi de former une lumière dans laquelle sont perfusées des cellules endothéliales. Sous un flux de milieu, les cellules endothéliales tapissent la lumière puis bourgeonnent pour former des capillaires dans le collagène I où se trouvent les sphéroïdes tumoraux. Bien que l'on observe quelques bourgeonnements endothéliaux vers les masses tumorales, ce modèle ne permet pas de reproduire la vascularisation aberrante du ccRCC. De plus, les interactions entre cellules

tumorales et endothéliales sont limitées et l'étude de la morphologie est peu approfondie. Cependant, l'observation attentive de ces travaux révèle des morphologies vasculaires différentes en fonction des patients, notamment la présence de capillaires plus ou moins dilatés. Cette observation suggère la capacité des cellules tumorales du ccRCC à instruire les cellules endothéliales présentes dans leur microenvironnement aboutissant à la formation de capillaires aux morphologies différentes (*Miller et al., 2018*). Dans le ccRCC, il est décrit 4 sous-types moléculaires présentant une signature angiogénique plus ou moins importante (*Beuselinck et al., 2015*). De plus, Su et coll. décrivent deux sous-populations de cellules endothéliales dans le ccRCC se distinguant notamment par une expression différentielle du VEGFR2 (*Su et al., 2021*). Ces deux arguments peuvent expliquer la présence des différentes morphologies de vaisseaux observées dans les travaux de Miller et coll. Ces observations soulignent l'intérêt d'utiliser des cellules tumorales isolées à partir de patients.

B. Vers la médecine personnalisée

a. Les « tumoroides » : Cellules tumorales isolées à partir de patients

Aujourd'hui, l'isolation et le maintien en culture de cellules tumorales isolées à partir de patients restent un défi expérimental relevé par quelques laboratoires dans le Monde. L'une des principales stratégies consiste à utiliser des organoïdes composés de cellules isolées à partir de biopsies tumorales, appelés « tumoroides ». Comme précédemment reporté par Drost et Clevers, les cellules primaires peuvent être isolées à partir de divers types de cancers tels que les cancers colorectal, pancréatique, du foie, du sein, de la prostate, du cerveau et de la vessie pour former ces « tumoroides » (*Drost and Clevers, 2018*). Ces cellules directement isolées de patient permettraient notamment de reproduire l'hétérogénéité inter-patient. La formation de micro-tumeurs vascularisées à partir de ces « tumoroides » constituerait un pas supplémentaire vers des applications en médecine personnalisée.

Face à une telle difficulté expérimentale, et au défi de reconstitution reproductible et calibrée des structures vasculaires aberrantes, nous avons privilégié l'utilisation de lignées cellulaires tumorales du ccRCC. Dans ce but, nous avons analysé, avec Camille Compère, plusieurs lignées, présentant des capacités invasives variées, dont les 786-O et les RCC4. Ce travail a permis d'établir que les sphéroïdes de RCC4, possédant un profil invasif « modéré »

par rapport aux 786-O, permettent la formation d'étangs vasculaires. De plus, nous avons pu étudier l'effet de la ré-expression de VHL sauvage par ces cellules de ccRCC sur la formation de la vascularisation et démontré l'effet spécifique de l'inactivation de cette protéine sur les réponses invasives et angiogéniques, associées à la formation des étangs.

b. Les cellules endothéliales dérivées de cellules souches pluripotentes induites

La culture de cellules endothéliales pour l'ingénierie des capillaires demeure aujourd'hui un défi expérimental. Bien que les cellules le plus couramment utilisées pour développer ces modèles soient les cellules endothéliales de veines de cordons ombilicaux humaines (HUVEC) (*Nowak-Sliwinska et al., 2018*), l'utilisation de cellules endothéliales tumorales de patients constitue une finalité dans le domaine de la médecine personnalisée. En effet, dans la littérature, il est rapporté que les cellules endothéliales tumorales possèdent une forte instabilité génétique, dépendante du patient (*Aird, 2012; Hida et al., 2016*). Afin de reproduire cette variabilité dans nos modèles, il serait pertinent d'intégrer des cellules endothéliales isolées à partir de tumeurs de patients. Cependant, cela soulève une limite expérimentale puisque les cellules endothéliales tumorales humaines ou murines n'ont jamais permis de générer des capillaires dans des modèles *in vitro* 3D, à ce jour, qu'elles soient co-cultivées avec des cellules tumorales ou non.

Une alternative à cette approche pourrait être d'utiliser des cellules souches pluripotentes induites humaines (iPS) isolées à partir de patients et se différenciant en cellules endothéliales fonctionnelles (iPSC). En effet, il est décrit que ces cellules endothéliales sont capables d'adopter des caractéristiques spécifiques de chaque tissu. Ces iPSC pourraient donc constituer une source de cellules endothéliales s'organisant en structures vasculaires présentant des caractéristiques morphologiques et moléculaires spécifiques de chaque patient (*Jahan and McCloskey, 2020; Palikuqi et al., 2020*). De manière intéressante, en utilisant une stratégie similaire, Roger Kamm développe un modèle sur puce microfluidique de la barrière hémato-encéphalique (BHE). L'ensemble de ce travail repose sur l'hypothèse que la co-culture permettrait la différenciation et la maturation de cellules endothéliales dérivées de cellules iPS humaines en cellules microvasculaires de la barrière hémato-encéphalique. Ils ont montré que l'ajout de péricytes du cerveau et d'astrocytes orientent drastiquement la différenciation des iPSC en cellules endothéliales microvasculaires de la BHE exprimant des marqueurs spécifiques de celles-ci (*Campisi et al.,*

2018). En conclusion, l'instruction des cellules endothéliales par le microenvironnement et la co-culture 3D avec les sphéroïdes tumoraux de ccRCC est suffisamment efficace sur les HUVEC, cellules présentant une grande plasticité, pour aboutir à la formation d'étangs vasculaires, spécifiques des ccRCC. A long terme, il sera davantage pertinent d'utiliser des cellules endothéliales de patients afin d'établir le traitement personnalisé le plus adéquat, n'aboutissant pas à la mise en place de mécanismes de résistance.

II. L'étang vasculaire du ccRCC : caractérisation moléculaire, cellulaire et fonctionnelle

A. Etude des défauts fonctionnels

L'un des facteurs majeurs impliqués dans le processus de la vascularisation est le flux sanguin et les forces de cisaillement. Lors de la morphogenèse, le flux participe à la polarisation des cellules endothéliales et son altération peut être responsable de malformations artério-veineuses. De plus, il est décrit que les défauts structuraux portés par les vaisseaux tumoraux induisent des anomalies fonctionnelles comme une diminution du flux sanguin ou une fuite accrue (*Lugano et al., 2020*). De manière intéressante, nous avons notamment observé la forte accumulation d'érythrocytes dans les étangs vasculaires, sur les échantillons de patients et de xénogreffes de souris, suggérant un défaut important de la perfusion. Dans ce contexte, afin de caractériser les défauts fonctionnels des étangs vasculaires, l'un de nos prochains défis sera d'inclure un flux dans notre modèle. Cette approche permettra : - d'effectuer des analyses fonctionnelles, - de fournir une voie d'administration des traitements plus pertinente physiologiquement, - de maintenir plus longtemps les sphéroïdes vascularisés en culture. Cette approche permettra ainsi d'appliquer des protocoles thérapeutiques en cohérence avec les cinétiques appliquées chez l'Homme.

La stratégie privilégiée pour établir une perfusion *in vitro* est l'utilisation de puces microfluidiques. Ces puces, lorsqu'elles sont combinées à des sphéroïdes tumoraux, récapitulent l'architecture multicellulaire, l'interface tumeur-stroma, le microenvironnement physique des tumeurs évoluant au sein des organes humains et la perfusion du compartiment vasculaire (*Brassard-Jollive et al., 2020*). Dans la littérature, quelques modèles de micro- tumeurs vascularisées perfusées ont été développés, notamment au sein du laboratoire de Christopher Hugues (*Figure 34*). Son système est composé d'un canal central

contenant un hydrogel ensemencé avec des cellules endothéliales en suspension et bordé périphériques (*Shin et al., 2012; Kim et al., 2013b; Moya et al., 2013; Wang et al., 2017*) pouvant contenir des fibroblastes (*Chen et al., 2013b; Sobrino et al., 2016b*). Nous pourrions réaliser une approche similaire à celle de Christopher Hugues en ensemencant des sphéroïdes de RCC4 dans le canal central du système précédemment décrit. Ainsi, nous obtiendrons une structure vasculaire aberrante spécifique du ccRCC, perfusée. Cette approche permettrait de caractériser les défauts fonctionnels des étangs vasculaires.

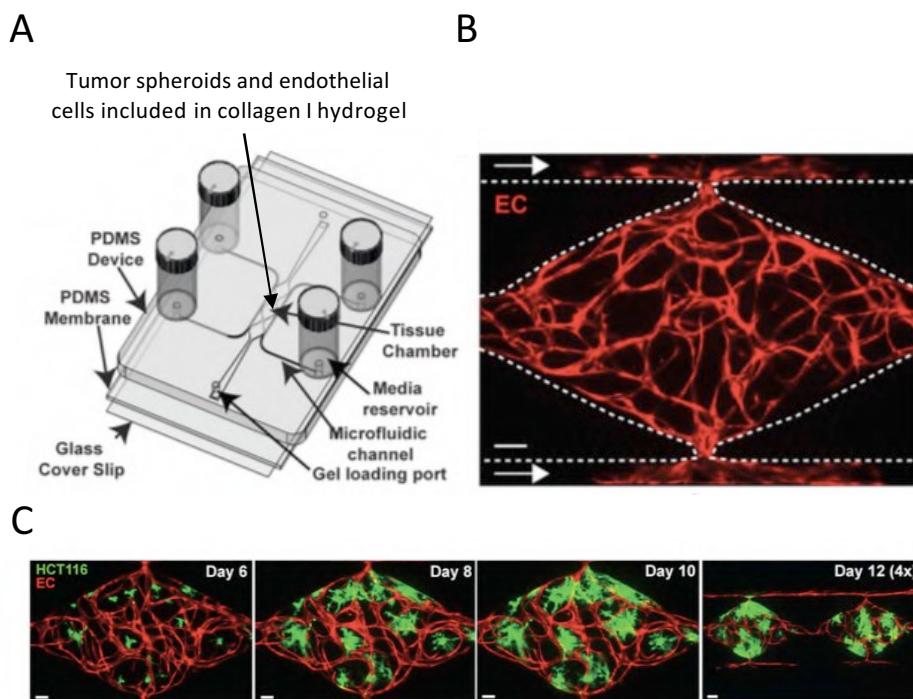


Figure 34 : Système microfluidique de micro-tumeurs vascularisées développé au sein du laboratoire de Christopher Hugues

(A) Schéma du système microfluidique. Ce système consiste en une épaisse couche de PDMS contenant des chambres et des canaux microfluidiques reposant sur une fine membrane de PDMS et une lamelle de verre. Trois chambres au centre sont reliées à deux canaux adjacents par deux vannes retenant le mélange de cellules endothéliales et sphéroïdes tumoraux en hydrogel à l'intérieur des chambres. Aux deux extrémités des chambres se trouvent deux orifices de chargement de gel, à travers lesquels est introduite la suspension de cellules incluses en hydrogel. Quatre réservoirs de milieu sont fixés aux entrées et sorties des canaux microfluidiques.

(B) Chambre représentative avec un réseau vasculaire entièrement développé à jour 7. Les cellules endothéliales fluorescentes sont visualisées en rouge.

(C) Cinétique de développement d'une lignée cellulaire de carcinome colorectal (HCT116) (vert) à proximité du réseau vasculaire perfusé (rouge) (*D'après Sobrino et al., 2016*).

B. Etude de la couverture péricytaire

La couverture péricytaire est déficiente dans de nombreuses tumeurs, entraînant des conditions propices à l'apparition de métastases. Ces défauts ne s'expliquent pas par une absence des péricytes puisque qu'il a été précédemment décrit dans 3 modèles

tumoraux de souris, que 73 à 92 % des vaisseaux sanguins présentaient une couverture péricytaire. Néanmoins, ces péricytes émettent des extensions cytoplasmiques dans le stroma, ne recouvrant pas l'endothélium, et sont faiblement associés aux cellules endothéliales (Morikawa et al., 2002). Il a notamment été proposé que les anomalies de la couverture péricytaire dans les tumeurs seraient dues à des sources endothéliales et non-endothéliales de PDGF-B, qui influence le recrutement des péricytes et la morphologie des vaisseaux (Abramsson et al., 2003). Aujourd'hui, les défauts de couverture péricytaire des vaisseaux tumoraux restent peu connus et aucun travail n'est rapporté dans le contexte du ccRCC. De manière intéressante, nous avons observé sur des coupes de tumeurs de patients marquées au CD31 et à l'alpha-SMA, la présence de péricytes recouvrant les étangs vasculaires révélant que ces interactions sont bien présentes dans le ccRCC. Dans ce contexte, un nouvel axe de ce travail est d'étudier les défauts de couverture péricytaire des étangs vasculaires.

Il a récemment été développé dans mon équipe un modèle de recrutement périvasculaire de cellules souches mésenchymateuses de dent de lait (SHED) en hydrogels vascularisés dans le cadre d'une étude d'ingénierie tissulaire en collaboration avec le laboratoire du Professeur Catherine Chaussain localisé à l'Université Paris Descartes (*Atlas et al., 2021*). Dans ce modèle de vasculogenèse, les cellules souches et endothéliales sont ensemencées en suspension en hydrogel de collagène I. Après quelques jours de culture, certaines de ces cellules souches s'étalent sur les capillaires et expriment des marqueurs de péricytes. Des outils de quantification du recrutement péricytaire ont été développés (*Figure 35*).

Ce modèle, combiné à l'ajout de sphéroïde de RCC4, permettra l'analyse de la couverture péricytaire de l'étang vasculaire. Nous disposons de tous les outils d'imagerie, d'analyse et de quantification permettant l'analyse de ce mécanisme cellulaire.

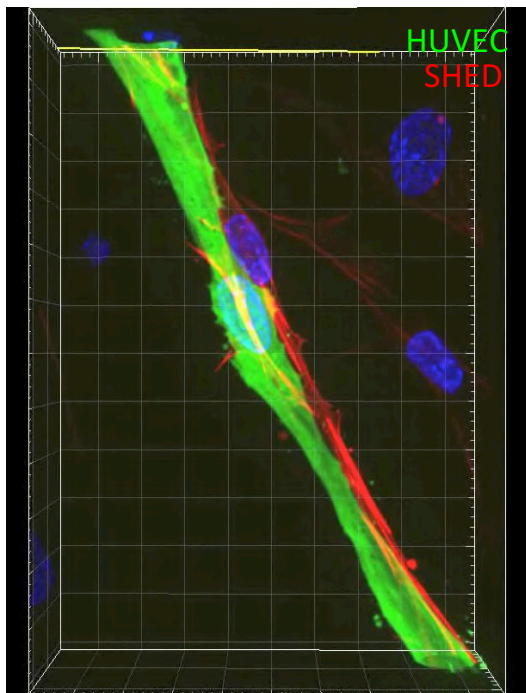


Figure 35 : Modélisation *in vitro* 3D d'un capillaire et de sa couverture péricytaire

Des HUVEC et des SHED sontensemencées en hydrogel de collagène I et cultivées en présence d'ECGM2. Après 5 jours de culture, des SHED se sont différenciées en péricytes (rouge). Le capillaire est visualisé par un marquage CD31 (verte) (*Travaux de Yoann Atlas et Laurent Muller*)

C. Les CAF : Acteur cellulaire majeur ?

Les CAF présentent une prévalence élevée dans le microenvironnement du ccRCC et leur implication a notamment été décrite dans la dissémination métastatique et l'angiogenèse tumorale (*Chakiryan et al., 2021; Ambrosetti et al., 2022*). De plus, cette dernière publication montre l'implication de ces cellules dans le pronostic et la résistance aux thérapies anti-angiogéniques dans le ccRCC (*Ambrosetti et al., 2022*). Les CAF constituent un acteur majeur du microenvironnement, ils participent notamment à la rigidification de la MEC, phénomène associé à un phénotype de tumeurs agressives (*Calvo et al., 2013*). Dans certains cas, ce remodelage conduit à la génération de travées dans la MEC, permettant l'invasion de cellules tumorales (*Gaggioli et al., 2007*). Nos résultats démontrent un rôle majeur des propriétés mécaniques de la MEC sur les stratégies d'invasion des cellules tumorales et sur la formation de l'étang vasculaire. En effet, l'augmentation de la rigidité de l'hydrogel entraîne une augmentation de migration tumorale individuelle et la suppression de la formation de l'étang vasculaire, dépendante du remodelage matriciel associé à l'invasion tumorale. Dans ce contexte, un futur axe de travail serait d'étudier l'impact des CAF sur la formation de l'étang vasculaire et l'invasion tumorale associé au remodelage de la MEC, en ajoutant ces cellules dans notre modèle.

D. Signature moléculaire

Nous émettons l'hypothèse que les cellules endothéliales composant les étangs et feuillets vasculaires résistants aux traitements anti-angiogéniques présentent une signature transcriptomique unique. Un de nos principaux objectifs est maintenant de comprendre les mécanismes moléculaires qui sous-tendent la formation de ces structures vasculaires, peu sensibles au sunitinib. De futurs travaux, réalisés dans le cadre de la thèse de Camille Compère, consisteront à l'analyse spatiale du transcriptome sur coupes de ccRCC, présentant des structures vasculaires aberrantes, par l'approche Visium Spatial Gene Expression (10x Genomics). Ainsi, nous pourrions identifier la signature transcriptomique précise de l'étang, du feuillet et de capillaires au sein du stroma tumoral. Un intérêt majeur sera porté aux protéines impliquées dans : - les interactions hétérotypiques entre cellules tumorales et endothéliales et homotypiques entre cellules endothéliales; - les interactions cellules endothéliales-MEC, - la voie de signalisation du VEGFR. Plusieurs travaux récents, s'appuyant sur le séquençage d'ARN de cellule unique effectué sur des échantillons de ccRCC, ont révélé deux sous-groupes endothéliaux majeurs, l'un ayant une expression plus élevée des ARNm des récepteurs VEGF 1 et 2 par rapport à l'autre (*Young et al., 2018; Su et al., 2021; Zhang et al., 2021*). De manière intéressante, la première étude a mentionné que le deuxième groupe endothélial peut échapper aux effets des inhibiteurs de l'angiogenèse. Nous suggérons donc que l'étang puisse être composé de cellules endothéliales du deuxième groupe, offrant une sensibilité réduite au sunitinib. De plus, ces analyses du profil transcriptomique de ces structures permettront également de déterminer le niveau d'engagement dans la différenciation artério-veineuse.

III. Perspectives cliniques

A. Etangs et feuillets vasculaires : spécificité du site primaire dans ccRCC ?

Pour la première fois, nous avons identifié et caractérisé des structures vasculaires aberrantes tridimensionnelles au sein de tumeurs du ccRCC, nommées étangs et feuillets vasculaires. En comparant des coupes marquées pour le CD31 d'une grande variété de tumeurs solides répertoriées dans les bases de données de « The human protein atlas »

(<https://www.proteinatlas.org/>), j'ai constaté la spécificité de ces structures pour le ccRCC. Néanmoins, de façon très intéressante, la présence de structures vasculaires similaires a déjà été rapportée au sein de phéochromocytomes, paragangliomes développés aux dépens de la glande médullo-surrénale. En effet, ces tumeurs sont caractérisées par la présence « d'arcs vasculaires, parallèles et organisés en réseau » suggérant fortement une organisation tridimensionnelle en feuillets vasculaires (Oudijk et al., 2015). La spécificité de l'architecture vasculaire a notamment été proposé comme prédicteur de malignité dans le phéochromocytome (Oudijk et al., 2015). De manière intéressante, les cellules tumorales des phéochromocytomes, tout comme celles du ccRCC, présentent une altération du gène VHL. Ce résultat suggère fortement l'implication de l'altération du gène VHL dans la formation de ces structures vasculaires aberrantes.

De plus, nos résultats préliminaires d'analyse de coupes de patients en association avec les différents sous-types du ccRCC identifiés par Beuselinck et coll. (Beuselinck et al., 2015), indiquent que le sous-groupe ccrcc3, associé à un faible taux d'altération du gène VHL, présente une hypervascularisation avec une absence de structures vasculaires aberrantes. Ces résultats préliminaires seront repris plus bas. Enfin, dans notre modèle de micro-tumeurs vascularisées, la restauration de VHL sauvage dans la lignée RCC4 induit la formation de capillaires réguliers avec une absence de structures vasculaires aberrantes. Nous proposons donc que la formation des structures vasculaires aberrantes du ccRCC soit fortement associée à l'altération du gène VHL dans les cellules tumorales. Cependant, bien que l'altération de ce gène semble être une condition indispensable, d'autres paramètres comme l'invasion des cellules tumorales ou le remodelage du microenvironnement jouent un rôle majeur dans la formation et le maintien de ces structures.

Le ccRCC est un carcinome au potentiel métastatique élevé (50 % des tumeurs primaires évolueront en métastases), avec un tropisme pour l'os, le poumon, le foie ainsi que la glande surrénale. Puisque la formation de ces structures vasculaires aberrantes est associée au statut VHL des cellules tumorales et est modulée par les propriétés du microenvironnement, il semble intéressant d'étudier leur présence au sein des sites métastatiques du ccRCC. Dagher et coll. ont étudié les différences phénotypiques et génétiques du ccRCC entre les sites métastatiques et primaires correspondants (Dagher et al., 2017). De manière intéressante, ils montrent, par un marquage CD31 sur des coupes de métastases hépatiques, surrénales et pulmonaires, une absence de structures vasculaires

aberrantes alors que celles-ci sont visibles sur les sites primaires. De plus, par séquençage, ils montrent que les cellules tumorales du ccRCC, localisées aux sites métastatiques, présentent toujours une altération du gène VHL. Ces observations soulignent, une fois de plus, l'importance du microenvironnement tumoral dans la formation des structures vasculaires aberrantes.

B. Les structures vasculaires aberrantes du ccRCC : un marqueur de mauvais pronostic ?

Nous avons mis en évidence pour la première fois la résistance des structures aberrantes du ccRCC au traitement anti-angiogénique, le sunitinib. Chez l'Homme, l'observation de la persistance de ces structures malgré le traitement n'a jamais été démontré. Une analyse systématique de leur présence sur les coupes de patients de ccRCC résistants aux thérapies anti-angiogéniques permettrait donc de mettre en évidence leur persistance ou non malgré le traitement. En effet, l'augmentation de la densité microvasculaire n'est pas considérée comme un marqueur de pronostic dans le ccRCC. Un paramètre, reflétant la complexité de l'architecture vasculaire, a déjà été utilisé pour caractériser les vaisseaux du ccRCC : La « microvessel fractal dimension (MFD) », montrant notamment une corrélation positive entre la MFD et la survie (*Sabo et al., 2001*). Une classification plus récente, basée sur la morphologie des vaisseaux a été proposée. Celle-ci implique l'utilisation de paramètres comme les diamètres maximum et minimum, les axes majeur et mineur, le périmètre, le rapport du rayon et de la circularité. Cette étude a permis l'identification de 4 motifs vasculaires dont deux sont plus représentés dans le ccRCC : les motifs pseudoacinaire et fasciculaire. Les particularités morphologiques de ces structures sont décrites dans la littérature et celles-ci se rapprochent fortement des étangs et feuilletts vasculaires que nous avons identifiés. Dans cette étude, ces morphologies vasculaires semblent associées à une densité vasculaire élevée, un stade peu avancé du développement de la tumeur et donc un bon pronostic mais ces travaux doivent être approfondis (*Ruiz-Sauri et al., 2018*). La compréhension de l'organisation tridimensionnelle de ces structures permettrait à plus long terme de les associer à l'un des 4 sous-types de ccRCC et/ou à la progression de la tumeur et ainsi leur donner une valeur pronostic. En effet, des résultats préliminaires obtenues dans le cadre d'une collaboration avec les Pr. Yann Vano, Dominique Halley-Russick et Laetitia Mauge (HEGP, Paris) révèlent la présence de ces structures dans les

sous-types ccrcc1 (MYC-UP), ccrcc2 (classical) et ccrcc4 (immun.UP) mais leur absence dans le sous-type ccrcc3, selon la classification précédemment établie (*Beuselinck et al., 2015*). En effet, malgré la présence d'une riche vascularisation, nous n'avons pas observé la présence de structures vasculaires aberrantes dans cette catégorie. De manière intéressante, d'après une analyse OMIC, ce sous-groupe correspondrait à un stade précoce de la maladie.

C. Les micro-tumeurs vascularisées : Un outil de criblage de molécules thérapeutiques

Le développement de modèles *in vitro* 3D de micro-tumeurs vascularisées ouvre, à plus ou moins long terme, des perspectives cliniques. En effet, depuis 50 ans, la culture 2D de lignées tumorales a été largement utilisée pour permettre le criblage de nouveaux traitements. Cependant, des études réalisées dans les années 2000 mettent en évidence une plus grande fiabilité des modèles cellulaires 3D pour prédire la réponse aux traitements. En effet, les sphéroïdes tumoraux cultivés en suspension ou inclus en hydrogel de collagène I ont été proposés pour combler le manque entre la culture 2D considérée comme trop simpliste et les expérimentations *in vivo* se rapprochant parfois que trop peu de la physiopathologie humaine. De plus, la vascularisation au sein du stroma tumoral confère un grand intérêt pour évaluer la délivrance des traitements. Pendant de nombreuses années, l'effet de traitement anti-angiogéniques était évalué par l'utilisation de « tube formation assay » (*Nowak-Sliwinska et al., 2018*). Ce test, rapide et peu onéreux, consiste en l'ensemencement de cellules endothéliales à la surface d'un revêtement de MatrigelTM et il est aujourd'hui admis par la communauté scientifique spécialiste dans ce domaine son insuffisance pour mimer la morphologie des capillaires et leurs mécanismes de formation (*Simons et al., 2015*). Par le développement de micro-tumeurs vascularisées, nous avons montré que le crizotinib ciblant le récepteur c-met altère davantage l'invasion tumorale alors que le sunitinib ciblant principalement le VEGFR2 impacte plutôt la formation de la vascularisation. De plus, le sunitinib et le temsirolimus altèrent plus que le crizotinib l'accumulation de cellules endothéliales au centre du sphéroïdes, qui constitue, comme nous l'avons démontré, une étape d'initiation de l'étang vasculaire. Ces résultats soulignent la puissance de notre modèle pour mettre en évidence la spécificité d'action de molécules thérapeutiques ciblant avec une plus forte affinité l'invasion tumorale ou les étapes d'initiation de la formation de l'étang vasculaire ainsi que l'angiogenèse. Ce travail constitue

une première preuve-de-concept pour la validation de ce modèle comme outil de criblage de nouveaux traitements. Afin de renforcer cette validation, des travaux sont actuellement menés par Camille Compère, dans le but de comparer l'effet des molécules anti-angiogéniques (cabozantinib, axitinib), admis comme première ligne thérapeutique actuelle du ccRCC, sur la formation des micro-tumeurs vascularisées. Ces molécules présentant des cibles moléculaires différentes du sunitinib, il est donc intéressant d'évaluer la capacité de notre modèle à distinguer leurs effets.

IV. Stratégies d'invasion tumorale et mécanotransduction dans le ccRCC

A. Rôle de YAP dans la détermination des stratégies d'invasion

Le ccRCC présente un potentiel métastatique élevé par voie hématogène, puisque 50 % des tumeurs primaires développeront des métastases. Ce constat peut s'expliquer notamment par la forte promiscuité entre les cellules tumorales et les structures vasculaires aberrantes au sein du microenvironnement. L'invasion cellulaire est un processus déterminant dans la dissémination métastatique, mais ces mécanismes dans le ccRCC restent peu connus aujourd'hui. Dans le stroma tumoral, les propriétés physiques du microenvironnement sont altérées. Les protéines telles que le collagène I et la fibronectine déterminent la géométrie tridimensionnelle poreuse et fibrillaire de la MEC. Au sein de ce stroma, la sécrétion anormale de collagène I et de fibronectine, les réarrangements structuraux, le remodelage par des enzymes telles que LOXL2 conduisent à une augmentation de la rigidité (*Barker et al., 2013*). Les cellules sont mécaniquement couplées à la MEC, et l'altération de ses propriétés physico-chimiques modifie le comportement cellulaire en favorisant l'invasion tumorale (*Ehrbar et al., 2011; Goetz et al., 2011; Grasset et al., 2018; Bertero et al., 2019*). Lors de la progression tumorale et de la dissémination métastatique des cancers épithéliaux, différentes stratégies de migration cellulaire sont mises en place, se définissant par la migration individuelle (mésenchymateuse ou amiboïde) et la migration collective, avec la possibilité de passer d'une stratégie de migration à une autre (*Odenthal et al., 2016*). Dans ce contexte, je me suis intéressée à l'impact des propriétés de la MEC sur l'invasion des cellules du ccRCC présentant une altération du gène VHL. Nos résultats, impliquant la culture de sphéroïdes tumoraux dans 3 hydrogels, démontrent que les stratégies d'invasion des cellules tumorales invalidées pour VHL sont

déterminées par les propriétés mécaniques de la MEC. L'invasion est collective dans les hydrogels peu fibrillés/mous et individuelles dans les hydrogels plus fibrillés/rigides. De plus, nous démontrons que le changement de stratégie d'invasion induit par les propriétés mécaniques de la MEC est associé à l'activation de voies de mécanotransduction impliquant YAP. Ce résultat est en accord avec ceux de la littérature démontrant que les matrices rigides promeuvent l'activation de YAP, révélée par sa translocation nucléaire, mais celle-ci n'avait jamais été associée à un changement de stratégies d'invasion (*Dupont et al., 2011*). Afin d'aller plus loin dans la compréhension de ce mécanisme, je souhaiterais montrer que la mécanotransduction impliquant YAP est nécessaire au changement de stratégie d'invasion des cellules tumorales en réponse aux propriétés mécaniques. Pour cela, nous pourrions invalider la protéine YAP dans les cellules tumorales RCC4, une stratégie similaire ayant déjà été réalisée dans les cellules endothéliales (*Neto et al., 2018*). Ainsi, j'évaluerai l'impact de l'altération de YAP sur :

- la mise en place des stratégies d'invasion par les cellules tumorales en réponse aux propriétés du microenvironnement, - leur capacité de remodelage de l'hydrogel, - l'expression de protéines régulatrices du cytosquelette comme ANLN (Anillin actin binding protein) et DIAPH3 (Diaphanous Related Formin 3). Ces travaux permettraient d'identifier un rôle clef de YAP dans la détermination des stratégies d'invasion en réponse aux propriétés du microenvironnement.

