



HAL
open science

Décrypter le dialogue des cellules de tumeur du sein avec leur écosystème, après radio/chimiothérapie, en utilisant des technologies de bioimpression

Théo Desigaux

► **To cite this version:**

Théo Desigaux. Décrypter le dialogue des cellules de tumeur du sein avec leur écosystème, après radio/chimiothérapie, en utilisant des technologies de bioimpression. Médecine humaine et pathologie. Université de Bordeaux, 2024. Français. NNT : 2024BORD0053 . tel-04636851

HAL Id: tel-04636851

<https://theses.hal.science/tel-04636851>

Submitted on 5 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.

THÈSE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE

**DOCTEUR
DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX**

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE ET DE LA
SANTÉ

Spécialité Interface Chimie Biologie

Par **Théo DESIGAUX**

**Décrypter le dialogue des cellules de tumeur du sein
avec leur écosystème, après radio/chimiothérapie, en
utilisant des technologies de bioimpression**

Sous la direction de : **Pr. Jean-Christophe FRICAIN**

Soutenance le 04 Avril 2024

Membres du jury :

Dr. Julie GUILLERMET-GUIBERT	Dir. de recherche	INSERM, U. de Toulouse	Présidente
Dr. Maria-Carla PARRINI	Ing. de recherche	Institut Curie	Rapporteuse
Dr. Vincent SENEZ	Dir. de recherche	INSERM, U. de Lille	Rapporteur
Dr. Xavier GIDROL	Dir. de recherche	CEA, U. de Grenoble	Examineur
Pr. Jean-Christophe FRICAIN	Pr. des Universités	INSERM, U. de Bordeaux	Directeur
Dr. Hugo OLIVEIRA	Ing. de recherche	INSERM	Encadrant
Dr. François PARIS	Dir. de recherche	INSERM, U. de Nantes	Invité

Décrypter le dialogue des cellules de tumeur du sein avec leur écosystème, après radio/chimiothérapie, en utilisant des technologies de bioimpression

Résumé : Le cancer du sein est aujourd'hui la pathologie cancéreuse la plus fréquemment diagnostiquée, et la plus mortelle chez la femme. Cette mortalité est imputable aux mécanismes de résistance aux traitements, qui permettent à la tumeur de récidiver localement ou à distance en formant des métastases. Lors des soins, la radiothérapie et la chimiothérapie sont des stratégies utilisées dans la majorité des sous-types de tumeur du sein. Cependant, leur délivrance n'est pas spécifique des cellules cancéreuses, mais atteint également le microenvironnement tumoral. L'intercommunication du microenvironnement stromal, et notamment des fibroblastes associés au cancer (CAF), avec la tumeur joue un rôle dans la réponse aux traitements et reste à ce jour peu comprise. L'usage historique des modèles de culture cellulaire en 2D sur flasques, ainsi que des modèles *in vivo*, atteint ses limites dans le contexte de ces mécanismes. Les premiers manquent en effet d'une organisation 3D intégrée à une matrice extracellulaire, et les seconds ne peuvent pas fournir un environnement cellulaire et matriciel humain essentiel à la pertinence biologique de tels modèles. Pour répondre à ce défi, la biofabrication, et plus spécifiquement la bioimpression, ont permis de recréer ex vivo des structures tridimensionnelles structurées et cellularisées. Ces travaux de thèses visent à exploiter cette technologie dans le cadre du cancer du sein, afin de développer, caractériser et interroger un modèle bioimprimé dans le contexte de l'interaction tumeur-stroma lors du traitement par radio/chimiothérapie.

Afin de répliquer la matrice extracellulaire du cancer du sein, une bioencres à base de collagène et d'acide hyaluronique a d'abord été optimisée par sa fonctionnalisation avec un peptide dérivé de la laminine, qui a induit une augmentation de la croissance tumorale tout en montrant des propriétés mécaniques adéquates pour la bioimpression. Ce processus a donc ensuite été évalué, et a démontré sa reproductibilité et sa consistance dans la création d'un modèle en forme de disque de l'ordre de 5 millimètres de diamètre, composé de deux compartiments, tumoral au centre et stromal en périphérie. La maturation des cellules cancéreuses au sein du modèle a mis en évidence l'apparition d'un cœur nécrotique et hypoxique faisant écho à la physiopathologie de la maladie. Le microenvironnement a aussi montré des signes de maturation, avec une augmentation de la complexité des réseaux microvasculaires en présence de fibroblastes, et notamment des CAF. Ce sous-type de fibroblaste a aussi montré des capacités de remodelage matriciel augmentées, avec une sécrétion importante de collagènes et de laminines. Cette modification de composition s'est en parallèle traduite par une augmentation de la rigidité de la matrice extracellulaire, en comparaison à des fibroblastes mammaires sains. Un phénomène de radioprotection a enfin pu être mis en évidence en présence des CAF, suggérant une implication dans la résistance aux traitements. Cet effet était concomitant avec une élévation du niveau de sécrétion des cytokines. Parmi celles-ci, CXCL-1, dont l'expression par le stroma est associée à un mauvais pronostic clinique, avait des niveaux d'expression significativement plus élevés dans les CAF. Cependant, l'inhibition de cette cytokine n'a pas été concluante pour radiosensibiliser le modèle bioimprimé.

Dans le cadre de la compréhension du cancer du sein et de son microenvironnement, ces travaux de thèse mettent en avant un nouveau modèle fiable et pertinent vis-à-vis de la clinique. Sa flexibilité permettrait d'appliquer cette méthode à différents sous-types tumoraux, ou à des cellules primaires de patients dans le cadre de la médecine personnalisée. L'identification de l'impact du stroma sur la réponse aux traitements suggère aussi que ce modèle pourrait servir de plateforme pour tester de nouveaux traitements ciblant le microenvironnement tumoral, et notamment les CAF.

Mots-clés : Bioimpression, cancer du sein, microenvironnement, ingénierie tissulaire, fibroblastes associés au cancer, radiothérapie

Decipher environment-breast cancer cell crosstalk after radio/chemotherapy using bioprinting technologies

Abstract: Breast cancer currently ranks as the most frequently diagnosed cancer and the deadliest among women. This mortality is often attributed to treatment resistance mechanisms, enabling the tumor to relapse locally or distantly by forming metastases. During treatment, strategies such as radiotherapy and chemotherapy are commonly employed across various breast tumor subtypes. However, their administration isn't specific solely to cancer cells but also influences the tumor microenvironment. The interplay between the stromal microenvironment, especially cancer-associated fibroblasts (CAF), and the tumor plays a crucial role in treatment response, yet it remains poorly understood to date. The historical utilization of 2D cell culture models and *in vivo* models has reached its limitations in comprehensively studying these mechanisms. The former lacks integrated 3D organization within an extracellular matrix, while the latter fails to provide a human cellular and matrix environment essential for the biological relevance of such models. To address this challenge, biofabrication, particularly bioprinting, has enabled the ex vivo production of structured and cellularized three-dimensional constructs. This thesis aims to leverage this technology for breast cancer research, specifically to develop, characterize, and investigate a bioprinted model in the context of tumor-stroma interaction during radio/chemotherapy.

To replicate the composition of breast cancer extracellular matrix, a collagen/hyaluronic acid-based bioink was optimized by functionalizing it with a laminin-derived peptide, which induced increased tumor growth while also demonstrating suitable mechanical properties for bioprinting. Subsequently, this process was evaluated, demonstrating its reproducibility and consistency in creating a disc-shaped model approximately 5 millimeters in diameter, consisting of two compartments: a central tumor and a peripheral stromal region. The maturation of cancer cells within the model highlighted the emergence of a necrotic and hypoxic core mirroring the disease's pathophysiology. Additionally, the microenvironment exhibited signs of maturation, evidenced by the increased complexity of microvascular networks in the presence of fibroblasts, particularly CAF. This subtype of fibroblast also displayed heightened matrix remodeling capabilities, accompanied by significant secretion of collagens and laminins. This compositional shift correlated with an increase in extracellular matrix stiffness compared to healthy mammary fibroblasts. Finally, a radioprotection phenomenon was demonstrated in the presence of CAF, suggesting their involvement in treatment resistance. This effect coincided with an elevation in cytokine secretion levels. Notably, among these cytokines, CXCL-1, whose expression by the stroma is associated with poor clinical prognosis, exhibited significantly higher expression levels in CAF. However, inhibiting this cytokine did not conclusively radiosensitize the bioprinted model.

In the context of understanding breast cancer and its microenvironment, this thesis underscores a novel, reliable, and clinically relevant model. Its versatility could facilitate the application of this method across different tumor subtypes or primary patient cells in the realm of personalized medicine. Moreover, the identification of stromal impact on treatment response suggests that this model could serve as a platform for testing novel treatments targeting the tumor microenvironment, particularly CAF.

Keywords: Bioprinting, breast cancer, microenvironment, tissue engineering, cancer-associated fibroblasts, radiotherapy

BIOTIS

INSERM U1026, Université de Bordeaux
2 Rue Hoffmann Martinot, 33000 Bordeaux, France.

Remerciements

Je tiens dans un premier temps à remercier Jean-Christophe Fricain et François Paris. Ils m'ont ouvert la porte et ont conçu pour moi un projet qui m'a permis de travailler dans le domaine de la bioimpression qui me tenait tant à cœur. Merci aussi pour votre confiance dans mon travail. Hugo, *obrigado*. Merci d'avoir endosser un rôle de mentor quand j'en ai eu besoin. Merci d'avoir pris le temps de questionner ce que je faisais, de me faire progresser professionnellement dans ma qualité de scientifique, mais aussi humainement. Merci de m'avoir expliqué l'intérêt des conférences et les méthodes pour y valoriser mon travail (la fameuse p* scientifique). Enfin, merci de m'avoir soutenu quand j'étais au creux de la vague, et à l'inverse d'avoir supporté les moments où je débordais d'énergie. J'espère un jour t'arriver à la cheville, bien que je doute d'avoir ta capacité à prendre toujours plus sur tes épaules (par contre je me débrouillerai sûrement mieux pour réparer des toitures).

Merci à tous ceux qui nous entourent au laboratoire et qui y rendent la vie plus agréable, particulièrement à mes collègues doctorants. Merci Naïma, toi qui as commencé en même temps que moi, et qui as su me montrer tout au long de nos thèses respectives ce que veut dire le mot persévérance. Merci à Nicolas, petit ange parti trop tôt, qui savait comment me signaler qu'il passait près de moi dans le couloir et m'a permis de bien rire tout au long de mes deux premières années. Merci à Aurélien, qui m'a rejoint en tant que doctorant officiel de l'ART, d'avoir pris le relais et de m'avoir donné confiance en moi. Un grand merci à l'ART, Marie-Laure, Léo, Julie, Charles, ce groupe fait chaud au cœur et je suis fier d'en avoir fait partie pendant ma thèse. Un merci à Alexandra Elbakyan, sans qui le monde de la recherche fonctionnerait moins bien, et sans qui mon travail n'aurait pas pu être aussi abouti. Au passage, un merci à mon syndrome de l'imposteur de s'être calmé au fur et à mesure de ma thèse pour que je puisse être fier de mon travail, aussi imparfait soit-il.

Enfin merci à tous mes proches. Je me vante d'être un robot mais la vérité c'est que sans votre soutien, ces trois ans et demi auraient été bien plus complexes.

Merci d'abord à ma famille qui, parfois sans trop comprendre pourquoi je fais tout ça, me soutient depuis le début de mon parcours en médecine, dans sa poursuite en recherche, et en qui j'ai confiance pour continuer à me soutenir quand je retournerai finir mes études de médecine. Merci à tous les amis qui m'ont permis de sortir la tête de l'eau, pour un soir (coucou Maxime), quelques jours (les sauvages du DCDDC) ou tout du long.

Un merci particulier à tous mes *Daddys*, Léa, Océane, Maë, Pierre, Victor, Iris, Joris et *last but not least*, Clément. En catégorie à part, Etienne, je t'ai déjà dit tout ce que j'ai sur le cœur donc je ne vais pas écrire un pavé, mais encore merci pour les moments passés avec toi pendant lesquels je peux oublier le reste et profiter de vivre un peu.

Merci aux deux personnes qui m'ont sauvé quand j'étais au plus bas. Sans vous ma dernière année de thèse aurait été très désagréable. Merci d'avoir insisté pour que je prenne soin de moi quand j'étais trop fier pour le faire. Merci de vous être inquiété pour moi, même si ça m'énerve de vous avoir causé du souci, alors que vous avez chacune déjà beaucoup de poids sur les épaules. Merci de m'avoir inspiré par votre ténacité, votre motivation sans pareille, et votre capacité à ne jamais vous arrêter (d'ailleurs vous devriez apprendre ça fait du bien). Vous vous êtes toutes les deux, et sans complètement le savoir, relayées pour me maintenir debout dans la tempête. Aliona, Micaela, merci.

Sommaire

1	Contexte et enjeux : la bioimpression appliquée au cancer du sein	1
1.1	Le cancer du sein	1
1.1.1	Généralités	1
1.1.2	Étiologie et épidémiologie	3
1.1.3	Classification	7
1.1.4	Prise en charge thérapeutique	9
1.2	Le microenvironnement tumoral	10
1.2.1	Les multiples acteurs du microenvironnement	10
1.2.2	Intérêts du microenvironnement dans la thérapie	22
1.3	Modèles d'études contionnels	24
1.3.1	La culture cellulaires <i>in vitro</i>	24
1.3.2	Expérimentation <i>in vivo</i>	28
1.4	Biofabrication et bioimpression appliquées à la modélisation du cancer du sein	30
1.4.1	Définitions	30
1.4.2	Les technologies de bioimpression	32
1.4.3	Les bioencres	37
1.4.4	État de l'art des modèles de cancer du sein bioimprimés	39
1.5	Objectifs du projet	44
2	Ingénierie d'un modèle bioimprimé de cancer du sein	45
2.1	Développement et caractérisation des lignées cellulaires	45
2.2	Optimisation et caractérisation de la bioencre	47
2.2.1	Optimisation des propriétés biologiques	47
2.2.2	Caractérisation mécanique	50
2.3	Bioimpression	52
2.3.1	Viabilité post-impression	52
2.3.2	Impression et reproductibilité du modèle	54
3	Caractérisation et maturation du modèle	58
3.1	Maturation des cellules cancéreuses	58
3.1.1	Évolution de la viabilité	58
3.1.2	Apparition d'un coeur hypoxique	61
3.2	Modulation de la maturation cellulaire en présence du stroma	64
3.2.1	Prolifération des cellules cancéreuses	65
3.2.2	Maturation endothéliale	68

3.3	Maturation de la matrice extracellulaire	72
3.3.1	Composition protéique	73
3.3.2	Propriétés mécaniques	77
4	Réponse aux traitements et modulation stromale paracrine	81
4.1	Évaluation de la réponse du BpBCM à la radiothérapie	81
4.1.1	Optimisation du protocole de traitement	81
4.1.2	Modulation de la réponse à la radiothérapie par les CAF	83
4.2	Modulation paracrine	85
4.2.1	Sécrétion de cytokines	85
4.2.2	Modulation de la radiosensibilité par CXCL-1	88
4.2.3	Modulation endothéliale de la radiosensibilité et sphingolipides	91
5	Discussion, perspectives et conclusion	96
5.1	Modèles cellulaires	96
5.1.1	Cellules cancéreuses du sein	96
5.1.2	Cellules endothéliales	97
5.1.3	Fibroblastes	98
5.1.4	Intégration d'autres types cellulaires	99
5.2	Matrice extracellulaire	101
5.3	Bioimpression	104
5.3.1	Choix de la technologie	104
5.3.2	Design du modèle	105
5.4	Maturation cellulaire	106
5.5	Réponse aux traitements et communication paracrine	109
5.6	Conclusion	113
6	Matériels et méthodes	115
6.1	Culture cellulaire	115
6.1.1	Obtention des lignées cellulaires	115
6.1.2	Transduction des lignées	115
6.1.3	Amplification et maintien des lignées	116
6.2	Caractérisation des lignées	116
6.2.1	PCR	116
6.2.2	Cytométrie	117
6.3	Bioimpression	118
6.3.1	Préparation des bioencres	118
6.3.2	Design et conception sur ordinateur	119
6.3.3	Bioimpression par extrusion	120
6.3.4	Maintien en culture et traitement des modèles	121
6.4	Marqueurs et imagerie	121
6.4.1	Activité métabolique	121
6.4.2	Microscopie	121
6.4.3	Live/Dead	122
6.4.4	Immunofluorescence	122
6.5	Caractérisation des propriétés mécaniques	123

6.5.1	Rhéologie	123
6.5.2	Microscopie à force atomique	123
6.5.3	Quantifications protéiques	124
6.5.4	ELISA	124
6.5.5	Cytokine array	125
6.5.6	Extraction des protéines matricielles	125
6.5.7	LC-MS/MS Spéctrométrie de masse	126
6.6	Analyse bioinformatique	127
6.6.1	Analyse des données d'imagerie	127
6.6.2	Analyse des données de quantifications protéiques	127
6.6.3	Analyse statistique	128
6.6.4	Représentation des données	128
A	Valorisation des travaux	129
B	Code source - analyse de la reproductibilité	131
C	Code source - analyse de la prolifération	139
D	Code source - analyse des structures microvasculaire	151
E	Code source - analyse des données de protéomiques	156
F	Liste des abréviations	177

Table des Figures

1	Progression du cancer du sein [6]	2
2	Sites métastatiques du cancer du sein [7]	3
3	Incidence et mortalité du cancer du sein dans le monde [15]	5
4	Carte du monde représentant la cause principale de mortalité par cancer par pays [15]	6
5	Principaux sous-types tumoraux et leur traitement [21]	8
6	Le microenvironnement tumoral du cancer du sein	11
7	Sous-types de CAF dans le cancer du sein [41]	13
8	Origines multiples des CAF [44]	15
9	Communication paracrine des CAF avec les cellules cancéreuses après radiothérapie [54]	17
10	Développement du réseau vasculaire tumoral [61]	18
11	Mécanisme d'action du VEGF sur l'angiogenèse [67]	20
12	Stratégies thérapeutiques ciblant les CAF [86]	23
13	Modèles d'études <i>in vitro</i> [94]	26
14	Occurrence des termes biofabrication et bioimpression sur PubMed	31
15	Principales technologies de bioimpression [110–112]	33
16	Fréquence d'utilisation des différentes méthodes de bioimpression [113]	35
17	Avantages et inconvénients des technologies d'impression	37
18	Principales bioencres et méthodes de polymérisation [113]	38
19	Etat de l'art des modèles de cancer du sein bioimprimés	41
20	Expression des rapporteurs fluorescents et de marqueurs spécifiques	46
21	Composition et fonctionnalisation de la bioencre	48
22	Caractérisation mécanique de la bioencre	51
23	Viabilité cellulaire post-impression	53
24	Impression du modèle et reproductibilité	55
25	Représentation schématique du modèle de cancer du sein bioimprimé (Bp-BCM)	57
26	Évolution de la viabilité des cellules cancéreuses à 7 jours	60
27	Apparition d'un cœur hypoxique et d'une surface proliférative au sein du modèle	63
28	Croissance du centre cancéreux avec l'introduction de la périphérie stromale	67
29	Bi-culture des modèles et modulation de la croissance tumorale	68
30	Maturation des structures microvasculaire dans la périphérie stromale	70
31	Marqueur de maturation et organisation 3D des réseaux microvasculaires	72

32	Heatmap des 2408 protéines quantifiées par protéomique	74
33	Heatmap des différents sous-types de protéines matricielles	76
34	Analyse d'enrichissement à jour 7 des CAF par rapport aux NMF	77
35	Évaluation des propriétés mécaniques par microscopie à force atomique des BpBCM maturés	79
36	Traitement radio/chimiothérapeutique de modèles triCAF	82
37	réponse différentielle à la radiothérapie entre les modèles triCAF et triNMF	84
38	Heatmap de l'ensemble des cytokines détectées	86
39	Expression cytokiniques après irradiation	87
40	Expression et sécrétion de CXCL-1	89
41	CRISPR KO du CXCL-1	90
42	Effet de CXCL-1 sur la réponse à la radiothérapie des modèles triCAF .	91
43	Effet des cellules endothéliales sur la radiosensitivité	92
44	Quantification des lipides sécrétés	93
45	inhibition des céramides pendant la radiothérapie	95
46	Représentation schématique de l'obtention des différentes bioencres	119
47	Modèle CAD pour l'impression du BpBCM	120
48	Microscopie à Force Atomique en spectrométrie de force	124
49	Protocole de quantification protéomique	126

Chapitre 1

Contexte et enjeux : la bioimpression appliquée au cancer du sein

1.1 Le cancer du sein

1.1.1 Généralités

Le sein est un organe à fonction exocrine se développant chez la femme. On y retrouve majoritairement du tissu adipeux, dans lequel se trouve le système exocrine permettant l'allaitement. Ces glandes sont composées de cellules épithéliales qui s'organisent en lobules puis en canaux qui convergent pour acheminer les sécrétions au mamelon. La fonction sécrétoire est contrôlée par des signaux hormonaux, notamment durant les cycles menstruels, mais aussi en post-partum par la prolactine.