B. Mécanisme meneur-suiveur : Implication de jonctions mécaniquement actives ?

La TEM complète n'est pas nécessairement requise pour induire l'invasion tumorale. Il est aujourd'hui reconnu que la TEM, à l'instar d'être deux états exclusifs, est en fait un processus de transition réversible avec de multiples étapes intermédiaires (*Wei et al., 2015; Nieto et al., 2016; Brabletz et al., 2018; Kröger et al., 2019; Vilchez Mercedes et al., 2021*). Cet état hybride confère une plasticité aux cellules tumorales, leur permettant de passer d'un état à un autre lors de la progression tumorale (*Williams et al., 2019*). Ce contexte favorise notamment des stratégies d'invasion impliquant un mécanisme meneur-suiveur, le meneur pouvant provenir de différents types cellulaires mésenchymateux du stroma dont des cellules tumorales ayant subi l'EMT. Dans ce contexte, nous démontrons que les cellules tumorales mutées pour VHL, présentant un phénotype mésenchymateux, sont capables

d'induire la migration de cellules RCC4-VHL, à phénotype épithélial, non invasives par le mécanisme meneur-suiveur. Ces travaux constituent la première preuve de la capacité des cellules tumorales du ccRCC à changer de stratégie d'invasion en réponse au microenvironnement. Dans la littérature, il est décrit que cette stratégie peut impliquer différents mécanismes sous-jacents comme la création de pistes à faible résistance à travers la MEC ou des interactions biochimiques ou biomécaniques avec la MEC afin de coordonner le mouvement de migration. Nous faisons l'hypothèse que le mécanisme meneur-suiveur entre cellules tumorales invasives du ccRCC et non invasives implique des interactions cellule-cellule biomécaniquement actives. Dans la littérature, le couplage mécanique des cellules épithéliales par l'intermédiaire des complexes E-cadhérine et β -caténine liés au cytosquelette d'actine est bien établi (*Bazellères et al., 2015*). De plus, le rôle de ce complexe a déjà été démontré dans un contexte de mécanisme meneur-suiveur entre CAF et cellules cancéreuses épithéliales (*Labernadie et al., 2017*). Il est décrit dans la littérature que l'inactivation de VHL induit la perte de l'expression de l'E-cadhérine (*Esteban et al., 2006*) (*Annexe 1*). Je propose donc que ces jonctions cellule-cellule impliquent des interactions hétérotypiques entre la N-cadhérine (RCC4) et la E-cadhérine (RCC4-VHL). J'aimerais d'abord montrer que ces interactions sont mécaniquement actives : pour cela, j'analyserai le recrutement de la β -caténine à la membrane plasmique et les interactions entre l' α -caténine et la vinculine en réponse à une force appliquée sur la cellule. En réalisant la déplétion de l'E-cadhérine par une stratégie CRISPR/Cas9, je pourrai montrer que les adhésions E et N-cadhérines sont indispensables aux capacités des cellules tumorales RCC4 pour guider l'invasion des cellules non invasives. Dans l'ensemble, ces travaux permettraient donc de montrer que les jonctions adhérentes impliquant des interactions hétérotypiques mécaniquement actives entre cellules mutées pour VHL et cellules non invasives promeuvent l'invasion tumorale.

La totalité de ces travaux permettrait alors de dresser un tableau complet des mécanismes mis en jeu dans la formation des structures vasculaires aberrantes spécifiques du ccRCC, associée au potentiel invasif et aux mécanismes éventuels de résistance aux traitements anti-angiogéniques.

Références bibliographiques

Abramsson, A., Berlin, Ö., Papayan, H., Paulin, D., Shani, M., and Betsholtz, C. (2002). Analysis of Mural Cell Recruitment to Tumor Vessels. *Circulation* 105, 112–117. doi: 10.1161/hc0102.101437.

Abramsson, A., Lindblom, P., and Betsholtz, C. (2003). Endothelial and nonendothelial sources of PDGF-B regulate pericyte recruitment and influence vascular pattern formation in tumors. *J. Clin. Invest.* 112, 1142–1151. doi: 10.1172/JCI200318549.

Aceto, N., Bardia, A., Miyamoto, D. T., Donaldson, M. C., Wittner, B. S., Spencer, J. A., et al. (2014). Circulating Tumor Cell Clusters Are Oligoclonal Precursors of Breast Cancer Metastasis. *Cell* 158, 1110–1122. doi: 10.1016/j.cell.2014.07.013.

Adams, J. C. (2001). Cell-matrix contact structures. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* 58, 371–392. doi: 10.1007/PL00000864.

Adelaiye, R., Ciamporcerio, E., Miles, K. M., Sotomayor, P., Bard, J., Tsompana, M., et al. (2015). Sunitinib Dose Escalation Overcomes Transient Resistance in Clear Cell Renal Cell Carcinoma and Is Associated with Epigenetic Modifications. *Mol Cancer Ther* 14, 513–522. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-14-0208.

Aeppli, S., Schmaus, M., Eisen, T., Escudier, B., Grünwald, V., Larkin, J., et al. (2021). First-line treatment of metastatic clear cell renal cell carcinoma: a decision-making analysis among experts. *ESMO Open* 6, 100030. doi: 10.1016/j.esmoop.2020.100030.

Aird, W. C. (2012). Endothelial Cell Heterogeneity. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2, a006429–a006429. doi: 10.1101/cshperspect.a006429.

Akhshi, T. K., Wernike, D., and Piekny, A. (2014). Microtubules and actin crosstalk in cell migration and division: Bartolini Microtubules and Actin Crosstalk in Cell Migration and Division. *Cytoskeleton* 71, 1–23. doi: 10.1002/cm.21150.

Albers, J., Rajska, M., Schönenberger, D., Harlander, S., Schraml, P., von Teichman, A., et al. (2013). Combined mutation of *Vhl* and *Trp53* causes renal cysts and tumours in mice. *EMBO Mol Med* 5, 949–964. doi: 10.1002/emmm.201202231.

Ambrosetti, D., Coutts, M., Paoli, C., Durand, M., Borchiellini, D., Montemagno, C., et al. (2022). Cancer-associated fibroblasts in renal cell carcinoma: implication in prognosis and resistance to anti-angiogenic therapy. *BJU International* 129, 80–92. doi: 10.1111/bju.15506.

Anastassiou, G. (2000). Expression of VLA-2, VLA-3, and alpha v integrin receptors in uveal melanoma: association with microvascular architecture of the tumour and prognostic value. *British Journal of Ophthalmology* 84, 899–902. doi: 10.1136/bjo.84.8.899.

Apte, M. V., Haber, P. S., Darby, S. J., Rodgers, S. C., McCaughan, G. W., Korsten, M. A., et al. (1999). Pancreatic stellate cells are activated by proinflammatory cytokines: implications for pancreatic fibrogenesis. *Gut* 44, 534–541. doi: 10.1136/gut.44.4.534.

Apte, R. S., Chen, D. S., and Ferrara, N. (2019). VEGF in Signaling and Disease: Beyond Discovery and Development. *Cell* 176, 1248–1264. doi: 10.1016/j.cell.2019.01.021.

Arganda-Carreras, I., Fernández-González, R., Muñoz-Barrutia, A., and Ortiz-De-Solorzano, C. (2010). 3D reconstruction of histological sections: Application to mammary gland tissue. *Microscopy Research and Technique* 73, 1019–1029. doi: 10.1002/jemt.20829.

Références bibliographiques

- Arina, A., Idel, C., Hyjek, E. M., Alegre, M.-L., Wang, Y., Bindokas, V. P., et al. (2016). Tumor-associated fibroblasts predominantly come from local and not circulating precursors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 113, 7551–7556. doi: 10.1073/pnas.1600363113.
- Armulik, A., Genové, G., and Betsholtz, C. (2011). Pericytes: Developmental, Physiological, and Pathological Perspectives, Problems, and Promises. *Developmental Cell* 21, 193–215. doi: 10.1016/j.devcel.2011.07.001.
- Atkins, M. B., and Tannir, N. M. (2018). Current and emerging therapies for first-line treatment of metastatic clear cell renal cell carcinoma. *Cancer Treatment Reviews* 70, 127–137. doi: 10.1016/j.ctrv.2018.07.009.
- Atlas, Y., Gorin, C., Novais, A., Marchand, M. F., Chatzopoulou, E., Lesieur, J., et al. (2021). Microvascular maturation by mesenchymal stem cells *in vitro* improves blood perfusion in implanted tissue constructs. *Biomaterials* 268, 120594. doi: 10.1016/j.biomaterials.2020.120594.
- Aziz-Seible, R. S. (2011). Fibronectin: Functional character and role in alcoholic liver disease. *WJG* 17, 2482. doi: 10.3748/wjg.v17.i20.2482.
- Bachem, M. G., Schneider, E., Groß, H., Weidenbach, H., Schmid, R. M., Menke, A., et al. (1998). Identification, culture, and characterization of pancreatic stellate cells in rats and humans. *Gastroenterology* 115, 421–432. doi: 10.1016/S0016-5085(98)70209-4.
- Baluk, P., Hashizume, H., and McDonald, D. M. (2005). Cellular abnormalities of blood vessels as targets in cancer. *Current Opinion in Genetics & Development* 15, 102–111. doi: 10.1016/j.gde.2004.12.005.
- Baluk, P., Morikawa, S., Haskell, A., Mancuso, M., and McDonald, D. M. (2003). Abnormalities of Basement Membrane on Blood Vessels and Endothelial Sprouts in Tumors. *The American Journal of Pathology* 163, 1801–1815. doi: 10.1016/S0002-9440(10)63540-7.
- Barker, H. E., Bird, D., Lang, G., and Erler, J. T. (2013). Tumor-Secreted LOXL2 Activates Fibroblasts through FAK Signaling. *Molecular Cancer Research* 11, 1425–1436. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-13-0033-T.
- Barker, H. E., Chang, J., Cox, T. R., Lang, G., Bird, D., Nicolau, M., et al. (2011). LOXL2-mediated matrix remodeling in metastasis and mammary gland involution. *Cancer Res.* 71, 1561–1572. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-2868.
- Barry-Hamilton, V., Spangler, R., Marshall, D., McCauley, S., Rodriguez, H. M., Oyasu, M., et al. (2010). Allosteric inhibition of lysyl oxidase-like-2 impedes the development of a pathologic microenvironment. *Nature Medicine* 16, 1009–1017. doi: 10.1038/nm.2208.
- Baudino, T. A. ed. (2013). *Cell-Cell Interactions*. Totowa, NJ: Humana Press doi: 10.1007/978-1-62703-604-7.
- Bazellères, E., Conte, V., Elosegui-Artola, A., Serra-Picamal, X., Bintanel-Morcillo, M., Roca-Cusachs, P., et al. (2015). Control of cell–cell forces and collective cell dynamics by the intercellular adhesome. *Nat Cell Biol* 17, 409–420. doi: 10.1038/ncb3135.
- Beckouche, N., Bignon, M., Lelarge, V., Mathivet, T., Pichol-Thievend, C., Berndt, S., et al. (2015). The interaction of heparan sulfate proteoglycans with endothelial transglutaminase-2 limits VEGF₁₆₅-induced angiogenesis. *Sci. Signal.* 8, ra70–ra70. doi: 10.1126/scisignal.aaa0963.
- Benjamin, L. E., Hemo, I., and Keshet, E. A plasticity window for blood vessel remodelling is defined by pericyte coverage of the preformed endothelial network and is regulated by PDGF-B and VEGF. 8.
- Bergers, G., Brekken, R., McMahon, G., Vu, T. H., Itoh, T., Tamaki, K., et al. (2000). Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat Cell Biol* 2, 737–744. doi: 10.1038/35036374.
- Bertero, T., Oldham, W. M., Grasset, E. M., Bourget, I., Boulter, E., Pisano, S., et al. (2019). Tumor-Stroma Mechanics Coordinate Amino Acid Availability to Sustain Tumor Growth and Malignancy. *Cell Metabolism* 29, 124-140.e10. doi: 10.1016/j.cmet.2018.09.012.

Références bibliographiques

- Betz, C., Lenard, A., Belting, H.-G., and Affolter, M. (2016). Cell behaviors and dynamics during angiogenesis. *Development* 143, 2249–2260. doi: 10.1242/dev.135616.
- Beuselinck, B., Job, S., Becht, E., Karadimou, A., Verkarre, V., Couchy, G., et al. (2015). Molecular Subtypes of Clear Cell Renal Cell Carcinoma Are Associated with Sunitinib Response in the Metastatic Setting. *Clin Cancer Res* 21, 1329–1339. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-1128.
- Biffi, G., and Tuveson, D. A. (2021). Diversity and Biology of Cancer-Associated Fibroblasts. *Physiological Reviews* 101, 147–176. doi: 10.1152/physrev.00048.2019.
- Bignon, M., Pichol-Thievend, C., Hardouin, J., Malbouyres, M., Bréchet, N., Nasciutti, L., et al. (2011). Lysyl Oxidase-like-2 Cross-links Collagen IV of Glomerular Basement Membrane. *Blood* 118, 3979–3989. doi: 10.1182/blood-2010-10-313296.
- Blache, U., and Ehrbar, M. (2017a). Inspired by Nature: Hydrogels as Versatile Tools for Vascular Engineering. 15. Blache, U., and Ehrbar, M. (2017b). Inspired by Nature: Hydrogels as Versatile Tools for Vascular Engineering. 15.
- Blache, U., Metzger, S., Vallmajo-Martin, Q., Martin, I., Djonov, V., and Ehrbar, M. (2016). Dual Role of Mesenchymal Stem Cells Allows for Microvascularized Bone Tissue-Like Environments in PEG Hydrogels. *Adv. Healthcare Mater.* 5, 489–498. doi: 10.1002/adhm.201500795.
- Bochet, L., Lehuédé, C., Dauvillier, S., Wang, Y. Y., Dirat, B., Laurent, V., et al. (2013). Adipocyte-Derived Fibroblasts Promote Tumor Progression and Contribute to the Desmoplastic Reaction in Breast Cancer. *Cancer Res* 73, 5657–5668. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-0530.
- Bousquet, G., and Janin, A. (2016). Patient-Derived Xenograft: An Adjuvant Technology for the Treatment of Metastatic Disease. *Pathobiology* 83, 170–176. doi: 10.1159/000444533.
- Brabletz, T., Jung, A., Reu, S., Porzner, M., Hlubek, F., Kunz-Schughart, L. A., et al. (2001). Variable β -catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 10356–10361. doi: 10.1073/pnas.171610498.
- Brabletz, T., Kalluri, R., Nieto, M. A., and Weinberg, R. A. (2018). EMT in cancer. *Nat Rev Cancer* 18, 128–134. doi: 10.1038/nrc.2017.118.
- Brassard-Jollive, N., Monnot, C., Muller, L., and Germain, S. (2020). *In vitro* 3D Systems to Model Tumor Angiogenesis and Interactions With Stromal Cells. *Front. Cell Dev. Biol.* 8, 594903. doi: 10.3389/fcell.2020.594903.
- Bray, L. J., Binner, M., Holzheu, A., Friedrichs, J., Freudenberg, U., Hutmacher, D. W., et al. (2015). Multi-parametric hydrogels support 3D *in vitro* bioengineered microenvironment models of tumour angiogenesis. *Biomaterials* 53, 609–620. doi: 10.1016/j.biomaterials.2015.02.124.
- Bridgeman, V. L., Vermeulen, P. B., Foo, S., Bilecz, A., Daley, F., Kostaras, E., et al. (2017). Vessel co-option is common in human lung metastases and mediates resistance to anti-angiogenic therapy in preclinical lung metastasis models: Vessel co-option in lung metastases. *J. Pathol.* 241, 362–374. doi: 10.1002/path.4845.
- Brownlee, P. M., Chambers, A. L., Cloney, R., Bianchi, A., and Downs, J. A. (2014). BAF180 Promotes Cohesion and Prevents Genome Instability and Aneuploidy. *Cell Reports* 6, 973–981. doi: 10.1016/j.celrep.2014.02.012.
- Calon, A., Espinet, E., Palomo-Ponce, S., Tauriello, D. V. F., Iglesias, M., Céspedes, M. V., et al. (2012). Dependency of Colorectal Cancer on a TGF- β -Driven Program in Stromal Cells for Metastasis Initiation. *Cancer Cell* 22, 571–584. doi: 10.1016/j.ccr.2012.08.013.

Références bibliographiques

- Calvo, F., Ege, N., Grande-García, A., Hooper, S., Jenkins, R. P., Chaudhry, S. I., et al. (2013). Mechanotransduction and YAP-dependent matrix remodelling is required for the generation and maintenance of cancer-associated fibroblasts. *Nat Cell Biol* 15, 637–646. doi: 10.1038/ncb2756.
- Calzada, M. J., Esteban, M. A., Feijoo-Cuaresma, M., Castellanos, M. C., Naranjo-Suárez, S., Temes, E., ... & Landázuri, M. O. (2006). von Hippel-Lindau tumor suppressor protein regulates the assembly of intercellular junctions in renal cancer cells through hypoxia-inducible factor-independent mechanisms. *Cancer Research*, 66(3), 1553-1560.
- Campisi, M., Shin, Y., Osaki, T., Hajal, C., Chiono, V., and Kamm, R. D. (2018). 3D self-organized microvascular model of the human blood-brain barrier with endothelial cells, pericytes and astrocytes. *Biomaterials* 180, 117–129. doi: 10.1016/j.biomaterials.2018.07.014.
- Cantelmo, A. R., Pircher, A., Kalucka, J., and Carmeliet, P. (2017). Vessel pruning or healing: endothelial metabolism as a novel target? *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 21, 239–247. doi: 10.1080/14728222.2017.1282465.
- Canty, E. G., and Kadler, K. E. (2005). Procollagen trafficking, processing and fibrillogenesis. *Journal of Cell Science* 118, 1341–1353. doi: 10.1242/jcs.01731.
- Cardoso, A. P., Pinto, M. L., Pinto, A. T., Oliveira, M. I., Pinto, M. T., Gonçalves, R., et al. (2014). Macrophages stimulate gastric and colorectal cancer invasion through EGFR Y1086, c-Src, Erk1/2 and Akt phosphorylation and smallGTPase activity. *Oncogene* 33, 2123–2133. doi: 10.1038/onc.2013.154.
- Carmeliet, P., and Jain, R. K. (2000). Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407, 249–257. doi: 10.1038/35025220.
- Castañeda, A., Serrano, C., Hernández-Trejo, J. A., Gutiérrez-Martínez, I. Z., Montejó-López, W., Gómez-Suárez, M., ... & Nava, P. (2017). pVHL suppresses Akt/ β -catenin-mediated cell proliferation by inhibiting 14-3-3 ζ expression. *Biochemical Journal*, 474(16), 2679-2689.
- Cattelino, A., Liebner, S., Gallini, R., Zanetti, A., Balconi, G., Corsi, A., et al. (2003). The conditional inactivation of the β -catenin gene in endothelial cells causes a defective vascular pattern and increased vascular fragility. *Journal of Cell Biology* 162, 1111–1122. doi: 10.1083/jcb.200212157.
- Cazes, A., Galaup, A., Chomel, C., Bignon, M., Bréchet, N., Le Jan, S., et al. (2006). Extracellular Matrix-Bound Angiopoietin-Like 4 Inhibits Endothelial Cell Adhesion, Migration, and Sprouting and Alters Actin Cytoskeleton. *Circulation Research* 99, 1207–1215. doi: 10.1161/01.RES.0000250758.63358.91.
- Chakiryan, N. H., Kimmel, G. J., Kim, Y., Johnson, J. O., Clark, N., Hajiran, A., et al. (2021). Geospatial Cellular Distribution of Cancer-Associated Fibroblasts Significantly Impacts Clinical Outcomes in Metastatic Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Cancers* 13, 3743. doi: 10.3390/cancers13153743.
- Chapman, J. A. (1974). The Staining Pattern of Collagen Fibrils: I. an Analysis of Electron Micrographs. *Connective Tissue Research* 2, 137–150. doi: 10.3109/03008207409152099.
- Chen, J., He, W.-R., Shen, L., Dong, H., Yu, J., Wang, X., et al. (2015). The Laminin Receptor Is a Cellular Attachment Receptor for Classical Swine Fever Virus. *J Virol* 89, 4894–4906. doi: 10.1128/JVI.00019-15.
- Chen, M. B., Lamar, J. M., Li, R., Hynes, R. O., and Kamm, R. D. (2016). Elucidation of the Roles of Tumor Integrin 1 in the Extravasation Stage of the Metastasis Cascade. *Cancer Research* 76, 2513–2524. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-1325.
- Chen, M. B., Whisler, J. A., Jeon, J. S., and Kamm, R. D. (2013a). Mechanisms of tumor cell extravasation in an *in vitro* microvascular network platform. *Integr. Biol.* 5, 1262. doi: 10.1039/c3ib40149a.

Références bibliographiques

- Chen, M. B., Whisler, J. A., Jeon, J. S., and Kamm, R. D. (2013b). Mechanisms of tumor cell extravasation in an *in vitro* microvascular network platform. *Integr. Biol.* 5, 1262. doi: 10.1039/c3ib40149a.
- Chen, W., Jin, D., Shi, Y., Zhang, Y., Zhou, H., and Li, G. (2020). The underlying mechanisms of lorlatinib penetration across the blood - brain barrier and the distribution characteristics of lorlatinib in the brain. *Cancer Med* 9, 4350–4359. doi: 10.1002/cam4.3061.
- Choueiri, T. K., Halabi, S., Sanford, B. L., Hahn, O., Michaelson, M. D., Walsh, M. K., et al. (2017). Cabozantinib Versus Sunitinib As Initial Targeted Therapy for Patients With Metastatic Renal Cell Carcinoma of Poor or Intermediate Risk: The Alliance A031203 CABOSUN Trial. *JCO* 35, 591–597. doi: 10.1200/JCO.2016.70.7398.
- Choueiri, T. K., Motzer, R. J., Rini, B. I., Haanen, J., Campbell, M. T., Venugopal, B., et al. (2020). Updated efficacy results from the JAVELIN Renal 101 trial: first-line avelumab plus axitinib versus sunitinib in patients with advanced renal cell carcinoma. *Annals of Oncology* 31, 1030–1039. doi: 10.1016/j.annonc.2020.04.010.
- Choueiri, T. K., Powles, T., Burotto, M., Escudier, B., Bourlon, M. T., Zurawski, B., et al. (2021). Nivolumab plus Cabozantinib versus Sunitinib for Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med* 384, 829–841. doi: 10.1056/NEJMoa2026982.
- Chwalek, K., Tsurkan, M. V., Freudenberg, U., and Werner, C. (2015). Glycosaminoglycan-based hydrogels to modulate heterocellular communication in *in vitro* angiogenesis models. *Sci Rep* 4, 4414. doi: 10.1038/srep04414.
- Clark, A. G., and Vignjevic, D. M. (2015). Modes of cancer cell invasion and the role of the microenvironment. *Current Opinion in Cell Biology* 36, 13–22. doi: 10.1016/j.ceb.2015.06.004.
- Conklin, M. W., Eickhoff, J. C., Riching, K. M., Pehlke, C. A., Eliceiri, K. W., Provenzano, P. P., et al. (2011). Aligned Collagen Is a Prognostic Signature for Survival in Human Breast Carcinoma. *The American Journal of Pathology* 178, 1221–1232. doi: 10.1016/j.ajpath.2010.11.076.
- Conklin, M. W., and Keely, P. J. (2012). Why the stroma matters in breast cancer: Insights into breast cancer patient outcomes through the examination of stromal biomarkers. *Cell Adhesion & Migration* 6, 249–260. doi: 10.4161/cam.20567.
- Conrad, A. H., Zhang, Y., Tasheva, E. S., and Conrad, G. W. (2010). Proteomic Analysis of Potential Keratan Sulfate, Chondroitin Sulfate A, and Hyaluronic Acid Molecular Interactions. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 51, 4500. doi: 10.1167/iovs.09-4914.
- Cowden Dahl, K. D., Symowicz, J., Ning, Y., Gutierrez, E., Fishman, D. A., Adley, B. P., et al. (2008). Matrix Metalloproteinase 9 Is a Mediator of Epidermal Growth Factor-Dependent E-Cadherin Loss in Ovarian Carcinoma Cells. *Cancer Res* 68, 4606–4613. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-5046.
- Cox, T. R., Bird, D., Baker, A.-M., Barker, H. E., Ho, M. W.-Y., Lang, G., et al. (2013). LOX-Mediated Collagen Crosslinking Is Responsible for Fibrosis-Enhanced Metastasis. *Cancer Res* 73, 1721–1732. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-2233.
- Crivellato, E., Nico, B., Vacca, A., Djonov, V., Presta, M., and Ribatti, D. (2004). Recombinant human erythropoietin induces intussusceptive microvascular growth *in vivo*. *Leukemia* 18, 331–336. doi: 10.1038/sj.leu.2403246.
- Dagher, J., Kammerer-Jacquet, S.-F., Dugay, F., Beaumont, M., Lespagnol, A., Cornevin, L., et al. (2017). Clear cell renal cell carcinoma: a comparative study of histological and chromosomal characteristics between primary tumors and their corresponding metastases. *Virchows Arch* 471, 107–115. doi: 10.1007/s00428-017-2124-0.
- Davis, G. E., and Saunders, W. B. (2006). Molecular Balance of Capillary Tube Formation versus Regression in Wound Repair: Role of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings* 11, 44–56. doi: 10.1038/sj.jidsymp.5650008.

Références bibliographiques

- De Palma, M., Biziato, D., and Petrova, T. V. (2017). Microenvironmental regulation of tumour angiogenesis. *Nat. Rev. Cancer* 17, 457–474. doi: 10.1038/nrc.2017.51.
- de Vries, C., Escobedo, J. A., Ueno, H., Houck, K., Ferrara, N., and Williams, L. T. (1992). The *fms*-Like Tyrosine Kinase, a Receptor for Vascular Endothelial Growth Factor. *Science* 255, 989–991. doi: 10.1126/science.1312256.
- Derler, R., Gesslbauer, B., Weber, C., Strutzmann, E., Miller, I., and Kungl, A. (2017). Glycosaminoglycan-Mediated Downstream Signaling of CXCL8 Binding to Endothelial Cells. *IJMS* 18, 2605. doi: 10.3390/ijms18122605.
- Di Stefano, V., Torsello, B., Bianchi, C., Cifola, I., Mangano, E., Bovo, G., et al. (2016). Major Action of Endogenous Lysyl Oxidase in Clear Cell Renal Cell Carcinoma Progression and Collagen Stiffness Revealed by Primary Cell Cultures. *The American Journal of Pathology* 186, 2473–2485. doi: 10.1016/j.ajpath.2016.05.019.
- Direkze, N. C., Forbes, S. J., Brittan, M., Hunt, T., Jeffery, R., Preston, S. L., et al. (2003). Multiple Organ Engraftment by Bone-Marrow-Derived Myofibroblasts and Fibroblasts in Bone-Marrow-Transplanted Mice. *STEM CELLS* 21, 514–520. doi: 10.1634/stemcells.21-5-514.
- Doyle, A. D., Carvajal, N., Jin, A., Matsumoto, K., and Yamada, K. M. (2015). Local 3D matrix microenvironment regulates cell migration through spatiotemporal dynamics of contractility-dependent adhesions. *Nat Commun* 6, 8720. doi: 10.1038/ncomms9720.
- Drost, J., and Clevers, H. (2018). Organoids in cancer research. *Nat Rev Cancer* 18, 407–418. doi: 10.1038/s41568-018-0007-6.
- DuChez, B. J., Doyle, A. D., Dimitriadis, E. K., and Yamada, K. M. (2019). Durotaxis by Human Cancer Cells. *Biophysical Journal* 116, 670–683. doi: 10.1016/j.bpj.2019.01.009.
- Duda, D. G., Duyverman, A. M. M. J., Kohno, M., Snuderl, M., Steller, E. J. A., Fukumura, D., et al. (2010). Malignant cells facilitate lung metastasis by bringing their own soil. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 21677–21682. doi: 10.1073/pnas.1016234107.
- DuFort, C. C., Paszek, M. J., and Weaver, V. M. (2011). Balancing forces: architectural control of mechanotransduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12, 308–319. doi: 10.1038/nrm3112.
- Dupont, S., Morsut, L., Aragona, M., Enzo, E., Giulitti, S., Cordenonsi, M., et al. (2011). Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature* 474, 179–183. doi: 10.1038/nature10137.
- Dvorak, H. F., Weaver, V. M., Tlsty, T. D., and Bergers, G. (2011). Tumor microenvironment and progression. *Journal of Surgical Oncology* 103, 468–474. doi: 10.1002/jso.21709.
- Ebrahim, Q., Chaurasia, S. S., Vasanji, A., Qi, J. H., Klenotic, P. A., Cutler, A., et al. (2010). Cross-Talk between Vascular Endothelial Growth Factor and Matrix Metalloproteinases in the Induction of Neovascularization *in Vivo*. *The American Journal of Pathology* 176, 496–503. doi: 10.2353/ajpath.2010.080642.
- Eelen, G., Treps, L., Li, X., and Carmeliet, P. (2020). Basic and Therapeutic Aspects of Angiogenesis Updated. *Circ Res* 127, 310–329. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.120.316851.
- Egeblad, M., Rasch, M. G., and Weaver, V. M. (2010). Dynamic interplay between the collagen scaffold and tumor evolution. *Current Opinion in Cell Biology* 22, 697–706. doi: 10.1016/j.ceb.2010.08.015.
- Ehrbar, M., Sala, A., Lienemann, P., Ranga, A., Mosiewicz, K., Bittermann, A., et al. (2011). Elucidating the Role of Matrix Stiffness in 3D Cell Migration and Remodeling. *Biophysical Journal* 100, 284–293. doi: 10.1016/j.bpj.2010.11.082.
- Ehsan, S. M., Welch-Reardon, K. M., Waterman, M. L., Hughes, C. C. W., and George, S. C. (2014). A three-dimensional *in vitro* model of tumor cell intravasation. *Integr. Biol.* 6, 603. doi: 10.1039/c3ib40170g.

Références bibliographiques

- Elias, R., Zhang, Q., and Brugarolas, J. (2020). jona. *The Cancer Journal* 26, 9.
- Engler, A. J., Sen, S., Sweeney, H. L., and Discher, D. E. (2006). Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification. *Cell* 126, 677–689. doi: 10.1016/j.cell.2006.06.044.
- Escudier, B., Bellmunt, J., Négrier, S., Bajetta, E., Melichar, B., Bracarda, S., et al. (2010). Phase III Trial of Bevacizumab Plus Interferon Alfa-2a in Patients With Metastatic Renal Cell Carcinoma (AVOREN): Final Analysis of Overall Survival. *JCO* 28, 2144–2150. doi: 10.1200/JCO.2009.26.7849.
- Espana-Agusti, J. (2026). Loss of PBRM1 rescues VHL dependent replication stress to promote renal carcinogenesis. *NATURE COMMUNICATIONS*, 11.
- Esteban, M. A., Tran, M. G. B., Harten, S. K., Hill, P., Castellanos, M. C., Chandra, A., et al. (2006). Regulation of E-cadherin Expression by VHL and Hypoxia-Inducible Factor. *Cancer Res* 66, 3567–3575. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-2670.
- Etienne-Manneville, S. (2013). Microtubules in Cell Migration. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 29, 471–499. doi: 10.1146/annurev-cellbio-101011-155711.
- Evans, A. J., Russell, R. C., Roche, O., Burry, T. N., Fish, J. E., Chow, V. W., ... & Ohh, M. (2007). VHL promotes E2 box-dependent E-cadherin transcription by HIF-mediated regulation of SIP1 and snail. *Molecular and cellular biology*, 27(1), 157-169.
- Evrova, O, and J Buschmann. 2017. "In Vitro and in Vivo Effects of PDGF-BB Delivery Strategies on Tendon Healing: A Review." *European Cells and Materials* 34 (July): 15–39. <https://doi.org/10.22203/eCM.v034a02>.
- Feijoo-Cuaresma, M., Méndez, F., Maqueda, A., Esteban, M. A., Naranjo-Suarez, S., Castellanos, M. C., ... & Calzada, M. J. (2008). Inadequate activation of the GTPase RhoA contributes to the lack of fibronectin matrix assembly in von Hippel-Lindau protein-defective renal cancer cells. *Journal of Biological Chemistry*, 283(36), 24982-24990.
- Fernández-Chacón, M., García-González, I., Mühleder, S., and Benedito, R. (2021). Role of Notch in endothelial biology. *Angiogenesis* 24, 237–250. doi: 10.1007/s10456-021-09793-7.
- Ferratge, S., Ha, G., Carpentier, G., Arouche, N., Bascetin, R., Muller, L., et al. (2017). Initial clonogenic potential of human endothelial progenitor cells is predictive of their further properties and establishes a functional hierarchy related to immaturity. *Stem Cell Research* 21, 148–159. doi: 10.1016/j.scr.2017.04.009.
- Frew, I. J., Thoma, C. R., Georgiev, S., Minola, A., Hitz, M., Montani, M., et al. (2008). pVHL and PTEN tumour suppressor proteins cooperatively suppress kidney cyst formation. *EMBO J* 27, 1747–1757. doi: 10.1038/emboj.2008.96.
- Fridlender, Z. G., and Albelda, S. M. (2012). Tumor-associated neutrophils: friend or foe? *Carcinogenesis* 33, 949–955. doi: 10.1093/carcin/bgs123.
- Fridman, W. H., Meylan, M., Petitprez, F., Sun, C.-M., Italiano, A., and Sautès-Fridman, C. (2022). B cells and tertiary lymphoid structures as determinants of tumour immune contexture and clinical outcome. *Nat Rev Clin Oncol*. doi: 10.1038/s41571-022-00619-z.
- Friedl, P., and Alexander, S. (2011). Cancer Invasion and the Microenvironment: Plasticity and Reciprocity. *Cell* 147, 992–1009. doi: 10.1016/j.cell.2011.11.016.
- Friedl, P., and Brückner, E.-B. (2000). The biology of cell locomotion within three-dimensional extracellular matrix. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)* 57, 41–64. doi: 10.1007/s000180050498.

Références bibliographiques

- Friedl, P., and Wolf, K. (2003). Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer* 3, 362–374. doi: 10.1038/nrc1075.
- Gaengel, K., Genové, G., Armulik, A., and Betsholtz, C. (2009). Endothelial-Mural Cell Signaling in Vascular Development and Angiogenesis. *ATVB* 29, 630–638. doi: 10.1161/ATVBAHA.107.161521.
- Gaggioli, C., Hooper, S., Hidalgo-Carcedo, C., Grosse, R., Marshall, J. F., Harrington, K., et al. (2007). Fibroblast-led collective invasion of carcinoma cells with differing roles for RhoGTPases in leading and following cells. *Nat Cell Biol* 9, 1392–1400. doi: 10.1038/ncb1658.
- Gao, G., Park, J. Y., Kim, B. S., Jang, J., and Cho, D. (2018). Coaxial Cell Printing of Freestanding, Perfusable, and Functional *In Vitro* Vascular Models for Recapitulation of Native Vascular Endothelium Pathophysiology. *Adv. Healthcare Mater.* 7, 1801102. doi: 10.1002/adhm.201801102.
- Gebala, V., Collins, R., Geudens, I., Phng, L.-K., and Gerhardt, H. (2016). Blood flow drives lumen formation by inverse membrane blebbing during angiogenesis *in vivo*. *Nat Cell Biol* 18, 443–450. doi: 10.1038/ncb3320.
- Geraldo, S., Simon, A., Elkhatib, N., Louvard, D., Fetler, L., and Vignjevic, D. M. (2012). Do cancer cells have distinct adhesions in 3D collagen matrices and *in vivo*? *European Journal of Cell Biology* 91, 930–937. doi: 10.1016/j.ejcb.2012.07.005.
- Gerhardt, H., and Betsholtz, C. (2003). Endothelial-pericyte interactions in angiogenesis. *Cell and Tissue Research* 314, 15–23. doi: 10.1007/s00441-003-0745-x.
- Germain, S., Monnot, C., Muller, L., and Eichmann, A. (2010). Hypoxia-driven angiogenesis: role of tip cells and extracellular matrix scaffolding: *Current Opinion in Hematology*, 1. doi: 10.1097/MOH.0b013e32833865b9.
- Ghajar, C. M., Chen, X., Harris, J. W., Suresh, V., Hughes, C. C. W., Jeon, N. L., et al. (2008). The Effect of Matrix Density on the Regulation of 3-D Capillary Morphogenesis. *Biophysical Journal* 94, 1930–1941. doi: 10.1529/biophysj.107.120774.
- Giampieri, S., Manning, C., Hooper, S., Jones, L., Hill, C. S., and Sahai, E. (2009). Localized and reversible TGF β signalling switches breast cancer cells from cohesive to single cell motility. *Nat Cell Biol* 11, 1287–1296. doi: 10.1038/ncb1973.
- Gkretsi, V., and Stylianopoulos, T. (2018). Cell Adhesion and Matrix Stiffness: Coordinating Cancer Cell Invasion and Metastasis. *Front. Oncol.* 8, 145. doi: 10.3389/fonc.2018.00145.
- Gligorijevic, B., Bergman, A., and Condeelis, J. (2014). Multiparametric Classification Links Tumor Microenvironments with Tumor Cell Phenotype. *PLoS Biol* 12, e1001995. doi: 10.1371/journal.pbio.1001995.
- Goetz, J. G., Minguet, S., Navarro-Lérida, I., Lazcano, J. J., Samaniego, R., Calvo, E., et al. (2011). Biomechanical Remodeling of the Microenvironment by Stromal Caveolin-1 Favors Tumor Invasion and Metastasis. *Cell* 146, 148–163. doi: 10.1016/j.cell.2011.05.040.
- Goodarzi, S., Prunet, A., Rossetti, F., Bort, G., Tillement, O., Porcel, E., et al. (2021). Quantifying nanotherapeutic penetration using a hydrogel-based microsystem as a new 3D *in vitro* platform. *Lab Chip* 21, 2495–2510. doi: 10.1039/D1LC00192B.
- Gopal, S., Veracini, L., Grall, D., Butori, C., Schaub, S., Audebert, S., et al. (2017). Fibronectin-guided migration of carcinoma collectives. *Nat Commun* 8, 14105. doi: 10.1038/ncomms14105.
- Gorin, C., Rochefort, G. Y., Bascetin, R., Ying, H., Lesieur, J., Sadoine, J., et al. (2016). Priming Dental Pulp Stem Cells With Fibroblast Growth Factor-2 Increases Angiogenesis of Implanted Tissue-Engineered Constructs Through Hepatocyte Growth Factor and Vascular Endothelial Growth Factor Secretion: FGF-2 Priming Enhances Angiogenesis by DPSCs. *atka* 5, 392–404. doi: 10.5966/sctm.2015-0166.

Références bibliographiques

- Goswami, S., Sahai, E., Wyckoff, J. B., Cammer, M., Cox, D., Pixley, F. J., et al. (2005). Macrophages Promote the Invasion of Breast Carcinoma Cells via a Colony-Stimulating Factor-1/Epidermal Growth Factor Paracrine Loop. *Cancer Res* 65, 5278–5283. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-1853.
- Grasset, E. M., Bertero, T., Bozec, A., Friard, J., Bourget, I., Pisano, S., et al. (2018). Matrix Stiffening and EGFR Cooperate to Promote the Collective Invasion of Cancer Cells. *Cancer Res* 78, 5229–5242. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-18-0601.
- Grisanzio, C., Seeley, A., Chang, M., Collins, M., Di Napoli, A., Cheng, S.-C., et al. (2011). Orthotopic xenografts of RCC retain histological, immunophenotypic and genetic features of tumours in patients. *J. Pathol.* 225, 212–221. doi: 10.1002/path.2929.
- Grugan, K. D., Miller, C. G., Yao, Y., Michaylira, C. Z., Ohashi, S., Klein-Szanto, A. J., et al. (2010). Fibroblast-secreted hepatocyte growth factor plays a functional role in esophageal squamous cell carcinoma invasion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 11026–11031. doi: 10.1073/pnas.0914295107.
- Gu, Y.-F., Cohn, S., Christie, A., McKenzie, T., Wolff, N., Do, Q. N., et al. (2017). Modeling Renal Cell Carcinoma in Mice: *Bap1* and *Pbrm1* Inactivation Drive Tumor Grade. *Cancer Discov* 7, 900–917. doi: 10.1158/2159-8290.CD-17-0292.
- Guess, C. M., LaFleur, B. J., Weidow, B. L., and Quaranta, V. (2009). A Decreased Ratio of Laminin-332 $\beta 3$ to $\gamma 2$ Subunit mRNA is Associated with Poor Prognosis in Colon Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 18, 1584–1590. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-08-1027.
- Guess, C. M., and Quaranta, V. (2009). Defining the role of laminin-332 in carcinoma. *Matrix Biology* 28, 445–455. doi: 10.1016/j.matbio.2009.07.008.
- Haase, V. H., Glickman, J. N., Socolovsky, M., and Jaenisch, R. (2001). Vascular tumors in livers with targeted inactivation of the von Hippel–Lindau tumor suppressor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 1583–1588. doi: 10.1073/pnas.98.4.1583.
- Haeger, A., Krause, M., Wolf, K., and Friedl, P. (2014). Cell jamming: Collective invasion of mesenchymal tumor cells imposed by tissue confinement. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1840, 2386–2395. doi: 10.1016/j.bbagen.2014.03.020.
- Hakkinen, K. M., Harunaga, J. S., Doyle, A. D., and Yamada, K. M. (2011). Direct Comparisons of the Morphology, Migration, Cell Adhesions, and Actin Cytoskeleton of Fibroblasts in Four Different Three-Dimensional Extracellular Matrices. *Tissue Engineering Part A* 17, 713–724. doi: 10.1089/ten.tea.2010.0273.
- Hanahan, D., and Folkman, J. (1996). Patterns and Emerging Mechanisms of the Angiogenic Switch during Tumorigenesis. *Cell* 86, 353–364. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80108-7.
- Harlander, S., Schönenberger, D., Toussaint, N. C., Prummer, M., Catalano, A., Brandt, L., et al. (2017). Combined mutation in *Vhl*, *Trp53* and *Rb1* causes clear cell renal cell carcinoma in mice. *Nat Med* 23, 869–877. doi: 10.1038/nm.4343.
- Harburger, D. S., & Calderwood, D. A. (2009). Integrin signalling at a glance. *Journal of cell science*, 122(2), 159–163.
- Harley, B. A. C., Kim, H.-D., Zaman, M. H., Yannas, I. V., Lauffenburger, D. A., and Gibson, L. J. (2008). Microarchitecture of Three-Dimensional Scaffolds Influences Cell Migration Behavior via Junction Interactions. *Biophysical Journal* 95, 4013–4024. doi: 10.1529/biophysj.107.122598.
- Hartmann, N., Giese, N. A., Giese, T., Poschke, I., Offringa, R., Werner, J., et al. (2014). Prevailing Role of Contact Guidance in Intrastromal T-cell Trapping in Human Pancreatic Cancer. *Clin Cancer Res* 20, 3422–3433. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-2972.

Références bibliographiques

- Hashimoto, G., Inoki, I., Fujii, Y., Aoki, T., Ikeda, E., and Okada, Y. (2002). Matrix Metalloproteinases Cleave Connective Tissue Growth Factor and Reactivate Angiogenic Activity of Vascular Endothelial Growth Factor 165. *Journal of Biological Chemistry* 277, 36288–36295. doi: 10.1074/jbc.M201674200.
- Hashizume, H., Baluk, P., Morikawa, S., McLean, J. W., Thurston, G., Roberge, S., et al. (2000). Openings between Defective Endothelial Cells Explain Tumor Vessel Leakiness. *The American Journal of Pathology* 156, 1363–1380. doi: 10.1016/S0002-9440(10)65006-7.
- Heiss, M., Hellström, M., Kalén, M., May, T., Weber, H., Hecker, M., et al. (2015). Endothelial cell spheroids as a versatile tool to study angiogenesis *in vitro*. *FASEB j.* 29, 3076–3084. doi: 10.1096/fj.14-267633.
- Heissig, B., Hattori, K., Friedrich, M., Rafii, S., and Werb, Z. (2003). Angiogenesis: vascular remodeling of the extracellular matrix involves metalloproteinases: *Current Opinion in Hematology* 10, 136–141. doi: 10.1097/00062752-200303000-00007.
- Hernandez-Fernaud, J. R., Ruengeler, E., Casazza, A., Neilson, L. J., Pulleine, E., Santi, A., et al. (2017). Secreted CLIC3 drives cancer progression through its glutathione-dependent oxidoreductase activity. *Nat Commun* 8, 14206. doi: 10.1038/ncomms14206.
- Herwig, L., Blum, Y., Krudewig, A., Ellertsdottir, E., Lenard, A., Belting, H.-G., et al. (2011). Distinct Cellular Mechanisms of Blood Vessel Fusion in the Zebrafish Embryo. *Current Biology* 21, 1942–1948. doi: 10.1016/j.cub.2011.10.016.
- Hessmann, E., Patzak, M. S., Klein, L., Chen, N., Kari, V., Ramu, I., et al. (2018). Fibroblast drug scavenging increases intratumoural gemcitabine accumulation in murine pancreas cancer. *Gut* 67, 497–507. doi: 10.1136/gutjnl-2016-311954.
- Hida, K., Maishi, N., Torii, C., and Hida, Y. (2016). Tumor angiogenesis—characteristics of tumor endothelial cells. *Int J Clin Oncol* 21, 206–212. doi: 10.1007/s10147-016-0957-1.
- Hinshaw, D. C., and Shevde, L. A. (2019). The Tumor Microenvironment Innately Modulates Cancer Progression. *Cancer Res* 79, 4557–4566. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-18-3962.
- Hirata, E., and Sahai, E. (2017). Tumor Microenvironment and Differential Responses to Therapy. *Cold Spring Harb Perspect Med* 7, a026781. doi: 10.1101/cshperspect.a026781.
- Hohenester, E., and Yurchenco, P. D. (2013). Laminins in basement membrane assembly. *Cell Adhesion & Migration* 7, 56–63. doi: 10.4161/cam.21831.
- Hosaka, K., Yang, Y., Seki, T., Fischer, C., Dubey, O., Fredlund, E., et al. (2016). Pericyte–fibroblast transition promotes tumor growth and metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 113. doi: 10.1073/pnas.1608384113.
- Hou, J.-M., Krebs, M. G., Lancashire, L., Sloane, R., Backen, A., Swain, R. K., et al. (2012). Clinical Significance and Molecular Characteristics of Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor Microemboli in Patients With Small-Cell Lung Cancer. *JCO* 30, 525–532. doi: 10.1200/JCO.2010.33.3716.
- Houck, K. A., Leung, D. W., Rowland, A. M., Winer, J., and Ferrara, N. (1992). Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *Journal of Biological Chemistry* 267, 26031–26037. doi: 10.1016/S0021-9258(18)35712-0.
- Hsieh, J. J., Purdue, M. P., Signoretti, S., Swanton, C., Albiges, L., Schmidinger, M., et al. (2017). Renal cell carcinoma. *Nat Rev Dis Primers* 3, 17009. doi: 10.1038/nrdp.2017.9.
- Hudes, G., Dutcher, J., Staroslawska, E., Bodrogi, I., Schmidt-Wolf, I. G. H., O’Toole, T., et al. (2007). Temsirolimus, Interferon Alfa, or Both for Advanced Renal-Cell Carcinoma. *The New England Journal of Medicine*, 11.

Références bibliographiques

- Hynes, R. O., and Destree, A. T. (1978). 10 nm filaments in normal and transformed cells. *Cell* 13, 151–163. doi: 10.1016/0092-8674(78)90146-0.
- Iliopoulos, O., A. Kibel, S. Gray, and W. G. Kaelin. 1995. "Tumour Suppression by the Human von Hippel-Lindau Gene Product." *Nature Medicine* 1 (8): 822–26.
- Imai, K., Matsuyama, S., Miyake, S., Suga, K., and Nakachi, K. (2000). Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: an 11-year follow-up study of a general population. *The Lancet* 356, 1795–1799. doi: 10.1016/S0140-6736(00)03231-1.
- Imao, T., Egawa, M., Takashima, H., Koshida, K., and Namiki, M. (2004). Inverse correlation of microvessel density with metastasis and prognosis in renal cell carcinoma: Microvessel density in renal cell carcinoma. *International Journal of Urology* 11, 948–953. doi: 10.1111/j.1442-2042.2004.00931.x.
- Iozzo, R. V., and Gubbiotti, M. A. (2018). Extracellular matrix: The driving force of mammalian diseases. *Matrix Biology* 71–72, 1–9. doi: 10.1016/j.matbio.2018.03.023.
- Ireland, L., Santos, A., Ahmed, M. S., Rainer, C., Nielsen, S. R., Quaranta, V., et al. (2016). Chemoresistance in Pancreatic Cancer Is Driven by Stroma-Derived Insulin-Like Growth Factors. *Cancer Res* 76, 6851–6863. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-1201.
- Iwano, M., Plieth, D., Danoff, T. M., Xue, C., Okada, H., and Neilson, E. G. (2002). Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *J. Clin. Invest.* 110, 341–350. doi: 10.1172/JCI0215518.
- Jacobetz, M. A., Chan, D. S., Neesse, A., Bapiro, T. E., Cook, N., Frese, K. K., et al. (2013). Hyaluronan impairs vascular function and drug delivery in a mouse model of pancreatic cancer. *Gut* 62, 112–120. doi: 10.1136/gutjnl-2012-302529.
- Jahan, B., and McCloskey, K. E. (2020). Differentiation and expansion of endothelial cells requires pre-optimization of KDR+ expression kinetics. *Stem Cell Research* 42, 101685. doi: 10.1016/j.scr.2019.101685.
- Jain, R. K. (2005). Normalization of Tumor Vasculature: An Emerging Concept in Antiangiogenic Therapy. *Science, New Series* 307, 58–62.
- Jalalvand, M., Darbeheshti, F., & Rezaei, N. (2021). Immune checkpoint inhibitors: review of the existing evidence and challenges in breast cancer. *Immunotherapy*, 13(7), 587-603.
- Jeon, J. S., Bersini, S., Gilardi, M., Dubini, G., Charest, J. L., Moretti, M., et al. (2015). Human 3D vascularized organotypic microfluidic assays to study breast cancer cell extravasation. *Proc Natl Acad Sci USA* 112, 214–219. doi: 10.1073/pnas.1417115112.
- Jeong, S.-Y., Lee, J.-H., Shin, Y., Chung, S., and Kuh, H.-J. (2016). Co-Culture of Tumor Spheroids and Fibroblasts in a Collagen Matrix-Incorporated Microfluidic Chip Mimics Reciprocal Activation in Solid Tumor Microenvironment. *PLoS ONE* 11, e0159013. doi: 10.1371/journal.pone.0159013.
- Jodele, S., Blavier, L., Yoon, J. M., and DeClerck, Y. A. (2006). Modifying the soil to affect the seed: role of stromal- derived matrix metalloproteinases in cancer progression. *Cancer Metastasis Rev* 25, 35–43. doi: 10.1007/s10555-006-7887-8.
- Jonasch, E., Gao, J., and Rathmell, W. K. (2014). Renal cell carcinoma. *BMJ* 349, g4797–g4797. doi: 10.1136/bmj.g4797.
- Jonasch, E., Walker, C. L., and Rathmell, W. K. (2021). Clear cell renal cell carcinoma ontogeny and mechanisms of lethality. *Nat Rev Nephrol* 17, 245–261. doi: 10.1038/s41581-020-00359-2.
- Kaelin, W. G. (2007). von Hippel-Lindau Disease. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 2, 145–173. doi: 10.1146/annurev.pathol.2.010506.092049.

Références bibliographiques

- Kai, F., Drain, A. P., and Weaver, V. M. (2019). The Extracellular Matrix Modulates the Metastatic Journey. *Developmental Cell* 49, 332–346. doi: 10.1016/j.devcel.2019.03.026.
- Kalluri, R. (2016). The biology and function of fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer* 16, 582–598. doi: 10.1038/nrc.2016.73.
- Katayama, Y., Uchino, J., Chihara, Y., Tamiya, N., Kaneko, Y., Yamada, T., et al. (2019). Tumor Neovascularization and Developments in Therapeutics. *Cancers* 11, 316. doi: 10.3390/cancers11030316.
- Kaur, A., Webster, M. R., Marchbank, K., Behera, R., Ndoye, A., Kugel, C. H., et al. (2016). sFRP2 in the aged microenvironment drives melanoma metastasis and therapy resistance. *Nature* 532, 250–254. doi: 10.1038/nature17392.
- Kerschnitzki, M., Kollmannsberger, P., Burghammer, M., Duda, G. N., Weinkamer, R., Wagermaier, W., et al. (2013). Architecture of the osteocyte network correlates with bone material quality. *Journal of Bone and Mineral Research* 28, 1837–1845. doi: 10.1002/jbmr.1927.
- Kessenbrock, K., Plaks, V., and Werb, Z. (2010). Matrix Metalloproteinases: Regulators of the Tumor Microenvironment. *Cell* 141, 52–67. doi: 10.1016/j.cell.2010.03.015.
- Khalil, A. A., and Friedl, P. (2010). Determinants of leader cells in collective cell migration. *Integr. Biol.* 2, 568. doi: 10.1039/c0ib00052c.
- Khoshnoodi, J., Pedchenko, V., and Hudson, B. G. (2008). Mammalian collagen IV. *Microsc. Res. Tech.* 71, 357–370. doi: 10.1002/jemt.20564.
- Kidd, S., Spaeth, E., Watson, K., Burks, J., Lu, H., Klopp, A., et al. (2012). Origins of the Tumor Microenvironment: Quantitative Assessment of Adipose-Derived and Bone Marrow-Derived Stroma. *PLoS ONE* 7, e30563. doi: 10.1371/journal.pone.0030563.
- Kim, S., Lee, H., Chung, M., and Jeon, N. L. (2013a). Engineering of functional, perfusable 3D microvascular networks on a chip. *Lab Chip* 13, 1489. doi: 10.1039/c3lc41320a.
- Kim, S., Lee, H., Chung, M., and Jeon, N. L. (2013b). Engineering of functional, perfusable 3D microvascular networks on a chip. *Lab Chip* 13, 1489. doi: 10.1039/c3lc41320a.
- Ko, J., Ahn, J., Kim, S., Lee, Y., Lee, J., Park, D., et al. (2019). Tumor spheroid-on-a-chip: a standardized microfluidic culture platform for investigating tumor angiogenesis. *Lab Chip* 19, 2822–2833. doi: 10.1039/C9LC00140A.
- Kohler, H. H., Barth, P. J., Siebel, A., Gerharz, E. W., and Bittinger, A. (1996). Quantitative assessment of vascular surface density in renal cell carcinomas. *BJU Int* 77, 650–654. doi: 10.1046/j.1464-410X.1996.08544.x.
- Kojima, Y., Acar, A., Eaton, E. N., Mellody, K. T., Scheel, C., Ben-Porath, I., et al. (2010). Autocrine TGF- β and stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) signaling drives the evolution of tumor-promoting mammary stromal myofibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 20009–20014. doi: 10.1073/pnas.1013805107.
- Kostourou, V., and Papalazarou, V. (2014). Non-collagenous ECM proteins in blood vessel morphogenesis and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1840, 2403–2413. doi: 10.1016/j.bbagen.2014.02.018.
- Kraehenbuehl, T. P., Zammaretti, P., Van der Vlies, A. J., Schoenmakers, R. G., Lutolf, M. P., Jaconi, M. E., et al. (2008). Three-dimensional extracellular matrix-directed cardioprogenitor differentiation: Systematic modulation of a synthetic cell-responsive PEG-hydrogel. *Biomaterials* 29, 2757–2766. doi: 10.1016/j.biomaterials.2008.03.016.

Références bibliographiques

- Kraman, M., Bambrough, P. J., Arnold, J. N., Roberts, E. W., Magiera, L., Jones, J. O., et al. (2010). Suppression of Antitumor Immunity by Stromal Cells Expressing Fibroblast Activation Protein- α . *Science* 330, 827–830. doi: 10.1126/science.1195300.
- Kröger, C., Afeyan, A., Mraz, J., Eaton, E. N., Reinhardt, F., Khodor, Y. L., et al. (2019). Acquisition of a hybrid E/M state is essential for tumorigenicity of basal breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 116, 7353–7362. doi: 10.1073/pnas.1812876116.
- Kubow, K. E., Vukmirovic, R., Zhe, L., Klotzsch, E., Smith, M. L., Gourdon, D., et al. (2015). Mechanical forces regulate the interactions of fibronectin and collagen I in extracellular matrix. *Nat Commun* 6, 8026. doi: 10.1038/ncomms9026.
- Kučera, T., Strilić, B., Regener, K., Schubert, M., Laudet, V., and Lammert, E. (2009). Ancestral Vascular Lumen Formation via Basal Cell Surfaces. *PLoS ONE* 4, e4132. doi: 10.1371/journal.pone.0004132.
- Kuczynski, E. A., and Reynolds, A. R. (2020). Vessel co-option and resistance to anti-angiogenic therapy. *Angiogenesis* 23, 55–74. doi: 10.1007/s10456-019-09698-6.
- Kuczynski, E. A., Vermeulen, P. B., Pezzella, F., Kerbel, R. S., and Reynolds, A. R. (2019). Vessel co-option in cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 16, 469–493. doi: 10.1038/s41571-019-0181-9.
- Kurup, S., Abramsson, A., Li, J. P., Lindahl, U., Kjellen, L., Betsholtz, C., et al. (2006). Heparan sulphate requirement in platelet-derived growth factor B-mediated pericyte recruitment. *Biochemical Society Transactions* 34, 454–455. doi: 10.1042/BST0340454.
- Labernadie, A., Kato, T., Brugués, A., Serra-Picamal, X., Derzsi, S., Arwert, E., et al. (2017). A mechanically active heterotypic E-cadherin/N-cadherin adhesion enables fibroblasts to drive cancer cell invasion. *Nat Cell Biol* 19, 224–237. doi: 10.1038/ncb3478.
- Laib, A. M., Bartol, A., Alajati, A., Korff, T., Weber, H., and Augustin, H. G. (2009). Spheroid-based human endothelial cell microvessel formation *in vivo*. *Nat Protoc* 4, 1202–1215. doi: 10.1038/nprot.2009.96.
- Lakins, M. A., Ghorani, E., Munir, H., Martins, C. P., and Shields, J. D. (2018). Cancer-associated fibroblasts induce antigen-specific deletion of CD8 + T Cells to protect tumour cells. *Nat Commun* 9, 948. doi: 10.1038/s41467-018-03347-0.
- Latacz, E., Caspani, E., Barnhill, R., Lugassy, C., Verhoef, C., Grünhagen, D., et al. (2020). Pathological features of vessel co-option versus sprouting angiogenesis. *Angiogenesis* 23, 43–54. doi: 10.1007/s10456-019-09690-0.
- Lau, E. Y. T., Lo, J., Cheng, B. Y. L., Ma, M. K. F., Lee, J. M. F., Ng, J. K. Y., et al. (2016). Cancer-Associated Fibroblasts Regulate Tumor-Initiating Cell Plasticity in Hepatocellular Carcinoma through c-Met/FRA1/HEY1 Signaling. *Cell Reports* 15, 1175–1189. doi: 10.1016/j.celrep.2016.04.019.
- Lauffenburger, D. A., and Horwitz, A. F. (1996). Cell Migration: A Physically Integrated Molecular Process. *Cell* 84, 359–369. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81280-5.
- Lazard, D., Sastre, X., Frid, M. G., Glukhova, M. A., Thiery, J. P., and Kotliansky, V. E. (1993). Expression of smooth muscle-specific proteins in myoepithelium and stromal myofibroblasts of normal and malignant human breast tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 999–1003. doi: 10.1073/pnas.90.3.999.
- Le Jan, S., Amy, C., Cazes, A., Monnot, C., Lamandé, N., Favier, J., et al. (2003). Angiopoietin-Like 4 Is a Proangiogenic Factor Produced during Ischemia and in Conventional Renal Cell Carcinoma. *The American Journal of Pathology* 162, 1521–1528. doi: 10.1016/S0002-9440(10)64285-X.
- Leduc, C., and Etienne-Manneville, S. (2015). Intermediate filaments in cell migration and invasion: the unusual suspects. *Current Opinion in Cell Biology* 32, 102–112. doi: 10.1016/j.ceb.2015.01.005.