Une hyperplasie atypique dans cet organe est un signe d'appel pour l'apparition d'une tumeur. Dans plus de 99% des cas, elle est liée aux cellules épithéliales lobulaire ou canalaire, qu'on définit alors comme un adénocarcinome [1]. La tumeur se développe dans un premier temps *in situ* en respectant l'intégrité de la lame basale qui sépare le tissu glandulaire du tissu stromal (**Figure 1**). Une tumeur restant localisée et ayant peu de risque d'envahissement des tissus adjacents est bénigne mais fera l'objet d'une surveillance médicale accrue.

Au stade invasif, la tumeur primaire dégrade la lame basale et se développe dans le tissu stromal. Les tumeurs invasives représentent 23% de l'ensemble des cancers du sein au moment de leur diagnostic [2] et sont les plus fréquemment diagnostiquées avec 287 500 nouveaux cas estimés en 2022 aux Etats-Unis contre seulement 51 400 *in situ* [3]. La fréquence de ce stade tumoral justifiera l'intérêt qu'y portera cette thèse. A ce stade, les cellules tumorales sont en contact direct et paracrine avec l'ensemble des cellules stromales,

ainsi que les cellules immunitaires. La croissance tumorale entraîne aussi l'apparition d'un cœur hypoxique [4], qui va affecter les capacités prolifératives tumorales et par conséquent favoriser une résistance aux traitements par radiations ionisantes et chimiothérapies. L'hypoxie induit aussi une pression de sélection qui favorise entre autres les signaux pro-angiogéniques, permettant le développement d'une vascularisation intra-tumorale et donc une continuation de la croissance tumorale [5].

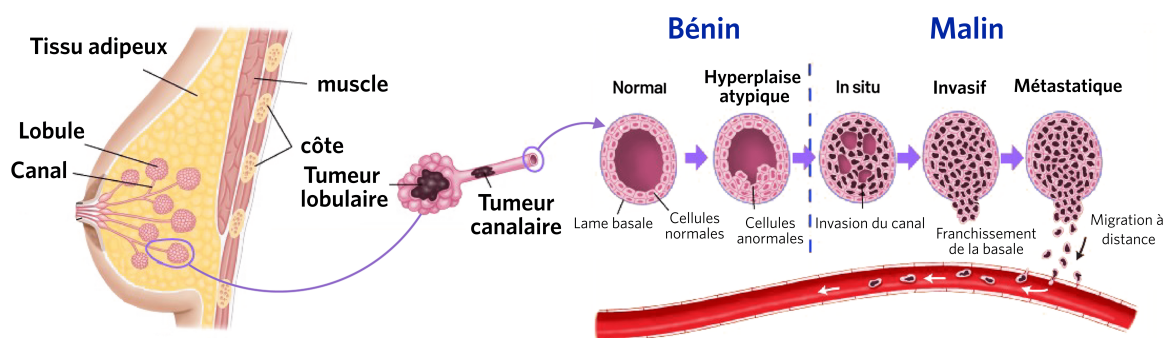


Figure 1: Progression du cancer du sein [6]

Le passage des cellules tumorales dans ces structures vasculaires, et lymphatiques, puis vers d'autres organes, définit le stade métastatique. L'enchaînement de ces étapes de tissu sain à cancer métastatique est illustré en **Figure 1**.

Entre 20 à 30% des patients développent une récurrence tumorale à distance [7]. Les premiers sites envahis sont les ganglions à proximité de la tumeur primaire. L'organe à distance le plus touché par les métastases du cancer du sein est l'os. On retrouve ensuite les poumons, le foie, et le cerveau (**Figure 2**) [7, 8]. Ces différents tissus ont une vascularisation dense, on peut supposer que cela augmente la probabilité d'extravasation des cellules cancéreuses et donc de métastase. Les environnements matriciels et cellulaires de ces tissus sont propices au développement tumoral [9]. On parle de l'hypothèse 'seed and soil' ou 'graine et sol', avancée par Stephen Paget. Une compatibilité serait nécessaire entre les cellules cancéreuses et leur environnement afin d'observer un développement tumoral métastatique (**Figure 2**).

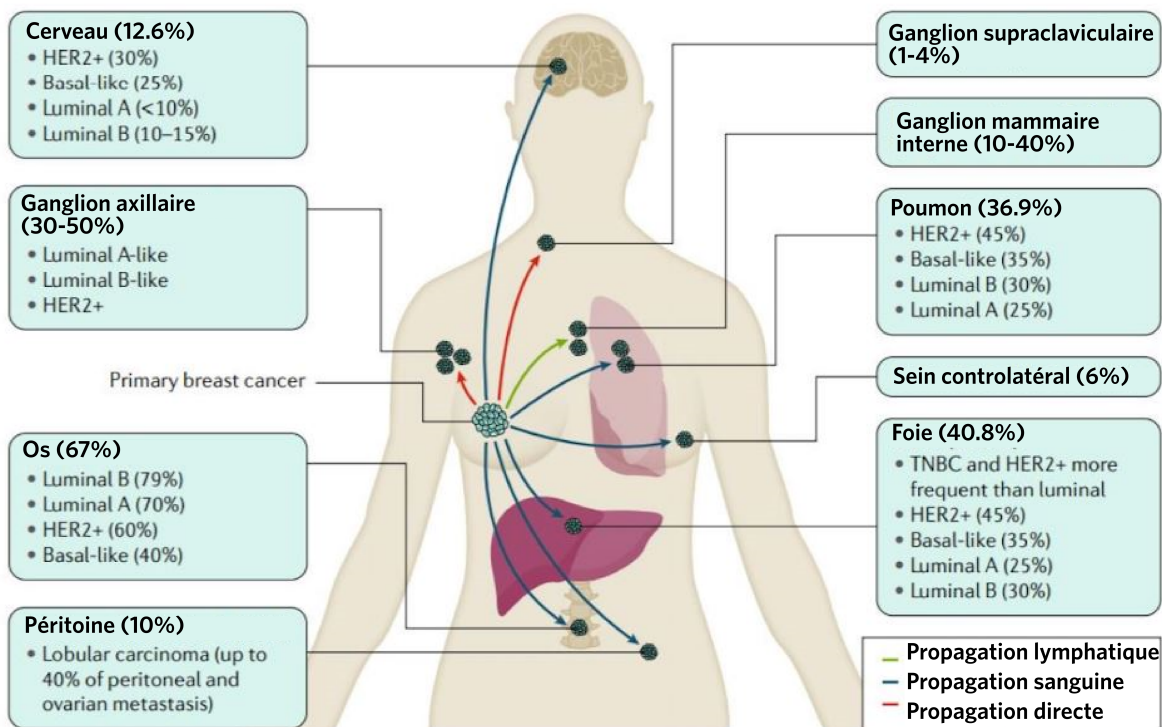


Figure 2: Sites métastatiques du cancer du sein [7]

1.1.2 Étiologie et épidémiologie

Étiologie

L'apparition d'un cancer du sein est un phénomène probabiliste lié au devenir des cellules épithéliales. Cependant, ce risque est modulé par des facteurs environnementaux et génétiques.

L'exposition aux facteurs hormonaux est un acteur majeur dans la survenue du cancer. Il semblerait notamment que l'augmentation de l'exposition aux oestrogènes endogènes induit une augmentation du risque [10]. Cela se traduit par exemple par une réduction du risque corrélée aux nombres de grossesses, celles-ci interrompant les cycles menstruels. Inversement, une puberté précoce ou une ménopause tardive induit une augmentation du risque.

De la même façon les facteurs hormonaux exogènes, tels que les contraceptifs oraux et le traitement hormonal substitutif augmentent l'incidence. On retrouve une multiplication du risque entre 1.1 et 2.1 selon la durée d'utilisation de ce dernier traitement [noauthor' <https://www.cancerfrprofessionnels-santeles-chiffres-du-cancer-en-france/epidemiologie>]

Le mode de vie influe aussi également sur le risque. Le surpoids et l'obésité ainsi que la sédentarité sont liés à une augmentation du risque [11]. La consommation d'alcool et le tabagisme ont aussi été confirmée comme facteurs de risque du développement de la pathologie par le WCRF (World Cancer Research Fund 2017).

L'exposition aux radiations est un facteur de risque mis en évidence grâce aux études de cohortes réalisées sur les survivants des bombardements d'Hiroshima et Nagasaki [11]. Une exposition faible mais répétée pourrait aussi entraîner un surrisque, posant la question du risque lié aux dépistages systématiques par mammographie, notamment pour les femmes exposées dès 30 ans [11]. L'accumulation de ces différents facteurs, malgré des risques relatifs pour la plupart faibles, est estimée comme responsable de 70% des cancers post-ménopausiques.

Certaines prédispositions génétiques favorisent aussi l'apparition de cancer du sein. Les plus notables sont les mutations monogéniques de BRCA1 et BRCA2. Leur fonction est liée à la réparation de l'ADN, au contrôle du cycle cellulaire ainsi qu'à la régulation de la transcription. Une perte de cette fonction due à une mutation entraîne un risque relatif 10 fois supérieur à la normale de développer un cancer du sein [12]. Ces mutations étant transmissibles des parents à l'enfant, on retrouve des altérations de BRCA1 et BRCA2 dans la majorité des formes familiales de cancer du sein [13].

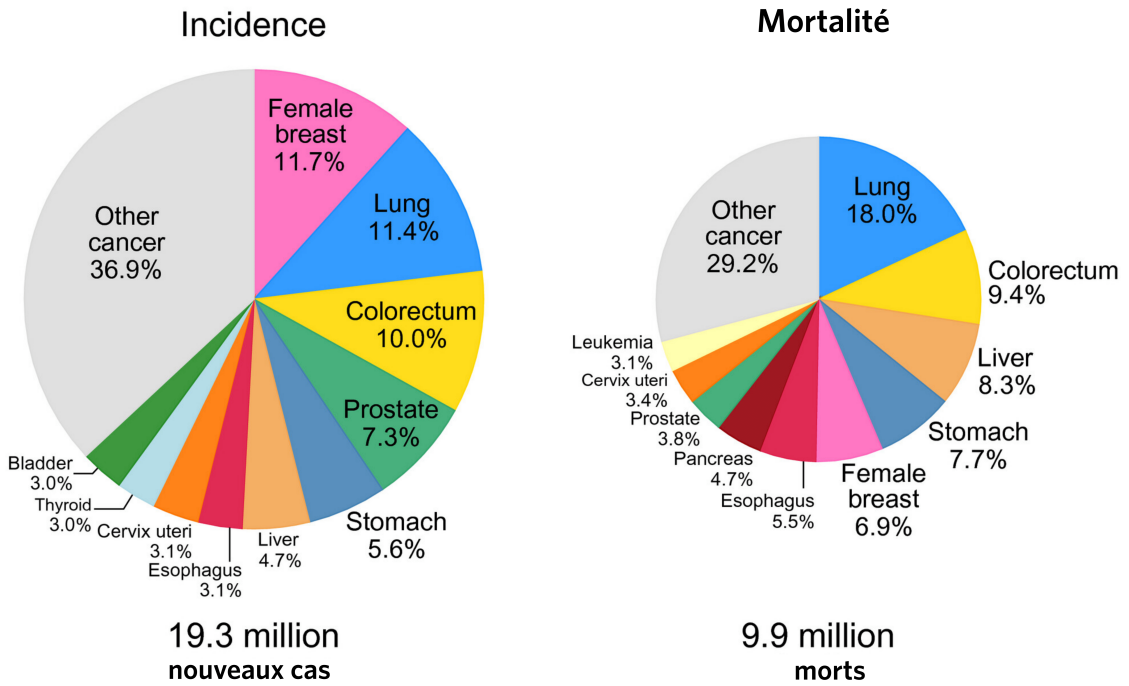
Plus rarement, on retrouve des mutations des gènes TP53 ou STK11 qui entraîne un risque cumulé d'apparition de cancer du sein entre 40 et 90% [14]. Le risque induit par une mutation des gènes PTEN ou CDH1 est pour leur part entre 25% et 60% [14].

Épidémiologie

Le cancer du sein est la pathologie cancéreuse la plus fréquente, avec 11.7% de l'ensemble des cancers diagnostiqués dans le monde en 2020, tout sexes confondus, correspondant à un total estimé de plus de 2 millions de cas [15]. Cette incidence a notamment augmenté entre 1990 et 1999 de 1.2% par an avant de décroître dans les 20 dernières années [16].

L'augmentation initiale est attribuée à l'évolution du mode de vie de la population, favorisant l'exposition à certains facteurs de risques, mais aussi à l'augmentation du dépistage à cette période. La diminution plus récente est en partie expliquée par la baisse de prescription de thérapie hormonale chez les femmes ménopausées.

Tout sexes confondus



Femmes

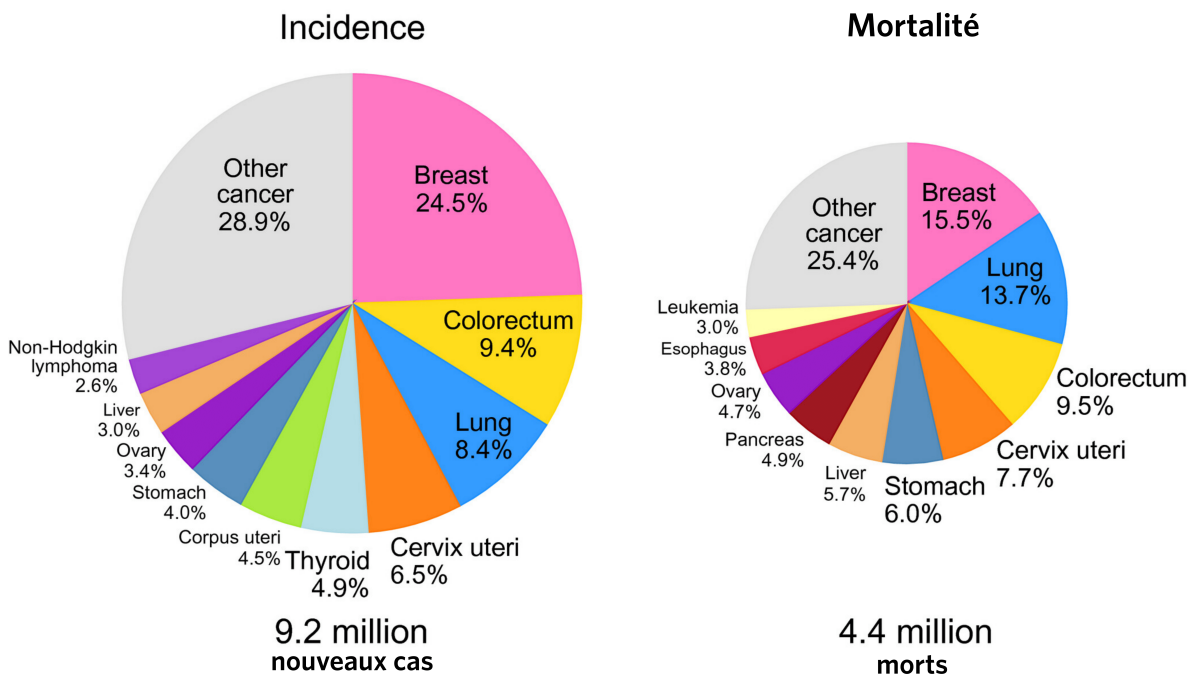


Figure 3: Incidence et mortalité du cancer du sein dans le monde [15]

- a. Tout sexes confondus
- b. Chez les femmes seulement

On notera cependant que cette diminution d'incidence ne s'est pas retrouvée dans le

cas des cancer *in situ*. Dans plus de 99% des cas, le cancer du sein touche des femmes. Il représente donc dans cette population 24.5% des cancers (**Figure 3b**). Malgré un pronostic relativement meilleur que les autres cancers les plus fréquents, le cancer du sein reste chez la femme le plus mortel. On estime à presque 700,000 le nombre de morts pour l'année 2020, représentant 15.5% des morts imputables au cancer chez la femme (**Figure 3b**) [15]. Cette mortalité élevée s'explique par son incidence plus de 2 fois plus élevée que le cancer du côlon, qui est le second plus fréquent.

Depuis 30 ans, on observe une diminution de la mortalité liée au cancer du sein, avec un taux de survie à 5 ans augmentant de 86% à 88% entre 1989 et 2010 [10]. Cette amélioration est attribuable principalement à des diagnostics plus précoces ainsi qu'à une meilleure efficacité des soins.