Références bibliographiques

- Lee, C. H., Shah, B., Moiola, E. K., and Mao, J. J. (2010). CTGF directs fibroblast differentiation from human mesenchymal stem/stromal cells and defines connective tissue healing in a rodent injury model. *J. Clin. Invest.* 120, 3340–3349. doi: 10.1172/JCI43230.
- Lee, C.-H., and Motzer, R. J. (2017). The evolution of anti-angiogenic therapy for kidney cancer. *Nat Rev Nephrol* 13, 69–70. doi: 10.1038/nrneph.2016.194.
- Lee, S., Jilani, S. M., Nikolova, G. V., Carpizo, D., and Iruela-Arispe, M. L. (2005). Processing of VEGF-A by matrix metalloproteinases regulates bioavailability and vascular patterning in tumors. *Journal of Cell Biology* 169, 681–691. doi: 10.1083/jcb.200409115.
- Lenard, A., Ellertsdottir, E., Herwig, L., Krudewig, A., Sauteur, L., Belting, H.-G., et al. (2013). *In Vivo* Analysis Reveals a Highly Stereotypic Morphogenetic Pathway of Vascular Anastomosis. *Developmental Cell* 25, 492–506. doi: 10.1016/j.devcel.2013.05.010.
- Levental, Kandice R., Hongmei Yu, Laura Kass, Johnathon N. Lakins, Mikala Egeblad, Janine T. Erler, Sheri F.T. Fong, et al. 2009. “Matrix Crosslinking Forces Tumor Progression by Enhancing Integrin Signaling.” *Cell* 139 (5): 891–906. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.10.027>.
- Li, Y., and Kumacheva, E. (2018). Hydrogel microenvironments for cancer spheroid growth and drug screening. *Sci. Adv.* 4, eaas8998. doi: 10.1126/sciadv.aas8998.
- Liabotis, A., Ardidie-Robouant, C., Mailly, P., Besbes, S., Gutierrez, C., Atlas, Y., et al. (2022). Angiopoietin-like 4-Induced 3D Capillary Morphogenesis Correlates to Stabilization of Endothelial Adherens Junctions and Restriction of VEGF-Induced Sprouting. *Biomedicines* 10, 206. doi: 10.3390/biomedicines10020206.
- Liang, Y., Jeong, J., DeVolder, R. J., Cha, C., Wang, F., Tong, Y. W., et al. (2011). A cell-instructive hydrogel to regulate malignancy of 3D tumor spheroids with matrix rigidity. *Biomaterials* 32, 9308–9315. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.08.045.
- Liu, J., Tan, Y., Zhang, H., Zhang, Y., Xu, P., Chen, J., et al. (2012). Soft fibrin gels promote selection and growth of tumorigenic cells. *Nature Mater* 11, 734–741. doi: 10.1038/nmat3361.
- Ljungberg, B., Bensalah, K., Canfield, S., Dabestani, S., Hofmann, F., Hora, M., et al. (2015). EAU Guidelines on Renal Cell Carcinoma: 2014 Update. *European Urology* 67, 913–924. doi: 10.1016/j.eururo.2015.01.005.
- Logsdon, E. A., Finley, S. D., Popel, A. S., and Gabhann, F. M. (2014). A systems biology view of blood vessel growth and remodelling. *J. Cell. Mol. Med.* 18, 1491–1508. doi: 10.1111/jcmm.12164.
- Lucero, H. A., and Kagan, H. M. (2006). Lysyl oxidase: an oxidative enzyme and effector of cell function. *Cell. Mol. Life Sci.* 63, 2304–2316. doi: 10.1007/s00018-006-6149-9.
- Lugano, R., Ramachandran, M., and Dimberg, A. (2020). Tumor angiogenesis: causes, consequences, challenges and opportunities. *Cell. Mol. Life Sci.* 77, 1745–1770. doi: 10.1007/s00018-019-03351-7.
- M P Lutolf (2005). Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering. Available at: <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.proxy.insermbiblio.inist.fr/15637621/>.
- Ma, W., Tessarollo, L., Hong, S.-B., Baba, M., Southon, E., Back, T. C., et al. Hepatic Vascular Tumors, Angiectasis in Multiple Organs, and Impaired Spermatogenesis in Mice with Conditional Inactivation of the VHL Gene. 9.
- MacLennan, G. T., and Bostwick, D. G. (1995). Microvessel density in renal cell carcinoma: Lack of prognostic significance. *Urology* 46, 27–30. doi: 10.1016/S0090-4295(99)80153-8.
- Madsen, C., and Cox, T. (2017). Relative Stiffness Measurements of Tumour Tissues by Shear Rheology. *BIO-PROTOCOL* 7. doi: 10.21769/BioProtoc.2265.

Références bibliographiques

- Magdeldin, T., López-Dávila, V., Pape, J., Cameron, G. W. W., Emberton, M., Loizidou, M., et al. (2017). Engineering a vascularised 3D *in vitro* model of cancer progression. *Sci Rep* 7, 44045. doi: 10.1038/srep44045.
- Magnussen, A., Kasman, I. M., Norberg, S., Baluk, P., Murray, R., and McDonald, D. M. (2005). Rapid Access of Antibodies to A5B1 Integrin Overexpressed on the Luminal Surface of Tumor Blood Vessels. *Cancer Res*, 10.
- Malik, R., Lelkes, P. I., and Cukierman, E. (2015). Biomechanical and biochemical remodeling of stromal extracellular matrix in cancer. *Trends in Biotechnology* 33, 230–236. doi: 10.1016/j.tibtech.2015.01.004.
- Mantoni, T. S., Lunardi, S., Al-Assar, O., Masamune, A., and Brunner, T. B. (2011). Pancreatic Stellate Cells Radioprotect Pancreatic Cancer Cells through β 1-Integrin Signaling. *Cancer Res* 71, 3453–3458. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1633.
- Marchand, M., Monnot, C., Muller, L., and Germain, S. (2019). Extracellular matrix scaffolding in angiogenesis and capillary homeostasis. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 89, 147–156. doi: 10.1016/j.semcdb.2018.08.007.
- Martino, F., Perestrelo, A. R., Vinarský, V., Pagliari, S., and Forte, G. (2018). Cellular Mechanotransduction: From Tension to Function. *Front. Physiol.* 9, 824. doi: 10.3389/fphys.2018.00824.
- Maru, S., Ishigaki, Y., Shinohara, N., Takata, T., Tomosugi, N., & Nonomura, K. (2013). Inhibition of mTORC2 but not mTORC1 up-regulates E-cadherin expression and inhibits cell motility by blocking HIF-2 α expression in human renal cell carcinoma. *The Journal of urology*, 189(5), 1921-1929.
- Masuda, T., Tanaka, N., Takamatsu, K., Hakozaki, K., Takahashi, R., Anno, T., et al. (2022). Unique characteristics of tertiary lymphoid structures in kidney clear cell carcinoma: prognostic outcome and comparison with bladder cancer. *J Immunother Cancer* 10, e003883. doi: 10.1136/jitc-2021-003883.
- Mathia, S., Paliege, A., Koesters, R., Peters, H., Neumayer, H.-H., Bachmann, S., et al. (2013). Action of hypoxia-inducible factor in liver and kidney from mice with Pax8-rtTA-based deletion of von Hippel-Lindau protein. *Acta Physiol* 207, 565–576. doi: 10.1111/apha.12058.
- Maxwell, M., Borges, L. F., & Zervas, N. T. (1999). Renal cell carcinoma: a rare source of cauda equina metastasis: Case report. *Journal of Neurosurgery: Spine*, 90(1), 129-132.
- McDonald, D. M., and Choyke, P. L. (2003). Imaging of angiogenesis: from microscope to clinic. *Nat Med* 9, 713–725. doi: 10.1038/nm0603-713.
- McIntyre, A., and Harris, A. L. (2015). Metabolic and hypoxic adaptation to anti-angiogenic therapy: a target for induced essentiality. *EMBO Mol Med* 7, 368–379. doi: 10.15252/emmm.201404271.
- Meng, F., Meyer, C. M., Joung, D., Vallera, D. A., McAlpine, M. C., and Panoskaltsis-Mortari, A. (2019). 3D Bioprinted *In Vitro* Metastatic Models via Reconstruction of Tumor Microenvironments. *Adv. Mater.* 31, 1806899. doi: 10.1002/adma.201806899.
- Meylan, M., Petitprez, F., Becht, E., Bougouïin, A., Pupier, G., Calvez, A., et al. (2022). Tertiary lymphoid structures generate and propagate anti-tumor antibody-producing plasma cells in renal cell cancer. *Immunity* 55, 527- 541.e5. doi: 10.1016/j.immuni.2022.02.001.
- Micke, P., and Östman, A. (2005). Exploring the tumour environment: cancer-associated fibroblasts as targets in cancer therapy. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 9, 1217–1233. doi: 10.1517/14728222.9.6.1217.
- Miller, C. P., Tsuchida, C., Zheng, Y., Himmelfarb, J., and Akilesh, S. (2018). A 3D Human Renal Cell Carcinoma-on-a-Chip for the Study of Tumor Angiogenesis. *Neoplasia* 20, 610–620. doi: 10.1016/j.neo.2018.02.011.
- Miller, T., Goude, M. C., McDevitt, T. C., and Temenoff, J. S. (2014). Molecular engineering of glycosaminoglycan chemistry for biomolecule delivery. *Acta Biomaterialia* 10, 1705–1719. doi: 10.1016/j.actbio.2013.09.039.

Références bibliographiques

- Minardi, D., Lucarini, G., Mazzucchelli, R., Milanese, G., Natali, D., Galosi, A. B., et al. (2005). PROGNOSTIC ROLE OF FUHRMAN GRADE AND VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR IN pT1a CLEAR CELL CARCINOMA IN PARTIAL NEPHRECTOMY SPECIMENS. *Journal of Urology* 174, 1208–1212. doi: 10.1097/01.ju.0000173078.57871.2d.
- Mishra, P. J., Mishra, P. J., Humeniuk, R., Medina, D. J., Alexe, G., Mesirov, J. P., et al. (2008). Carcinoma-Associated Fibroblast-Like Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. *Cancer Res* 68, 4331–4339. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-0943.
- Mitsiades, N., Yu, W., Poulaki, V., Tsokos, M., and Stamenkovic, I. Matrix Metalloproteinase-7-mediated Cleavage of Fas Ligand Protects Tumor Cells from Chemotherapeutic Drug Cytotoxicity. 6.
- Mohan, V., Das, A., and Sagi, I. (2019). Emerging roles of ECM remodeling processes in cancer. *Seminars in Cancer Biology*, S1044579X19302688. doi: 10.1016/j.semcan.2019.09.004.
- Moon, H.-J., Finney, J., Ronnebaum, T., and Mure, M. (2014). Human lysyl oxidase-like 2. *Bioorg. Chem.* 57, 231–241. doi: 10.1016/j.bioorg.2014.07.003.
- Morikawa, S., Baluk, P., Kaidoh, T., Haskell, A., Jain, R. K., and McDonald, D. M. (2002). Abnormalities in Pericytes on Blood Vessels and Endothelial Sprouts in Tumors. *The American Journal of Pathology* 160, 985–1000. doi: 10.1016/S0002-9440(10)64920-6.
- Motzer, R., Alekseev, B., Rha, S.-Y., Porta, C., Eto, M., Powles, T., et al. (2021). Lenvatinib plus Pembrolizumab or Everolimus for Advanced Renal Cell Carcinoma. *N Engl J Med*, NEJMoa2035716. doi: 10.1056/NEJMoa2035716.
- Motzer, R. J., Escudier, B., George, S., Hammers, H. J., Srinivas, S., Tykodi, S. S., et al. (2020). Nivolumab versus everolimus in patients with advanced renal cell carcinoma: Updated results with long-term follow-up of the randomized, open-label, phase 3 CheckMate 025 trial. *Cancer* 126, 4156–4167. doi: 10.1002/cncr.33033.
- Motzer, R. J., Escudier, B., McDermott, D. F., George, S., Hammers, H. J., Srinivas, S., et al. (2015). Nivolumab versus Everolimus in Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med* 373, 1803–1813. doi: 10.1056/NEJMoa1510665.
- Motzer, R. J., Hutson, T. E., Cella, D., Reeves, J., Hawkins, R., Guo, J., et al. (2013). Pazopanib versus Sunitinib in Metastatic Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med* 369, 722–731. doi: 10.1056/NEJMoa1303989.
- Motzer, R. J., Hutson, T. E., Tomczak, P., Michaelson, M. D., Bukowski, R. M., Oudard, S., et al. (2009). Overall Survival and Updated Results for Sunitinib Compared With Interferon Alfa in Patients With Metastatic Renal Cell Carcinoma. *JCO* 27, 3584–3590. doi: 10.1200/JCO.2008.20.1293.
- Motzer, R. J., Jonasch, E., Michaelson, M. D., Nandagopal, L., Gore, J. L., George, S., et al. (2019). NCCN Guidelines Insights: Kidney Cancer, Version 2.2020. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network* 17, 1278–1285. doi: 10.6004/jnccn.2019.0054.
- Motzer, R. J., Tannir, N. M., McDermott, D. F., Arén Frontera, O., Melichar, B., Choueiri, T. K., et al. (2018). Nivolumab plus Ipilimumab versus Sunitinib in Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med* 378, 1277–1290. doi: 10.1056/NEJMoa1712126.
- Moya, M. L., Hsu, Y.-H., Lee, A. P., Hughes, C. C. W., and George, S. C. (2013). *In Vitro* Perfused Human Capillary Networks. *Tissue Engineering Part C: Methods* 19, 730–737. doi: 10.1089/ten.tec.2012.0430.
- Nakatsu, M. N., and Hughes, C. C. W. (2008). “Chapter 4 An Optimized Three-Dimensional *In Vitro* Model for the Analysis of Angiogenesis,” in *Methods in Enzymology* (Elsevier), 65–82. doi: 10.1016/S0076-6879(08)02004-1.
- Nakatsu, M. N., Sainson, R. C. A., Aoto, J. N., Taylor, K. L., Aitkenhead, M., Pérez-del-Pulgar, S., et al. (2003). Angiogenic sprouting and capillary lumen formation modeled by human umbilical vein endothelial cells (HUVEC)

Références bibliographiques

in fibrin gels: the role of fibroblasts and Angiopoietin-16. *Microvascular Research* 66, 102–112. doi: 10.1016/S0026-2862(03)00045-1.

Nargund, A. M., Pham, C. G., Dong, Y., Wang, P. I., Osmangeyoglu, H. U., Xie, Y., et al. (2017). The SWI/SNF Protein PBRM1 Restrains VHL-Loss-Driven Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Cell Reports* 18, 2893–2906. doi: 10.1016/j.celrep.2017.02.074.

Nativ, O., Sabo, E., Reiss, A., Wald, M., Madjar, S., and Moskovitz, B. (1998). Clinical Significance of Tumor Angiogenesis in Patients with Localized Renal Cell Carcinoma. *Urology* 51, 693–696. doi: 10.1016/S0090-4295(98)00019-3.

Neto, F., Klaus-Bergmann, A., Ong, Y. T., Alt, S., Vion, A.-C., Szymborska, A., et al. (2018). YAP and TAZ regulate adherens junction dynamics and endothelial cell distribution during vascular development. *eLife* 7, e31037. doi: 10.7554/eLife.31037.

Nguyen-Ngoc, K.-V., and Ewald, A. J. (2013). Mammary ductal elongation and myoepithelial migration are regulated by the composition of the extracellular matrix: EXTRACELLULAR MATRIX REGULATION OF BRANCHING MORPHOGENESIS. *Journal of Microscopy* 251, 212–223. doi: 10.1111/jmi.12017.

Nielsen, S. R., Quaranta, V., Linford, A., Emeagi, P., Rainer, C., Santos, A., et al. (2016). Macrophage-secreted granulins supports pancreatic cancer metastasis by inducing liver fibrosis. *Nat Cell Biol* 18, 549–560. doi: 10.1038/ncb3340.

Nieto, M. A., Huang, R. Y.-J., Jackson, R. A., and Thiery, J. P. (2016). EMT: 2016. *Cell* 166, 21–45. doi: 10.1016/j.cell.2016.06.028.

Nowak-Sliwinska, P., Alitalo, K., Allen, E., Anisimov, A., Aplin, A. C., Auerbach, R., et al. (2018). Consensus guidelines for the use and interpretation of angiogenesis assays. *Angiogenesis* 21, 425–532. doi: 10.1007/s10456-018-9613-x.

Odenthal, J., Takes, R., and Friedl, P. (2016). Plasticity of tumor cell invasion: governance by growth factors and cytokines. *CARCIN*, bgw098. doi: 10.1093/carcin/bgw098.

Ogawa, M., LaRue, A. C., and Drake, C. J. (2006). Hematopoietic origin of fibroblasts/myofibroblasts: its pathophysiologic implications. *Blood* 108, 2893–2896. doi: 10.1182/blood-2006-04-016600.

Olive, K. P., Jacobetz, M. A., Davidson, C. J., Gopinathan, A., McIntyre, D., Honess, D., et al. (2009). Inhibition of Hedgehog Signaling Enhances Delivery of Chemotherapy in a Mouse Model of Pancreatic Cancer. *Science* 324, 1457–1461. doi: 10.1126/science.1171362.

Orimo, A., Gupta, P. B., Sgroi, D. C., Arenzana-Seisdedos, F., Delaunay, T., Naeem, R., et al. (2005). Stromal Fibroblasts Present in Invasive Human Breast Carcinomas Promote Tumor Growth and Angiogenesis through Elevated SDF-1/CXCL12 Secretion. *Cell* 121, 335–348. doi: 10.1016/j.cell.2005.02.034.

Oudijk, L., van Nederveen, F., Badoual, C., Tissier, F., Tischler, A. S., Smid, M., et al. (2015). Vascular Pattern Analysis for the Prediction of Clinical Behaviour in Pheochromocytomas and Paragangliomas. *PLoS ONE* 10, e0121361. doi: 10.1371/journal.pone.0121361.

Page-McCaw, A., Ewald, A. J., and Werb, Z. (2007). Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 221–233. doi: 10.1038/nrm2125.

Pajusola, K., Aprelikova, O., Korhonen, J., Kaipainen, A., Pertovaara, L., Alitalo, R., et al. FLT4 Receptor Tyrosine Kinase Contains Seven Immunoglobulin-like Loops and Is Expressed in Multiple Human Tissues and Cell Lines. 7.

Palikuqi, B., Nguyen, D.-H. T., Li, G., Schreiner, R., Pellegata, A. F., Liu, Y., et al. (2020). Adaptable haemodynamic endothelial cells for organogenesis and tumorigenesis. *Nature* 585, 426–432. doi: 10.1038/s41586-020-2712-z.

Références bibliographiques

- Pankov, R., and Yamada, K. M. (2002). Fibronectin at a glance. *Journal of Cell Science* 115, 3861–3863. doi: 10.1242/jcs.00059.
- Pape, J., Magdeldin, T., Ali, M., Walsh, C., Lythgoe, M., Emberton, M., et al. (2019). Cancer invasion regulates vascular complexity in a three-dimensional biomimetic model. *European Journal of Cancer* 119, 179–193. doi: 10.1016/j.ejca.2019.07.005.
- Parsons-Wingerter, P., Kasman, I. M., Norberg, S., Magnussen, A., Zanivan, S., Rissone, A., et al. (2005). Uniform Overexpression and Rapid Accessibility of $\alpha_5\beta_1$ Integrin on Blood Vessels in Tumors. 167, 19.
- Pastushenko, I., Brisebarre, A., Sifrim, A., Fioramonti, M., Revenco, T., Boumahdi, S., et al. (2018). Identification of the tumour transition states occurring during EMT. *Nature* 556, 463–468. doi: 10.1038/s41586-018-0040-3.
- Patan, S., Munn, L. L., and Jain, R. K. (1996). Intussusceptive Microvascular Growth in a Human Colon Adenocarcinoma Xenograft: A Novel Mechanism of Tumor Angiogenesis. *Microvascular Research* 51, 260–272. doi: 10.1006/mvre.1996.0025.
- Pauling, L., and Corey, R. B. (1951). The Structure of Fibrous Proteins of the Collagen-Gelatin Group. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 37, 272–281. doi: 10.1073/pnas.37.5.272.
- Pavía-Jiménez, A., Tcheuyap, V. T., and Brugarolas, J. (2014). Establishing a human renal cell carcinoma tumorgraft platform for preclinical drug testing. *Nat Protoc* 9, 1848–1859. doi: 10.1038/nprot.2014.108.
- Peng, J., Ma, J., Li, W., Mo, R., Zhang, P., Gao, K., et al. (2015). Stabilization of MCRS1 by BAP1 prevents chromosome instability in renal cell carcinoma. *Cancer Letters* 369, 167–174. doi: 10.1016/j.canlet.2015.08.013.
- Perier, A., Fregni, G., Wittnebel, S., Gad, S., Allard, M., Gervois, N., et al. (2011). Mutations of the von Hippel-Lindau gene confer increased susceptibility to natural killer cells of clear-cell renal cell carcinoma. *Oncogene* 30, 2622–2632. doi: 10.1038/onc.2010.638.
- Persikov, A. V., Ramshaw, J. A. M., Kirkpatrick, A., and Brodsky, B. (2005). Electrostatic Interactions Involving Lysine Make Major Contributions to Collagen Triple-Helix Stability. *Biochemistry* 44, 1414–1422. doi: 10.1021/bi048216r.
- Pedersen, John A., and Melody A. Swartz. 2005. “Mechanobiology in the Third Dimension.” *Annals of Biomedical Engineering* 33 (11): 1469–90. <https://doi.org/10.1007/s10439-005-8159-4>.
- Peyton, S. R., Kim, P. D., Ghajar, C. M., Seliktar, D., and Putnam, A. J. (2008). The effects of matrix stiffness and RhoA on the phenotypic plasticity of smooth muscle cells in a 3-D biosynthetic hydrogel system. *Biomaterials* 29, 2597–2607. doi: 10.1016/j.biomaterials.2008.02.005.
- Phan, D. T. T., Wang, X., Craver, B. M., Sobrino, A., Zhao, D., Chen, J. C., et al. (2017). A vascularized and perfused organ-on-a-chip platform for large-scale drug screening applications. *Lab Chip* 17, 511–520. doi: 10.1039/C6LC01422D.
- Phng, L.-K., Gebala, V., Bentley, K., Philippides, A., Wacker, A., Mathivet, T., et al. (2015). Formin-Mediated Actin Polymerization at Endothelial Junctions Is Required for Vessel Lumen Formation and Stabilization. *Developmental Cell* 32, 123–132. doi: 10.1016/j.devcel.2014.11.017.
- Poincloux, R., Lizárraga, F., and Chavrier, P. (2009). Matrix invasion by tumour cells: a focus on MT1-MMP trafficking to invadopodia. *Journal of Cell Science* 122, 3015–3024. doi: 10.1242/jcs.034561.
- Polyak, K., Haviv, I., and Campbell, I. G. (2009). Co-evolution of tumor cells and their microenvironment. *Trends in Genetics* 25, 30–38. doi: 10.1016/j.tig.2008.10.012.

Références bibliographiques

- Pöschl, E., Schlötzer-Schrehardt, U., Brachvogel, B., Saito, K., Ninomiya, Y., and Mayer, U. (2004). Collagen IV is essential for basement membrane stability but dispensable for initiation of its assembly during early development. *Development* 131, 1619–1628. doi: 10.1242/dev.01037.
- Potente, M., Gerhardt, H., and Carmeliet, P. (2011). Basic and Therapeutic Aspects of Angiogenesis. *Cell* 146, 873–887. doi: 10.1016/j.cell.2011.08.039.
- Powles, T., Plimack, E. R., Soulières, D., Waddell, T., Stus, V., Gafanov, R., et al. (2020). Pembrolizumab plus axitinib versus sunitinib monotherapy as first-line treatment of advanced renal cell carcinoma (KEYNOTE-426): extended follow-up from a randomised, open-label, phase 3 trial. *The Lancet Oncology* 21, 1563–1573. doi: 10.1016/S1470-2045(20)30436-8.
- Prall, F. (2007). Tumour budding in colorectal carcinoma. *Histopathology* 50, 151–162. doi: 10.1111/j.1365-2559.2006.02551.x.
- Provenzano, P. P., Cuevas, C., Chang, A. E., Goel, V. K., Von Hoff, D. D., and Hingorani, S. R. (2012). Enzymatic Targeting of the Stroma Ablates Physical Barriers to Treatment of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Cell* 21, 418–429. doi: 10.1016/j.ccr.2012.01.007.
- Provenzano, P. P., Eliceiri, K. W., Campbell, J. M., Inman, D. R., White, J. G., and Keely, P. J. (2006). Collagen reorganization at the tumor-stromal interface facilitates local invasion. *BMC Med* 4, 38. doi: 10.1186/1741-7015-4-38.
- Quan, Q., Wang, X., Lu, C., Ma, W., Wang, Y., Xia, G., et al. (2020). Cancer stem-like cells with hybrid epithelial/mesenchymal phenotype leading the collective invasion. *Cancer Sci* 111, 467–476. doi: 10.1111/cas.14285.
- Quante, M., Tu, S. P., Tomita, H., Gonda, T., Wang, S. S. W., Takashi, S., et al. (2011). Bone Marrow-Derived Myofibroblasts Contribute to the Mesenchymal Stem Cell Niche and Promote Tumor Growth. *Cancer Cell* 19, 257–272. doi: 10.1016/j.ccr.2011.01.020.
- Rahimi, N. (2012). The Ubiquitin-Proteasome System Meets Angiogenesis. *Mol Cancer Ther* 11, 538–548. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-11-0555.
- Ramamonjisoa, N., and Ackerstaff, E. (2017). Characterization of the Tumor Microenvironment and Tumor–Stroma Interaction by Non-invasive Preclinical Imaging. *Front. Oncol.* 7. doi: 10.3389/fonc.2017.00003.
- Ramer, R., Fischer, S., Haustein, M., Manda, K., and Hinz, B. (2014). Cannabinoids inhibit angiogenic capacities of endothelial cells via release of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1 from lung cancer cells. *Biochemical Pharmacology* 91, 202–216. doi: 10.1016/j.bcp.2014.06.017.
- Rankin, E. B., Tomaszewski, J. E., and Haase, V. H. (2012). Renal Cyst Development in Mice with Conditional Inactivation of the von Hippel-Lindau Tumor Suppressor. 18.
- Ricard-Blum, S. (2011). The Collagen Family. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3, a004978–a004978. doi: 10.1101/cshperspect.a004978.
- Rice, A. J., Cortes, E., Lachowski, D., Cheung, B. C. H., Karim, S. A., Morton, J. P., et al. (2017). Matrix stiffness induces epithelial–mesenchymal transition and promotes chemoresistance in pancreatic cancer cells. *Oncogenesis* 6, e352–e352. doi: 10.1038/oncsis.2017.54.
- Rini, B. I., Halabi, S., Rosenberg, J. E., Stadler, W. M., Vaena, D. A., Archer, L., et al. (2010). Phase III Trial of Bevacizumab Plus Interferon Alfa Versus Interferon Alfa Monotherapy in Patients With Metastatic Renal Cell Carcinoma: Final Results of CALGB 90206. *JCO* 28, 2137–2143. doi: 10.1200/JCO.2009.26.5561.

Références bibliographiques

- Rini, B. I., Plimack, E. R., Stus, V., Gafanov, R., Hawkins, R., Nosov, D., et al. (2019). Pembrolizumab plus Axitinib versus Sunitinib for Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med* 380, 1116–1127. doi: 10.1056/NEJMoa1816714.
- Rioux-Leclercq, N., Epstein, J. I., Bansard, J.-Y., Turlin, B., Patard, J.-J., Manunta, A., et al. (2001). Clinical significance of cell proliferation, microvessel density, and CD44 adhesion molecule expression in renal cell carcinoma. *Human Pathology* 32, 1209–1215. doi: 10.1053/hupa.2001.28957.
- Rodrigues, J., Heinrich, M. A., Teixeira, L. M., and Prakash, J. (2021). 3D *In Vitro* Model (R)evolution: Unveiling Tumor–Stroma Interactions. *Trends in Cancer* 7, 249–264. doi: 10.1016/j.trecan.2020.10.009.
- Roduit, C., Sekatski, S., Dietler, G., Catsicas, S., Lafont, F., and Kasas, S. (2009). Stiffness Tomography by Atomic Force Microscopy. *Biophysical Journal* 97, 674–677. doi: 10.1016/j.bpj.2009.05.010.
- Rojas, J. D., Papadopoulou, V., Czernuszewicz, T. J., Rajamahendiran, R. M., Chytil, A., Chiang, Y.-C., et al. (2019). Ultrasound Measurement of Vascular Density to Evaluate Response to Anti-Angiogenic Therapy in Renal Cell Carcinoma. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 66, 873–880. doi: 10.1109/TBME.2018.2860932.
- Roman, J., Ritzenthaler, J. D., Roser-Page, S., Sun, X., and Han, S. (2010). $\alpha 5\beta 1$ -Integrin Expression Is Essential for Tumor Progression in Experimental Lung Cancer. *Am J Respir Cell Mol Biol* 43, 684–691. doi: 10.1165/rcmb.2009-0375OC.
- Roudsari, L. C., Jeffs, S. E., Witt, A. S., Gill, B. J., and West, J. L. (2016). A 3D Poly(ethylene glycol)-based Tumor Angiogenesis Model to Study the Influence of Vascular Cells on Lung Tumor Cell Behavior. *Sci Rep* 6, 32726. doi: 10.1038/srep32726.
- Ruiz-Saurí, A., García-Bustos, V., Granero, E., Cuesta, S., Sales, M. A., Marcos, V., et al. (2018). Distribution of Vascular Patterns in Different Subtypes of Renal Cell Carcinoma. A Morphometric Study in Two Distinct Types of Blood Vessels. *Pathol. Oncol. Res.* 24, 515–524. doi: 10.1007/s12253-017-0262-y.
- Sabeh, F., Shimizu-Hirota, R., and Weiss, S. J. (2009). Protease-dependent versus -independent cancer cell invasion programs: three-dimensional amoeboid movement revisited. *Journal of Cell Biology* 185, 11–19. doi: 10.1083/jcb.200807195.
- Sabo, E., Boltenko, A., Sova, Y., Stein, A., Kleinhaus, S., and Resnick, M. B. Microscopic Analysis and Significance of Vascular Architectural Complexity in Renal Cell Carcinoma. 6.
- Sakamoto, H., Yamasaki, T., Sumiyoshi, T., Takeda, M., Shibasaki, N., Utsunomiya, N., et al. (2021). Functional and genomic characterization of patient-derived xenograft model to study the adaptation to mTORC1 inhibitor in clear cell renal cell carcinoma. *Cancer Med.* 10, 119–134. doi: 10.1002/cam4.3578.
- Salajegheh, A. (2016). *Angiogenesis in Health, Disease and Malignancy*. Cham: Springer International Publishing doi: 10.1007/978-3-319-28140-7.
- Salvador, F., Martin, A., López-Menéndez, C., Moreno-Bueno, G., Santos, V., Vázquez-Naharro, A., et al. (2017). Lysyl Oxidase-like Protein LOXL2 Promotes Lung Metastasis of Breast Cancer. *Cancer Res.* 77, 5846–5859. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-3152.
- Sapudom, J., Rubner, S., Martin, S., Kurth, T., Riedel, S., Mierke, C. T., et al. (2015). The phenotype of cancer cell invasion controlled by fibril diameter and pore size of 3D collagen networks. *Biomaterials* 52, 367–375. doi: 10.1016/j.biomaterials.2015.02.022.
- Sarrazin, S., Lamanna, W. C., and Esko, J. D. (2011). Heparan Sulfate Proteoglycans. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3, a004952–a004952. doi: 10.1101/cshperspect.a004952.

Références bibliographiques

- Schedin, P., and Keely, P. J. (2011). Mammary Gland ECM Remodeling, Stiffness, and Mechanosignaling in Normal Development and Tumor Progression. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3, a003228–a003228. doi: 10.1101/cshperspect.a003228.
- Schietke, R. E., Hackenbeck, T., Tran, M., Knaup, K. X., Shukla, D., Rosenberger, C., et al. (2012). Renal Tubular HIF-2 α Expression Requires VHL Inactivation and Causes Fibrosis and Cysts. *PLoS ONE* 7, 12.
- Schietke, R., Warnecke, C., Wacker, I., Schödel, J., Mole, D. R., Campean, V., et al. (2010). The lysyl oxidases LOX and LOXL2 are necessary and sufficient to repress E-cadherin in hypoxia: insights into cellular transformation processes mediated by HIF-1. *J. Biol. Chem.* 285, 6658–6669. doi: 10.1074/jbc.M109.042424.
- Schley, G., Klanke, B., Kurtz, A., Amann, K., Wiesener, M. S., Rosen, S., et al. (2004). Hypoxia-Inducible Transcription Factors Stabilization in the Thick Ascending Limb Protects against Ischemic Acute Kidney Injury. *J Am Soc Nephrol*, 12.
- Schor-Bardach, R., Alsop, D. C., Pedrosa, I., Solazzo, S. A., Wang, X., Marquis, R. P., et al. (2009). Does Arterial Spin-labeling MR Imaging–measured Tumor Perfusion Correlate with Renal Cell Cancer Response to Antiangiogenic Therapy in a Mouse Model? *Radiology* 251, 731–742. doi: 10.1148/radiol.2521081059.
- Schraml, P., Struckmann, K., Hatz, F., Sonnet, S., Kully, C., Gasser, T., et al. (2002). VHL mutations and their correlation with tumour cell proliferation, microvessel density, and patient prognosis in clear cell renal cell carcinoma. *J. Pathol.* 196, 186–193. doi: 10.1002/path.1034.
- Shin, Y., Han, S., Jeon, J. S., Yamamoto, K., Zervantonakis, I. K., Sudo, R., et al. (2012). Microfluidic assay for simultaneous culture of multiple cell types on surfaces or within hydrogels. *Nat Protoc* 7, 1247–1259. doi: 10.1038/nprot.2012.051.
- Sidani, M., Wyckoff, J., Xue, C., Segall, J. E., and Condeelis, J. (2006). Probing the Microenvironment of Mammary Tumors Using Multiphoton Microscopy. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 11, 151–163. doi: 10.1007/s10911-006-9021-5.
- Silvestri, V. L., Henriët, E., Linville, R. M., Wong, A. D., Searson, P. C., and Ewald, A. J. (2020). A Tissue-Engineered 3D Microvessel Model Reveals the Dynamics of Mosaic Vessel Formation in Breast Cancer. *Cancer Res* 80, 4288–4301. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-19-1564.
- Simi, A. K., Pang, M.-F., and Nelson, C. M. (2018). “Extracellular Matrix Stiffness Exists in a Feedback Loop that Drives Tumor Progression,” in *Biomechanics in Oncology Advances in Experimental Medicine and Biology.*, eds. C. Dong, N. Zahir, and K. Konstantopoulos (Cham: Springer International Publishing), 57–67. doi: 10.1007/978-3-319-95294-9_4.
- Simons, M., Alitalo, K., Annex, B. H., Augustin, H. G., Beam, C., Berk, B. C., et al. (2015). State-of-the-Art Methods for Evaluation of Angiogenesis and Tissue Vascularization: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circ Res* 116. doi: 10.1161/RES.0000000000000054.
- Sinha, R., Winer, A. G., Chevinsky, M., Jakubowski, C., Chen, Y.-B., Dong, Y., et al. (2017). Analysis of renal cancer cell lines from two major resources enables genomics-guided cell line selection. *Nat Commun* 8, 15165. doi: 10.1038/ncomms15165.
- Sobrinho, A., Phan, D. T. T., Datta, R., Wang, X., Hachey, S. J., Romero-López, M., et al. (2016a). 3D microtumors *in vitro* supported by perfused vascular networks. *Sci Rep* 6, 31589. doi: 10.1038/srep31589.
- Sobrinho, A., Phan, D. T. T., Datta, R., Wang, X., Hachey, S. J., Romero-López, M., et al. (2016b). 3D microtumors *in vitro* supported by perfused vascular networks. *Sci Rep* 6, 31589. doi: 10.1038/srep31589.
- Sökeland, G., and Schumacher, U. (2019). The functional role of integrins during intra- and extravasation within the metastatic cascade. *Mol Cancer* 18, 12. doi: 10.1186/s12943-018-0937-3.

Références bibliographiques

- Song, H.-H. G., Park, K. M., and Gerecht, S. (2014). Hydrogels to model 3D *in vitro* microenvironment of tumor vascularization. *Advanced Drug Delivery Reviews* 79–80, 19–29. doi: 10.1016/j.addr.2014.06.002.
- Song, Y., Fu, Y., Xie, Q., Zhu, B., Wang, J., & Zhang, B. (2020). Anti-angiogenic agents in combination with immune checkpoint inhibitors: a promising strategy for cancer treatment. *Frontiers in immunology*, 11, 1956.
- Sorushanova, A., Delgado, L. M., Wu, Z., Shologu, N., Kshirsagar, A., Raghunath, R., et al. (2019). The Collagen Suprafamily: From Biosynthesis to Advanced Biomaterial Development. *Adv. Mater.* 31, 1801651. doi: 10.1002/adma.201801651.
- Sternberg, C. N., Davis, I. D., Mardiak, J., Szczylik, C., Lee, E., Wagstaff, J., et al. (2010). Pazopanib in Locally Advanced or Metastatic Renal Cell Carcinoma: Results of a Randomized Phase III Trial. *JCO* 28, 1061–1068. doi: 10.1200/JCO.2009.23.9764.
- Storm, C., Pastore, J. J., MacKintosh, F. C., Lubensky, T. C., and Janmey, P. A. (2005). Nonlinear elasticity in biological gels. *Nature* 435, 191–194. doi: 10.1038/nature03521.
- Straussman, R., Morikawa, T., Shee, K., Barzily-Rokni, M., Qian, Z. R., Du, J., et al. (2012). Tumour micro-environment elicits innate resistance to RAF inhibitors through HGF secretion. *Nature* 487, 500–504. doi: 10.1038/nature11183.
- Strilić, B., Kučera, T., Eglinger, J., Hughes, M. R., McNagny, K. M., Tsukita, S., et al. (2009). The Molecular Basis of Vascular Lumen Formation in the Developing Mouse Aorta. *Developmental Cell* 17, 505–515. doi: 10.1016/j.devcel.2009.08.011.
- Struckmann, K., Mertz, K. D., Steu, S., Storz, M., Staller, P., Krek, W., ... & Moch, H. (2008). pVHL co-ordinately regulates CXCR4/CXCL12 and MMP2/MMP9 expression in human clear-cell renal cell carcinoma. *The Journal of pathology*, 214(4), 464-471.
- Su, C., Lv, Y., Lu, W., Yu, Z., Ye, Y., Guo, B., et al. (2021). Single-Cell RNA Sequencing in Multiple Pathologic Types of Renal Cell Carcinoma Revealed Novel Potential Tumor-Specific Markers. *Front. Oncol.* 11, 719564. doi: 10.3389/fonc.2021.719564.
- Suarez-Carmona, M., Bourcy, M., Lesage, J., Leroi, N., Syne, L., Blacher, S., et al. (2015). Soluble factors regulated by epithelial-mesenchymal transition mediate tumour angiogenesis and myeloid cell recruitment: EMT-regulated angiogenesis and myeloid cell recruitment. *J. Pathol.* 236, 491–504. doi: 10.1002/path.4546.
- Sun, Y.-X., Fang, M., Wang, J., Cooper, C. R., Pienta, K. J., and Taichman, R. S. (2007). Expression and activation of $\alpha v\beta 3$ integrins by SDF-1/CXC12 increases the aggressiveness of prostate cancer cells. *Prostate* 67, 61–73. doi: 10.1002/pros.20500.
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., et al. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA A Cancer J Clin* 71, 209–249. doi: 10.3322/caac.21660.
- Szot, C. S., Buchanan, C. F., Freeman, J. W., and Rylander, M. N. (2011). 3D *in vitro* bioengineered tumors based on collagen I hydrogels. *Biomaterials* 32, 7905–7912. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.07.001.
- Szymborska, A., and Gerhardt, H. (2018). Hold Me, but Not Too Tight—Endothelial Cell–Cell Junctions in Angiogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 10, a029223. doi: 10.1101/cshperspect.a029223.
- Tape, C. J., Ling, S., Dimitriadi, M., McMahon, K. M., Worboys, J. D., Leong, H. S., et al. (2016). Oncogenic KRAS Regulates Tumor Cell Signaling via Stromal Reciprocation. *Cell* 165, 910–920. doi: 10.1016/j.cell.2016.03.029.
- Tate, J. G., Bamford, S., Jubb, H. C., Sondka, Z., Beare, D. M., Bindal, N., et al. (2019). COSMIC: the Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer. *Nucleic Acids Research* 47, D941–D947. doi: 10.1093/nar/gky1015.

Références bibliographiques

- Tatla, A. S., Justin, A. W., Watts, C., and Markaki, A. E. (2021). A vascularized tumoroid model for human glioblastoma angiogenesis. *Sci Rep* 11, 19550. doi: 10.1038/s41598-021-98911-y.
- Taubenberger, A. V., Bray, L. J., Haller, B., Shaposhnykov, A., Binner, M., Freudenberg, U., et al. (2016a). 3D extracellular matrix interactions modulate tumour cell growth, invasion and angiogenesis in engineered tumour microenvironments. *Acta Biomaterialia* 36, 73–85. doi: 10.1016/j.actbio.2016.03.017.
- Taubenberger, A. V., Bray, L. J., Haller, B., Shaposhnykov, A., Binner, M., Freudenberg, U., et al. (2016b). 3D extracellular matrix interactions modulate tumour cell growth, invasion and angiogenesis in engineered tumour microenvironments. *Acta Biomaterialia* 36, 73–85. doi: 10.1016/j.actbio.2016.03.017.
- Terman, B. I., Khandke, L., Dougher-Vermazan, M., Maglione, D., Lassam, N. J., Gospodarowicz, D., et al. (1994). VEGF Receptor Subtypes KDR and FLT1 Show Different Sensitivities to Heparin and Placenta Growth Factor. *Growth Factors* 11, 187–195. doi: 10.3109/08977199409046916.
- Thiery, J. P. (2002). Epithelial–mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2, 442–454. doi: 10.1038/nrc822.
- Thyboll, J., Kortessmaa, J., Cao, R., Soininen, R., Wang, L., Iivanainen, A., et al. (2002). Deletion of the Laminin α_4 Chain Leads to Impaired Microvessel Maturation. *MOL. CELL. BIOL.* 22, 9.
- Tian, C., Clauser, K. R., Öhlund, D., Rickelt, S., Huang, Y., Gupta, M., et al. (2019). Proteomic analyses of ECM during pancreatic ductal adenocarcinoma progression reveal different contributions by tumor and stromal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 116, 19609–19618. doi: 10.1073/pnas.1908626116.
- Timpl, R., Wiedemann, H., Delden, V., Furthmayr, H., and Kuhn, K. (1981). A Network Model for the Organization of Type IV Collagen Molecules in Basement Membranes. *Eur J Biochem* 120, 203–211. doi: 10.1111/j.1432-1033.1981.tb05690.x.
- Torres-Vazquez, J., Kamei, M., and Weinstein, B. M. (2003). Molecular distinction between arteries and veins. *Cell and Tissue Research* 314, 43–59. doi: 10.1007/s00441-003-0771-8.
- Trappmann, B., Baker, B. M., Polacheck, W. J., Choi, C. K., Burdick, J. A., and Chen, C. S. (2017). Matrix degradability controls multicellularity of 3D cell migration. *Nat Commun* 8, 371. doi: 10.1038/s41467-017-00418-6.
- Turajlic, S., Xu, H., Litchfield, K., Rowan, A., Horswell, S., Chambers, T., et al. (2018). Deterministic Evolutionary Trajectories Influence Primary Tumor Growth: TRACERx Renal. *Cell* 173, 595-610.e11. doi: 10.1016/j.cell.2018.03.043.
- Ulrich, T. A., de Juan Pardo, E. M., and Kumar, S. (2009). The Mechanical Rigidity of the Extracellular Matrix Regulates the Structure, Motility, and Proliferation of Glioma Cells. *Cancer Research* 69, 4167–4174. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-4859.
- Umana-Diaz, C., Pichol-Thievend, C., Marchand, M. F., Atlas, Y., Salza, R., Malbouyres, M., et al. (2020). Scavenger Receptor Cysteine-Rich domains of Lysyl Oxidase-Like2 regulate endothelial ECM and angiogenesis through non-catalytic scaffolding mechanisms. *Matrix Biology* 88, 33–52. doi: 10.1016/j.matbio.2019.11.003.
- Vallet, S. D., Berthollier, C., Salza, R., Muller, L., and Ricard-Blum, S. (2020). The Interactome of Cancer-Related Lysyl Oxidase and Lysyl Oxidase-Like Proteins. *Cancers* 13, 71. doi: 10.3390/cancers13010071.
- van Helvert, S., Storm, C., and Friedl, P. (2018). Mechanoreciprocity in cell migration. *Nat Cell Biol* 20, 8–20. doi: 10.1038/s41556-017-0012-0.
- van Hinsbergh, V. W. M., and Koolwijk, P. (2008). Endothelial sprouting and angiogenesis: matrix metalloproteinases in the lead. *Cardiovascular Research* 78, 203–212. doi: 10.1093/cvr/cvm102.

Références bibliographiques

- Van Obberghen-Schilling, E., Tucker, R. P., Saupe, F., Gasser, I., Cseh, B., and Orend, G. (2011). Fibronectin and tenascin-C: accomplices in vascular morphogenesis during development and tumor growth. *Int. J. Dev. Biol.* 55, 511–525. doi: 10.1387/ijdb.103243eo.
- Vano, Y.-A., Ladoire, S., Elaidi, R., Dermeche, S., Eymard, J.-C., Falkowski, S., et al. (2021). First-Line Treatment of Metastatic Clear Cell Renal Cell Carcinoma: What Are the Most Appropriate Combination Therapies? *Cancers* 13, 5548. doi: 10.3390/cancers13215548.
- Varna, M., Gapihan, G., Feugeas, J.-P., Ratajczak, P., Tan, S., Ferreira, I., et al. (2015). Stem Cells Increase in Numbers in Perinecrotic Areas in Human Renal Cancer. *Clinical Cancer Research* 21, 916–924. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-0666.
- Verine, J., Pluvinaud, A., Bousquet, G., Lehmann-Che, J., de Bazelaire, C., Soufir, N., et al. (2010). Hereditary Renal Cancer Syndromes: An Update of a Systematic Review. *European Urology* 58, 701–710. doi: 10.1016/j.eururo.2010.08.031.
- Vernon, R., Angello, J., Iruela-Arispe, L., Lane, T., and Sage, H. (1992). Reorganization of Basement Membrane Matrices by Cellular Traction Promotes the Formation of Cellular Networks *in vitro*.
- Vilchez Mercedes, S. A., Bocci, F., Levine, H., Onuchic, J. N., Jolly, M. K., and Wong, P. K. (2021). Decoding leader cells in collective cancer invasion. *Nat Rev Cancer* 21, 592–604. doi: 10.1038/s41568-021-00376-8.
- Vimalraj, S., Saravanan, S., Anuradha, D., and Chatterjee, S. (2019). Models to investigate intussusceptive angiogenesis: A special note on CRISPR/Cas9 based system in zebrafish. *International Journal of Biological Macromolecules* 123, 1229–1240. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.11.164.
- Waghray, M., Yalamanchili, M., Dziubinski, M., Zeinali, M., Erkinen, M., Yang, H., et al. (2016). GM-CSF Mediates Mesenchymal–Epithelial Cross-talk in Pancreatic Cancer. *Cancer Discov* 6, 886–899. doi: 10.1158/2159-8290.CD-15-0947.
- Wang, J., Wang, C., Xu, P., Li, X., Lu, Y., Jin, D., et al. (2021). PRMT1 is a novel molecular therapeutic target for clear cell renal cell carcinoma. *Theranostics* 11, 5387–5403. doi: 10.7150/thno.42345.
- Wang, N., Liu, W., Zheng, Y., Wang, S., Yang, B., Li, M., et al. (2018). CXCL1 derived from tumor-associated macrophages promotes breast cancer metastasis via activating NF- κ B/SOX4 signaling. *Cell Death Dis* 9, 880. doi: 10.1038/s41419-018-0876-3.
- Wang, X., Phan, D. T. T., George, S. C., Hughes, C. C. W., and Lee, A. P. (2017). “3D Anastomosed Microvascular Network Model with Living Capillary Networks and Endothelial Cell-Lined Microfluidic Channels,” in *3D Cell Culture Methods in Molecular Biology.*, ed. Z. Koledova (New York, NY: Springer New York), 325–344. doi: 10.1007/978-1-4939-7021-6_24.
- Wei, S. C., Fattet, L., Tsai, J. H., Guo, Y., Pai, V. H., Majeski, H. E., et al. (2015). Matrix stiffness drives epithelial–mesenchymal transition and tumour metastasis through a TWIST1–G3BP2 mechanotransduction pathway. *Nat Cell Biol* 17, 678–688. doi: 10.1038/ncb3157.
- Welti, J. C., Gourlaouen, M., Powles, T., Kudahetti, S. C., Wilson, P., Berney, D. M., et al. (2011). Fibroblast growth factor 2 regulates endothelial cell sensitivity to sunitinib. *Oncogene* 30, 1183–1193. doi: 10.1038/onc.2010.503.
- Williams, E. D., Gao, D., Redfern, A., and Thompson, E. W. (2019). Controversies around epithelial–mesenchymal plasticity in cancer metastasis. *Nat Rev Cancer* 19, 716–732. doi: 10.1038/s41568-019-0213-x.
- Winkler, J., Abisoye-Ogunniyan, A., Metcalf, K. J., and Werb, Z. (2020). Concepts of extracellular matrix remodelling in tumour progression and metastasis. *Nat Commun* 11, 5120. doi: 10.1038/s41467-020-18794-x.

Références bibliographiques

- Wolf, K., te Lindert, M., Krause, M., Alexander, S., te Riet, J., Willis, A. L., et al. (2013). Physical limits of cell migration: Control by ECM space and nuclear deformation and tuning by proteolysis and traction force. *Journal of Cell Biology* 201, 1069–1084. doi: 10.1083/jcb.201210152.
- Wolf, M. M., Kimryn Rathmell, W., and Beckermann, K. E. (2020). Modeling clear cell renal cell carcinoma and therapeutic implications. *Oncogene*. doi: 10.1038/s41388-020-1234-3.
- Wu, J., Li, Z., Wang, H., Yu, X., Pang, X., Wu, J., et al. (2019). Cathepsin B defines leader cells during the collective invasion of salivary adenoid cystic carcinoma. *Int J Oncol*. doi: 10.3892/ijo.2019.4722.
- Wyckoff, R. W. G., Corey, R. B., and Biscoe, J. (1935). X-Ray Reflections of Long Spacing from Tendon. *Science* 82, 175–176. doi: 10.1126/science.82.2121.175.
- Wykoff, C. C., Pugh, C. W., Maxwell, P. H., Harris, A. L., & Ratcliffe, P. J. (2000). Identification of novel hypoxia dependent and independent target genes of the von Hippel-Lindau (VHL) tumour suppressor by mRNA differential expression profiling. *Oncogene*, 19(54), 6297-6305.
- Yamada, K. M., and Sixt, M. (2019). Mechanisms of 3D cell migration. *Nat Rev Mol Cell Biol* 20, 738–752. doi: 10.1038/s41580-019-0172-9.
- Yamauchi, M., Barker, T. H., Gibbons, D. L., and Kurie, J. M. (2018). The fibrotic tumor stroma. *J. Clin. Invest.* 128, 16–25. doi: 10.1172/JCI93554.
- Yang, J. C., Hughes, M., Kammula, U., Royal, R., Sherry, R. M., Topalian, S. L., et al. (2007). Ipilimumab (Anti-CTLA4 Antibody) Causes Regression of Metastatic Renal Cell Cancer Associated With Enteritis and Hypophysitis. *Journal of Immunotherapy* 30, 825–830. doi: 10.1097/CJI.0b013e318156e47e.
- Yao, X., Qian, C.-N., Zhang, Z.-F., Tan, M.-H., Kort, E. J., Yang, X. J., et al. (2007). Two Distinct Types of Blood Vessels in Clear Cell Renal Cell Carcinoma Have Contrasting Prognostic Implications. *Clin Cancer Res* 13, 161–169. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-0774.
- Yin, C., Evason, K. J., Asahina, K., and Stainier, D. Y. R. (2013). Hepatic stellate cells in liver development, regeneration, and cancer. *J. Clin. Invest.* 123, 1902–1910. doi: 10.1172/JCI66369.
- Yoshino, S., Kato, M., and Okada, K. (1995). PROGNOSTIC SIGNIFICANCE OF MICROVESSEL COUNT IN LOW STAGE RENAL CELL CARCINOMA. *Int J Urol* 2, 156–160. doi: 10.1111/j.1442-2042.1995.tb00445.x.
- Young, M. D., Mitchell, T. J., Vieira Braga, F. A., Tran, M. G. B., Stewart, B. J., Ferdinand, J. R., et al. (2018). Single- cell transcriptomes from human kidneys reveal the cellular identity of renal tumors. *Science* 361, 594–599. doi: 10.1126/science.aat1699.
- Yu, M., Bardia, A., Wittner, B. S., Stott, S. L., Smas, M. E., Ting, D. T., et al. (2013). Circulating Breast Tumor Cells Exhibit Dynamic Changes in Epithelial and Mesenchymal Composition. *Science* 339, 580–584. doi: 10.1126/science.1228522.
- Zarrabi, K., and Wu, S. (2018). Current and Emerging Therapeutic Targets for Metastatic Renal Cell Carcinoma. *Curr Oncol Rep* 20, 41. doi: 10.1007/s11912-018-0684-z.
- Zatyka, M., da Silva, N. F., Clifford, S. C., Morris, M. R., Wiesener, M. S., Eckardt, K. U., ... & Maher, E. R. (2002). Identification of cyclin D1 and other novel targets for the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene by expression array analysis and investigation of cyclin D1 genotype as a modifier in von Hippel-Lindau disease. *Cancer research*, 62(13), 3803-3811.
- Zeisberg, E. M., Potenta, S., Xie, L., Zeisberg, M., and Kalluri, R. (2007). Discovery of Endothelial to Mesenchymal Transition as a Source for Carcinoma-Associated Fibroblasts. *Cancer Res* 67, 10123–10128. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-3127.

Références bibliographiques

Zhang, T., Niu, X., Liao, L., Cho, E.-A., and Yang, H. (2013). The Contributions of HIF-Target Genes to Tumor Growth in RCC. *PLoS ONE* 8, e80544. doi: 10.1371/journal.pone.0080544.

Zhang, Y., Narayanan, S. P., Mannan, R., Raskind, G., Wang, X., Vats, P., et al. (2021). Single-cell analyses of renal cell cancers reveal insights into tumor microenvironment, cell of origin, and therapy response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 118, e2103240118. doi: 10.1073/pnas.2103240118.

Zhao, Y., Tang, K., Tianbao, X., Wang, J., Yang, J., and Li, D. (2017). Increased serum lysyl oxidase-like 2 levels correlate with the degree of left atrial fibrosis in patients with atrial fibrillation. *Biosci. Rep.* 37. doi: 10.1042/BSR20171332.

Zovein, A. C., Luque, A., Turlo, K. A., Hofmann, J. J., Yee, K. M., Becker, M. S., et al. (2010). β 1 Integrin Establishes Endothelial Cell Polarity and Arteriolar Lumen Formation via a Par3-Dependent Mechanism. *Developmental Cell* 18, 39–51. doi: 10.1016/j.devcel.2009.12.006.

Annexes

- I. Annexe 1 : Synthèse bibliographique des principaux marqueurs de l'EMT exprimés par 3 lignées cellulaires du ccRCC (RCC4, 786-O et UMRC2) en fonction du statut VHL

Lignées cellulaires du ccRCC	Protéines régulées	Familles de protéines	Références bibliographiques
RCC4/RCC4-VHL	Migration individuelle: Augmentation	Comportement cellulaire	<i>Maru et al., 2013</i>
	E-cadherin: Diminution de l'expression	Protéines des jonctions adhérentes	<i>Esteban et al., 2006 ; Maru et al., 2013 ; Evans et al., 2007</i>
	b-catenin: Défaut de localisation au niveau des jonctions		<i>Calzada et al., 2006</i>
	ZO-1: Défaut de localisation au niveau des jonctions et diminution de l'expression	Protéines des jonctions serrées	<i>Calzada et al., 2006 ; Maru et al., 2013</i>
	Snail: Augmentation de l'expression	Facteurs de transcription clefs de l'EMT	<i>Evans et al., 2007</i>
	SIP1: Augmentation de l'expression		
	Cyclin D1: Augmentation de l'expression	Protéine régulatrice du cycle cellulaire	<i>Zatyka et al., 2002</i>
	Integrin a5: Augmentation de l'expression	Protéines d'adhésion	<i>Wykoff et al., 2000</i>
	TG2: Augmentation de l'expression	Enzymes de régulation de la MEC	
	Collagen Ia1: Augmentation de l'expression	Protéines de la MEC	
	Collagen Va1: Augmentation de l'expression		
Morphologie: Perte d'une morphologie épithéliale pour une morphologie mésenchymateuse	Comportement cellulaire		
RCC10/RCC10-VHL	E-cadherin: Diminution de l'expression	Protéines des jonctions adhérentes	<i>Esteban et al., 2006 ; Schietke et al., 2010</i>
	b-catenin: Défaut de localisation au niveau des jonctions	Protéines des jonctions serrées	<i>Calzada et al., 2006</i>
	ZO-1: Défaut de localisation au niveau des jonctions et diminution de l'expression		<i>Calzada et al., 2006 ; Schietke et al., 2010</i>
	LOX: Augmentation de l'expression	Enzyme de régulation de la MEC	<i>Schietke et al., 2010</i>
	LOXL2: Augmentation de l'expression		<i>Schietke et al., 2010</i>
	Fibronectine: Défaut d'assemblage dans la MEC	Protéines de la MEC	<i>Feijóo-Cuaresma et al., 2008</i>
	786-O/786-O-VHL	Migration individuelle: Augmentation	Comportement cellulaire
E-cadherin: Diminution de l'expression		Protéines des jonctions adhérentes	<i>Evans et al., 2007</i>
b-catenin: Augmentation de l'expression			<i>Castaneda et al., 2017</i>
ZO-1: Défaut de localisation au niveau des jonctions et diminution de l'expression		Protéines des jonctions serrées	<i>Calzada et al., 2006 ; Maru et al., 2013</i>
Snail: Augmentation de l'expression		Facteurs de transcription clefs de l'EMT	<i>Evans et al., 2007</i>
SIP1: Augmentation de l'expression			
MMP2: Augmentation de l'expression		Métalloprotéinase	<i>Struckmann et al., 2007</i>
MMP9: Augmentation de l'expression			
Integrin a5: Augmentation de l'expression		Protéines d'adhésion	<i>Wykoff et al., 2000</i>
TG2: Augmentation de l'expression		Enzymes de régulation de la MEC	
Collagen Ia1: Augmentation de l'expression		Protéines de la MEC	
Collagen Va1: Augmentation de l'expression			

II. Annexe 2 : Revue « Brassard-Jollive et al., 2020 »



In vitro 3D Systems to Model Tumor Angiogenesis and Interactions With Stromal Cells

Noémie Brassard-Jollive^{1,2}, Catherine Monnot¹, Laurent Muller¹ and Stéphane Germain^{1*}

¹ Center for Interdisciplinary Research in Biology, College de France, CNRS UMR 7241, INSERM U1050, PSL Research University, Paris, France, ² Sorbonne Université, Collège Doctoral, Paris, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Lucas Treps,
VIB KU Leuven Center for Cancer
Biology, Belgium

Reviewed by:

Enrique Boccardo,
University of São Paulo, Brazil
Ana Paula Lepique,
University of São Paulo, Brazil

*Correspondence:

Stéphane Germain
stephane.germain@college-de-
france.fr

Specialty section:

This article was submitted to
Molecular and Cellular Oncology,
a section of the
journal *Frontiers in Cell and
Developmental
Biology*

Received: 14 August 2020

Accepted: 05 October 2020

Published: 05 November 2020

Citation:

Brassard-Jollive N, Monnot C,
Muller L and Germain S (2020) *In vitro*
3D Systems to Model Tumor
Angiogenesis and Interactions With
Stromal Cells.