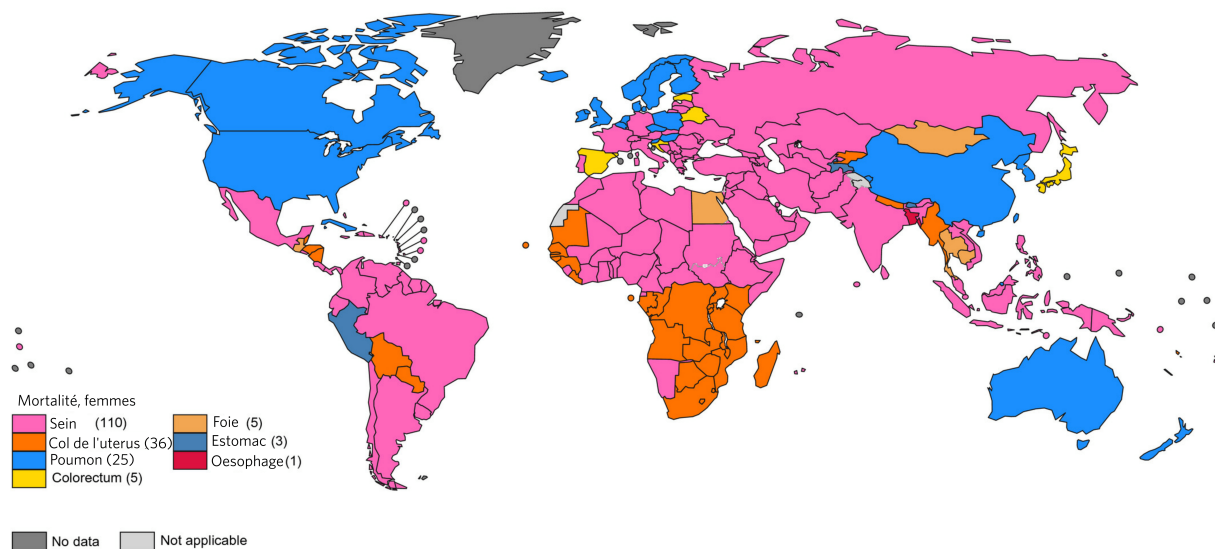


Figure 4: Carte du monde représentant la cause principale de mortalité par cancer par pays [15]

La distribution géographique de la mortalité liée aux cancers classe en première position le cancer du sein dans 110 pays. Le cancer du col de l'utérus et le cancer des poumons viennent ensuite, représentant, à eux deux, 71 des pays restants [15] (**Figure 4**). Cette variabilité géographique est en partie explicable par les variations de conditions socio-économiques et démographiques. Par exemple, dans les pays avec des espérances

de vie plus basses, donc des populations plus jeunes et moins à risque de développer des cancers du sein notamment en Afrique Sub-Saharienne, on constate une prédominance du cancer du col l'utérus.

L'ensemble de ces observations épidémiologiques font du cancer du sein un enjeu de santé publique d'envergure mondiale. L'impact socio-économique d'une maladie si fréquente et lourde à traiter est important en termes de qualité de vie mais aussi en coût pour les systèmes de santé.

1.1.3 Classification

Le terme 'cancer du sein' regroupe un grand nombre de pathologies aux origines proches mais avec une évolution variable, au point de vue phénotypique et génétique. Ces variabilités à l'échelle de la tumeur entraînent des différences de réponse aux traitements. Identifier les différents sous-types de cancer du sein est donc essentiel au moment du diagnostic, afin de pouvoir orienter la stratégie thérapeutique vers celle ayant le plus de chances de succès.

Classification histologique, phénotypique et pronostique

Historiquement, les premières classifications du cancer du seins ont été faites à partir des observations histologiques et morphologiques du tissu pathologique. L'OMS a mis à jour cette classification en 2012, version actuellement en vigueur.

Les cancers sont d'abord classés en fonction de leur envahissement, décrit plus tôt dans cette introduction. On retrouve donc des tumeurs *in situ* ou infiltrantes.

Les deux principaux types de carcinomes infiltrants sont le type canalaire et le type lobulaire. Ils représentent respectivement 50-75% et 5-15% des cas [2]. Les tumeurs de types lobulaires sont caractérisées par une morphologie cellulaire de petite taille, avec peu de mitoses et une absence de cohésion des cellules due à la perte de l'E-cadhérine. A l'inverse, les tumeurs canalaires reproduisent l'architecture acineuse, avec des cellules cohésives. On retrouve au total une vingtaine de carcinomes infiltrants du sein, dont les autres sous-types ne seront pas détaillés ici.

Les critères de Nothingam [17, 18] permettent la classification de la tumeur et l'évaluation du pronostic. On y retrouve le grade histopronostic, qui attribue un score entre 1 et 9, se basant sur le degré de différenciation tumoral, le pléomorphisme nucléaire et le nombre de mitoses. Un score inférieur à 6 correspond au grade I, 6-7 correspond au grade II et

enfin 8-9 correspond au grade III. A cela s'ajoute l'évaluation de la taille de la tumeur et l'envahissement des ganglions axillaires. La somme de ces mesures définit l'index pronostic de Nottingham.

L'expression de récepteurs permet la classification des cellules tumorales. Les récepteurs hormonaux (HR) aux oestrogènes (ER) et à la progestérone (PR) permet d'évaluer le pronostic et de cibler le traitement. Une expression élevée de ER est associée à un plus bas grade histopronostic [19]. De la même façon, le niveau d'expression de PR est positivement corrélé à la survie à 5 ans [20].

Le statut du récepteur *Human Epidermal Growth Factor Receptor-2* (HER2), codé par l'oncogène ERBB2, est essentiel pour le pronostic et le traitement des patientes. L'expression de HER2 est corrélée au statut prolifératif des cellules cancéreuses, et donc à un pronostic moins favorable [21].

L'absence d'expression de ces trois marqueurs est le sous-type Triple Négatif (TN). Celui-ci est de mauvais pronostic, avec une survie à 5 ans de seulement 77% contre 93% pour les autres types de cancer du sein [22]. Ce pronostic est notamment lié aux hautes capacités métastatiques de ce cancer, ainsi qu'à l'absence de thérapie ciblée.

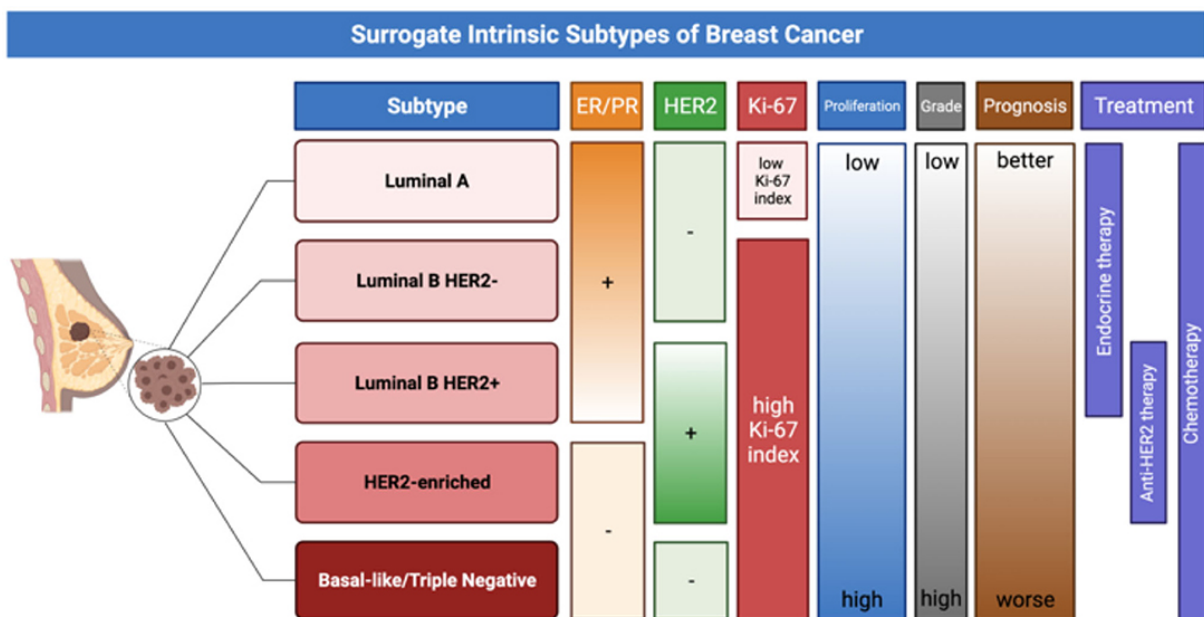


Figure 5: Principaux sous-types tumoraux et leur traitement [21]

Classification moléculaire

Au début des années 2000, avec l'essor des technologies de caractérisation moléculaire, notamment des tests d'expression génique sur puce, a permis la caractérisation rapide du statut génétique des tumeurs, aboutissant à une classification moléculaire [23–25]. Cinq sous-types moléculaires principaux ont été identifiés, concordant avec l'index de Nottingham et de l'expression des différents récepteurs (**Figure 5**).

Les tumeurs lumineales A, avec un faible grade histopronostic et fréquemment une expression de ER et PR. Les tumeurs lumineales B, de plus haut grade, se distinguent par une prolifération plus élevée et une expression moindre des récepteurs hormonaux. Ces caractéristiques induisent un pronostic moins bon que le sous-type luminal A [24]. Le sous-type luminal représente dans son ensemble 70% des cas [26], on regroupera pour simplifier ces sous-types luminal A et B dans le terme HR+.

On identifie ensuite les tumeurs dites HR négative, n'exprimant ni ER ni PR. On distingue le sous-type HER2+, qui exprime l'oncogène ERBB2. Le sous-type 'basal-like', proche du TN, fait aussi partie de cette catégorie. Il est associé à un haut grade histopronostic, et représente un total de 15% des carcinomes canauxaires infiltrants. Avec le sous-type ERBB2+, il s'agit de celui ayant le plus mauvais pronostic.

Des métastases de ces différents sous-types sont associées à une survie médiane de 2.2 et 1.6 ans pour les tumeurs lumineales A et B respectivement, pour seulement 0.7 et 0.5 ans pour les tumeurs ERBB2+ et basal-like [8].

1.1.4 Prise en charge thérapeutique

Suite à l'identification du sous-type tumoral, une stratégie thérapeutique est établie. Dans la majorité des cas, excepté certaines tumeurs métastatiques, celle-ci débute par une résection tumorale chirurgicale. Selon l'invasion des tissus conjonctifs, des ganglions et du sous-type, la résection peut être étendue de la tumeur elle-même, à un lobe entier du sein, voire à une mastectomie complète.

Ce traitement local est souvent complété par une radiothérapie. Ce traitement ionisant, induisant des cassures double-brin de l'ADN cellulaire, a démontré une fréquence des récurrences locales à 10 ans abaissée de 35% à 19.3%, entraînant une réduction de la mortalité à 15 ans chez les patientes n'ayant pas d'invasion des ganglions axillaires [27]. Dans les tumeurs avec une invasion des ganglions axillaires, la réduction est d'autant plus marquée avec une diminution absolue de 21.2% du risque de récurrence locale à 10

ans. Encore 42.5% des patientes dans ce dernier cas ont des récurrences locales. Une meilleure compréhension des effets de la radiothérapie permettrait d'optimiser son efficacité. Ce traitement sera donc particulièrement exploré au cours de ces travaux de thèse.

Après ces traitements locaux, la stratégie s'oriente vers les traitements systémiques. Pour les tumeurs HR+/HER2-, on emploie systématiquement une thérapie endocrine (**Figure 5**), avec des anti-oestrogènes, qui a démontré une division par 2 du risque de récurrence à 5 ans [26]. Une résistance aux traitements endocrines ou un grade avancé peuvent entraîner la nécessité d'ajouter un traitement par chimiothérapie. Dans le cadre d'une tumeur HER2+, le traitement standard inclut une chimiothérapie associée à un anticorps ciblant le récepteur HER2 (trastuzumab). Cette thérapie ciblée a en effet démontré une réduction absolue de la récurrence et de la mortalité à 10 ans de 9% et 6.4% respectivement [27]. Cet effet est d'autant plus important que le grade de la tumeur est élevé. Si la tumeur est aussi HR+, on peut y associer une thérapie endocrine (**Figure 5**). Enfin, pour les cancers TN, il n'existe pas de thérapie ciblée, on traite donc systématiquement avec une chimiothérapie les patients (**Figure 5**). Les molécules utilisées et souvent combinées sont, entre autres, l'Adriamycine, la Cyclophosphamide et le Paclitaxel [26]. Récemment, il a été mis en évidence qu'une immunothérapie anti PD-1/PD-L1 en combinaison à la chimiothérapie améliorerait significativement la survie [28].

L'ensemble de la prise en charge thérapeutique, excepté les immunothérapies décrites ci-dessus, se concentre sur l'atteinte des seules cellules cancéreuses. Cependant la tumeur n'est pas uniquement composée de ce type cellulaire. Nous allons maintenant décrire ces autres éléments et discuter leur intérêt d'un point de vue thérapeutique.

1.2 Le microenvironnement tumoral

Le microenvironnement tumoral (TME) représente l'ensemble des éléments cellulaires, matriciels, et facteurs solubles qui sont retrouvés autour des cellules tumorales. Cette section se concentrera sur la description du microenvironnement et de son rôle crucial dans les divers mécanismes régissant la progression tumorale et sa réponse aux traitements.

1.2.1 Les multiples acteurs du microenvironnement

Le microenvironnement comprend plusieurs éléments, cellulaires et matriciels, représentés en **Figure 6**.

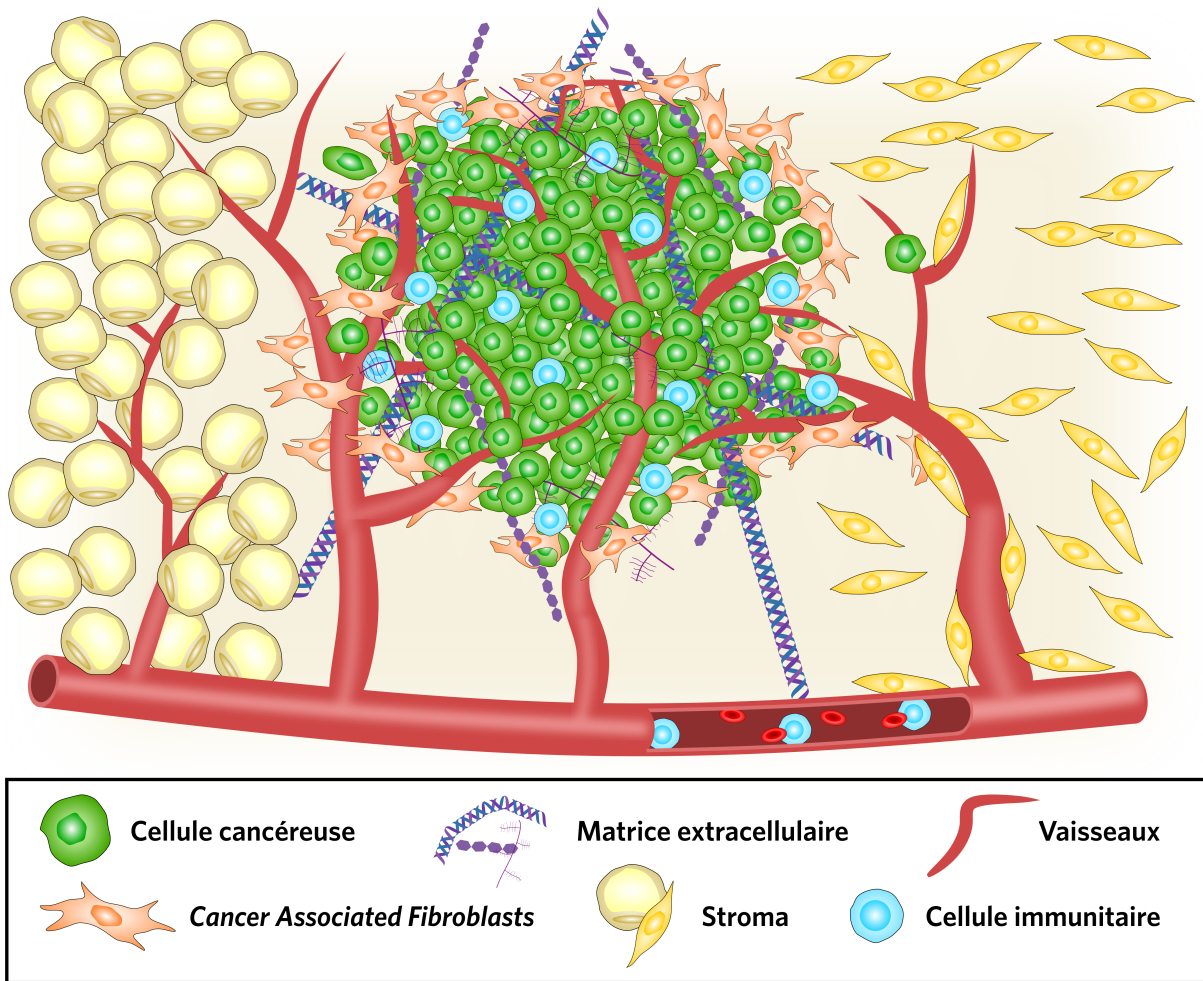


Figure 6: Le microenvironnement tumoral du cancer du sein

Matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire (MEC) représente un ensemble d'éléments protéiques, de glycoprotéines et de polysaccharides se trouvant à l'extérieur des cellules. Elle joue un rôle fondamental dans le maintien de l'intégrité structurale des tissus, interagissant de manières biochimique et mécanique avec les cellules environnantes. De plus, elle constitue un milieu crucial pour la diffusion des différentes molécules nécessaires à l'homéostasie et la communication paracrine.

Au cours du développement du cancer du sein, une augmentation significative de la fibrose du tissu est observée. La taille de cette zone fibreuse est prédictive du risque de métastases [29]. Ceci s'explique par les collagènes fibrillaires, protéines majoritaires dans

le tissu fibreux, qui s'alignent et permettent alors une migration des cellules tumorales accrues [30]. L'analyse de cette réorganisation du collagène a permis d'établir des signatures dont certaines corrélées avec le pronostic [30, 31]. Ces collagènes dits fibrillaires sont notamment les types I, III et V, sur-représentés dans le tissu cancéreux comparativement au tissu sain. Ils représentent la majorité des protéines de la MEC [32]. A l'inverse, on observe une diminution du collagène IV, composant essentiel de la lame basale qui est dégradée lorsque le cancer dépasse le stade *in situ* [33]. Le collagène VI, bien qu'il soit non fibrillaire mais pouvant s'associer au collagène I, est également fortement exprimé dans les tumeurs du sein. Il jouerait un rôle dans le contrôle de l'inflammation et de l'angiogenèse [34]. Les rôles de cette protéine ont été mis en parallèle avec un glycosaminoglycane : l'acide hyaluronique.

Par ailleurs, un lien a pu être établi entre la concentration sérique en HA, notamment de bas poids moléculaire, et le statut métastatique tumoral [35, 36]. La présence de ces molécules de petites tailles est associée à une augmentation du remodelage tissulaire, avec une sécrétion accrue de hyaluronidase dans le microenvironnement cancéreux [35]. Ce remodelage est en même temps soutenu par la surexpression des métalloprotéinases matricielles (MMP), qui dégradent entre autres les matrices collagéniques. La MMP-14 a notamment été identifiée comme nécessaire pour les processus de migration collective [33]. La MMP-2, dont la concentration sérique est de mauvais pronostic, n'agit pas seulement sur la dégradation du collagène mais aussi de la laminine-332 [33]. Cette laminine est associée à une augmentation de l'agressivité tumorale, via les interactions avec les intégrines transmembranaires des cellules du carcinome.

Il est donc essentiel d'étudier le cancer du sein dans des modèles tenant compte de ces éléments clés, tels que le collagène, l'HA et la laminine. Cette approche permet une discussion approfondie des recherches menées dans des modèles dépourvus de MEC. Il convient également de noter que d'autres glycoprotéines jouent un rôle crucial dans le microenvironnement tumoral, notamment la fibronectine, qui contribue à la fibrose, ainsi que l'ostéopontine, la ténascine C, et la périostine [33].

L'ensemble de cette MEC offre un environnement où les différentes cellules du microenvironnement évoluent. Elles en reçoivent des signaux et la remodelent à la fois, changeant ses propriétés de manière dynamique.