Front. Cell Dev. Biol. 8:594903.

doi:

10.3389/fcell.2020.594903

In vitro 3D culture systems provide promising tools for screening novel therapies and understanding drug resistance mechanisms in cancer because they are adapted for high throughput analysis. One of the main current challenges is to reproducibly culture patient samples containing cancer and stromal cells to faithfully recapitulate tumor microenvironment and move toward efficient personalized medicine. Tumors are composed of heterogeneous cell populations and characterized by chaotic vascularization in a remodeled microenvironment. Indeed, tumor angiogenesis occurs in a complex stroma containing immune cells and cancer-associated fibroblasts that secrete important amounts of cytokines, growth factors, extracellular vesicles, and extracellular matrix (ECM). This process leads to the formation of inflated, tortuous, and permeable capillaries that display deficient basement membrane (BM) and perivascular coverage. These abnormal capillaries affect responses to anti-cancer therapies such as anti-angiogenic, radio-, and immunotherapies. Current pre-clinical models are limited for investigating interactions between tumor cells and vascularization during tumor progression as well as mechanisms that lead to drug resistance. *In vitro* approaches developed for vascularization are either the result of engineered cell lining or based on physiological processes including vasculogenesis and sprouting angiogenesis. They allow investigation of paracrine and direct interactions between endothelial and tumor and/or stromal cells, as well as impact of biochemical and biophysical cues of the microenvironment, using either natural matrix components or functionalized synthetic hydrogels. In addition, microfluidic devices provide access to modeling the impact of shear stress and interstitial flow and growth factor gradients. In this review, we will describe the state of the art co-culture models of vascularized microtumors in order to study tumor progression and metastatic dissemination including intravasation and/or extravasation processes.

Keywords: 3D micro-tumors, microfluidic, angiogenesis, tumor microenvironment, tumor–stromal cell interactions, personalized medicine

INTRODUCTION

Angiogenesis in the Tumor Microenvironment, a Multidimensional Process

Understanding the mechanisms that govern tumor initiation, development, and response to therapy is one of the most obvious and challenging tasks in our quest to fight cancer. Every cancer originates from a single cell but tumors rapidly progress as heterogeneous populations of cells, since single cells acquire genetic and phenotypic differences from each other during expansion of the neoplastic cell population. In addition, oncogenes and tumor suppressor genes tend to show strong context specificity that depends on the tumor type, the cell-of-origin, and the environmental factors (Schneider et al., 2017). The desmoplastic reaction of the stroma, consisting of basement membrane (BM), extracellular matrix (ECM), fibroblasts, immune cells, and vasculature, can distinguish some tumor entities from other tumor types, such as sarcomas, even if they are driven by the same oncogene (Tomlinson et al., 1999). These distinct cell types establish complex dialogs that comprise both homotypic and heterotypic interactions. In addition, these cells secrete growth factors and cytokines, synthesize, and remodel a complex ECM that exerts physical constraints. These biochemical and mechanical signals are major components of a specific tumor microenvironment that profoundly affects tumor progression by modulating tumor cell proliferation but also by inducing angiogenesis aimed at providing oxygen and nutrients. Indeed, solid tumors depend on angiogenesis for growth and metastasis and numerous efforts have therefore been undertaken in the last decades to develop tools that target angiogenesis, some of which have been clinically developed. Nevertheless, these drugs often lack associated biomarkers of response and efficacy and might also be associated with acquisition of drug resistance and therapeutic failure in a long-term perspective. Therefore, reconstituting such a complex process as cancer and tumor angiogenesis *in vitro* is still rather technically challenging and represents an unmet medical need that must be addressed.

Current Angiogenesis Models and Their Limitations

Basement membrane extracts from Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) mouse tumor cells, such as MatrigelTM, have been extensively used for the so-called “tube formation assay” in order to investigate angiogenesis (Arnaoutova et al., 2009). This easy-to-perform assay is the most widely used *in vitro* angiogenesis assay. It should, however, be understood that the tube-like or capillary-like *in vitro* assays using endothelial cells (EC) plated on top of BM extract are not considered as actual angiogenesis models by the community since neither their structure nor the mechanisms of their formation are physiologically relevant (Simons et al., 2015; Nowak-Sliwinska et al., 2018). Furthermore, many mesenchymal cell types, including fibroblasts and smooth muscle cells, also organize in networks in response to the matrix alignment generated by tension forces of cellular traction (Vernon et al., 1992). These assays are commercially successful

but nevertheless insufficient to address the complexity of tumor angiogenesis and only made it more important to develop relevant 3D models. Whereas more advanced *in vivo* and *in vitro* models aimed at mimicking tumor angiogenesis have led to the discovery of novel therapies, most of these have nevertheless failed in clinical trials, thus shedding light on the numerous limitations of current pre-clinical models. Angiogenesis actually undergoes multiple discrete steps that can be individually evaluated and quantified by a large number of bioassays that have been reviewed elsewhere (Nowak-Sliwinska et al., 2018). In this review, we will focus on integrated assays aimed at properly reproducing the morphogenetic events of the formation of new capillaries.

IN VITRO 3D SYSTEMS TO MODEL TUMOR AND STROMAL CELL INTERACTIONS WITH CAPILLARIES

Diversification of *in vitro* 3D culture methods including culture supports, cells, imaging, and quantification has led to a great diversity of models. Here, we will survey the existing 3D models and highlight those that are urgently needed in order to fill the gap between 2D models and animal models of human disease, and that could help the research community to address the high attrition rates in drug development and to fulfill the transition toward personalized medicine.

Relevant *in vitro* models of capillary formation recapitulate many of the steps of angiogenesis, including EC migration and proliferation, lumen formation, branching, and anastomosis (Nakatsu et al., 2003; Nakatsu and Hughes, 2008). Indeed, angiogenesis- and vasculogenesis-based methods allow the formation of functional capillaries displaying adherens and tight junctions containing VE-cadherin/*b*-catenin complexes and Zonula occludens-1 (ZO-1), respectively, as well as accurate apical-basal polarity characterized by the abluminal deposition of BM components including laminin and collagen IV (Nowak-Sliwinska et al., 2018; Marchand et al., 2019).

3D Assays of Capillary Formation Endothelial Cells

The use of EC cultures for engineering capillaries remains an experimental challenge. The most commonly used cells are human umbilical EC (HUVEC) (Nowak-Sliwinska et al., 2018). Other primary sources of human EC are aortic or microvascular EC derived from various tissues, most frequently from skin, defined as human dermal microvascular EC (HDMEC). Endothelial progenitor cells (EPC) harvested as endothelial colony-forming cells (ECFC) from cord blood can also be used, but those from adult peripheral blood exhibit limited proliferation potential (Ferratge et al., 2017). Recently, Palikuqi et al. (2020) reported “reset” vascular EC that transiently express ETS variant transcription factor 2 (ETV2) and that self-assemble into vascular networks and arborized cancerous human colon organoids. Quite remarkably, only cells from human origin are used in relevant 3D models; while isolation and culture of mouse EC have been developed for years now, their ability to form

capillaries has proven to be more challenging (Nowak-Sliwinska et al., 2018). As example, mouse EC from the spleen stroma were used to explore the tumor-EC crosstalk in a 3D scaffold (Furlan et al., 2018). These cells were organized in elongated tubule-like structures but barely formed capillaries. Furthermore, neither human nor murine tumor EC have been reported to generate capillaries in 3D models, whether co-cultured with tumor cells or not.

Sprouting Angiogenesis- and Vasculogenesis-Based Assays

Two capillary morphogenesis models performed in 3D recapitulate sprouting angiogenesis and vasculogenesis processes. The bead and spheroid assays are relevant 3D models for investigating the mechanisms of sprouting angiogenesis (Nakatsu et al., 2003; Heiss et al., 2015). In the first assay, EC are seeded on polysaccharide beads before embedding in hydrogel and co-culture with fibroblasts to promote sprouting and formation of lumen-containing capillaries within a few days (Nowak-Sliwinska et al., 2018). These capillaries are led by tip cells, while their stalk cells are polarized and deposit BM. In the second assay, EC spheroids are embedded in a hydrogel that supports the formation of lumenized capillary-like structures where tip cells precede the elongation of individual sprouts originating from single spheroids (Heiss et al., 2015). These 3D models have been used for investigating the involvement of enzymes that remodel the microenvironment (Beckouche et al., 2015; Umana-Diaz et al., 2020) and factors secreted by tumor or stromal cells at several steps of sprouting angiogenesis (Welti et al., 2011; Ramer et al., 2014; Hernandez-Fernaud et al., 2017)

(**Figure 1**). The impact of anti-angiogenic drugs is also increasingly explored using these models (Welti et al., 2011; Ramer et al., 2014;

Heiss et al., 2015).

Vasculogenesis occurs via EC properties of self-assembling into a 3D vascular network. Single EC are seeded in collagen I hydrogels and cultured in presence of VEGF, FGF-2, or fibroblast-conditioned medium in order to allow formation of lumen-containing capillaries within 4–5 days (Nowak-Sliwinska et al., 2018). The 3D vasculogenesis assay is appropriate for studying interactions between tumor and EC and engineering vascularized micro-tumors (Chen et al., 2013, 2016; Kim et al., 2013; Bray et al., 2015; Jeon et al., 2015; Sobrino et al., 2016; Taubenberger et al., 2016). In addition, co-culture with stromal pericytes in the hydrogel recapitulates a key step of vascular morphogenesis consisting in their perivascular recruitment (Baudino, 2013). This assay is adapted to the study of tumor angiogenesis when isolated cancer cells or spheroids are co-embedded with sparse EC in the hydrogel. Interestingly, number and shape of capillaries can be tuned via modulating the density of the microenvironment, either in collagen or fibrin (see below, Ghajar et al., 2008).

Biochemical and Biophysical Properties of Tumor Microenvironment Controlled in the 3D Gels

For engineering tumor microenvironment, a variety of natural and synthetic materials have been used as 3D scaffolds

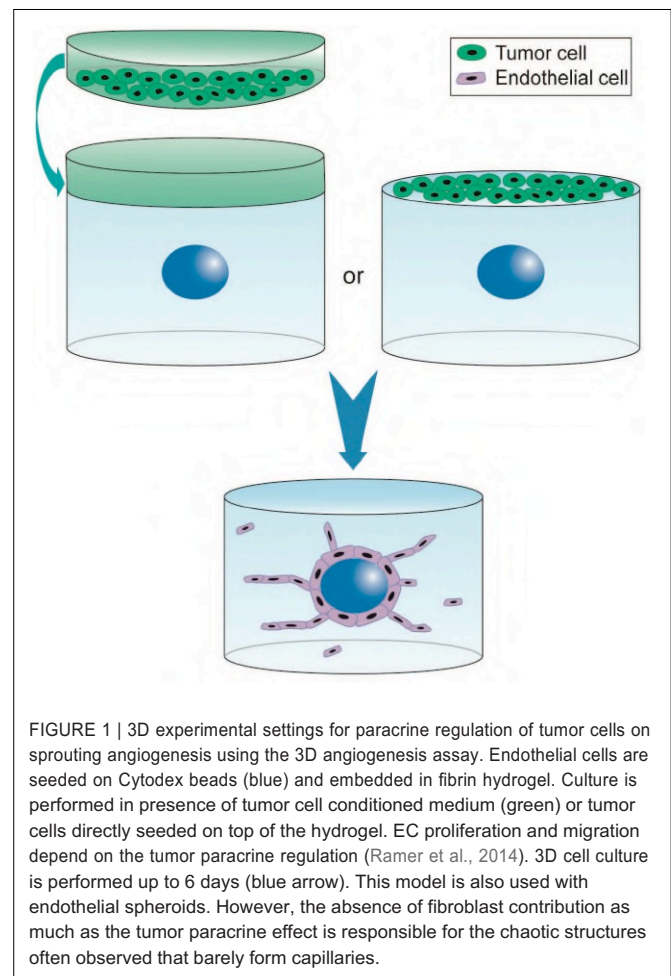


FIGURE 1 | 3D experimental settings for paracrine regulation of tumor cells on sprouting angiogenesis using the 3D angiogenesis assay. Endothelial cells are seeded on Cytodex beads (blue) and embedded in fibrin hydrogel. Culture is performed in presence of tumor cell conditioned medium (green) or tumor cells directly seeded on top of the hydrogel. EC proliferation and migration depend on the tumor paracrine regulation (Ramer et al., 2014). 3D cell culture is performed up to 6 days (blue arrow). This model is also used with endothelial spheroids. However, the absence of fibroblast contribution as much as the tumor paracrine effect is responsible for the chaotic structures often observed that barely form capillaries.

(Song et al., 2014). An important requirement for these scaffolds is their capacity to support simultaneously cancer cell proliferation/invasion and angiogenesis. Indeed, hydrogels have the ability to recapitulate many features of native ECM concerning their composition (either simple or composite), physical properties (stiffness, pore size, fiber length..), and biological functions (growth factors bioavailability, cell adhesion machinery..) (Li and Kumacheva, 2018). Modulation of these parameters does not only induce global changes of the 3D scaffold but also local modifications of the topology of cell microenvironment (Yamada and Sixt, 2019). Selection of the scaffold and associated culture medium is therefore a crucial step in engineering *in vitro* micro-tumors and their vasculature.

Natural Polymers for Hydrogels

Protein-based hydrogels consist in either purified single components of matrix proteins, including fibrin and collagen I or in crude extracts of natural matrices (Song et al., 2014; Li and Kumacheva, 2018).

Basement membrane extracts have been the most widely used biomaterial for many years, supporting growth for many tumor cell lines (Song et al., 2014). Assays combining 3D cultures of tumor spheroids overlaid with EC have thus also

been performed (Benton et al., 2015) but do not faithfully reproduce angiogenesis (see above). Furthermore, even when used for actual 3D culture of EC, Matrigel™ was demonstrated to induce formation of multicellular tubes that display an inversed luminal/abluminal polarization with deposition of BM components like laminin $\alpha 4$ in the lumen (Kuèera et al., 2009). Quite remarkably, using mixtures of Matrigel™ with natural polymers like fibrin turned out to noticeably improve capillary formation and resulted in efficient inosculation with the host vasculature and further blood perfusion after implantation in mice (Laib et al., 2009). Recently, Palikuqi et al. (2020) developed matrices made of mixture of laminin, entactin, and collagen IV that support vasculogenesis.

Polymerization of fibrin occurs from fibrinogen cleavage by thrombin and is controlled by calcium ions, temperature, and fibrinogen concentration. Fibrin hydrogels have been widely used for investigating angiogenesis in 3D settings since their nano/macro fibrous architecture mimics native ECM. They provide robust support for both sprouting angiogenesis (Nakatsu et al., 2003; Ghajar et al., 2006, 2008) and vasculogenesis (Rao et al., 2012). Ghajar et al. (2006) reported that fibrin hydrogel, at the concentration of 2.5 mg/ml, induces capillary network formation. Using a bead assay, the same authors further demonstrated that increasing fibrin density from 2.5 to 10 mg/ml leads to a decrease in capillary network formation. Soft fibrin gels of 90 Pa-stiffness corresponding to low density at 1 mg/ml were optimal for cancer cell proliferation and spheroid formation when compared to stiffer gels (Liu et al., 2012). These studies thus indicate that the fibrin hydrogel provides a relevant 3D scaffold for studying *in vitro* micro-tumors and their vasculature.

Collagen I, the major protein of the interstitial ECM (Blache and Ehrbar, 2017), is a biocompatible and biodegradable material that possesses the intrinsic capacity to self-assemble into hydrogels under physiological conditions (Sorushanova et al., 2019). Collagen gels can also be produced using multiple cross-linking methods resulting in fibrous architectures similar to those of native ECM. *In vitro* studies have demonstrated that collagen gel density and porosity are modulated by pH, temperature, and collagen concentration through modulation of fibrillogenesis, therefore offering ways to control structural properties (Doyle et al., 2015; Sapudom et al., 2015). Collagen hydrogels provide bioactive microenvironments supporting cellular processes, such as cell adhesion sites, proteolytic-degradable sites, and ECM crosslinking (Laib et al., 2009). Several *in vitro* studies have demonstrated that collagen hydrogels support capillary network formation using 3D vasculogenesis or EC spheroid assays (Heiss et al., 2015; Blache and Ehrbar, 2017). Collagen I also supports invasion and growth of numerous tumor cell lines (Jeong et al., 2016). MDA-MB 231 breast cancer cells cultured within collagen hydrogel formed spheroids displaying necrotic and hypoxic core (Szot et al., 2011; Song et al., 2014). Using collagen I of various origin (bovine dermal and rat tail), Wolf et al. (2013) demonstrated that matrix metalloproteinase (MMP)- independent migration of tumor cells into 3D hydrogel depends both on deformation of the nucleus and scaffold porosity in response to space constraints without any correlation with scaffold stiffness.

Natural materials have numerous limitations, though. They suffer from variability, either batch-to-batch or according to species or tissue differences as well as purification protocols. They provide limited control of ECM compound concentration and presence of degradation- or adhesion-sites. They thus fail to provide full control of both matrix density and stiffness (Song et al., 2014).

Synthetic Hydrogel Materials

Among the many synthetic biomaterials used for 3D cell culture (Blache and Ehrbar, 2017), polyethylene glycol-heparin (PEG) is one of the most commonly used for the development of micro-tumors (Bray et al., 2015; Chwalek et al., 2015; Roudsari et al., 2016; Taubenberger et al., 2016). PEG hydrogel aims to mimic the natural ECM and to offer control of its design and synthesis (Lutolf and Hubbell, 2005; Blache and Ehrbar, 2017). Scaffolds are generated using multi-armed PEG and heparin crosslinked via cytocompatible Michael-type addition that enables cell embedding in 3D (Chwalek et al., 2015). A major advantage of these synthetic scaffolds is the possibility to decouple mechanical and biochemical properties. Indeed, increasing PEG (or PEG-heparin) concentration allows to control mechanical properties over a broad range, while maintaining the heparin concentration constant. In addition, PEG can be functionalized for (i) reversible binding of multiple growth factors (VEGF, FGF-2, SDF-1), (ii) covalent conjugation of adhesion ligands (RGD motifs), or (iii) proteolytic sites (Kraehenbuehl et al., 2008; Bray et al., 2015; Chwalek et al., 2015; Blache et al., 2016; Taubenberger et al., 2016; Blache and Ehrbar, 2017). These PEG hydrogels support capillary network formation *in vitro*. Indeed, in several studies, co-culture of EC and mesenchymal cells leads to formation of capillaries displaying lumens, BM deposition (laminin and collagen IV), and perivascular localization of mesenchymal cells (Blache et al., 2016; Blache and Ehrbar, 2017). These vessels recapitulate many features of angiogenesis *in vitro* and are similar to those formed in natural hydrogels. Moreover, PEG hydrogels support 3D tumor spheroid formation and growth of a hepatocellular carcinoma (HCC) cell line (Liang et al., 2011) and of various others such as breast, prostate, and lung cancer cell lines (Bray et al., 2015; Roudsari et al., 2016; Taubenberger et al., 2016). This 3D scaffold is therefore readily available for the *in vitro* study of micro-tumors and their vasculature.

Static 3D Co-culture to Recapitulate Tumor–Stromal Cell Interactions With Capillaries

To date, multiple *in vitro* static 3D models have been engineered to recapitulate heterotypic interactions between tumor cells and capillaries. These are based on a large diversity of strategies using different scaffolds as well as tumor–stromal cell sources and methods for capillary formation. As described above, natural and synthetic scaffolds or tissue constructs are essential to support these cell interactions. Tumor cells are mainly human cell lines from breast, pancreatic, colorectal, skin, lung, and liver cancers cultured as single cells or in spheroids. Moreover, these models require stromal cells [e.g., fibroblasts, mesenchymal stem cells

(MSC)] or stromal conditioned medium since tumor cells alone do not support capillary formation. Basically, two types of approaches have been performed using vascularized spheroids in 3D hydrogels or vascularized tissue constructs.

Vascularized Spheroids in 3D Hydrogels

Cellular interactions

To recapitulate interactions between tumor cells and capillaries, Ehsan et al. developed vascularized tumor spheroids using various cancer cell lines from breast, lung, and colon. Multicellular spheroids containing tumor and EC were generated using the liquid overlay method and were co-embedded with isolated fibroblasts in fibrin hydrogels (Ehsan et al., 2014). The vascularized tumor spheroids exhibited sprouting angiogenesis, generating a capillary network that extends into the surrounding matrix within 7 days of culture (**Figure 2A**). In the case of colon cancer cell lines, capillaries localized within the spheroid have a distinct morphology and exhibit shorter, more branched, and irregular phenotype than capillaries that extend into the hydrogel. Interestingly, this model recapitulates specific pro-angiogenic capacities according to the type of tumor cell lines. Indeed, vascularized spheroids of breast tumor cell lines (MCF and MDA MB-231) exhibit more capillaries than those of lung or colon tumor cell lines. Quite surprisingly, co-seeding tumor cells, however, does not affect extent nor kinetics of sprouting and growth of the capillary network in the fibrin hydrogel. In addition, authors report that tumor cell-specific intravasation occurs in this model, as they detect SW620 cells localized

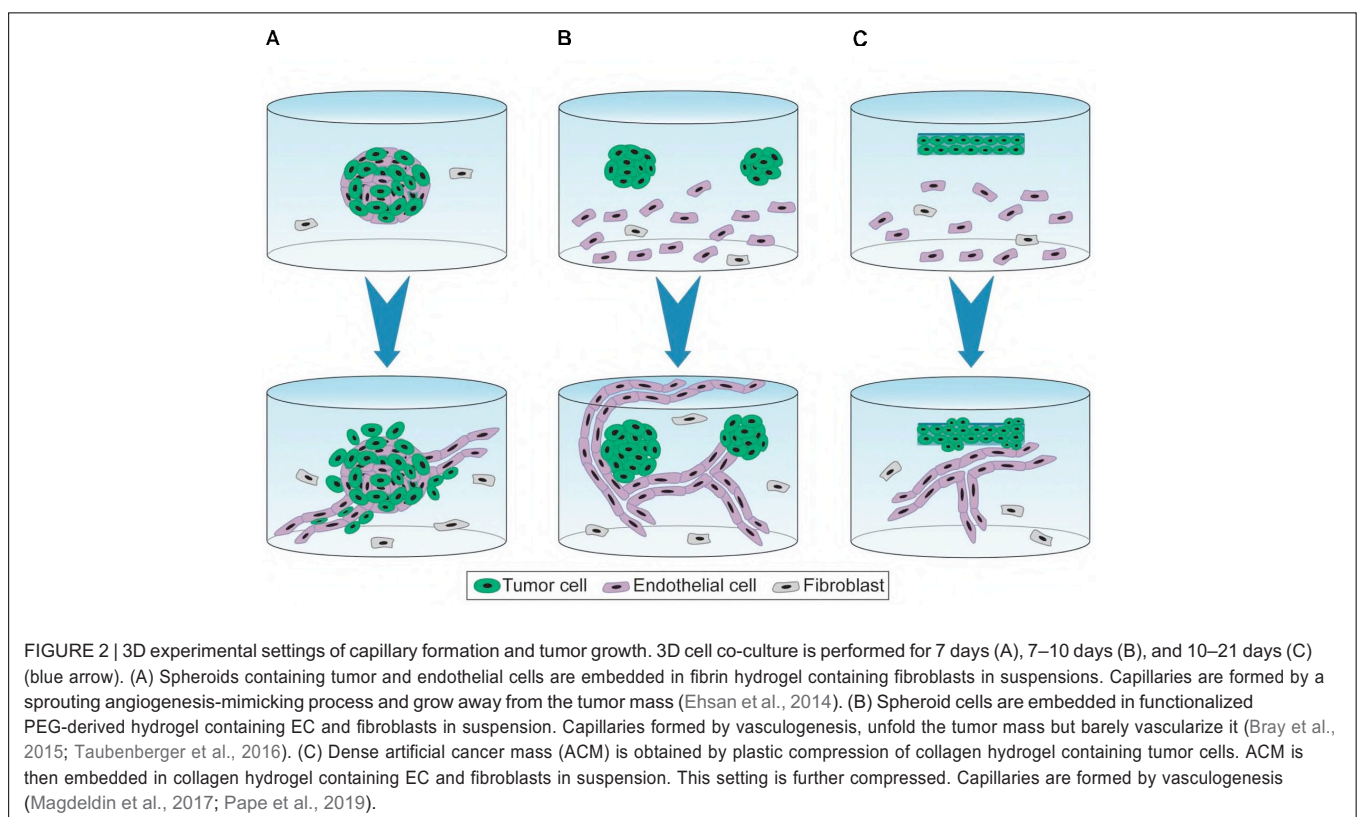
and migrating in the capillary lumen, which is enhanced by low oxygen condition. It is, however, not determined whether presence of tumor cells in the lumen corresponds to actual trans-endothelial intravasation or engulfment of tumor cells upon initiation of capillary formation. This model nonetheless recapitulates tumor angiogenesis and interactions of tumor cells with capillaries in a fibroblast-containing hydrogel.

Bray et al. (2015) also investigated the interactions between tumor spheroids and capillaries by co-culture with MSC seeded in suspension in a synthetic hydrogel. First, spheroids were formed in hydrogel through proliferation of isolated tumor cells. After 7 days of culture, spheroids were harvested by collagenase treatment and seeded in a newly formed hydrogel containing both EC and MSC (**Figure 2B**). This protocol recapitulates the first avascular growing step of the tumor mass but requires a tough collagenase-based treatment for the co-culture model. Unlike the model described above (Ehsan et al., 2014), capillaries sprouted toward the tumor spheroids and did not invade the core of the spheroid but only established contacts at the spheroid surface (Bray et al., 2015).

Whereas both studies used spheroids devoid of invasive capacities, applying invasive spheroids in such models would be of major interest to monitor interactions between tumor protrusions and capillaries in the surrounding hydrogel in order to assess potential co-option processes.

ECM interactions

Models of vascularized spheroids in natural hydrogels effectively recapitulate cellular interactions within a 3D environment but



are limited for studying interactions between tumor cells and specific ECM proteins. Cell–ECM interactions play a major role in tumor growth, invasion, and angiogenesis. ECM proteins such as collagen I, fibronectin, and laminin are major components of the stromal microenvironment (Provenzano et al., 2006; Schedin and Keely, 2011). As mentioned above, synthetic hydrogels functionalized with specific cell adhesion domains of these matrix proteins are also useful tools to recapitulate a wide range of ECM interactions. Taubenberger et al. (2016) investigated the involvement of specific cell adhesion domains on interactions between tumor cells organized in spheroids and capillaries. For this purpose, an integrin binding domain present in fibronectin and vitronectin (RGD), a laminin-111 derived adhesion peptide (IKVAV), and an integrin binding domain present in collagen I (GFOGER) were conjugated to PEG hydrogel. Tumor spheroid formation and co-inclusion with EC and MSC in these functionalized hydrogels were performed as in Bray et al. (2015). While interactions between tumor cells and capillaries were observed in each condition, both tumor spheroid invasiveness and tumor-EC interactions inside spheroids increased only in IKVAV and GFOGER functionalized hydrogels. This 3D culture model therefore constitutes an interesting tool to decipher the effect of ECM interactions on tumor cell growth, invasion, and angiogenesis.

Composition but also density of the ECM are crucial features that impact cell proliferation/invasion and angiogenesis. To modulate the ECM density, a strategy named plastic compression consists in removing water from collagen hydrogel containing tumor cells (Magdeldin et al., 2017; Pape et al., 2019). This dense artificial cancer mass (ACM) is then seeded in collagen hydrogel supplemented with laminin and containing fibroblasts and EC, thereby mimicking the stromal compartment, before further compression. ECM density modulated by plastic compression as well as ECM composition of the stroma modulated by laminin concentrations both regulate cancer cell invasion (**Figure 2C**). A high density of collagen I is associated with increased tumor cell invasion. Moreover, presence of laminin stimulated both tumor cell invasion and vascular network formation. Authors reported that EC seeded in the stromal compartment formed “healthy” and “tumorigenic” vascular networks in absence or in presence of colorectal tumor cells, respectively (Magdeldin et al., 2017). Pape et al. (2019) compared two colorectal tumor cell lines (HT29 and HCT116) displaying distinct invasive properties. Authors reported that HCT116 was more invasive than HT29, displaying an increased distance and surface area of invasion into the stromal compartment. Spheroids containing highly invasive cells form less complex and less branched vascular networks.

Vascularized Tissue Constructs

3D *in vitro* models described above recapitulate the crosstalk between tumor cells, stromal microenvironment, and vessels but none of them present a tissue-specific environment including both blood and lymphatic capillaries. Indeed, the vast majority of articles published up to now, aiming to recapitulate interactions between tumor cells and capillaries, focus on blood vessels. However, it is commonly accepted that lymphatic vessels are essential for tumor spread and metastasis (Stacker et

al., 2014).

Furthermore, formation of functional lymphatic capillaries has been documented for some years now either within 3D hydrogel (Montaño et al., 2010; Marino et al., 2014) or in skin constructs (Gibot et al., 2016, 2017) using HDMEC or lymphatic EC (LEC) isolated from human foreskin. These capillaries are positive for Prox1 (lymphatic-specific transcription factor) and CD31 staining thereby confirming their lymphatic nature. To recapitulate specific interactions between tumor cells and lymphatic capillaries, stromal tissues as well as skin constructs were engineered by the layer-by-layer technique (Bourland et al., 2018; Nishiguchi et al., 2018). Using this approach, the authors investigated: (i) intravasation into lymphatic capillaries, (ii) MMP secretion profiles, (iii) response to therapies.