Fibroblastes

Les fibroblastes représentent le type cellulaire le plus abondant du microenvironnement tumoral [37, 38]. En condition physiologique, ils adoptent une morphologie en fuseau

[39], et sont issus d'un large éventail de cellules mésenchymateuses. Dans le cadre du cancer, une grande hétérogénéité de ces cellules a été observée, et rend leur caractérisation complexe et souvent confuse dans la littérature [38].

L'absence d'expression de marqueur épithélial (E-Cadherin) et endothélial (CD31) constitue la première étape de l'identification de ces cellules.

On retrouve ensuite l' α Smooth Muscle Actin (α SMA), premier marqueur de ces cellules, qui reste aujourd'hui le plus utilisé [37]. Ce marqueur est lié à la mobilité et la contractilité des fibroblastes, attestant d'un phénotype myofibroblastique. Sa surexpression dans le stroma du cancer du sein est associée à un pronostic moins favorable [37, 40]. Cependant, sa sensibilité a par la suite été remise en cause, certains sous-types n'exprimant pas ce marqueur [37, 41], de même que sa spécificité, puisqu'il est exprimé par les péricytes et les cellules musculaires lisses [38].

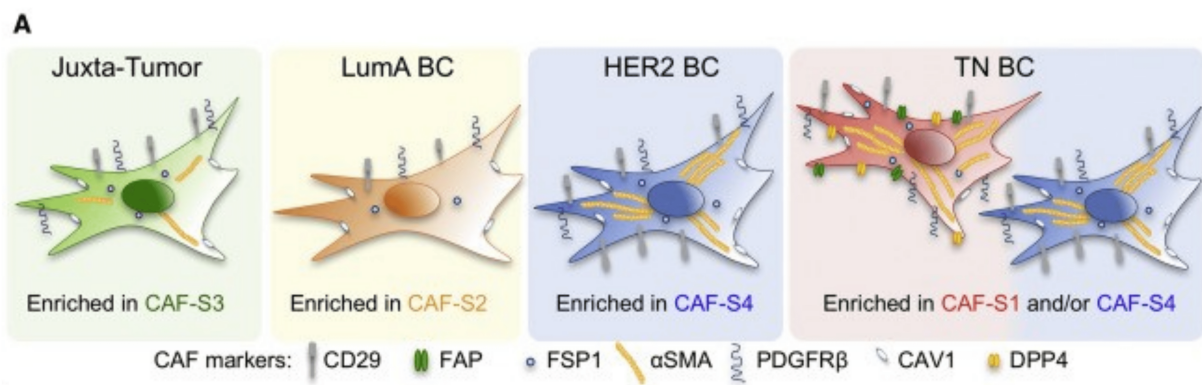


Figure 7: Sous-types de CAF dans le cancer du sein [41]

Le Fibroblast Activation Protein (FAP) est le deuxième marqueur le plus fréquemment avancé dans la littérature. Cette protéine membranaire est impliquée dans les mécanismes de réparation tissulaire. Il est surexprimé dans 90% des carcinomes [37], cependant la corrélation entre son expression et le pronostic est encore sujette à débat [38]. Une fois de plus, son expression par d'autres types cellulaires et, à l'inverse, son absence d'expression par certains sous-types limitent la pertinence de ce marqueur seul [37].

La famille des *Platelet-derived growth factor receptors* (PDGFR) est aussi souvent utilisée pour son expression dans une grande majorité des fibroblastes. Il s'agit d'un marqueur peu spécifique mais très sensible pour les fibroblastes [37]. D'autres marqueurs, avec les mêmes limites et moins utilisés, ont été identifiés : CD29, Col11A1, CAV1 de manière

non exhaustive [37–39]. Cependant, aucun de ces marqueurs n’est suffisant à lui seul pour conclure sur le type de fibroblaste étudié.

Pour cette raison, Costa *et al.* ont de clarifié la classification des fibroblastes retrouvés dans la zone tumorale du cancer du sein, dits fibroblastes associés au cancer (CAF), en co-marquant des cellules issues de tumeur pour plusieurs de ces marqueurs [41]. Cette étude a mis en évidence 4 sous-types principaux de CAF (**Figure 7**). Leur abondance varie selon les sous-types tumoraux, mais aussi selon leur localisation par rapport à la tumeur. Ainsi, on retrouve en position juxta-tumorale le sous-type S3, notablement négatif ou exprimant faiblement l’ α SMA. Le sous-type S1, α SMA^{pos}, FAP^{pos} et CD29^{pos} est sureprésenté dans les tumeurs de type triple-négatif, comme le type S4 qui lui n’exprime pas FAP. Ce dernier sous-type est retrouvé abondamment dans les cancers HER2+. Les CAF S2, négatifs à l’ensemble de ces marqueurs, sont pour leur part retrouvés en dans les tumeurs luminales A (**Figure 7**).

Une caractérisation non approfondie du sous-type de CAF peut entrainer des résultats contradictoires d’une étude à l’autre [37]. L’identification des CAF est donc essentielle pour la clarté et l’interprétation des résultats obtenus avec ces cellules.

L’origine de ces cellules reste aujourd’hui débattue, et est probablement hétérogène, ce qui pourrait aussi expliquer l’hétérogénéité retrouvée entre les sous-types de CAF (**Figure 8**) [38, 39, 42]. On retrouve notamment l’activation des fibroblastes tissulaires résidents induite par le TGF- β sécrété dans le microenvironnement [38, 43]. La transition vers un phénotype mésenchymateux des cellules épithéliales et endothéliales, et la transdifférenciation des autres cellules stromales sont aussi suspectées comme mécanisme d’émergence de CAF. [38, 44]. Finalement, certains CAF pourraient trouver leur origine dans le recrutement par la tumeur de cellules circulantes.

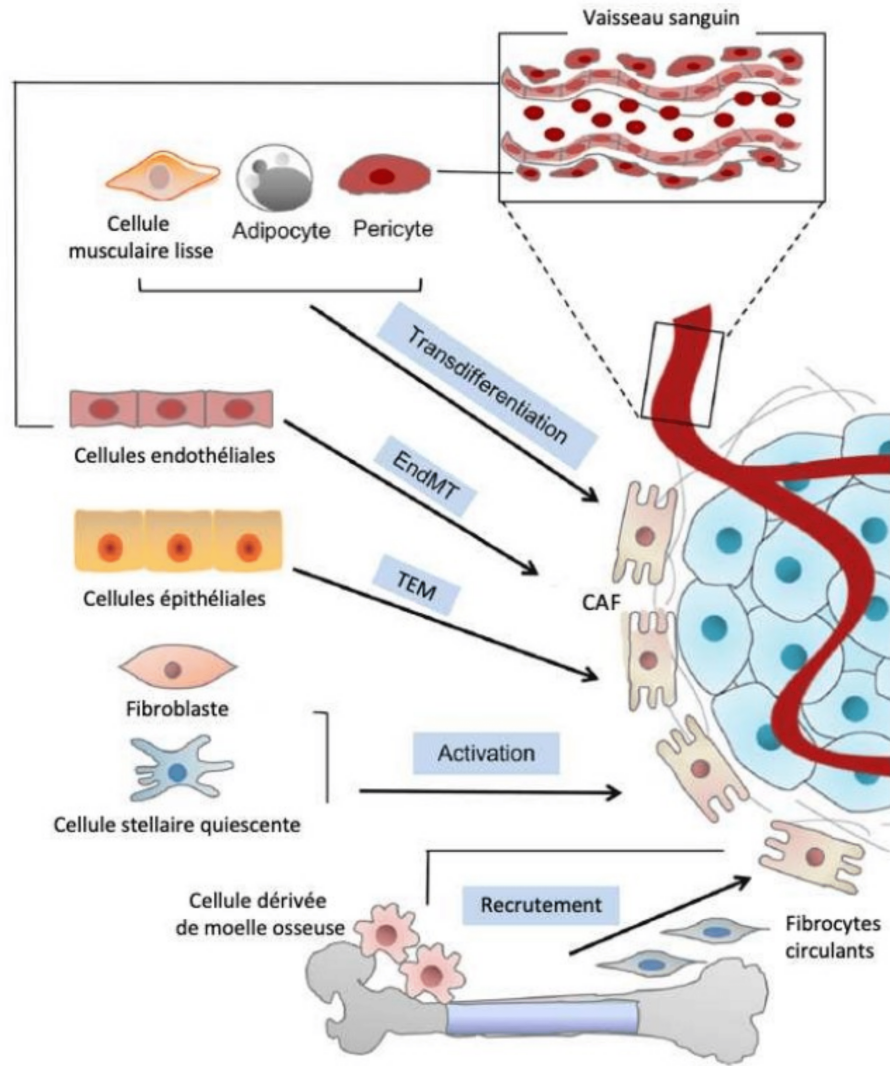


Figure 8: Origines multiples des CAF [44]

On notera que la plupart des études caractérisant cette différenciation vers un phénotype CAF se basent sur une définition des CAF à partir du marqueur α SMA. On peut donc imaginer qu'avec une définition plus large incluant les autres types de CAF, d'autres mécanismes pourraient être à l'œuvre dans l'apparition de chacun des sous-types.

La présence des CAF dans le microenvironnement tumoral leur permet de communiquer avec les autres éléments et notamment les cellules tumorales. L'impact de cette communication sur la progression tumorale est un aspect clé de l'évolution du cancer. On retrouve en effet une sécrétion de facteurs paracrines favorisant plusieurs mécanismes. Buchsbaum *et al.* ont recensé l'implication du TGF- β , du *Fibroblast Growth Factor*

(FGF), et de la cytokine CXCL-12, ayant un effet promoteur de la prolifération des cellules tumorales. Ces mêmes cytokines entraîneraient une augmentation des métastases [38]. Le TGF- β sécrété par le stroma a aussi été décrit comme participant à la transition épithélio-mésenchymateuse [45]. La cytokine CXCL-1, surexprimée en présence de TGF- β , pourrait médier ces mécanismes [46].

Un effet important des CAF sur la régulation des cellules immunitaires du microenvironnement a aussi fait l'objet de plusieurs études [38]. Les sous-types S4 et particulièrement S1 ont fait l'objet d'études approfondies mettant en lumière leur rôle immunosuppresseur [41, 47]. Les fonctions des sous-types S3 et S2 sont pour l'instant les moins étudiées dans la littérature, probablement en raison de leur absence d'expression de l' α SMA et de FAP les ayant exclus de la plupart des études sur le sujet.

Les CAF apparaissent aussi comme essentiels au remodelage matriciel du microenvironnement. Sapudom *et al.* ont caractérisé à la fois une surexpression de la Hyluronan Synthase 2 et des hyaluronidases HYAL1 et HYAL2 [48]. De plus, les CAF déposent une quantité accrue de fibronectine dans la MEC [38]. La modulation du collagène, notamment par la sécrétion des collagènes de type I et VI, et des MMP-2/9 et 14, représente aussi un rôle majeur des CAF [43]. Ces capacités de digestion de la matrice seraient aussi impliquées dans la migration guidée des cellules cancéreuses au front tumoral [43].

Enfin, et en lien avec ces précédentes caractéristiques, les CAF auraient un potentiel pro-angiogénique [38]. Des études de co-implantation *in vivo* de CAF et de cellules tumorales ont pu démontrer leur effet, non seulement sur l'accélération de la croissance tumorale, mais aussi sur l'augmentation de sa vascularisation [49]. En plus des effets médiés par les cytokines, les CAF seraient capables de promouvoir la vascularisation tumorale par leur capacité de contraction et son impact mécanique sur le microenvironnement [50].

Les CAF ont aussi été étudiés pour leur impact sur la réponse aux traitements, et notamment dans les mécanismes de résistance auxquels ils pourraient participer [38]. Les facteurs paracrines associés à la croissance tumorale et sa prolifération sont notamment impliqués dans la résistance à la chimiothérapie [42, 51]. De même, la communication paracrine est impliquée dans l'activation de la voie de signalisation des Phosphoinositide 3-kinase/Akt (PI3K/Akt) qui peut induire une résistance au tamoxifène dans les tumeurs hormono-dépendantes [38]. Cette voie est impliquée dans de multiples mécanismes de résistance, notamment au paclitaxel par chimiothérapie, et à la thérapie ciblée anti-HER2 [52]. Cela en fait une cible thérapeutique prometteuse dans le cancer du sein et d'autres tumeurs solides [53].

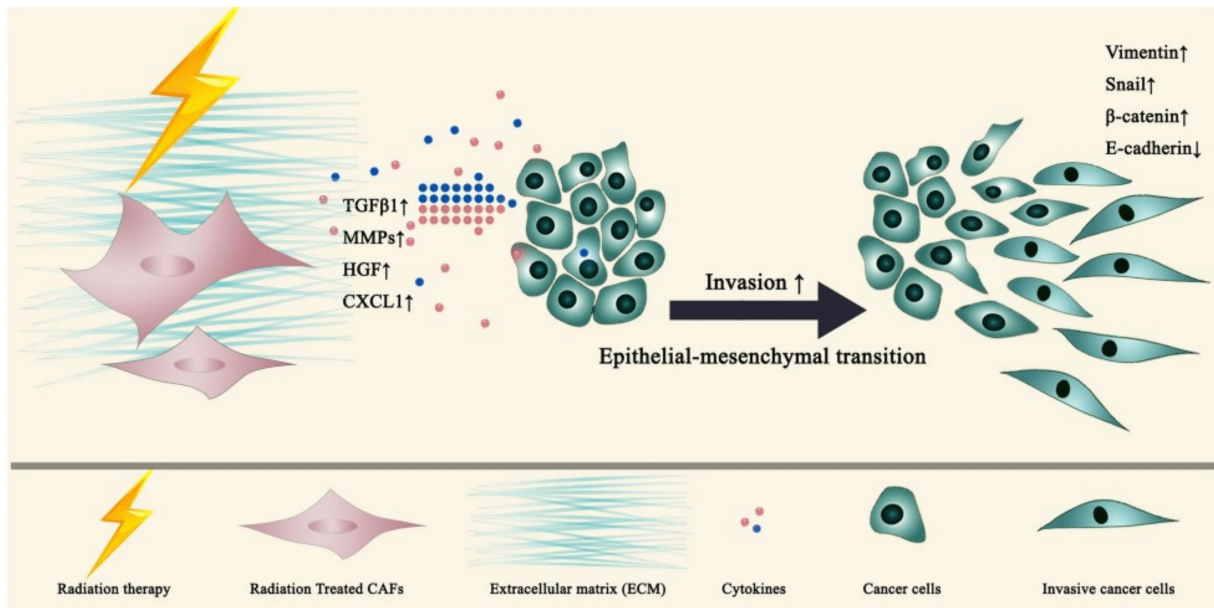


Figure 9: Communication paracrine des CAF avec les cellules cancéreuses après radiothérapie [54]

Les CAF ont aussi été mis en lien avec la radiorésistance (**Figure 9**) [54]. L'exposition aux radiations ionisantes semble induire une augmentation de la sécrétion de certains facteurs pouvant favoriser la prolifération tumorale et son invasivité, notamment de CXCL-1 [54]. Cette cytokine a d'ailleurs été identifiée par Zhang et collègues comme régulatrice de l'accumulation des espèces réactives à l'oxygène (ROS) dans les cellules cancéreuses, leur permettant d'améliorer leur capacité de réparation de l'ADN et donc de survie à la radiothérapie [55]. Ce mécanisme pourrait expliquer en partie le mauvais pronostic associé à l'expression de cette cytokine dans le stroma de la tumeur [56]. D'autres facteurs paracrines, comme les exosomes [51], IGF1/2 et CXCL12 [57] semblent induire des mécanismes similaires.

Ces différentes résistances pourraient aussi être médiées par la promotion d'un phénotype souche des cellules cancéreuses par les CAF [42, 58]]. Vaziri et collègues soutiennent que la sécrétion du *Leukemia Induced Factor* participe à ce mécanisme [59].

Enfin, les CAF-S1 semblent aussi capables de réduire l'interaction entre les cellules mononucléaires du sang périphérique et les cellules cancéreuses [60], suggérant leur implication dans la résistance à l'immunothérapie [42].

L'importance des CAF dans l'ensemble de ces processus, du développement tumoral à sa réponse aux traitements, caractérise leur caractère essentiel au stroma du microenvironnement tumoral. Pour cette raison, l'étude de ces cellules et de leurs rôles sera de

première importance dans ces travaux de thèse.

Compartiment vasculaire et cellules endothéliales

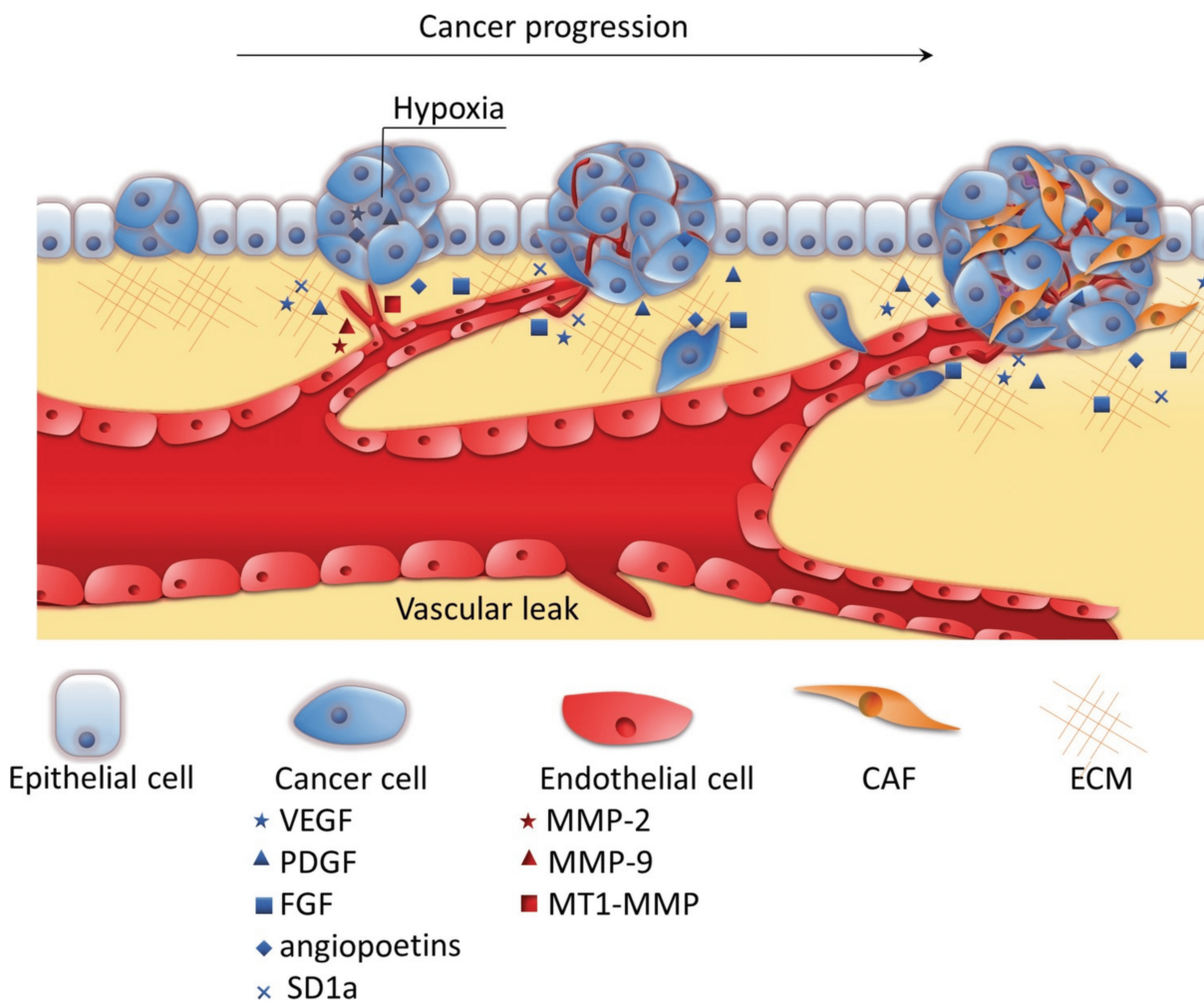


Figure 10: Développement du réseau vasculaire tumoral [61]

Au cours de son développement, la tumeur est dépendante de son accès aux nutriments et à l'oxygène que le réseau vasculaire va lui fournir. Celui-ci est composé de cellules endothéliales qui bordent les vaisseaux, leur phénotype variant en fonction de l'organe et de leur place dans l'arbre vasculaire dans lesquels elles se développent [61]. Ces cellules sont notamment caractérisées par leur expression des glycoprotéines membranaires CD34 et CD31, ainsi que Facteur de Von Willebrand et des récepteurs aux *Vascular endothelial growth factor* (VEGF) [62]. D'autres protéines d'adhésion intercellulaire comme la VE-Cadhérine permettent aussi de les distinguer. Ces adhésions permettent aux cellules

endothéliales de jouer leur rôle barrière qui contrôle les échanges entre les compartiment vasculaire et tissulaire [61].

Lors du développement tumoral, les vaisseaux envahissent la tumeur et deviennent progressivement désorganisés, avec une morphologie atypique dilatée et perméable (**Figure 10**) [61, 63]. Les cellules endothéliales dans les zones tumorales développent un phénotype propre avec l'expression de gènes spécifiques qui ont été caractérisés dans ce contexte [64]. Comme pour les CAF, les réseaux vasculaires du microenvironnement tumoral possèdent des origines multiples, à partir des structures préexistantes ou par le recrutement et la transdifférenciation d'autres cellules [65].

La néo-angiogenèse tumorale est contrôlée par de multiples facteurs, notamment paracrine. Un point essentiel du développement tumoral est l'atteinte d'une taille critique de $1 - 2\text{mm}^3$ à partir de laquelle se développe un cœur dit hypoxique, car manquant d'oxygène [61]. Ce moment déclenche le 'switch' angiogénique, qui va se caractériser par une activation de la voie de signalisation *Hypoxia Induced Factor* (HIF) [66].

Cette voie métabolique sera à l'origine d'une cascade de régulation d'expression, induisant la mise en place de processus pro-angiogénique par la tumeur. Cela s'exprime par une sécrétion de facteur paracrine, dont le plus important et le plus étudié est le VEGF [66, 67]. La liaison de ce facteur de croissance à son récepteur va favoriser la survie, la prolifération et la migration des cellules endothéliales (**Figure 11**). On retrouve aussi la description des facteurs FGF, *Transforming Growth Factor β* ($\text{TGF}\beta$), *Placental Growth Factor* (PlGF), *Platelet-derived Growth Factor* (PDGF), et des angiopoiétines [66, 67]. Certains ligands du récepteur CXCR-2 comme le CXCL-1 seraient aussi impliqués dans les mécanismes pro-angiogéniques [67]. Le remodelage matriciel par les MMP-2,9 et 14, ainsi que la déposition de fibronectine favoriseraient aussi ces mécanismes [67].

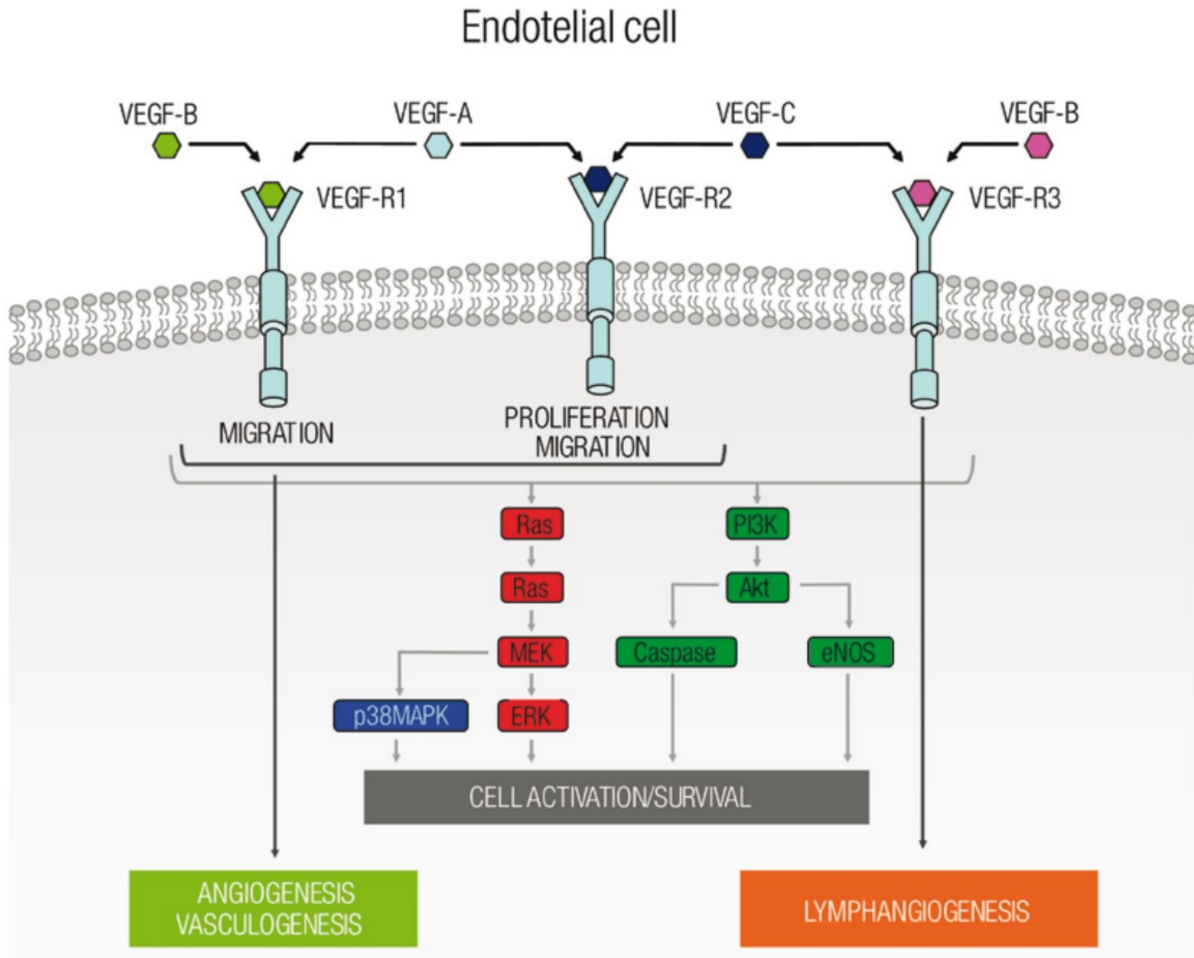


Figure 11: Mécanisme d'action du VEGF sur l'angiogénèse [67]

En plus de l'apport en nutriment et d'oxygène que permet la vascularisation tumorale, les cellules endothéliales participe à la régulation du microenvironnement. Le *Plasminogen Activator Inhibitor-1* (PAI-1), corrélé avec l'angiogénèse et les métastases, peuvent notamment promouvoir la sécrétion de CCL5 par les cellules endothéliales, augmentant les capacités migratoires et métastatiques des cellules cancéreuses [68].

Durant le traitement, la sénescence induite par l'exposition à l'irradiation lors de la thérapie induit la sécrétion de facteurs dont le CXCL-11 qui favoriserait la prolifération tumorale après irradiation [69, 70]. Plus précocement, le stress oxydatif induit dans les cellules endothéliales dans le contexte de la radiothérapie entraîne la sécrétion de céramide [71], sous le contrôle de la protéine membranaire cavéoline-1. Ces céramides entraineraient une modulation de la prolifération des cellules cancéreuses [72]. Lors de la chimiothérapie, ce même stress entrainerait la sécrétion de Tumor necrosis factor α (TNF α), impliqué dans l'intercommunication médiée par CXCL-1, responsable de l'apparition de résistances

décrites plus tôt.

La nécessité du compartiment vasculaire pour la progression tumorale, associée aux capacités de communication comme en contexte de traitement, justifieront leur considération dans ce travail de thèse.

Adipocytes

Les adipocytes sont les cellules stromales les plus représentées dans le tissu mammaire sain. Dans le cadre du cancer du sein, on les retrouve majoritairement en périphérie de la tumeur [73]. Ces cellules peuvent aussi adopter un phénotype associé au cancer, qui se distingue par des cellules plus petites, une diminution du contenu lipidique et des gouttes lipidiques dispersées. Ces cellules ont rapidement été d'intérêt dans le cancer du sein en raison du lien complexe entre la pathologie et l'obésité clinique [74, 75]. Comme les autres types cellulaires, les adipocytes participent au développement tumoral, notamment via la sécrétion d'interleukines IL-6, IL-8, et de cytokines CXCL-1 et CXCL-12, ainsi que par un remodelage matriciel avec une sécrétion de collagène VI [76–78]. Des adipokines plus spécifiques de ces cellules comme la leptine, et l'adiponectine semblent aussi avoir un caractère pro-tumoral [75]. De même, la fonction de stockage lipidique des adipocytes peut servir de source d'énergie aux cellules cancéreuses qui vont augmenter leur capacité à absorber et métaboliser des lipides via l'activation de la voie HIF évoquée plus tôt [75]. Leur impact sur la réponse est également significative, notamment dans le cadre de la radiothérapie. Des mécanismes de radiorésistance induits par la sécrétion des facteurs $\text{TNF}\alpha$, IGF-1 et HGF par les adipocytes ont été décrits dans la littérature [73, 76, 78].

Malgré leur pertinence indéniable dans le cadre du cancer du sein, de son développement et de son traitement, cette thèse ne portera pas sur les adipocytes afin de se concentrer sur les fibroblastes et les cellules endothéliales, plus généralisables à d'autres tumeurs solides.

Système immunitaire

Le système immunitaire joue un rôle clé dans le contrôle de l'émergence des tumeurs. La destruction des cellules tumorales par ce système est le mécanisme principal de lutte de l'hôte pour rétablir l'homéostasie tissulaire. Cette pression de sélection induit l'évolution de la tumeur et l'apparition d'une capacité immuno-modulatrice. Un équilibre s'installe entre signaux pro- et anti-inflammatoires, et lorsque cette balance penche du côté protégeant la tumeur, on parle d'échappement immunitaire [79, 80]. La tumeur continue ensuite à

inter-communiquer avec l'ensemble des acteurs du système immunitaire au cours de son développement.

Une grande variété de cellules immunitaires est retrouvée dans les tumeurs. Parmi celles stimulant la réponse immunitaire, on distingue les macrophages, lymphocytes, les cellules NK (natural killer), cellules lymphoïdes et dendritiques, et enfin les éosinophiles. A l'inverse, les cellules inhibitrices de la réponse sont les cellules myéloïdes, mastocytaires, les lymphocytes T régulateurs et les macrophages de type M2 [79, 81]. Certaines de ces cellules peuvent acquérir un phénotype associé au cancer, comme les macrophages M2 (TAM : Tumor associated macrophage), caractérisé par un rôle immunosuppresseur, pro-tumoral et pro-angiogénique [76, 82].

Les intercommunications entre ces cellules et la tumeur se font par voie paracrine, avec des associations complexes de sécrétion cytokinique impliquant entre autres la famille des CXCL, mais aussi par interaction cellule-cellule directe via des récepteurs de surface [76, 79, 81].

La complexité et l'hétérogénéité du système immunitaire et son implication dans la tumeur en fait un sujet à part entière, dont l'étude est particulièrement poussée depuis l'essor des immunothérapies. Cette thèse ne portera cependant pas sur leurs actions, pour se concentrer comme expliqué ci-dessus sur les fibroblastes et les cellules endothéliales.

1.2.2 Intérêts du microenvironnement dans la thérapie

La participation de tous ces éléments dans la progression et la réponse aux traitements des tumeurs du sein en font des cibles pertinentes dans la perspective de développer de nouvelles thérapies.

Les cellules endothéliales et les processus d'angiogenèse de la tumeur ont fait l'objet d'un grand nombre d'études dans l'espoir de limiter sa progression et d'améliorer l'efficacité des autres traitements. De nombreuses molécules ont été développées pour cibler le VEGF. Le bevacizumab, thérapie par anticorps monoclonal inhibant le VEGF, a pu montrer une faible efficacité en combinaison avec la chimiothérapie [66], mais pas en monothérapie [83]. D'autres inhibiteurs plus larges ciblant les récepteurs à kinases, VEGFR/PDGFR, comme le sunitinib ont aussi été évalué mais présentent une mauvaise tolérance et une efficacité faible [66, 84].

Les stratégies anti-angiogéniques posent cependant des problèmes quant à l'émergence de nouvelles résistances aux thérapies, puisqu'elles imposent une pression de sélection sur les cellules cancéreuses les forçant à évoluer dans des conditions hypoxiques fortes, les rendant plus agressives et résistantes [61, 83].

D'autres stratégies s'intéressent au contraire à la normalisation des réseaux vasculaires tumoraux [83]. Potiron *et al.* ont par exemple démontré une amélioration de la distribution et de l'efficacité d'un traitement par doxorubicine après une normalisation vasculaire radio-induite [85].

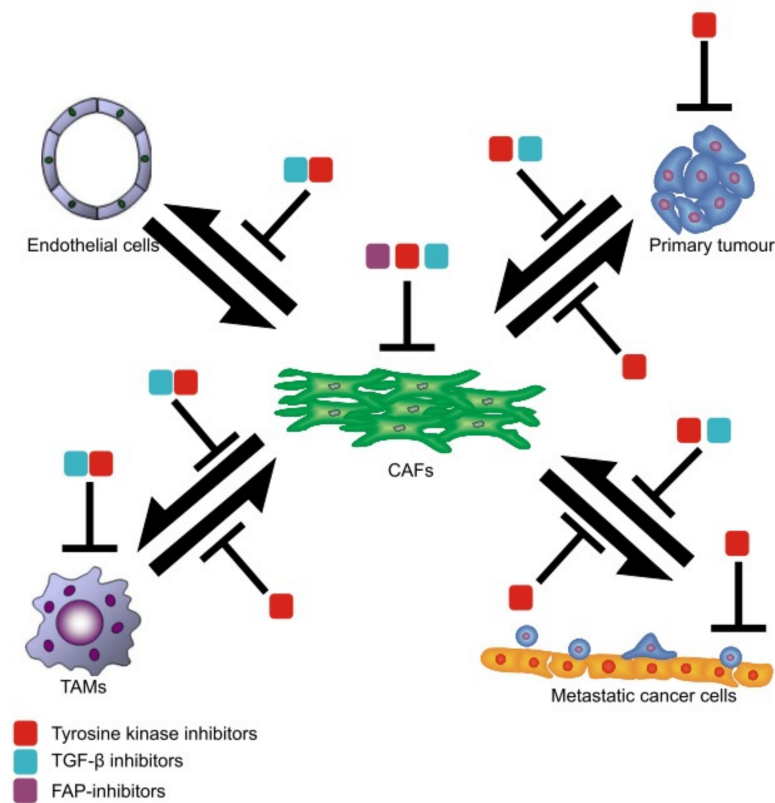


Figure 12: Stratégies thérapeutiques ciblant les CAF [86]

Les CAF font l'objet de ce type d'étude de manière plus récente (**Figure 12**). Le ciblage de la protéine FAP a fait ses preuves en études pré-cliniques mais n'a pas montré d'efficacité lors des tests cliniques [54, 86, 87]. Le ciblage de TGF- β a été arrêté en essai clinique suite au développement de nouvelles tumeurs, notamment cutanées, en raison du rôle ambivalent de ce facteur [86].

Peu d'autres traitements ciblant les CAF sont aujourd'hui à l'essai, probablement en raison de l'hétérogénéité de ce type cellulaire. Trouver des cibles spécifiques de ces cellules est aussi une tâche difficile puisque la plupart de leurs caractéristiques se retrouvent dans d'autres types cellulaires.

Enfin, de nouvelles stratégies s'intéressent au ciblage de la MEC [33, 54]. Parmi les cibles, on retrouve la Tenascin C, mais aussi les différentes MMP, pour lesquelles 50 inhibiteurs ont été testés en clinique, sans qu'aucun ne démontre de preuve d'efficacité convaincante [54]. Le ciblage de la fibronectine a aussi été essayé mais peu concluant, en s'intéressant aussi à l'effet que cela aurait sur l'angiogenèse tumorale [84].

Dans d'autres cancers, la mise à profit du système immunitaire par les immunothérapies a permis une avancée considérable dans la prise en charge des patients [79]. Le rétablissement de l'équilibre immunitaire vers un microenvironnement stimulant la réponse plutôt que l'inhibition a malheureusement montré peu d'efficacité pour le cancer du sein. Seule l'utilisation de la stratégie PD-L1 pour les cancer triple négatifs s'est révélée efficace. Les autres stratégies sont pour l'instant inefficaces [79], et bénéficieront sûrement de l'avancée des autres traitements ciblant le microenvironnement pour améliorer leur efficacité.

L'importance du microenvironnement dans le développement tumoral est si primordiale qu'il est maintenant considéré par les cliniciens dans les critères de réponse aux traitements [86].

La complexité du microenvironnement et sa compréhension est au centre des questions concernant le développement tumoral et la réponse aux traitements. L'étude de ces mécanismes, par essence, nécessite des modèles permettant de reproduire leur complexité.

1.3 Modèles d'études conditionnels

Un modèle d'étude en biologie fait référence à un organisme, un système biologique ou un ensemble de conditions qui est utilisé pour étudier des phénomènes biologiques spécifiques. Ces modèles sont souvent utilisés pour simplifier et comprendre des processus biologiques complexes, notamment en cancérologie.

Ce chapitre se concentrera sur la description des modèles conventionnels de recherche en cancérologie, et sur leurs limites face à la complexité de l'étude du microenvironnement.

1.3.1 La culture cellulaires *in vitro*

La culture *in vitro* permet l'étude des différentes cellules en dehors de leur organisme d'origine. Elle permet d'expérimenter en conditions contrôlées ces cellules et d'observer l'évolution du système et les conséquences de facteur induit par l'expérimentateur. On peut classer en deux grandes classes la culture *in vitro* : la culture en deux dimensions (2D) et celle en trois dimensions (3D).

Culture 2D

La culture 2D correspond à un état des cellules en monocouche, qui adhèrent à un support solide et rigide, comme le polystyrène communément utilisé dans les flasques de culture (**Figure 13a**). Cette méthode de culture est utilisée depuis les années 1950 [88], et est entrée depuis la fin des années 1980 dans les standards du développement de nouveaux traitements [89].