The stromal tissue developed by Nishiguchi et al. is composed of fibroblasts synthesizing their own ECM and of EC/LEC self-assembled in blood and lymph capillaries as originally described by Decher (1997). Single cancer cells are seeded onto these tissues to form primary micro-tumors. For studying intravasation in blood or lymphatic capillaries, pancreatic and colorectal cell lines displaying hematogenous (MiaPaCa-2 cells) or lymphogenous metastasis (BxPC3 cells) were used. The specificity of these cell lines for each type of vessel was indeed reproduced *in vitro* (Nishiguchi et al., 2018). Interestingly, tumor cells displayed distinct MMP secretion profiles according to their invasive properties and target vasculatures: hematogenous cells secreted MMP-1, -2, -3, and -10 while lymphogenous cells secreted MMP-1, -2, and -9. This model is thus relevant for recapitulating specific interactions of tumor cells displaying hematogenous and lymphogenous metastasis properties, tumor invasion, and intravasation/extravasation.

To mimic the melanoma microenvironment, Bourland et al. (2018) engineered a skin construct using the self-assembly method. This model mimics the human skin morphology characterized by a dermis enriched in ECM components, a differentiated epidermis composed by a proliferative basal layer and multiple suprabasal layers resulting in a *stratum corneum*. Microvascular EC self-organized to form two distinct capillary networks, one of lymphatic vessels positive for podoplanin and another of blood vessels positive for CD31 but negative for podoplanin. Melanoma spheroids integrated at the dermo-epidermal junction invaded the epidermal layer and localized in close contact with lymphatic capillaries. Chronic treatment with Vemurafenib (Zelboraf[®]), a selective inhibitor of BRAF frequently used to treat melanoma bearing the BRAF-V600E mutation, affected tumor cell proliferation and apoptosis, thereby recapitulating changes in tumor morphology, without leading to any toxicity in the surrounding tissue. Interestingly, some tumor cells localized in close contact with fibroblasts continue to proliferate even after 12 days of treatment suggesting an effect of the microenvironment on therapeutic resistance.

All in all, these approaches better recapitulate the global tissue organization than vascularized spheroids in 3D hydrogel.

Conclusion

Culture of vascularized tumor spheroids in hydrogel is suitable to mimic interactions between tumor cells and capillaries. Moreover, using functionalized synthetic scaffolds, 3D hydrogel

co-culture allows to study the impact of ECM proteins on tumor angiogenesis. Tissue constructs recapitulate the global tissue organization to create a more complex microenvironment than 3D culture in hydrogel. **Figure 1** illustrates some 3D experimental settings of capillary formation and tumor growth. **Table 1** is summing up the main features and applications of the static 3D models described above. Improvement of these models will consist in inclusion of other stromal cell types. Indeed, while fibroblasts are the major cell type used in these models, many other stromal cells such as immune cells, stem cells, or cancer associated fibroblasts (CAF) could be incorporated to recapitulate more complex features of the tumor microenvironment.

In addition, it is of major interest to include pericytes in these vascularized tumor spheroids to investigate the perivascular coverage defect observed in cancer. Other major factors involved in the vascularization process are shear forces and blood flow. These parameters require the use of microfluidic devices in order to be investigated *in vitro*.

Multiple Microfluidic Angiogenesis Models

Over the last decade, microfluidic organs-on-chips have been extensively developed to model cancer (Zervantonakis et al., 2012; Sontheimer-Phelps et al., 2019). These tumor-on-a-chip recapitulate the multicellular architecture, tumor–tissue interface, and physical microenvironment of cancers growing within human organs. Furthermore, a unique feature of microfluidic systems is perfusion of the vascular compartment, allowing the study of shear forces and blood flow in tumor vascularization (Haase and Kamm, 2017). Advantages of these systems are high spatial and temporal control over cell patterning, chemical gradients, and mechanical stimuli. In these tumor-on-chip technologies, engineering perfused microvessels has been a major challenge addressed by several *in vitro* approaches, such as EC lining-, vasculogenesis-, or angiogenesis-based methods (Haase and Kamm, 2017; Wang et al., 2018; Sontheimer-Phelps et al., 2019). Microfluidic tumor-on-a-chip models have been further developed to study tumor cell interactions with the vasculature as well as intravasation/extravasation processes.

Engineering Perfused Micro-Vessels

EC lining method

The EC lining method is based on endothelial monolayers established on the inner walls of microchannels (Sudo et al., 2009; Shin et al., 2012; Zhang et al., 2012; Tourouvskaia et al., 2014; Pauty et al., 2018; Andrique et al., 2019). The most widely described microfluidic platform comprises hydrogel-incorporating chambers between surface-accessible microchannels made of polydimethylsiloxane (PDMS) and coated with ECM proteins (Shin et al., 2012). In other devices, microchannels are made of hydrogel which require the inclusion of a cylindrical rod into collagen I and its removal after polymerization to form a microchannel for infusion of EC (Tourouvskaia et al., 2014; Wong and Searson, 2014). EC lining method is applied to explore processes of intravasation and extravasation by tumor cells under combination of multiple controllable biochemical and biophysical microenvironment

parameters (Zervantonakis et al., 2012; Bersini et al., 2014; Wong and Searson, 2014). These models provide some advantages over common static assays used for studying migration in response to chemotactic gradients, such as Boyden chamber and wound assay as they allow integration of multiple microenvironmental factors (cells, secreted factors, 3D ECM, flow).

Angiogenesis-based method

In microfluidic systems, angiogenesis is induced from either EC monolayers or pre-existing vessels (Haase and Kamm, 2017). A typical microfluidic platform, initially developed by Song and Munn (2011), contains a central chamber incorporating a hydrogel that is in direct contact with two surface-accessible microchannels. The EC infused in these microchannels cover the surface of the central hydrogel. This microfluidic device incorporates features such as: (i) contact between the abluminal side of EC and the hydrogel to allow angiogenic sprouting; (ii) fluid flowing through two adjacent channels and controllable fluid convection through the hydrogel; (iii) co-culture with other cell types seeded either in the central hydrogel or in the opposite channel to EC; (iv) specific growth factors gradients. This microfluidic platform has given rise to many proximate designs that are now commonly used by many research groups (Yeon et al., 2012; Abe et al., 2019; van Duinen et al., 2019).

Vasculogenesis-based method

As previously described, vasculogenesis-based method produces microcirculation by formation of interconnected lumens via a process that relies on the capacity of EC to self-assemble into capillaries under proper culture conditions and stimulation (Haase and Kamm, 2017; Wang et al., 2018). The model contains one central hydrogel seeded with EC in suspension and bordered by micro-fabricated channels for medium perfusion (Shin et al., 2012; Kim et al., 2013; Moya et al., 2013; Wang et al., 2017). Stromal cells such as fibroblasts (Chen et al., 2013, 2016; Sobrino et al., 2016), MSC, osteoblasts-differentiated cells (Jeon et al., 2015), or perivascular cells (Sobrino et al., 2016) are seeded either with EC in the central hydrogel region or in the surrounding channels.

This method allows to engineer capillaries that are not only properly polarized and lumenized but also functional. Indeed, perfusion of the vascular network with FITC reveals its barrier integrity and therefore allows investigation of regulatory mechanisms of vascular permeability (Sobrino et al., 2016). In this respect, only a few microfluidic models, however, include pericytes wrapping the abluminal surface of the endothelium even though pericyte coverage is required for establishment of vascular permeability *in vivo* (Kim et al., 2013; Sobrino et al., 2016). Thus, this represents an important challenge for the development of physiologically relevant models.

Strategies to Recapitulate Tumor–Vasculature Interactions

Culture in separate compartments

Interstitial and blood flow. There is a distinction between the functional perfusion of the entire microvascular networks (Kim et al., 2013; van Duinen et al., 2019) and interstitial flow applied in the microfluidic device without perfused capillaries

TABLE 1 | *In vitro* 3D vascularized tumors in non-perfused models and applications.

	3D culture methods					
	Co-culture in 3D hydrogel			Tissue constructs		
Natural or synthetic scaffolds	Collagen I	PEG or PEG-heparin		Fibrin	Fibroblast-derived skin construct	
Methods						
Capillary formation	Vasculogenesis assay			Endothelial spheroid assay	Combined vasculogenesis (blood and lymphatic) sheet (tissue-construct) assays	
Tumor mass formation	Artificial cancer mass (ACM)	Spheroid growth		Multicellular spheroid growth	Spheroid growth	Individual tumor cell proliferation
Stromal cells	Fibroblasts	MSC		Fibroblasts	Fibroblasts Keratinocytes	Fibroblasts
Advantages	Physical properties (stiffness, density)	Controlled properties of 3D scaffolds: Functionalization (Growth factor binding sites and cell adhesion motifs)		Multicellular stromal microenvironment Relevant model for sprouting angiogenesis	Self-assembly method: Tumor growth in relevant complex cell-based microenvironment for skin	Specificity of hematogenous/lymphogenous involvements in tumor invasion and intravasation
	Dissociation of ACM and Stromal Compartment	Cell Behavior Assessment during Capillary and Tumor Growth				
Limits	Tumor growth and capillary formation affected by plastic compression	No capillary penetration into the tumor mass Weak assessment of the stromal (MSC) contribution	Weak assessment of the stromal (MSC) contribution	Low relevancy for capillary penetration into the tumor mass and intravasation mechanisms	Applicable for skin constructs	No relevancy of tumor mass and capillary penetration
Molecular and cell responses applications	Tumor–vessel interactions					
	Impact of specific ECM mechanical properties	Time-dependent drug testing	Impact of specific cell–ECM interactions	Sprouting angiogenesis	Drug screening	MMP secretion profile intravasation
References examples	Magdeldin et al., 2017 Pape et al., 2019	Bray et al., 2015	Taubenberger et al., 2016	Ehsan et al., 2014	Bourland et al., 2018	Nishiguchi et al., 2018

(Abe et al., 2019). Microfluidic devices allow investigation of specific mechanical factors consisting in forces generated by fluid flow through either the hydrogel or the microvascular network, respectively, mimicking the interstitial (Abe et al., 2019) and the blood flow (Jeon et al., 2015). For example, in the single gel channel device of Song and Munn (2011) described above, convective flow through media channels results in interstitial flow across the hydrogel region. These authors demonstrated that interstitial flow enhanced sprouting morphogenesis consisting in increased formation of filopodia extending against the flow (Song and Munn, 2011). However, it remains unclear whether interstitial flow magnitude can be optimized to control 3D vascular network formation in combination with various VEGF concentrations. Therefore, using a wide range of interstitial flow in a microfluidic device dedicated to angiogenesis, Abe et al. (2019) demonstrated a pro-angiogenic effect of the interstitial flow that is not substituted by increasing VEGF concentration. Indeed, density and length of the microvascular network as well as lumen diameter of capillaries and area of degraded gel increased specifically in response to flow magnitude. This study is in agreement with previous work performed on avian embryos where interstitial flow has been reported to affect VEGF distribution in the mesenchyme (Ghaffari et al., 2017). In tumor, interstitial fluid pressure is high due to plasma leakage from blood capillaries and non-functional lymphatic networks which limit drug delivery (Viallard and Larrivée, 2017). Microfluidic approaches are thus powerful tools to study the effect of interstitial pressure within the tumor microenvironment, but no study has been performed using lymphatic vessels so far, to the best of our knowledge.

Blood flow through capillaries results in shear stress, which is the major biomechanical factor depending on fluid flow (Haase and Kamm, 2017; Wang et al., 2018). Shear flow can be applied using EC lining, angiogenesis-, and vasculogenesis-based methods. For the EC-lining based method, it is easy to assess the shear stress applied on the capillary network because geometries of the device are known. However, for angiogenesis- and vasculogenesis-based methods, generating a network homogeneously perfused remains quite challenging, as much as modeling flow in a complex network produced by cell self-assembly. Kim et al. (2013) have demonstrated EC alignment in the direction of applied shear flow. Moreover, Jeon et al. (2015) revealed that capillaries under laminar flow displayed decreased vasculature permeability and tumor cell extravasation rates when compared to static conditions.

Paracrine factors secreted by tumor cells. Some *in vitro* microfluidic platforms are engineered to study the effect of factors secreted by tumor and stromal cells on angiogenesis using growth factor cocktails (van Duinen et al., 2019) or co-culture of cells in separate channels (Kim et al., 2013; Miller et al., 2018). In contrast to static culture, these models integrate both perfusion and generation of robust biomolecular gradients (van Duinen et al., 2019). For example, van Duinen et al. (2019) perfused a microfluidic device by passive leveling using a rocker platform thus applying the flow through all 40

units and resulting in reproducible gradient formation. They identified a combination of pro-angiogenic factors VEGF-A, and Sphingosine-1-phosphate, together with the PKC activator Phorbol 12-myristate 13-acetate, that were required to induce sprouting angiogenesis (van Duinen et al., 2019). These platforms could be used, in a high throughput manner, to perfuse stromal or tumor cell conditioned medium allowing the identification of secreted factors involved in tumor angiogenesis.

Another microfluidic device using EC co-cultured with human glioblastoma cells (U87MG) or fibroblasts (control condition) in independent channel reveals that an increased number of EC sprouts invade the matrix, displaying an aberrant morphology, in response to factors secreted by tumor cells (Kim et al., 2013). Indeed, when compared to fibroblasts- induced sprouts, glioblastoma cells fail to promote formation of a perfused vascular network, only inducing immature and rarely lumenized vessels.

Recapitulation of the tumor vascularized microenvironment As described above for static models, co-culture of cells in 3D hydrogels recapitulates key features of the tumor microenvironment including crosstalk between tumor and stromal cells, ECM remodeling, and storage of paracrine factors. These culture conditions have therefore been transferred to microfluidics platforms for studying: (i) direct tumor-vasculature interactions; (ii) molecular interplay between tumor-stromal cells and the vasculature (Chung et al., 2017; Miller et al., 2018; Truong et al., 2019); (iii) response to standard therapies (Sobrinho et al., 2016); (iv) tumor metabolism, which is an interesting marker for cellular state and response to drugs (Sobrinho et al., 2016). For this purpose, a large variety of tumor cell lines and primary cultures from many origins, including breast, renal, and colorectal cancers have been incorporated in microfluidic devices. In addition, stromal cells such as fibroblasts, MSC, or osteoblasts are also included in these models either to support capillary formation or to generate tissue-specific microenvironments.

Sobrinho et al. (2016) engineered vascularized micro-tumors to assess direct tumor-vasculature interactions as well as tumor metabolism, and response to chemotactic and anti-angiogenic therapies. Their platform, based on a vasculogenesis approach, consists in two channels connected by three tissue chambers where EC, tumor cells, and fibroblasts are injected. EC formed a capillary network covered with fibroblasts that are NG2 and PDGFR-B positive, consistent with a pericyte phenotype. Various colorectal and breast tumor cell lines proliferated to form cell aggregates in close contact with the capillary network. Perfusion of this tumor-associated vascular network was demonstrated using dextran. These vascularized micro-tumors respond to chemotherapeutics, displaying reduced growth or even regression. The model established the distinction between VEGF-specific drugs that were not effective in disrupting the vascular networks and drugs against several targets (VEGFR2, PDGFR, and Tie2) that induced effective regression of the vasculature. Interestingly, tumor cells, fibroblasts, and EC that composed the micro-tumors displayed a strong metabolic heterogeneity: tumor cells were more glycolytic than the

surrounding stroma, which was consistent with their known preferences for aerobic glycolysis.

One advantage of studying direct interactions within perfused vascularized micro-tumors is the possibility to easily include various stromal cells mimicking a specific tumor microenvironment. It is widely agreed that cells with stem-like properties form a fertile niche allowing tumor to grow and expand (Valkenburg et al., 2018). Indeed, in glioblastoma, a sub-population of cells with stem-like properties, glioma stem cell (GSC), has been reported as one of the major drivers of tumor recurrence, invasion of normal brain parenchyma, and resistance to therapies. Truong et al. (2019) developed a vascularized tumor-on-a-chip technology mimicking the GSC vascular niche to study EC impact on patient-derived GSC behavior. The signaling pathways governing invasion were thus identified. To this aim, EC were embedded in a hydrogel and infused within the microfluidic device to enclose the tumor region of the platform

composed by patient-derived primary GSC encapsulated within MatrigelTM. The established microvascular network enhanced GSC migration in the hydrogel, promoted invasive morphology, and maintained GSC proliferation rates and stemness (Nestin, SOX2, CD44). Using a specific CXCR4 antagonist, the role of the CXCL12-CXCR4 signaling axis on EC-mediated GSC invasion was demonstrated. This model could be adapted to many types of cancer.

Whereas perfused vascularized micro-tumors have been engineered with various tumor cell lines (Sobrinho et al., 2016; Truong et al., 2019), the use of primary cells remains challenging. Miller et al. (2018) developed a vascularized flow-directed culture system for primary human clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) cells isolated from six patients to study the angiogenic signaling axis between ccRCC cells and EC. Collagen I containing embedded tumor spheroids were infused into the matrix channel. A retaining rod was removed from the collagen gel after polymerization to form the lumen for infusion of EC. Under a medium flow through the EC-lined lumen, capillaries were higher in all devices containing tumor cells when compared to clusters formed from normal-adjacent renal cortex. Moreover, endothelial sprouting was not limited to migration oriented toward tumor clusters but was isotropically distributed in the outlet. Indeed, computational simulation demonstrated that the biochemical gradient of angiogenic growth factors favors sprouting in the outlet region of the flow-directed microphysiological system (Miller et al., 2018). Interestingly, depending on patients, factors secreted by tumor clusters induced formation of capillaries displaying different morphologies that could reflect the inter-patient heterogeneity. This device therefore recapitulates a primary tumor cell-derived biochemical gradient.

Intravasation and extravasation

During the metastasis cascade, tumor cells dissociate from the primary tumor, intravasate into capillaries and survive in circulation, extravasate from the microvasculature, and form metastases in the secondary parenchyma (Chen et al., 2013, 2016). Intravasation is the transmigration of cancer cells through BM and endothelium into capillaries close to the tumor. This process is regulated by tumor cell intrinsic factors

and by stromal cells present in the tumor microenvironment such as macrophages and neutrophils. To study the interplay between tumor cells and the endothelium, Wong and Searson (2014) developed microvessels formed by an EC lining method and embedded in a hydrogel containing tumor cells. Using fluorescence live cell imaging, they deciphered various tumor–endothelium interactions such as invasion and intravasation. This platform could be used to investigate the role of tumor cell–endothelium interactions and biochemical factors involved in the intravasation process. Zervantonakis et al. developed a microfluidic model to mimic cancer cell intravasation across an impaired endothelial barrier by including soluble biochemical factors or macrophages. Using an EC lining method, they demonstrated that macrophage-secreted TNF- α stimulated intravasation of tumor cells due to impaired endothelial barrier function (Zervantonakis et al., 2012).

Extravasation is the reverse dynamic process that involves a cascade of events including tumor–EC adhesion, initiation and formation of tumor cell protrusions into the sub-endothelial ECM, interaction with the endothelial BM, and migration through the parenchyma. The study of this process requires real-time imaging at a single cell level in a model recapitulating the human microvasculature, which is possible only with microfluidic devices. Using a microfluidic model based on vasculogenesis, Chen et al. (2016) assessed the impact of *b1* integrin depletion in cancer cells on the extravasation cascade. For this purpose, individual tumor cell lines invalidated or not for *b1* integrin were directly perfused into the microvessels to monitor the dynamic extravasation events. The authors deciphered multiple steps of the extravasation process and their findings highlighted a critical role for beta1 integrin in adhesion to the sub-endothelial ECM, providing new insights into the mechanisms underlying metastasis.

Microfluidic systems recapitulate the trans-endothelial migration toward a non-organ-specific ECM. However, extravasation occurs in specific tumor microenvironment composed by several cell types which could impact this process. Bersini et al. (2014) and Jeon et al. (2015) explored breast cancer cell extravasation using two microfluidic approaches in a specific bone-mimicking microenvironment (BMi). These microfluidic devices are developed by an EC lining (Bersini et al., 2014) and a vasculogenesis-based method (Jeon et al., 2015). In the device developed by Bersini et al. (2014), osteo-differentiated-human bone marrow (OD-hBM)-derived MSC were embedded in hydrogel and cultured within an independent microfluidic channel for 2–3 weeks to allow proper deposition of bone ECM. EC were thus seeded into the adjacent channel inducing formation of a continuous monolayer at the 3D hydrogel–endothelial channel interface. Finally, breast cancer cells MDA-MB 231 were injected into the hollow channel mimicking the vascular lumen and the extravasation rate was monitored. Extravasation was significantly higher in the microenvironment conditioned by osteo-differentiated cells compared to collagen hydrogel. However, in this microfluidic device, the use of an endothelial monolayer does not recapitulate the parameters of a proper capillary. Aware of the limitations of this approach, they have developed another microfluidic system based on

a vasculogenesis approach. For this purpose, EC were co-embedded with hBM-MSC and OD-hBM-MSC in the central gel region of the microfluidic platform to generate a microvascular network enclosed in a BMi (Jeon et al., 2015). By perfusing individual breast tumor cell lines, the authors demonstrated that both extravasation rates and microvascular permeability were higher in the BMi compared to the muscle-mimicking microenvironment or to the unconditioned ECM. These results demonstrated a major role of the microenvironment in the extravasation process of tumor cells. This organ-specific vascularized 3D microfluidic model is an interesting tool to study cell extravasation in a stromal microenvironment and could be expanded to various cancer cells.

standardized

Conclusion

Microfluidic systems recapitulate many features of tumor microenvironment such as perfused and functional capillary networks, growth factor gradient, and shear stress. These models are powerful tools to study indirect and direct interactions between tumor and stromal cells with the vasculature. This approach is consistent with high resolution real-time imaging allowing to decipher each step of complex cellular processes such as intra- and extravasation (Zervantonakis et al., 2012; Chen et al., 2013, 2016). **Table 2** sums up the main features and applications of 3D microfluidic models of vascularized micro-tumors. As discussed below, these systems are adaptable to high-throughput analysis and drug screening (Sobrino et al., 2016; Miller et al., 2018; Ko et al., 2019; van Duinen et al., 2019). However, these perfused vascularized micro-tumors still fail to recapitulate the whole and complex composition of *in vivo* tumors, and they should in the next future include more specifically components of the immune compartment.

CHALLENGES AND FUTURE APPLICATIONS

High Throughput Screening of Drugs

For more than 50 years, 2D cultures of tumor cell lines have been widely used for drug screening. However, since the 2000s, many studies revealed more relevant responses to treatment of cells cultured in 3D. Tumor spheroids cultured in suspension or more recently in hydrogels have thus been proposed to bridge the gap between flat culture and *in vivo* experiments. Furthermore, vascularization as well as co-culture with stromal cells is of main interest to assess the drug delivery context. As described above, vascularized micro-tumors cultured within hydrogels (Bray et al., 2015), tissue constructs (Bourland et al., 2018; Nishiguchi et al., 2018), as well as microfluidic systems (Sobrino et al., 2016; Miller et al., 2018) are powerful platforms for cancer drug discovery and screening. However, in many cases, they are still at the proof-of-concept stage and are not designed for high throughput drug screening yet (Bray et al., 2015; Sobrino et al., 2016; Bourland et al., 2018; Miller et al., 2018; Nishiguchi et al., 2018).

Hughes's group has engineered a perfused vascularized micro-tumor model in a 96-well plate format compatible with standard robotic and fluorescent plate readers thus creating

and reproducible arrays (Sobrino et al., 2016; Phan et al., 2017). Adapted for high throughput screening, each unit can be filled by various drugs. The vascularized micro-tumors can be easily extracted for further gene expression analysis. As proof-of-concept, a full-blind test of 10 FDA-approved anti-tumor compounds and two negative control compounds has been performed on the vascularized micro-tumors. Anti-angiogenic, anti-tumor drugs and placebo were successfully discriminated according to their respective effects on tumor cells or on the vasculature. More recently, aware of the need to develop standardized assays, other groups have designed microfluidic platforms suitable for high throughput anti-tumor drug screening on vascularized micro-tumors (Ko et al., 2019; Meng et al., 2019). Interestingly, Meng et al. (2019) took advantage of 3D bioprinting to accurately position cluster of tumor cells, stromal cells, and EC in their device. These new platforms share some similar characteristics essential for high throughput analyses such as a simple and quick fabrication; a miniaturized format; a single vascularized micro-tumor per well; an automated imaging.

Toward Personalized Medicine

The development of perfused vascularized micro-tumors compatible with high throughput analysis is a major step toward personalized medicine in order to determine specific anti-tumor drugs for each individual patient.

However, up to now, personalized medicine remains challenging for many reasons: (1) the complex isolation of various cell types (tumor cells, EC, immune cells, CAF) from the same biopsy; (2) the maintenance of cell-specific functionality for a long time in culture; (3) the appropriate relative proportions of cell types; and (4) the optimal culture medium for the combined cell cultures (Sontheimer-Phelps et al., 2019). Indeed, specific isolation protocols and culture conditions are required for each cell type present in tumor biopsies. As described above, formation of *in vitro* capillaries with EC isolated from tumors is not achieved. The main improvement concerns the use of 3D-organoid technologies leading to the development of so-called “tumoroids” that are composed by patient-derived 3D cultures of cells isolated from tumor biopsies. As previously reviewed by Drost and Clevers (2018), primary cells can be isolated from various cancer types such as colorectal, pancreatic, liver, breast, prostate, brain and bladder cancers to form these “tumoroids.” These cells derived from living tissue are more likely to reflect the properties of native cells *in vivo*. A major step to move toward personalized medicine will be to form vascularized micro-tumors, in a high throughput manner, by co-culturing “tumoroid” and EC.

Induced Pluripotent Stem Cells

Recent results suggest that cancer cells remain susceptible to transcription factor-mediated reprogramming (Utikal et al., 2009). As for angiogenesis, although human induced pluripotent stem cells (iPSC) can differentiate into functional EC, they still exhibit limited expansion potential compared with human embryonic stem cells-derived EC. However, individual lines of human embryonic stem cells and iPSC are distinct and can

TABLE 2 | *In vitro* 3D vascularized tumors in perfused models and applications.

3D scaffolds	Fibrin	3D ECM (Collagen I)			Fibrin Fibrin/collagen I*		Fibrin		
Methods									
Capillary formation	EC lining				Vasculogenesis assay				
Tumor mass	Multicellular spheroid growth	Spheroid growth	Individual invading tumor cells		Perfused tumor cells			Individual tumor cells	
Stromal cells	Fibroblasts	–	Macrophages	–	Osteo-differentiated (OD) hBM-MSC	Fibroblasts	Fibroblasts Pericytes	–	
Advantages	Sprouting angiogenesis	Paracrine and juxtacrine regulations mediated by 3D microenvironment			Cell-based complexity and ECM deposition Dynamic analysis	Bone mimicking environment	Temporal Resolution		Glioblastoma mimicking environment Stem cell involvement
	Simultaneous use of lymphatic and blood EC	Culture of patient-derived tumor cells	Live imaging				Extravasation events Association with endothelial barrier function	Peri-mural cell behavior	
			Assessment of intravasation process Endothelial barrier integrity						
Limits	No lymphatic or blood capillary penetration of tumor mass	Undefined cell type content in 3D patient-derived tumor Uncharacterized vessels	No relevancy for capillary penetration of tumor mass		No angiogenic process No tumor cell migration	Bone-specific metastasis	No capillary invasion		
			Limited cell-based complexity	No tumor cell migration			Fibrin–matrigel interface Uncharacterized vessels		
Molecular and cell responses Applications	Angio- and lymph-angiogenesis Angiogenic regulation by tumor–fibroblasts interactions	Tumor cell-derived gradient of angiogenic factors	Paracrine factors involvement Intravasation		Extravasation		Extravasation Involvement of signaling pathways	Tumor–vessel interactions	
					Drug screening platform	Tumor metabolism Drug screening		Paracrine factors involvement	
References examples	Chung et al., 2017	Miller et al., 2018	Zervantonakis et al., 2012	Wong and Searson, 2014	Bersini et al., 2014	Jeon et al., 2015	Chen et al., 2013, 2016	Sobrino et al., 2016; Phan et al., 2017	Truong et al., 2019

*Chen et al. (2016) is associated with fibrin/collagenI.

often respond very differently to the same microenvironment cues. Thus, efficient and robust induction of EC from human pluripotent stem cells and multiple human iPSC lines or reset EC might also constitute a renewable and infinite cell source (Jahan and McCloskey, 2020; Palikuqi et al., 2020). These findings open new perspectives which should facilitate the study of epigenetic changes in human cancer and angiogenesis studies using pre-clinical complex *in vitro* 3D systems.

CRISPR/Cas9 Gene Editing

CRISPR-Cas9 genome editing has recently been used in tumor organoids to introduce mutations into genes commonly found mutated such as *Trp53*, *Brcal*, *Nfl*, and *Pten* in high-grade serous ovarian cancer (Löhmußaar et al., 2020). This technology could be further used on organoids to investigate the nature and extent of intra-tumor diversification but also to study the role of mutational diversification associated with response variability to anticancer drugs between even closely related cells of the same tumor as reported by Roerink et al. (2018). In addition, although this is not the case yet, such a technology will undoubtedly be very useful to study angiogenesis in *in vitro* 3D systems.

CONCLUSION

Since unperfused models constituted powerful tool for deciphering tumor–vessel interactions, perfused models are more relevant for deciphering extra- and intravasation mechanisms. However, both types of these models present limits such as (i) low representation of relevant capillaries displaying a pericyte coverage, (ii) low level of concomitant occurrence of tumor migratory processes and capillary growth

REFERENCES

- Abe, Y., Watanabe, M., Chung, S., Kamm, R. D., Tanishita, K., and Sudo, R. (2019). Balance of interstitial flow magnitude and vascular endothelial growth factor concentration modulates three-dimensional microvascular network formation. *APL Bioengin.* 3:036102. doi: 10.1063/1.5094735
- Andrique, L., Recher, G., Alessandri, K., Pujol, N., Feyeux, M., Bon, P., et al. (2019). A model of guided cell self-organization for rapid and spontaneous formation of functional vessels. *Sci. Adv.* 5:eaau6562. doi: 10.1126/sciadv.aau6562
- Arnaoutova, I., George, J., Kleinman, H. K., and Benton, G. (2009). The endothelial cell tube formation assay on basement membrane turns 20: state of the science and the art. *Angiogenesis* 12, 267–274. doi: 10.1007/s10456-009-9146-4
- Baudino, T. A. (ed.) (2013). *Cell-Cell Interactions*. Totowa, NJ: Humana.
- Beckouche, N., Bignon, M., Lelarge, V., Mathivet, T., Pichol-Thievent, C., Berndt, S., et al. (2015). The interaction of heparan sulfate proteoglycans with endothelial transglutaminase-2 limits VEGF₁₆₅-induced angiogenesis. *Sci. Signal.* 8, ra70–ra70. doi: 10.1126/scisignal.aaa0963
- Benton, G., DeGray, G., Kleinman, H. K., George, J., and Arnaoutova, I. (2015). In vitro microtumors provide a physiologically predictive tool for breast cancer therapeutic screening. *PLoS One* 10:e0123312. doi: 10.1371/journal.pone.0123312
- Bersini, S., Jeon, J. S., Dubini, G., Arrigoni, C., Chung, S., Charest, J. L., et al. (2014). A microfluidic 3D in vitro model for specificity of breast cancer metastasis to bone. *Biomaterials* 35, 2454–2461. doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.11.050
- Blache, U., and Ehrbar, M. (2017). Inspired by nature: hydrogels as versatile tools for vascular engineering. *Adv. Wound Care* 7, 232–246. doi: 10.1089/wound.2017.0760

for analyzing the co-option processes or the regulation of migratory strategies, and (iii) rare investigation of the interaction types between tumor mass and capillaries as well as underlying mechanisms.