L'isolation de cellules de patients, en cancérologie, permet l'établissement de lignées qui sont maintenues en culture au cours du temps. L'Institut National de Cancer des Etats-Unis à mis en place le NCI-60, un référentiel de 60 lignées cancéreuses utilisées pour la recherche de médicaments anti-cancéreux [89]. Dans le cas du cancer du sein, les deux lignées les plus utilisées sont nommées MCF-7, une lignée ER+, PR+ et HER2-, et les MDA-MB-231 qui sont TN [90].

Les lignées cellulaires permettent des études à relativement bas coût, avec une grande reproductibilité [89, 91]. Ces caractéristiques ont fait la force de ce type de modèles à la fin du XXIe siècle en permettant le criblage haut débit de molécules pour évaluer leur capacité anti-cancéreuse, ouvrant la voix au développement de traitement par chimiothérapie par exemple [92].

Cette méthode de culture est cependant grandement limitée par sa nature même. Le maintien en culture de lignées induit une pression de sélection qui va homogénéiser les cellules, perdant l'hétérogénéité tumorale essentielle aux mécanismes cancéreux [88, 89]. Dans le même temps, l'organisation en 2D diffère radicalement de celle des cellules dans leur MEC [91]. La polarisation entre la face de la cellule non adhérente, en contact avec le milieu et celle adhérent à la surface de culture modifie grandement l'organisation de la cellule, son cytosquelette et son expression génique. On peut d'ailleurs suggérer que cette maximisation de la surface avec un phénotype plat directement en contact avec le milieu, donc avec un meilleur accès à l'oxygène et aux nutriments, peut jouer sur la sensibilité aux traitements des cellules en culture. Cette disposition 2D nuit d'ailleurs grandement aux interactions cellule-cellule, et empêche les interaction cellule-MEC [88].

Cette méthode peut cependant être légèrement adaptée pour permettre l'étude du microenvironnement. Il est notamment possible de co-cultiver les cellules avec d'autres types cellulaires du microenvironnement (**Figure 13a**). La culture complexifie cependant cette méthode, nécessitant des optimisations de milieu pour éviter de favoriser un type cellulaire par rapport à l'autre qui deviendrait alors dominant [89, 91].

Pour éviter la co-culture, des méthodes par milieu conditionné, qui consiste à laisser le milieu incubé avec un premier type cellulaire avant de le mettre en contact avec l'autres,

ont permis d'étudier les interactions paracrines entre les différents types cellulaires [90]. Cette méthode a notamment été mise à profit par l'équipe partenaire pour l'étude de l'interaction entre cellules endothéliales et cellules cancéreuses dans le contexte de la radiothérapie [93].

Ces adaptations ne permettent cependant pas de s'affranchir des limites de la culture en 2D, et explique pourquoi cette méthode arrive au bout de ses capacités dans le cadre de l'étude du microenvironnement tumoral.

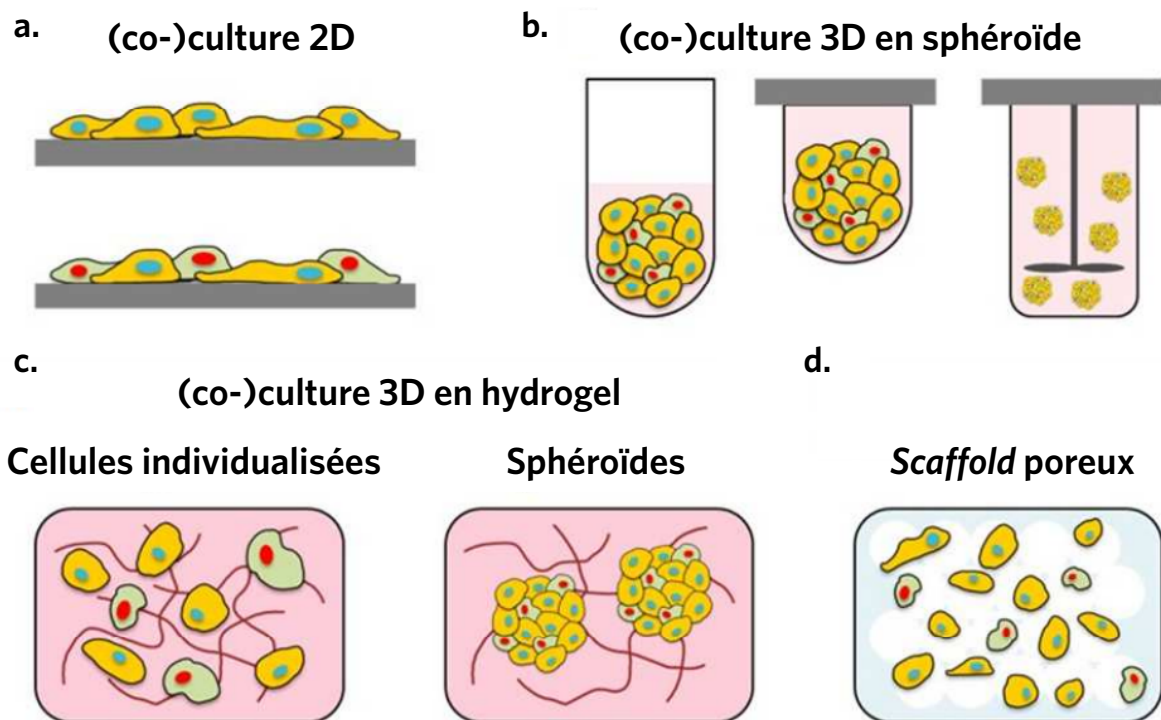


Figure 13: Modèles d'études *in vitro* [94]

- a. Culture en 2D, les cellules sont déposées sur un support solide et adhèrent à la surface.
- b. Modèles en sphéroïdes, par auto-organisation des cellules en structures 3D.
- c. Culture en hydrogel, soit directement avec des cellules individualisées, soit avec des sphéroïdes cellulaires.
- d. Culture par ensemencement de *scaffold* poreux.

Culture 3D

Afin de répondre aux limites de la culture 2D, l'étape suivante a été de s'engager vers une méthode intégrant la troisième dimension spatiale.

La première méthode développée pour faire cela a été mise en évidence dès 1970, avec la culture de sphéroïdes, qui correspondent à des agrégats cellulaires auto-organisés en 3D [90, 91] (**Figure 13b**). Il existe plusieurs méthodes pour faire des sphéroïdes. La plus classique est de cultiver les cellules dans un support sur lequel les cellules ne peuvent adhérer, comme de l'agarose ou du poly-diméthyl-syloxane (PDMS) [95]. On peut aussi les produire par culture en suspension dans une gouttelette ou dans des flasques avec agitation [88]. Ces différentes méthodes permettent d'obtenir une bonne reproductibilité dans la génération de sphéroïdes.

En plus de leur architecture 3D, ces sphéroïdes, à partir d'une certaine taille, peuvent développer des caractéristiques tumorales comme un cœur hypoxique [88, 96, 97]. Le développement de ce cœur est notamment conditionné par le type cellulaire, Imamura *et al.* ont par exemple mis en évidence que certaines lignées cellulaires produisaient des sphéroïdes peu denses, comme les MCF-7, quand d'autres comme les T47D formaient des structures denses. Ces derniers sphéroïdes étaient plus hypoxiques et plus résistants aux traitements [96].

De la même façon que la culture 2D, il est possible de générer des sphéroïdes en co-culture (**Figure 13**) [90]. Yakavets et collègues décrivent par exemple une capacité d'invasion augmentée et une plus grande résistance à la chimiothérapie dans des sphéroïdes de cancer du sein en co-culture avec des fibroblastes [98].

Pour s'approcher encore plus de la complexité et de la diversité au sein d'une tumeur, ces méthodes ont évolué vers des modèles dits organoïdes [90, 97]. Ces modèles comprennent des cellules organotypiques soit issues de la différenciation de cellules souches, soit directement issues de tumeur de patients [91]. Ces derniers sont appelés organoïdes dérivés de patients (PDO). Ce type de modèle a aussi servi à mettre en évidence le potentiel pro-invasif des CAF [99].

Cependant ces méthodes sont encore limitées. On retrouve notamment des variations d'un type cellulaire, et d'un patient à l'autre, qui ne permettent pas la génération systématique de PDO [90].

Avec l'absence de perfusion active, ces modèles développent, lorsqu'il atteignent une taille trop importante, un cœur nécrotique plus important que celui des tumeurs *in vivo* induisant une importante mortalité [91]. Ces modèles présentent aussi une absence de MEC, pourtant essentielle au microenvironnement. Enfin, ces modèles ne possèdent pas de composante matricielle, pourtant essentielle au microenvironnement.

Pour intégrer la MEC aux modèles de culture *in vitro* des substituts naturels ou synthétiques ont été mis en place pour y intégrer des cellules [88–90]. L’utilisation d’hydrogel ou de *scaffold* permet de donner aux cellules un environnement visco-élastique dans lequel elles peuvent évoluer (**Figure 13a,b**). On notera l’utilisation de Matrigel, un hydrogel issu de la MEC de tumeur souris, qui a amorcé la popularité de ces méthodes [88, 89]. La variété de ces matériaux sera discutée plus tard dans ce manuscrit (**Chapitre 1.4**).

Bien que permettant l’établissement d’un environnement 3D complexe contenant de multiples cellulaires intégrés dans une MEC, ces méthodes manquent de la possibilité de contrôler l’organisation spatiale de ces différents éléments, échouant à reproduire un tissu tumoral structurellement pertinent.

1.3.2 Expérimentation *in vivo*

Dans le même temps que la culture *in vitro*, l’expérimentation *in vivo* s’est développée. Il s’agit d’utiliser un animal comme modèle du phénomène biologique à étudier. Ces modèles sont intéressants par leur similarité avec l’humain, avec plus de 98% d’homologie entre les rongeurs et les hommes, et encore plus pour les modèles de grands animaux. Il s’agit aussi de modèles systémiques, qui permettent d’étudier la tumeur dans le cadre d’un organisme entier, permettant l’étude de phénomène de métastases et de toxicité des traitements [97]. Dans le cas du cancer, les espèces les plus utilisées sont des rongeurs [97]. On distingue plusieurs types de modèles de rongeurs, parmi les souris ou les rats. Dans un premier temps, les modèles syngéniques (**table 1.1**) permettent le développement de tumeur de la même espèce dans l’organisme hôte [100]. Ceux-ci peuvent être développés en induisant chimiquement l’apparition de cancer [97, 100] ou par modification génétique (**table 1.1**) [91, 92].

La limite principale de ces modèles réside dans leur origine entièrement non-humaine. La généralisation des résultats obtenus à partir de ceux-ci à la pathologie humaine est donc parfois difficile à franchir, notamment dans le cadre du microenvironnement tumoral [100].

Les modèles suivants sont des modèles de xénogreffes. On en retrouve dérivés de cellules de patients (PDX), implanté dans des rongeurs immuno-incompétents (**table 1.1**) [89]. Ces modèles ont été démontré comme supérieur aux implantations de lignées cellulaires pour reproduire des spécificités tumorales, notamment proches de celles retrouvées chez le patient donneur [90, 91]. Ils ont récemment pris le devant sur les lignées NCI-60 dans les recommandations de l’Institut National des Cancers des Etats-Unis.

Modèles d'étude murin			
	Statut	Avantage	Inconvénient
Syngénique	Immunocompétent	Peu coûteux, Simple, Rapide	Peu hétérogène, Non humain
PDX	Immunodéficient	Cancer humain, Hétérogénéité, Dérivé de patient	Accès limité, Immunodéficiences, Long temps
Génétique	Immunocompétent	Homogène, Carcinogène	Coûteux, Long, Très spécifique
Induction chimique	Immunocompétent	Carcinogène, Peu coûteux	Carcinogène rare, Long, Toxicité

Table 1.1: Modèles murins de cancer [100]

Ces modèles présentent cependant toujours le même défaut, légèrement atténué grâce à la présence de cellules humaines. Le reste du microenvironnement reste cependant celui de l'hôte, et le microenvironnement immunitaire est drastiquement affecté par sa déplétion [89, 91, 92].

Deux méthodes ont été mises en place pour palier à ce défaut. La première est la coimplantation de cellules du microenvironnement humain avec celles cancéreuses, par exemple pour l'étude des CAF [101]. Cette méthode n'exclut cependant pas les cellules de l'hôte, créant un facteur confondant dans les résultats.

La seconde, plus spécifique à l'immunothérapie, correspond aux modèles dits humanisés. Le système immunitaire supprimé chez l'hôte est remplacé par une greffe à partir de cellules humaines [92, 102, 103]. Si cette approche s'est révélée une réussite dans le cas du microenvironnement immunitaire, il est cependant impossible à mettre en place pour les autres types cellulaires, ou la MEC du microenvironnement.

On finira par évoquer les modèles de grands animaux : chats, chiens, porcins, et primates non humains. Ces modèles sont encore plus proches de la physiologie humaine. Les chats et les chiens peuvent notamment être étudiés après le développement spontané d'une tumeur découverte en consultation vétérinaire [97].

Cependant, ces modèles présentent un coût très important, des temps d'étude longs et une difficulté à réunir suffisamment d'animaux dans une seule étude pour obtenir des résultats interprétables.

L'ensemble de ces modèles animaux sont par ailleurs tous contraint par des questionnements éthiques sur l'expérimentation animale. La règle des '3R' contient d'ailleurs 'réduire', et la volonté politique, notamment Européenne, encourage cet objectif de diminution du recours à l'expérimentation animale [104]. Si l'expérimentation animale reste nécessaire en étude préclinique, sa combinaison avec d'autres types de modèles devra être

de plus en plus fréquente pour en minimiser l'importance.

Les limites de ces différents modèles, *in vitro* comme *in vivo* appellent au développement de nouveaux modèles. Ceux-ci doivent intégrer un microenvironnement humain, cellulaire et matriciel. Ils doivent aussi répondre à une certaine flexibilité, afin de pouvoir être développé spécifiquement pour une question de recherche, et interprété plus facilement que les modèles animaux. Ces modèles doivent aussi pouvoir répondre à la nécessité de contrôle spatial de l'organisation pour reproduire plus fidèlement l'organisation des tumeurs de patients.

1.4 Biofabrication et bioimpression appliquées à la modélisation du cancer du sein

En réponse aux lacunes de ces différents modèles, la communauté s'est tournée vers d'autres techniques de culture et de modélisation du cancer. Les méthodes avancées de culture s'inscrivent le plus souvent dans le cadre de la biofabrication. Cette section portera sur la description de ces technologies, leur intérêts et applications actuelles dans le contexte de l'étude du cancer du sein et de son microenvironnement.

1.4.1 Définitions

La biofabrication trouve son origine dans l'application des techniques de fabrication, et de microfabrication, à la biologie. Si cette appellation est apparue dès 1985 dans un article d'ingénierie tissulaire de la surface oculaire, il a fallu attendre 2010 pour observer l'essor de ce domaine (**Figure 14a**). Ce terme est aujourd'hui utilisé dans les articles discutant la fabrication basée sur des matériaux hybrides à l'interface chimie-biologie, dans des applications allant de l'ingénierie tissulaire à la médecine régénérative. La définition clarifiée par Jürgen Groll et ses collaborateurs en 2016 du mot biofabrication est la suivante : 'La fabrication automatisée de produits biologiquement fonctionnels dotés d'une organisation structurale, à partir de cellules vivantes, de molécules bioactives, de biomatériaux, d'agrégats cellulaires comme les micro-tissus, ou de constructions hybrides cellule-matériau, grâce à la bioimpression ou au bioassemblage, et suivie d'un processus de maturation tissulaire' [105].

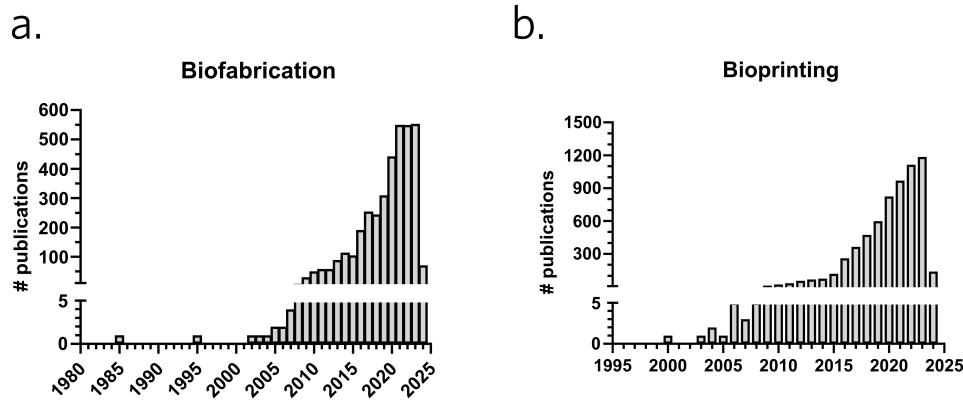


Figure 14: Occurrence des termes biofabrication et bioimpression sur PubMed

Ils distinguent notamment deux types de méthodologie, par bioassemblage et bioimpression. Ces deux approches sont reliées par leur objectif de reproduire un équivalent tissulaire, via un procédé de fabrication, suivi d’une phase de maturation, qui pourra ensuite servir pour l’implantation en médecine régénératrice, ou en tant que modèle *in vitro*. La possibilité d’avoir une maîtrise de l’organisation spatiale, de choisir les biomatériaux qui accompagneront les cellules et d’automatiser le processus à la fois est ce qui donne à la biofabrication un avantage par rapport aux modèles cités précédemment. Cela permet en théorie l’obtention de produits biologiques reproductibles et de complexité maîtrisée.

Le bioassemblage correspond à la création et l’assemblage organisé d’unités biologiques, afin d’obtenir une structure finale 2D ou 3D récapitulant le tissu cible. On retrouve par exemple dans cette méthodologie les techniques de microfluidiques, qui permettent de créer des compartiments organisés dans des chambres en silicone pouvant ensuite être assemblés en y injectant des cellules avec des biomatériaux. Ce type de systèmes a pu être utilisé avec succès pour modéliser le microenvironnement tumoral [92]. Cette méthode permet d’obtenir une grande reproductibilité, ainsi que des systèmes qui peuvent être imagé facilement en temps réels pour observer des phénomènes à l’échelle cellulaire, comme l’interaction entre les différents types cellulaires [106]. Cependant, l’échelle de ce type de système est souvent de l’ordre de $100\mu\text{m}$ d’épaisseur [107], certains auteurs parlant parfois de ‘2.5D’ plutôt que de 3D, limitant la reproduction de caractéristiques essentielles comme l’hypoxie. Une perfusion permet cependant de contrôler cette caractéristique via la diffusion du milieu [108]. De plus, le processus de fabrication de ces systèmes est relativement laborieux, impliquant une implication du manipulateur pour remplir les canaux avec des hydrogels cellularisés. Ces particularités des modèles dits ‘on-chip’ nous amèneront à nous intéresser plutôt à la bioimpression au cours de ce travail de thèse.

La bioimpression se base sur les technologies de fabrication additive, permettant la déposition d'un matériau de manière contrôlée spatialement. On constate que son utilisation a suivi celle de la biofabrication en général, depuis l'an 2000, avec une nette augmentation depuis 2010 (**Figure 14b**). Le matériau utilisé dans le cadre de cette technique est communément appelé encre, ou bioencre si elle contient des cellules vivantes. La formulation de cette encre est adaptée en fonction du tissu ciblé et de la technologie utilisée. Les propriétés biologiques et mécanique de la bioencre sont indissociable du processus d'impression et de la maturation du tissu imprimé. La bioimpression se déroule donc en 4 étapes majeures :

1. La conception assistée par ordinateur (CAO) d'un design spécifique qui sera transmis à la machine et exécuté pour obtenir l'organisation requise
2. La préparation des cellules, matériaux et leur formulation en bioencre
3. L'impression par la bioimprimante de cette bioencre en suivant le design initial
4. La maturation du tissu biologique

Chacune de ces étapes est essentielle et doit être dictée par le tissu biologique d'intérêt. Parmi ces différents aspects, le choix de la technologie est vaste, et fera l'objet de la prochaine partie.

1.4.2 Les technologies de bioimpression

La bioimpression se décline en effet sous plusieurs formes, chaque méthode possédant ses points forts et ses points faibles lui permettant de répondre à un objectif précis. Le développement de nouvelles technologies de bioimpression, un domaine toujours actif, vient répondre aux nécessités imposées par la création d'équivalent tissulaire toujours plus proches du standard *in vivo*. A partir de la littérature, on peut distinguer 3 types d'approches [109, 110] : extrusion, stéréolithographie et déposition de gouttelettes ; supportées par des technologies que cette partie décrira. Ces technologies sont représentées en **Figure 15**, et leur fréquence dans la littérature en **Figure 16**.

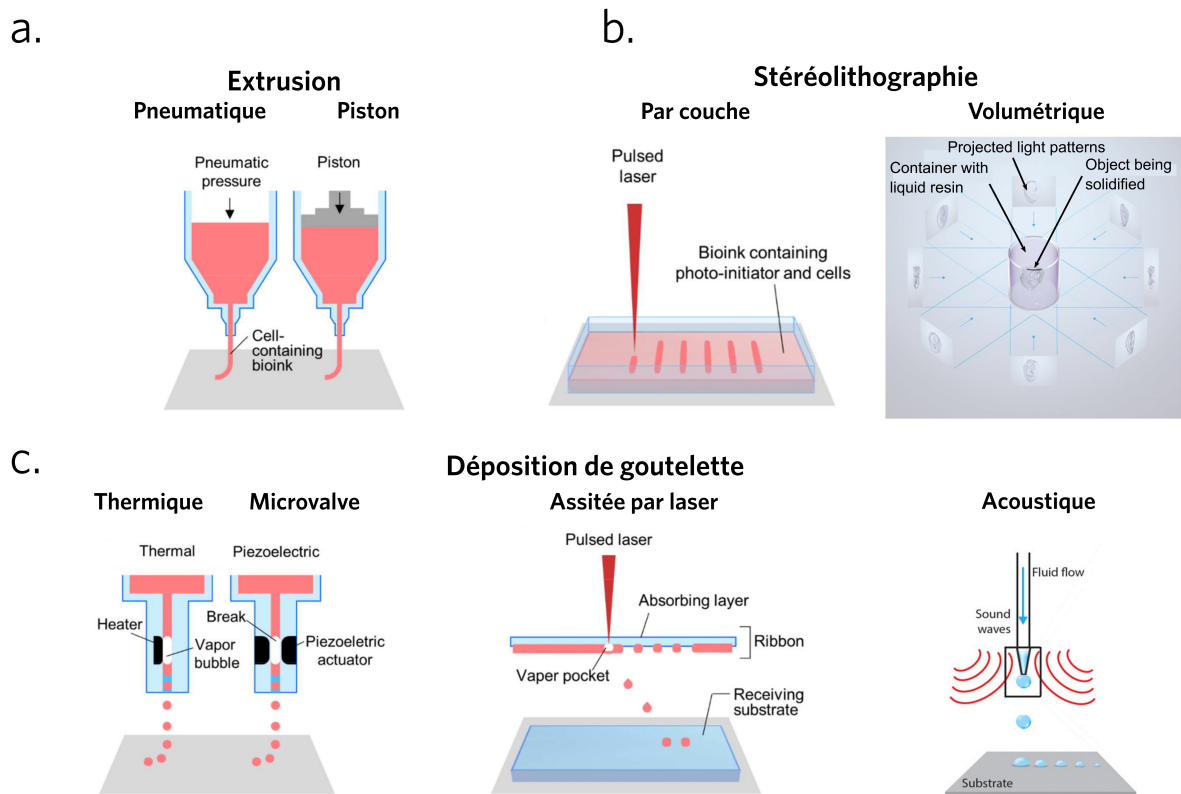


Figure 15: Principales technologies de bioimpression [110–112]

- a. Technologies par extrusion. Déposition sur un support de la bioencre en appliquant une pression pneumatique, ou à l'aide d'un piston ou d'une vis sans fin à travers une buse [110].
- b. Technologies par stéréolithographie. Une bioencre photopolymérisable est excitée par un laser ou un écran led suivant des patterns. La méthode couche par couche [110] se fait en imprimant une couche en contact avec un support, le support se déplace ensuite permettant la polymérisation de la couche suivante. La méthode volumétrique [111] utilise un volume de bioencre en rotation et un écran led dont la projection d'adapte à l'angle du contenant pour reproduire le modèle 3D final, le cumul de la lumière reçue induisant la photopolymérisation spécifique des zones d'intérêts.
- c. Technologies par déposition de gouttelette. La bioencre peut être poussée au travers d'une buse, dans laquelle des gouttelettes seront formées en créant une cavitation thermique, à l'aide d'une microvalve piezoelectrique [110] ou d'onde acoustique [112]. La technologie par laser utiliser une lame receveuse enduite de bioencre qui va créer une caviter et éjecter une gouttelette lors de la réception de photons.

Extrusion (Figure 15a)

L'extrusion ou microextrusion est la méthode d'impression la plus utilisée (**Figure 16**) [113]. Le concept se base sur l'éjection d'un matériau à travers une buse sous la forme d'un filament, le plus souvent couche par couche pour obtenir un volume 3D. La buse est reliée à une cartouche dont la position est contrôlée par ordinateur. L'expulsion de l'encre se fait soit en appliquant une pression pneumatique, soit via un piston ou une vis sans fin.

La déposition de l'encre se fait directement sur un support solide ou en suspension dans un gel de support.

La fabrication par extrusion peut être contrôlée par des paramètres machine. Notamment, la quantité de matériau extrudée peut être modifiée de deux manières, en modulant la pression d'expulsion, ou la vitesse de déplacement de la tête d'impression. Une pression plus forte augmentera la quantité de matériau déposée sur une même zone à interval de temps égal. Inversement, une vitesse plus élevée induira un temps plus court passé sur une même zone, à pression d'expulsion égale, entraînant une déposition de moins de matière sur cette zone. Le diamètre du filament peut lui être contrôlé en modifiant la taille de la buse.

La popularité de l'extrusion peut s'expliquer par son accessibilité, tant en terme de coût que d'apprentissage utilisateur. La prise en main rapide de cette méthode permet son application rapide aux différentes questions biologiques. Sa relative rapidité dans la fabrication de tissu de l'ordre du millimètre au centimètre a aussi un intérêt dans les applications d'ingénierie tissulaire. C'est aussi une technologie qui permet d'imprimer avec plusieurs têtes d'impression différentes, en multimatériaux.

Cette technologie possède cependant une résolution limitée à environ $100\mu\text{m}$, ne permettant pas d'atteindre des organisations structurales de l'échelle des cellules. La résolution est en effet dictée par la taille de la buse. L'écoulement de la bioencre dans celle-ci entraîne en effet des forces de cisaillements, qui peuvent appliquer des contraintes mécaniques aux cellules. Plus la buse est fine, plus les forces de cisaillements sont importantes et donc, moins la viabilité cellulaire est élevée.

L'extrusion est aussi une méthode intéressante par sa versatilité, et son adaptation sous différentes formes. L'impression en suspension, directement dans un autre matériau capable de supporter les structures imprimées, permet par exemple de pouvoir s'affranchir d'une impression couche par couche et d'être moins impacté par la gravité (impression freeform). Cette méthode a par exemple été appliquée avec pour matériau de support des sphéroïdes cellulaire dans lesquels des structures vasculaires ont été imprimées pour reproduire des tissus cellulaires denses [114]. On peut aussi citer une adaptation de la méthode dite co-axiale, où deux buses sont emboîtées afin de pouvoir entourer un filament central par un ou plusieurs matériaux périphériques. Cette stratégie a par exemple été utilisée pour fabriquer des structures glomérulaires perfusées [115].

L'ensemble de ces avantages, principalement la vitesse d'impression, les échelles millimétriques atteintes, et l'impression en multimatériaux, font de cette technologie celle qui sera mise en avant au cours de ces travaux de thèse.

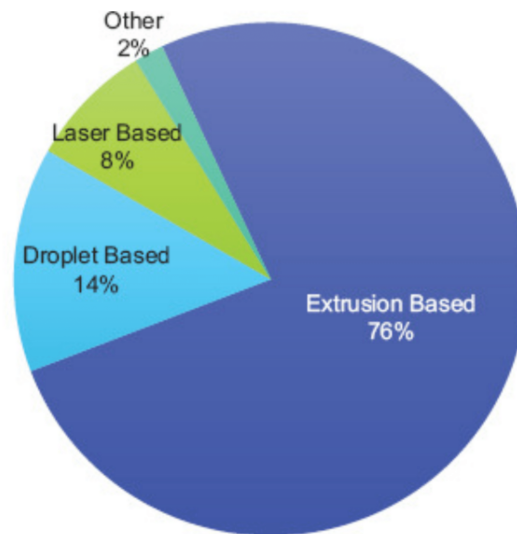


Figure 16: Fréquence d'utilisation des différentes méthodes de bioimpression [113]

Déposition de gouttelettes (Figure 15c)

Les stratégies par déposition de gouttelettes sont les plus variées dans le paysage de la bioimpression. Leur objectif commun est l'éjection d'une gouttelette sur un substrat receveur. Ce substrat peut être un support solide ou un hydrogel dans lequel la gouttelette pourra plus ou moins pénétrer en fonction de sa vitesse. L'avantage d'une éjection de gouttelette par rapport à l'extrusion est l'augmentation de la distance au substrat, ce qui évite l'imposition d'un stress mécanique à la bioencres entre la buse et le support, retrouvé en extrusion. Les technologies par déposition de gouttelettes peuvent utiliser plusieurs têtes d'impression permettant la déposition de multiples matériaux. La limite principale de cette méthode est l'étalement des gouttelettes projetées, qui complexifie la création d'une structure 3D épaisse. Cette limite est d'autant plus forte que les volumes projetés sont faibles, par exemple en déposition assistée par laser.

Les technologies thermiques, microvalve [110] et acoustique [112] fonctionnent de manière similaire en créant des gouttelettes à partir de la bioencres expulsée par une buse. La technologie laser se distingue en utilisant une couche métallique donneuse, recouverte de bioencres qui induira l'expulsion d'une gouttelette lors de l'action d'une impulsion laser,

lui conférant une résolution micrométrique [116].

Stéréolithographie (Figure 15b)

L'impression par stéréolithographie se base sur la photopolymérisation de bioencre. Elle permet d'atteindre une résolution très précise, de l'ordre du micromètre si la diffraction de la lumière induite par cette encre est faible [117]. Plus le volume à traverser par la lumière est grand, plus la diffraction le sera avec une perte de précision. Cela donne un avantage de précision pour une stratégie dite couche par couche, qui va polymériser l'hydrogel directement en contact avec la source de photon [110]. Inversement la technique volumétrique, qui expose l'ensemble du volume d'hydrogel à la lumière, perd en résolution. Cependant cette dernière est beaucoup plus rapide car elle se concentre sur l'ensemble du volume imprimé en une fois, atteignant des impressions de l'ordre du centimètre en seulement quelques secondes [118]. Ces deux méthodes ont l'avantage de permettre aussi l'impression freeform. Cependant, se basant sur un 'bassin' de bioencre polymérisable, il n'est pas possible d'utiliser ces technologies pour faire des impressions multimatériaux.

Les avantages et inconvénients des différentes technologies sont récapitulés en **Figure 17**. On peut en effet classer ces technologies en fonction de deux paramètres principaux: la vitesse et la résolution. Une vitesse élevée permettra de fabriquer des structures volumineuses en peu de temps. Une haute résolution permettra pour sa part d'imprimer des structures précises et avec un niveau de détails fin. Ces deux paramètres s'opposent souvent, puisque la déposition d'une grande quantité de matériau induit une perte de résolution.

A ces deux paramètres principaux s'ajoutent des paramètres auxiliaires, comme le coût technologique, la capacité d'imprimer en multi-matériaux ou encore la viabilité. Certains de ces paramètres sont conditionnés par la modalité d'utilisation de la technologie: l'extrusion, par exemple, permet l'impression *freeform* uniquement en impression en suspension et non sur support solide.

Ces avantages et inconvénients pourraient être compensés en combinant ces différentes technologies, bien que peu d'équipes l'aient déjà fait. Ribezzi *et al.* ont par exemple associé l'extrusion en suspension avec l'impression volumétrique pour créer des structures cellulaires complexes et intriquées [119].

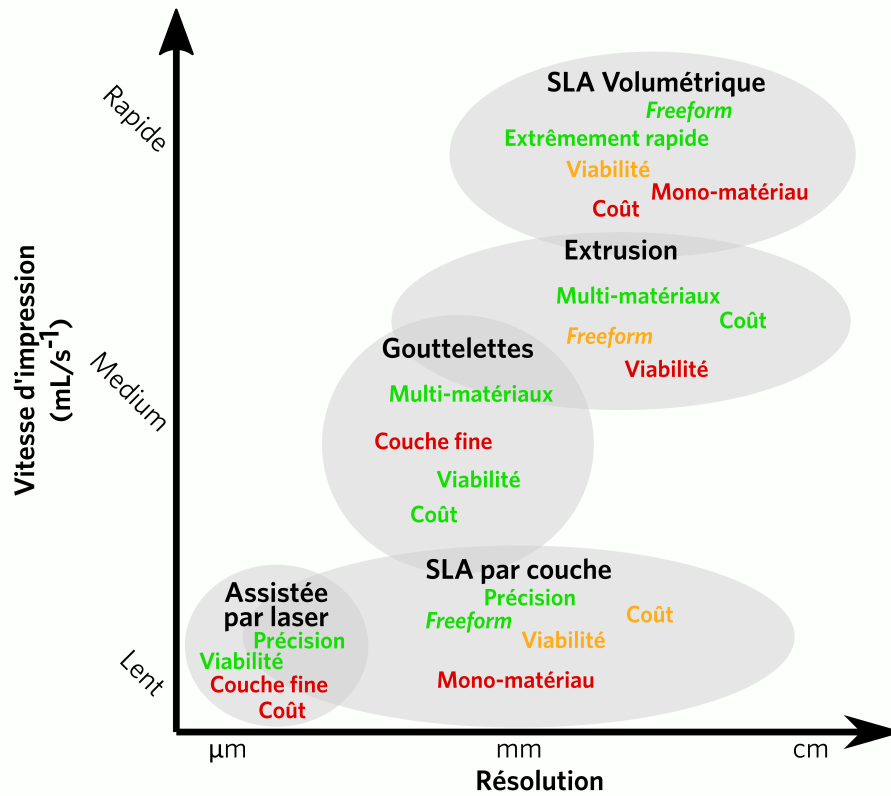


Figure 17: Avantages et inconvénients des technologies d'impression

Les avantages sont en vert, les inconvénients sont en rouges, et en orange sont représentés des paramètres intermédiaires ou conditionnel.

1.4.3 Les bioencres

L'ensemble de ces technologies se basent sur l'utilisation de bioencres, qui doivent répondre au cahier des charges imposé par le processus. La littérature sur les bioencres étant très riche, cette partie se concentrera sur une description générale des différents types de bioencres et de leurs intérêts et limites respectives.

Bien que certains articles se basent sur une bioencre purement cellulaire [120, 121], la grande majorité des bioencres sont basées sur la combinaison d'un hydrogel polymérisable et de cellules. Les hydrogels se basent sur des réseaux de polymères hydrophiles, aux propriétés visco-élastiques, qui peuvent le plus souvent, dans le cadre de la bioimpression, passer d'un état dominant liquide à dominant solide par une étape de polymérisation. Dans la littérature, trois principaux groupes d'hydrogels sont identifiés et peuvent être catégorisés comme suit : synthétique, naturel provenant des algues, et naturel animal

(Figure 18a) [113]. Certains hydrogels peuvent aussi être modifiés chimiquement, par exemple l'HA (HA) en ajoutant des groupements métacrylates (MA) pour donner une encre semi-synthétique (HAMA dans cet exemple).

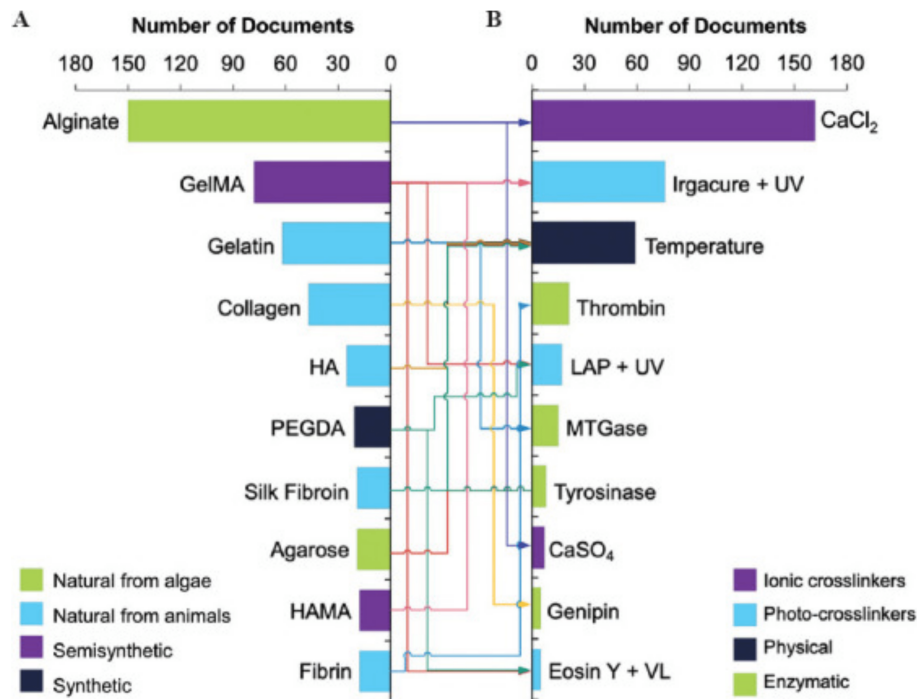


Figure 18: Principales bioencres et méthodes de polymérisation [113]

- Top 10 des hydrogels les plus référencés dans les articles de bioimpression.
- Top 10 des méthodes de polymérisation les plus référencées dans les articles de bioimpression. Ces méthodes sont reliées aux hydrogels avec lesquelles elles sont associables.

Les hydrogels dérivés d'algues ou purement synthétiques présentent l'inconvénient de ne pas être dégradables de manière enzymatique par des cellules mammifères, limitant la capacité de remodelage par les cellules. Ils ne possèdent pas non plus de site d'ancrage pour les protéines membranaires, limitant l'adhésion cellulaire à l'adoption d'un phénotype similaire à celui d'une cellule dans sa MEC. Ces hydrogels peuvent cependant être fonctionnalisés, avec des peptides par exemple, facilitant leur biodégradabilité [122] ou leur conférant des points d'adhésion pour les cellules [123]. L'avantage majeur de ce type d'hydrogel est la capacité de contrôle qu'ils permettent, avec une modification simplifiée des propriétés mécaniques et de la polymérisation.