A further present limit of these models is the absence of a wide panel of stromal cells since most of the studies are based on 3D microenvironment constituted by ECM and cells such as fibroblasts, MSC, macrophages, and pericytes. There is an obvious increasing need of engineering *in vitro* 3D vascularized micro-tumors for investigating the role of inflammatory cells as well as cytokines recapitulating the complex immune compartment. Moreover, another feature to consider is the EC origins and heterogeneities. As example, it has been recently reported that EC display metabolic transcriptome heterogeneity and plasticity in tumor angiogenesis (Rohlenova et al., 2020).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

NB-J, CM, LM, and SG wrote the review and the tables. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

NB-J was supported by the Sorbonne Université.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank France Maloumian for designing the figures.

- Blache, U., Metzger, S., Vallmajo-Martin, Q., Martin, I., Djonov, V., and Ehrbar, M. (2016). Dual Role of Mesenchymal Stem Cells Allows for Microvascularized Bone Tissue-Like Environments in PEG Hydrogels. *Adv. Healthcare Mater.* 5, 489–498. doi: 10.1002/adhm.201500795
- Bourland, J., Fradette, J., and Auger, F. A. (2018). Tissue-engineered 3D melanoma model with blood and lymphatic capillaries for drug development. *Sci. Rep.* 8:13191. doi: 10.1038/s41598-018-31502-6
- Bray, L. J., Binner, M., Holzheu, A., Friedrichs, J., Freudenberg, U., Huttmacher, D. W., et al. (2015). Multi-parametric hydrogels support 3D in vitro bioengineered microenvironment models of tumour angiogenesis. *Biomaterials* 53, 609–620. doi: 10.1016/j.biomaterials.2015.02.124
- Chen, M. B., Lamar, J. M., Li, R., Hynes, R. O., and Kamm, R. D. (2016). Elucidation of the Roles of Tumor Integrin 1 in the Extravasation Stage of the Metastasis Cascade. *Cancer Res.* 76, 2513–2524. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-1325
- Chen, M. B., Whisler, J. A., Jeon, J. S., and Kamm, R. D. (2013). Mechanisms of tumor cell extravasation in an in vitro microvascular network platform. *Integr. Biol.* 5:1262. doi: 10.1039/c3ib40149a
- Chung, M., Ahn, J., Son, K., Kim, S., and Jeon, N. L. (2017). Biomimetic Model of Tumor Microenvironment on Microfluidic Platform. *Adv. Healthcare Mater.* 6:1700196. doi: 10.1002/adhm.201700196
- Chwalek, K., Tsurkan, M. V., Freudenberg, U., and Werner, C. (2015). Glycosaminoglycan-based hydrogels to modulate heterocellular communication in in vitro angiogenesis models. *Sci. Rep.* 4:4414. doi: 10.1038/srep04414
- Decher, G. (1997). Fuzzy Nanoassemblies: Toward Layered Polymeric Multicomposites. *Science* 227, 1232–1237. doi: 10.1126/science.277.5330.1232

- Doyle, A. D., Carvajal, N., Jin, A., Matsumoto, K., and Yamada, K. M. (2015). Local 3D matrix microenvironment regulates cell migration through spatiotemporal dynamics of contractility-dependent adhesions. *Nat. Commun.* 6:8720. doi: 10.1038/ncomms9720
- Drost, J., and Clevers, H. (2018). Organoids in cancer research. *Nat. Rev. Cancer* 18, 407–418. doi: 10.1038/s41568-018-0007-6
- Ehsan, S. M., Welch-Reardon, K. M., Waterman, M. L., Hughes, C. C. W., and George, S. C. (2014). A three-dimensional in vitro model of tumor cell intravasation. *Integr. Biol.* 6:603. doi: 10.1039/c3ib40170g
- Ferratge, S., Ha, G., Carpentier, G., Arouche, N., Bascetin, R., Muller, L., et al. (2017). Initial clonogenic potential of human endothelial progenitor cells is predictive of their further properties and establishes a functional hierarchy related to immaturity. *Stem Cell Res.* 21, 148–159. doi: 10.1016/j.scr.2017.04.009
- Furlan, A., Vercamer, C., Heliot, L., Wernert, N., Desbiens, X., and Pourtier, A. (2018). Ets-1 drives breast cancer cell angiogenic potential and interactions between breast cancer and endothelial cells. *Int. J. Oncol.* 54(1), 29–40. doi: 10.3892/ijo.2018.4605
- Ghaffari, S., Leask, R. L., and Jones, E. A. V. (2017). Blood flow can signal during angiogenesis not only through mechanotransduction, but also by affecting growth factor distribution. *Angiogenesis* 20, 373–384. doi: 10.1007/s10456-017-9553-x
- Ghajar, C. M., Blevins, K. S., Hughes, C. C. W., George, S. C., and Putnam, A. J. (2006). Mesenchymal stem cells enhance angiogenesis in mechanically viable prevascularized tissues via early matrix metalloproteinase upregulation. *Tissue Eng.* 12, 2875–2888. doi: 10.1089/ten.2006.12.2875
- Ghajar, C. M., Chen, X., Harris, J. W., Suresh, V., Hughes, C. C. W., Jeon, N. L., et al. (2008). The effect of matrix density on the regulation of 3-D capillary morphogenesis. *Biophys. J.* 94, 1930–1941. doi: 10.1529/biophysj.107.120774
- Gibot, L., Galbraith, T., Bourland, J., Rogic, A., Skobe, M., and Auger, F. A. (2017). Tissue-engineered 3D human lymphatic microvascular network for in vitro studies of lymphangiogenesis. *Nat. Protoc.* 12, 1077–1088. doi: 10.1038/nprot.2017.025
- Gibot, L., Galbraith, T., Kloos, B., Das, S., Lacroix, D. A., Auger, F. A., et al. (2016). Cell-based approach for 3D reconstruction of lymphatic capillaries in vitro reveals distinct functions of HGF and VEGF-C in lymphangiogenesis. *Biomaterials* 78, 129–139. doi: 10.1016/j.biomaterials.2015.11.027
- Haase, K., and Kamm, R. D. (2017). Advances in on-chip vascularization. *Regener.* 12, 285–302. doi: 10.2217/rme-2016-0152
- Heiss, M., Hellström, M., Kalén, M., May, T., Weber, H., Hecker, M., et al. (2015). Endothelial cell spheroids as a versatile tool to study angiogenesis in vitro. *FASEB J.* 29, 3076–3084. doi: 10.1096/fj.14-267633
- Hernandez-Fernaund, J. R., Ruengeler, E., Casazza, A., Neilson, L. J., Puelleine, E., Santi, A., et al. (2017). Secreted CLIC3 drives cancer progression through its glutathione-dependent oxidoreductase activity. *Nat. Commun.* 8:14206. doi: 10.1038/ncomms14206
- Jahan, B., and McCloskey, K. E. (2020). Differentiation and expansion of endothelial cells requires pre-optimization of KDR+ expression kinetics. *Stem Cell Res.* 42:101685. doi: 10.1016/j.scr.2019.101685
- Jeon, J. S., Bersini, S., Gilardi, M., Dubini, G., Charest, J. L., Moretti, M., et al. (2015). Human 3D vascularized organotypic microfluidic assays to study breast cancer cell extravasation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 112, 214–219. doi: 10.1073/pnas.1417115112
- Jeong, S.-Y., Lee, J.-H., Shin, Y., Chung, S., and Kuh, H.-J. (2016). Co-culture of tumor spheroids and fibroblasts in a collagen matrix-incorporated microfluidic chip mimics reciprocal activation in solid tumor microenvironment. *Plos One* 11:e0159013. doi: 10.1371/journal.pone.0159013
- Kim, S., Lee, H., Chung, M., and Jeon, N. L. (2013). Engineering of functional, perfusable 3D microvascular networks on a chip. *Lab. Chip.* 13:1489. doi: 10.1039/c3lc41320a
- Ko, J., Ahn, J., Kim, S., Lee, Y., Lee, J., Park, D., et al. (2019). Tumor spheroid-on-a-chip: a standardized microfluidic culture platform for investigating tumor angiogenesis. *Lab. Chip.* 19, 2822–2833. doi: 10.1039/C9LC00140A
- Kraehenbuehl, T. P., Zammaretti, P., Van der Vlies, A. J., Schoenmakers, R. G., Lutolf, M. P., Jaconi, M. E., et al. (2008). Three-dimensional extracellular matrix-directed cardioprogenitor differentiation: Systematic modulation of a synthetic cell-responsive PEG-hydrogel. *Biomaterials* 29, 2757–2766. doi: 10.1016/j.biomaterials.2008.03.016
- Kučera, T., Strilič, B., Regener, K., Schubert, M., Laudet, V., and Lammert, E. (2009). Ancestral Vascular Lumen Formation via Basal Cell Surfaces. *PLoS One* 4:e4132. doi: 10.1371/journal.pone.0004132
- Laib, A. M., Bartol, A., Alajati, A., Korff, T., Weber, H., and Augustin, H. G. (2009). Spheroid-based human endothelial cell microvessel formation in vivo. *Nat. Protoc.* 4, 1202–1215. doi: 10.1038/nprot.2009.96
- Li, Y., and Kumacheva, E. (2018). Hydrogel microenvironments for cancer spheroid growth and drug screening. *Sci. Adv.* 4:eas8998. doi: 10.1126/sciadv.aas8998
- Liang, Y., Jeong, J., DeVolder, R. J., Cha, C., Wang, F., Tong, Y. W., et al. (2011). A cell-instructive hydrogel to regulate malignancy of 3D tumor spheroids with matrix rigidity. *Biomaterials* 32, 9308–9315. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.08.045
- Liu, J., Tan, Y., Zhang, H., Zhang, Y., Xu, P., Chen, J., et al. (2012). Soft fibrin gels promote selection and growth of tumorigenic cells. *Nat. Mater.* 11, 734–741. doi: 10.1038/nmat3361
- Löhmußaar, K., Kopper, O., Korving, J., Begthel, H., Vreuls, C. P. H., van Es, J. H., et al. (2020). Assessing the origin of high-grade serous ovarian cancer using CRISPR-modification of mouse organoids. *Nat. Commun.* 11:2660. doi: 10.1038/s41467-020-16432-0
- Lutolf, M. P., and Hubbell, J. A. (2005). Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering. *Nat. Biotech.* 23, 47–55. doi: 10.1038/nbt1055
- Magdeldin, T., López-Dávila, V., Pape, J., Cameron, G. W. W., Emberton, M., Loizidou, M., et al. (2017). Engineering a vascularised 3D in vitro model of cancer progression. *Sci. Rep.* 7:44045. doi: 10.1038/srep44045
- Marchand, M., Monnot, C., Muller, L., and Germain, S. (2019). Extracellular matrix scaffolding in angiogenesis and capillary homeostasis. *Semin. Cell Dev. Biol.* 89, 147–156. doi: 10.1016/j.semdb.2018.08.007
- Marino, D., Luginbuhl, J., Scola, S., Meuli, M., and Reichmann, E. (2014). Bioengineering Dermo-Epidermal Skin Grafts with Blood and Lymphatic Capillaries. *Sci. Transl. Med.* 6, ra14–ra221. doi: 10.1126/scitranslmed.3006894
- Meng, F., Meyer, C. M., Joung, D., Vallera, D. A., McAlpine, M. C., and Panoskaltis-Mortari, A. (2019). 3D Bioprinted In Vitro Metastatic Models via Reconstruction of Tumor Microenvironments. *Adv. Mater.* 31:1806899. doi: 10.1002/adma.201806899
- Miller, C. P., Tsuchida, C., Zheng, Y., Himmelfarb, J., and Akilesh, S. (2018). A 3D Human Renal Cell Carcinoma-on-a-Chip for the Study of Tumor Angiogenesis. *Neoplasia* 20, 610–620. doi: 10.1016/j.neo.2018.02.011
- Montaño, I., Schiestl, C., Schneider, J., Pontiggia, L., Luginbühl, J., Biedermann, T., et al. (2010). Formation of human capillaries in vitro: The Engineering of Prevascularized Matrices. *Tissue Engin. Part A.* 16, 269–282. doi: 10.1089/ten.tea.2008.0550
- Moya, M. L., Hsu, Y.-H., Lee, A. P., Hughes, C. C. W., and George, S. C. (2013). In vitro perfused human capillary networks. *Tissue Engin. Part C Methods* 19, 730–737. doi: 10.1089/ten.tec.2012.0430
- Nakatsu, M. N., and Hughes, C. C. W. (2008). An optimized three-dimensional in vitro model for the analysis of angiogenesis. *Methods Enzymol.* 443, 65–82. doi: 10.1016/S0076-6879(08)02004-1
- Nakatsu, M. N., Sainson, R. C. A., Aoto, J. N., Taylor, K. L., Aitkenhead, M., Pérez-del-Pulgar, S., et al. (2003). Angiogenic sprouting and capillary lumen formation modeled by human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) in fibrin gels: the role of fibroblasts and Angiopoietin-1? *Microvasc. Res.* 66, 102–112. doi: 10.1016/S0026-2862(03)00045-1
- Nishiguchi, A., Matsusaki, M., Kano, M. R., Nishihara, H., Okano, D., Asano, Y., et al. (2018). In vitro 3D blood/lymph-vascularized human stromal tissues for preclinical assays of cancer metastasis. *Biomaterials* 179, 144–155. doi: 10.1016/j.biomaterials.2018.06.019
- Nowak-Sliwinska, P., Alitalo, K., Allen, E., Anisimov, A., Aplin, A. C., Auerbach, R., et al. (2018). Consensus guidelines for the use and interpretation of angiogenesis assays. *Angiogenesis* 21, 425–532. doi: 10.1007/s10456-018-9613-x
- Palikou, B., Nguyen, D.-H. T., Li, G., Schreiner, R., Pellegata, A. F., Liu, Y., et al. (2020). Adaptable haemodynamic endothelial cells for organogenesis and tumorigenesis. *Nature* 585, 426–432. doi: 10.1038/s41586-020-2712-z
- Pape, J., Magdeldin, T., Ali, M., Walsh, C., Lythgoe, M., Emberton, M., et al. (2019). Cancer invasion regulates vascular complexity in a three-dimensional biomimetic model. *Eur. J. Cancer* 119, 179–193. doi: 10.1016/j.ejca.2019.07.005

- Pauty, J., Usuba, R., Cheng, I. G., Hespel, L., Takahashi, H., Kato, K., et al. (2018). A Vascular Endothelial Growth Factor-Dependent Sprouting Angiogenesis Assay Based on an In Vitro Human Blood Vessel Model for the Study of Anti-Angiogenic Drugs. *EBioMedicine* 27, 225–236. doi: 10.1016/j.ebiom.2017.12.014
- Phan, D. T. T., Wang, X., Craver, B. M., Sobrino, A., Zhao, D., Chen, J. C., et al. (2017). A vascularized and perfused organ-on-a-chip platform for large-scale drug screening applications. *Lab. Chip* 17, 511–520. doi: 10.1039/C6LC01422D
- Provenzano, P. P., Eliceiri, K. W., Campbell, J. M., Inman, D. R., White, J. G., and Keely, P. J. (2006). Collagen reorganization at the tumor-stromal interface facilitates local invasion. *BMC Med.* 4:38. doi: 10.1186/1741-7015-4-38
- Ramer, R., Fischer, S., Hausteiner, M., Manda, K., and Hinz, B. (2014). Cannabinoids inhibit angiogenic capacities of endothelial cells via release of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1 from lung cancer cells. *Biochem. Pharmacol.* 91, 202–216. doi: 10.1016/j.bcp.2014.06.017
- Rao, R. R., Peterson, A. W., Ceccarelli, J., Putnam, A. J., and Stegemann, J. P. (2012). Matrix composition regulates three-dimensional network formation by endothelial cells and mesenchymal stem cells in collagen/fibrin materials. *Angiogenesis* 15, 253–264. doi: 10.1007/s10456-012-9257-1
- Roerink, S. F., Sasaki, N., Lee-Six, H., Young, M. D., Alexandrov, L. B., Behjati, S., et al. (2018). Intra-tumour diversification in colorectal cancer at the single-cell level. *Nature* 556, 457–462. doi: 10.1038/s41586-018-0024-3
- Rohlenova, K., Goveia, J., Garcia-Caballero, M., Subramanian, A., Kalucka, J., Treps, L., et al. (2020). Single-Cell RNA Sequencing Maps Endothelial Metabolic Plasticity in Pathological Angiogenesis. *Cell Metab.* 31, 862–877. doi: 10.1016/j.cmet.2020.03.009
- Roudsari, L. C., Jeffs, S. E., Witt, A. S., Gill, B. J., and West, J. L. (2016). A 3D poly(ethylene glycol)-based tumor angiogenesis model to study the influence of vascular cells on lung tumor cell behavior. *Sci. Rep.* 6:32726. doi: 10.1038/srep32726
- Sapudom, J., Rubner, S., Martin, S., Kurth, T., Riedel, S., Mierke, C. T., et al. (2015). The phenotype of cancer cell invasion controlled by fibril diameter and pore size of 3D collagen networks. *Biomaterials* 52, 367–375. doi: 10.1016/j.biomaterials.2015.02.022
- Schedin, P., and Keely, P. J. (2011). Mammary Gland ECM Remodeling, Stiffness, and Mechanosignaling in Normal Development and Tumor Progression. *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.* 3, a003228–a003228. doi: 10.1101/cshperspect.a003228
- Schneider, G., Schmidt-Suppran, M., Rad, R., and Saur, D. (2017). Tissue-specific tumorigenesis: context matters. *Nat. Rev. Cancer* 17, 239–253. doi: 10.1038/nrc.2017.5
- Shin, Y., Han, S., Jeon, J. S., Yamamoto, K., Zervantonakis, I. K., Sudo, R., et al. (2012). Microfluidic assay for simultaneous culture of multiple cell types on surfaces or within hydrogels. *Nat. Protoc.* 7, 1247–1259. doi: 10.1038/nprot.2012.051
- Simons, M., Alitalo, K., Annex, B. H., Augustin, H. G., Beam, C., Berk, B. C., et al. (2015). State-of-the-Art Methods for Evaluation of Angiogenesis and Tissue Vascularization: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circ. Res.* 116, e99–132. doi: 10.1161/RES.0000000000000054
- Sobrino, A., Phan, D. T. T., Datta, R., Wang, X., Hachey, S. J., Romero-López, M., et al. (2016). 3D microtumors in vitro supported by perfused vascular networks. *Sci. Rep.* 6:31589. doi: 10.1038/srep31589
- Song, H.-H. G., Park, K. M., and Gerecht, S. (2014). Hydrogels to model 3D in vitro microenvironment of tumor vascularization. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 7, 19–29. doi: 10.1016/j.addr.2014.06.002
- Song, J. W., and Munn, L. L. (2011). Fluid forces control endothelial sprouting. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 15342–15347. doi: 10.1073/pnas.1105316108
- Sontheimer-Phelps, A., Hassell, B. A., and Ingber, D. E. (2019). Modelling cancer in microfluidic human organs-on-chips. *Nat. Rev. Cancer* 19, 65–81. doi: 10.1038/s41586-018-0104-6
- Sorushanova, A., Delgado, L. M., Wu, Z., Shologu, N., Kshirsagar, A., Raghunath, R., et al. (2019). The collagen suprafamily: from biosynthesis to advanced biomaterial development. *Adv. Mater.* 31:1801651. doi: 10.1002/adma.201801651
- Stacker, S. A., Williams, S. P., Karnezis, T., Shayan, R., Fox, S. B., and Achen, M. G. (2014). Lymphangiogenesis and lymphatic vessel remodelling in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 14, 159–172. doi: 10.1038/nrc3677
- Sudo, R., Chung, S., Zervantonakis, I. K., Vickerman, V., Toshimitsu, Y., Griffith, L. G., et al. (2009). Transport-mediated angiogenesis in 3D epithelial coculture. *FASEB J.* 23, 2155–2164. doi: 10.1096/fj.08-122.820
- Szot, C. S., Buchanan, C. F., Freeman, J. W., and Rylander, M. N. (2011). 3D in vitro bioengineered tumors based on collagen I hydrogels. *Biomaterials* 32, 7905–7912. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.07.001
- Taubenberger, A. V., Bray, L. J., Haller, B., Shaposhnykov, A., Binner, M., Freudenberg, U., et al. (2016). 3D extracellular matrix interactions modulate tumour cell growth, invasion and angiogenesis in engineered tumour microenvironments. *Acta Biomater.* 36, 73–85. doi: 10.1016/j.actbio.2016.03.017
- Tomlinson, J., Barsky, S. H., Nelson, S., Singer, S., Pezeshki, B., Lee, M. C., et al. (1999). Different Patterns of Angiogenesis in Sarcomas and Carcinomas. *Clin. Cancer Res.* 5, 3516–3522.
- Tourovskaya, A., Fauver, M., Kramer, G., Simonson, S., and Neumann, T. (2014). Tissue-engineered microenvironment systems for modeling human vasculature. *Exp. Biol. Med.* 239, 1264–1271. doi: 10.1177/1535370214539228
- Truong, D., Fiorelli, R., Barrientos, E. S., Melendez, E. L., Sanai, N., Mehta, S., et al. (2019). A three-dimensional (3D) organotypic microfluidic model for glioma stem cells – Vascular interactions. *Biomaterials* 198, 63–77. doi: 10.1016/j.biomaterials.2018.07.048
- Umana-Diaz, C., Pichol-Thieuvend, C., Marchand, M. F., Atlas, Y., Salza, R., Malbouyres, M., et al. (2020). Scavenger Receptor Cysteine-Rich domains of Lysyl Oxidase-Like2 regulate endothelial ECM and angiogenesis through non-catalytic scaffolding mechanisms. *Matr. Biol.* 88, 33–52. doi: 10.1016/j.matbio.2019.11.003
- Utikal, J., Maherali, N., Kulalert, W., and Hochedlinger, K. (2009). Sox2 is dispensable for the reprogramming of melanocytes and melanoma cells into induced pluripotent stem cells. *J. Cell Sci.* 122, 3502–3510. doi: 10.1242/jcs.054783
- Valkenburg, K. C., de Groot, A. E., and Pienta, K. J. (2018). Targeting the tumour stroma to improve cancer therapy. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 15, 366–381. doi: 10.1038/s41571-018-0007-1
- van Duinen, V., Zhu, D., Ramakers, C., van Zonneveld, A. J., Vulto, P., and Hankemeier, T. (2019). Perfused 3D angiogenic sprouting in a high-throughput in vitro platform. *Angiogenesis* 22, 157–165. doi: 10.1007/s10456-018-9647-0
- Vernon, R., Angello, J., Iruela-Arispe, L., Lane, T., and Sage, H. (1992). Reorganization of Basement Membrane Matrices by Cellular Traction Promotes the Formation of Cellular Networks in vitro. *Lab. Invest.* 66(5), 536–47.
- Viallard, C., and Larrivé, B. (2017). Tumor angiogenesis and vascular normalization: alternative therapeutic targets. *Angiogenesis* 20, 409–426. doi: 10.1007/s10456-017-9562-9
- Wang, X., Phan, D. T. T., George, S. C., Hughes, C. C. W., and Lee, A. P. (2017). “3D Anastomosed Microvascular Network Model with Living Capillary Networks and Endothelial Cell-Lined Microfluidic Channels,” in *3D Cell Culture Methods in Molecular Biology*, ed. Z. Koledova (New York, NY: Springer), 325–344. doi: 10.1007/978-1-4939-7021-6_24
- Wang, X., Sun, Q., and Pei, J. (2018). Microfluidic-Based 3D Engineered Microvascular Networks and Their Applications in Vascularized Microtumor Models. *Micromachines* 9:493. doi: 10.3390/mi9100493
- Welti, J. C., Gourlaouen, M., Powles, T., Kudahetti, S. C., Wilson, P., Berney, D. M., et al. (2011). Fibroblast growth factor 2 regulates endothelial cell sensitivity to sunitinib. *Oncogene* 30, 1183–1193. doi: 10.1038/onc.2010.503
- Wolf, K., te Lindert, M., Krause, M., Alexander, S., te Riet, J., Willis, A. L., et al. (2013). Physical limits of cell migration: Control by ECM space and nuclear deformation and tuning by proteolysis and traction force. *J. Cell Biol.* 201, 1069–1084. doi: 10.1083/jcb.201210152
- Wong, A. D., and Searson, P. C. (2014). Live-Cell Imaging of Invasion and Intravasation in an Artificial Microvessel Platform. *Cancer Res.* 74, 4937–4945. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-1042
- Yamada, K. M., and Sixt, M. (2019). Mechanisms of 3D cell migration. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 20, 738–752. doi: 10.1038/s41580-019-0172-9

- Yeon, J. H., Ryu, H. R., Chung, M., Hu, Q. P., and Jeon, N. L. (2012). In vitro formation and characterization of a perfusable three-dimensional tubular capillary network in microfluidic devices. *Lab. Chip.* 12:2815. doi: 10.1039/c2lc40131b
- Zervantonakis, I. K., Hughes-Alford, S. K., Charest, J. L., Condeelis, J. S., Gertler, F. B., and Kamm, R. D. (2012). Three-dimensional microfluidic model for tumor cell intravasation and endothelial barrier function. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 13515–13520. doi: 10.1073/pnas.1210182109
- Zhang, Q., Liu, T., and Qin, J. (2012). A microfluidic-based device for study of transendothelial invasion of tumor aggregates in realtime. *Lab. Chip.* 12:2837. doi: 10.1039/c2lc00030j

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2020 Brassard-Jollive, Monnot, Muller and Germain. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Résumé

Le carcinome du rein à cellules claires (ccRCC), l'un des cancers les plus représentés dans le monde, est fréquemment associé à une altération du gène *Von Hippel-Lindau* (VHL), entraînant un état de pseudo-hypoxie, qui favorise la transition épithélio-mésenchymateuse des cellules épithéliales, l'invasion tumorale, le remodelage matriciel et l'hypermécanisation. De nombreuses études alimentent une controverse concernant une potentielle corrélation entre densité microvasculaire et pronostic des patients du ccRCC. En parallèle, quelques travaux rapportent une architecture vasculaire complexe et aberrante, distincte de la vasculature physiologique rénale. Mon travail de doctorat repose sur l'hypothèse que la complexité du réseau vasculaire pourrait constituer un indice plus pertinent de la biologie et des réponses aux traitements du cRCC que sa densité.

Depuis une vingtaine d'années, les traitements anti-angiogéniques constituent un pilier de la prise en charge du ccRCC, bien que de nombreuses résistances et échappements aux traitements soient décrits. L'absence de modèles *in vitro* 3D pertinents reconstituant la vascularisation du ccRCC est aujourd'hui un écueil dans l'étude de ce cancer.

Mon projet de thèse a eu pour objectif d'étudier : i) - la vascularisation aberrante du ccRCC en interaction avec des cellules tumorales invasives; ii) la sensibilité de ces structures vasculaires aux traitements anti-angiogéniques; iii) le rôle des propriétés du microenvironnement tumoral sur les stratégies d'invasion et sur la formation de la vascularisation aberrante.

Utilisant un modèle de xénogreffes implantées en sous-cutané chez la souris, j'ai réalisé la première caractérisation 3D de la vascularisation du ccRCC composée de structures longues et fines appelées feuillets ou de structures larges et dilatées appelées étangs. Pour étudier les mécanismes cellulaires de formation de ces structures aberrantes ainsi que leur sensibilité aux traitements, j'ai développé un modèle de micro-tumeurs vascularisées impliquant l'inclusion de sphéroïdes d'une lignée cellulaire tumorale du ccRCC, présentant une mutation perte de fonction pour VHL et des cellules endothéliales en hydrogel de collagène I. Cette co-culture induit la formation d'étang vasculaire au sein du sphéroïde, semblable à ceux observés dans le ccRCC. De manière innovante, j'ai démontré que ces structures vasculaires aberrantes sont résistantes aux thérapies anti-angiogéniques telles que le sunitinib. Ces travaux ont également suggéré un lien fort entre formation de l'étang vasculaire et invasion des cellules tumorales, associé à un remodelage matriciel dans le microenvironnement tumoral.

Dans un second temps, j'ai donc analysé l'impact de la modulation de l'invasion du sphéroïde et du remodelage matriciel sur la formation des étangs vasculaires. Je me suis appuyée sur des travaux antérieurs de l'équipe ayant permis la caractérisation des propriétés mécaniques et structurales d'hydrogels de collagène I, formés sous différentes conditions de pH. Nos travaux démontrent que les stratégies d'invasion des cellules tumorales mutées pour VHL sont régulées par les propriétés mécaniques de la matrice extracellulaire et associées à l'activation de voies de mécanotransduction relayées par YAP. En co-culture, un lien fonctionnel réciproque s'établit entre cellules tumorales invasives et cellules endothéliales, associé à un remodelage matriciel local, les cellules tumorales invasives favorisant la formation de l'étang vasculaire et les cellules endothéliales induisant la migration individuelle des cellules tumorales. L'altération des propriétés de mécanotransduction des cellules tumorales m'a permis de démontrer que la formation de l'étang vasculaire nécessite le remodelage matriciel induit par les cellules tumorales invasives. L'ensemble de ces travaux suggèrent que les cellules tumorales invasives remodelent une niche favorable à la formation de l'étang vasculaire. En retour, les cellules endothéliales participent à la malignité tumorale en maintenant une invasion tumorale individuelle.