Les hydrogels issus d'animaux sont généralement remodelables par les cellules, qui possèdent des enzymes à même de cliver l'hydrogel, ainsi que des sites d'ancrage cellulaire. Leur avantage au niveau de ces propriétés biologiques est contrasté par une plus grande

difficulté à maîtriser les propriétés mécaniques. Les exemples les plus typiques de ce type d'hydrogel sont la gélatine et le collagène (**Figure 18a**), issus de la MEC de mammifères.

La réticulation peut pour sa part être induite chimiquement, physiquement ou à l'aide de processus enzymatiques (**Figure 18b**). Ces différents types de réticulation induisent des liaisons, covalentes ou ioniques, entre les différentes chaînes des polymères permettant de créer un réseau. La réticulation chimique peut s'effectuer à l'aide de solution ionique, comme le chlorure de calcium (CaCl_2), ou à l'aide d'un photo-initiateur (comme le LAP) qui relâchera des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) en réponse à une stimulation lumineuse. La présence de cette espèce chimique entraînera ensuite la création de liaisons entre certains groupes chimiques, par exemple entre les groupements métacrylates. Cette dernière méthode est particulièrement utilisée dans le cas de l'impression par stéréolithographie décrite précédemment, mais aussi dans les méthodes couches par couches comme l'extrusion.

La polymérisation enzymatique utilise la capacité de certaines enzymes à créer des connexions entre différentes protéines. Le cas le plus commun est celui de la thrombine avec un hydrogel basé sur la fibrine. Ce mécanisme fait partie des processus permettant la coagulation des plaies vasculaires et a été mis à profit dans l'ingénierie de nouvelles bioencres.

On peut mentionner un dernier type d'encre, dite sacrificielle, qui aura la propriété de pouvoir être éliminée après le processus d'impression, comme la gélatine, qui se liquéfie à 37°C ou le pluronic F-127 qui se liquéfie à 4°C . Cela permet la fabrication de structures creuses, notamment en impression couche par couche [124].

Toutes ces bioencres possèdent des propriétés propres, et leurs propriétés mécaniques seront limitantes pour leur utilisation avec certaines techniques de bioimpression. L'équilibre entre ces propriétés mécaniques et les propriétés biologiques, qui supporteront les cellules bioimprimées, est donc essentiel pour obtenir une bioencre 'idéale'.

1.4.4 État de l'art des modèles de cancer du sein bioimprimés

La possibilité de recréer des structures 3D biomimétiques offerte par la bioimpression à très rapidement été appliquée pour la cancérologie, avec un modèle de cancer du sein bioimprimé apparaissant dès 2013 [125], seulement 3 ans après le début de l'essor de cette technologie. Dans les 10 dernières années, cette tendance appliquée au cancer s'est intensifiée et se traduit aujourd'hui par une littérature riche, qui a fait l'objet de nombreux articles de revues [88, 90, 126–132]. Cette section décrira de manière non exhaustive les

modèles de cancer du sein bioimprimés les plus pertinent ainsi que leurs limites et besoins qui devront être adressés.

Plusieurs équipes se sont intéressés aux cellules cancéreuses du sein seules, et notamment à leur phénotype canalaire. Duchamp *et al.* ont créé une structure canalaire en utilisant l'impression sacrificielle, ensuiteensemencées avec des cellules MCF-7. Ils ont pu observer le recouvrement de l'entièreté du canal au bout de 24 jours de culture avec une haute viabilité cellulaire. Ils ont conclu à une capacité d'invasion des cellules dans la matrice, cependant celle-ci ne se fait que sur environ 20 μ m et les cellules n'envahissent pas réellement l'environnement, suggérant une impossibilité pour les cellules de dégrader l'hydrogel [124]. Une autre approche pour créer des structures possédant une lumen a été la bioimpression de cellules, de différentes lignées cellulaires, à différentes densités (**Figure 19a,b**) [133]. Cette méthode a permis d'obtenir des sphéroïdes en contrôlant la présence d'une lumen. Cette méthode a mis en évidence des différences phénotypiques entre ces deux conditions. On retrouve dans les sphéroïdes pleins une diminution de l'expression du marqueur E-Cadhérine par rapport aux structures canalaires, et à l'inverse une augmentation de HIF1 α , suggérant une transition épithélio-mésenchymateuse suivie de l'apparition d'un cœur hypoxique. Les sphéroïdes solides ont démontré une meilleure capacité d'invasion, et une résistance plus importante à la doxorubicine [133]. Reid *et al.* ont utilisé la microextrusion pour créer des organoïdes chimériques contenant des cellules saines (MCF-12A, rouges) avec des cellules cancéreuses (MDA-MB-468, vertes) (**Figure 19c**). A 21 jours, les cellules saines forment une structure canalaire, dans laquelle les cellules cancéreuses sont incluses, notamment retrouvée dans la lumen. Il apparaît cependant surprenant de ne pas observer de croissance importante des cellules cancéreuses dans ce système, ni d'invasion et d'échappement des canaux [134]. Ces approches manquent cependant du point essentiel qu'est le microenvironnement, et ne prennent donc pas avantage de la bioimpression pour reproduire cette complexité.

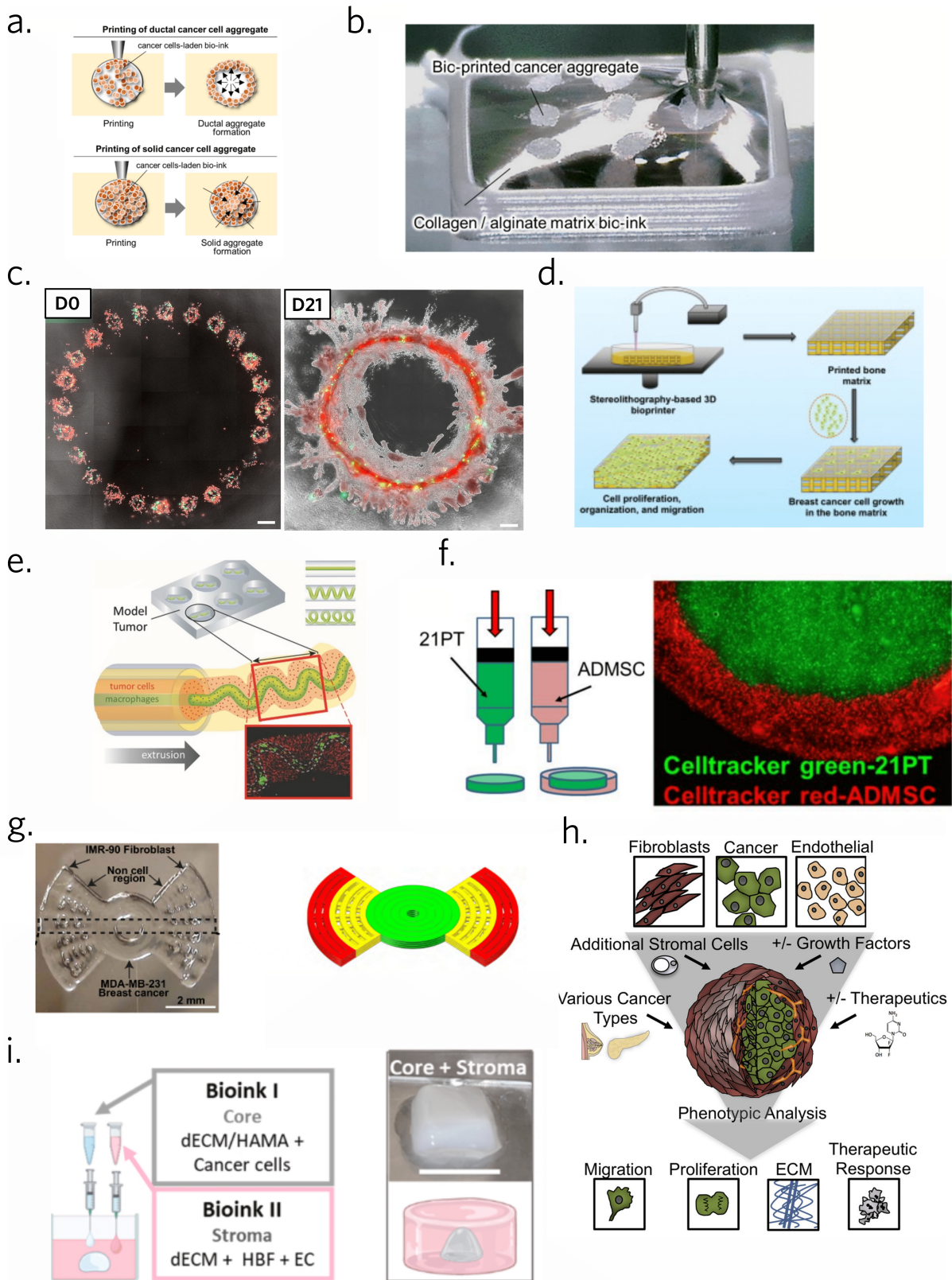


Figure 19: Etat de l'art des modèles de cancer du sein bioimprimés
 a. Schéma de l'impression de sphéroïdes canaux et solides

- b. Photographie de l'impression des sphéroïdes dans la MEC de collagen/alginate. [133]
- c. Image de la bioimpression de cellules épithéliales mammaires (MCF-12A, rouge) et de cellules cancéreuses (MDA-MB-468, vert) à jour 0 et jour 21 de maturation. [134]
- d. Schéma de bioimpression par stéréolithographie d'un modèle osseux pour l'étude des métastases du cancer du sein. [135]
- e. Schéma et imagerie de la coextrusion de macrophages (vert) et de cellules de cancer du sein (vert). [136]
- f. Schéma du processus d'impression et image d'un modèle bioimprimé contenant un cœur cancéreux (21-PT, vert) et une périphérie stromale adipocytaire (ADMSC, rouge). [137]
- g. Photographie et schéma représentant le modèle bioimprimé contenant un centre avec des cellules cancéreuses (MDA-MB-231, vert), ainsi qu'une périphérie avec des fibroblastes (IMR-90, rouge). Les deux sont séparés par une zone acellulaire, [138]
- h. Schéma du modèle bioimprimé contenant un cœur tumoral et une périphérie stromale de fibroblastes et cellules endothéliales (HMF, HUVEC). [120]
- i. Schéma du processus d'impression et photographie du modèle bioimprimé contenant un cœur tumoral entouré d'une périphérie stromale. [139]

Plusieurs travaux d'une même équipe ont utilisé la bioimpression par stéréolithographie pour recréer des structures osseuses, recréant l'environnement métastatique du cancer du sein (**Figure 19d**) [135, 140].

D'autres équipes ont choisi de reproduire des environnements plus représentatifs de la tumeur primaire, plus spécifique du cadre de cette thèse. L'équipe de K. Kilian a développé un système de coextrusion permettant d'encapsuler un filament de bioencres contenant des macrophages par des cellules cancéreuses. L'ensemble est contenu par une capsule d'alginate qui maintient la forme en tube (**Figure 19e**) [136]. Ils ont testé différentes géométries du filament interne en supposant un impact sur la communication entre ces deux types cellulaires sans pour autant le démontrer.

D'autres travaux ont fait le choix d'un microenvironnement composé de cellules adipocytaires [137, 141, 142]. Ying Wang et ses collègues ont développé une géométrie en disque, avec les cellules cancéreuses au centre, entourées par les adipocytes en périphérie (**Figure 19f**) [137]. Ils ont mis en évidence un effet protecteur des adipocytes par rapport à la monoculture, et ont ensuite démontré qu'un volume plus important de stroma adipocytaire entraînait une plus grande résistance [137]. On peut aussi supposer que cet effet soit issu de l'encombrement cellulaire et de l'augmentation de matrice, limitant la concentration locale finale de traitement. Vinson et Chaji n'ont à l'inverse pas mis en évidence d'effet protecteur dans leur modèle [141, 142]. Tao Jiang et collègues, s'intéressant pour leur part aux fibroblastes (lignée IMR-90), ont aussi établi un modèle avec une région centrale cancéreuse et une périphérie stromale (**Figure 19g**). Leur modèle était compatible avec des cultures à long terme, avec une croissance des cellules cancéreuses jusqu'à jour 30, sans

diminution de la viabilité des fibroblastes dans le même temps. Cependant, aucun impact sur la résistance aux traitements, ou sur l'effet des fibroblastes sur le microenvironnement n'a été évalué [138]. Enfin, les deux derniers travaux que nous aborderons incluent à la fois des fibroblastes et des cellules endothéliales [120, 139]. Les deux ont fait le choix d'une géométrie sphérique contenant un cœur cancéreux et une périphérie stromale (**Figure 19h,i**). Ces deux équipes ont utilisés des fibroblastes mammaires sains, non associés au cancer, ainsi que des cellules endothéliales primaires de cordons ombilicaux humains. Langer *et al.* ont montré une résistance accrue à l'inhibiteur de la kinase PI3K des modèles bioimprimés par rapport aux cellules cultivées en 2D. Ils ont aussi pu montrer l'efficacité du sunitinib, ciblant de multiples récepteurs tyrosine kinase, sur leur bioimpression [120]. Cette dernière étude a, par ailleurs, aussi démontré une preuve de concept de l'applicabilité de leur méthode avec des cellules entièrement issues de résection tumorale de tumeur pancréatique [120]. L'étude de González-Callejo a pu mettre en évidence des profils sécrétoires différents entre le cœur tumoral et la périphérie stromale, dans les processus angiogéniques, de l'immunosuppression et de la prolifération tumorale. Ils ont enfin mis en évidence une réponse aux traitements différentes entre les lignées cellulaires MCF-7 et MDA-MB-231 dans leur modèle, avec une résistance accrue au tamoxifène pour cette dernière, cohérente avec leur statut non hormono-dépendant. Il est cependant surprenant que ces deux lignées, avec des agressivités respectives si différentes, aient répondu de la même manière au paclitaxel et à la doxorubicine [139]. Ces deux études ont cependant plusieurs limites communes. Premièrement, les deux modèles sont basés sur une géométrie sphérique, entraînant une densité importante du modèle (**Figure 19i**), limitant l'étude du modèle par imagerie. Cela induit la nécessité de passer par des méthodes histologiques entraînant une perte de la structure tridimensionnelle du modèle. Une géométrie en disque, comme celle utilisée par Wang et Jiang [137, 138] pourrait permettre d'éviter ce problème. Ensuite, l'utilisation de fibroblastes non associés au cancer paraît imparfaite, malgré la capacité de transdifférenciation de celles-ci en présence de cellules cancéreuses [143, 144]. Une comparaison entre les fibroblastes sains et des CAF aurait permis de mettre plus précisément en évidence les spécificités de ces dernières. De plus, dans ces deux modèles, la caractérisation effectuée après maturation est principalement phénotypique et qualitative, avec des marquages cellulaires sans quantification de la complexité des structures par exemple pour les cellules endothéliales. De la même façon, ces deux études ne s'intéressent aucunement à la maturation et au remodelage de la MEC. Leur étude des traitements ne s'est pas non plus intéressée à la radiothérapie, malgré son importance pour le traitement de cette pathologie (**Chapitre 1.1**). Ils n'ont finalement pas testé l'effet des différentes cellules stromales sur la réponse aux traitements, mais se sont contentés d'un effet d'ensemble ne permettant pas de discriminer le rôle des différents acteurs du

microenvironnement.

L'ensemble de ces limites imposent la nécessité de nouveaux modèles, permettant de répondre à ces questions et d'approfondir notre connaissance et compréhension du stroma dans le microenvironnement tumoral. Ce travail de thèse s'attachera à résoudre ces problématiques, en répondant aux objectifs décrits dans la section suivante.

1.5 Objectifs du projet

Ce projet de thèse vise à créer une connexion entre l'expertise en bioimpression de l'ART Bioprint du laboratoire BIOTIS, et la biologie du microenvironnement tumoral, dans le contexte du traitement par radio/chimiothérapie, étudiée par l'équipe PETRY du CRCI2NA, partenaire du projet. Cette thèse s'est construite sur les trois objectifs suivants :

1. **Développer un modèle bioimprimé** récapitulant le cancer du sein et son microenvironnement stromal, incluant spécifiquement des fibroblastes et des cellules endothéliales. Ce modèle devra satisfaire les exigences suivantes : croissance des cellules tumorales, présenter une géométrie contrôlée et reproductible, avoir une taille de l'ordre de quelques millimètres, et être facilement observable par microscopie.
2. **Caractériser le modèle et sa maturation** afin d'évaluer sa pertinence pour l'étude du cancer du sein et de son microenvironnement. Cette caractérisation s'attachera entre autres à examiner le rôle spécifique des fibroblastes associés au cancer, pour décrypter leur impact sur le microenvironnement tumoral en condition basale. La reproduction de caractéristiques clés de la progression tumorale, tant sur le phénotype cellulaire que la MEC, sera analysée pour déterminer la pertinence du modèle.
3. **Comprendre l'influence du microenvironnement sur la réponse à la radiothérapie.** Le modèle sera exposé à des régimes de traitement qui permettront d'évaluer leur efficacité en relation avec le microenvironnement. Une attention particulière sera portée à étudier à nouveau le rôle des fibroblastes associés au cancer et des cellules endothéliales, en examinant notamment leur capacité de communication paracrine et son influence sur la réponse à la radiothérapie.

Chapitre 2

Ingénierie d'un modèle bioimprimé de cancer du sein

Ce projet ayant pour premier objectif le développement d'un modèle bioimprimé, ce chapitre sera consacré à cette tâche. Plus particulièrement, ce développement se déroulera en trois étapes : i) cellulaire, ii) bioencore, iii) processus de bioimpression.

2.1 Développement et caractérisation des lignées cellulaires

Ce projet s'est concentré sur le développement d'un modèle de cancer du sein et de son microenvironnement stromal. Afin de modéliser au mieux ces différents compartiments, différents types cellulaires ont été sélectionnés, comprenant des cellules cancéreuses mammaires, des cellules endothéliales et des fibroblastes. Pour leur reproductibilité, la lignée MCF-7, hormono-dépendante a été sélectionnée pour ce projet. Leur pertinence est aussi justifiée car le modèle s'intéresse à la tumeur primaire, invasive localement, mais non métastasée. Cette lignée est en effet peu agressive et correspond donc à ces critères. Pour les cellules endothéliales, le choix d'une lignée immortalisée est apparu comme peu pertinent en raison de leur faible capacité de maturation en structure microvasculaire. Les cellules primaires endothéliales de cordon ombilical humain (HUVEC) ont donc été utilisées dans ce projet. Afin de pouvoir suivre la disposition spatiale de ces cellules, leur maturation et leur organisation, il paraissait intéressant de leur faire exprimer un rapporteur fluorescent qui nous permettrait de les suivre en microscopie, à épifluorescence en temps réel ou confocale. Pour cela, des transductions avec un rapporteur GFP (*green fluorescent protein*) pour les MCF-7, et mKate pour les HUVEC, ont été réalisées par Marie-Laure Stachowicz et Nathalie Dusserre au sein de l'unité (**Figure 20a**). En

cytométrie de flux, la fluorescence à 488nm pour les MCF-7 GFP+ et les HUVEC mK+ a pu être confirmée, avec respectivement 92.7% et 99.3% d'événement positifs dans les longueurs d'onde attendues (**Figure 20b**).

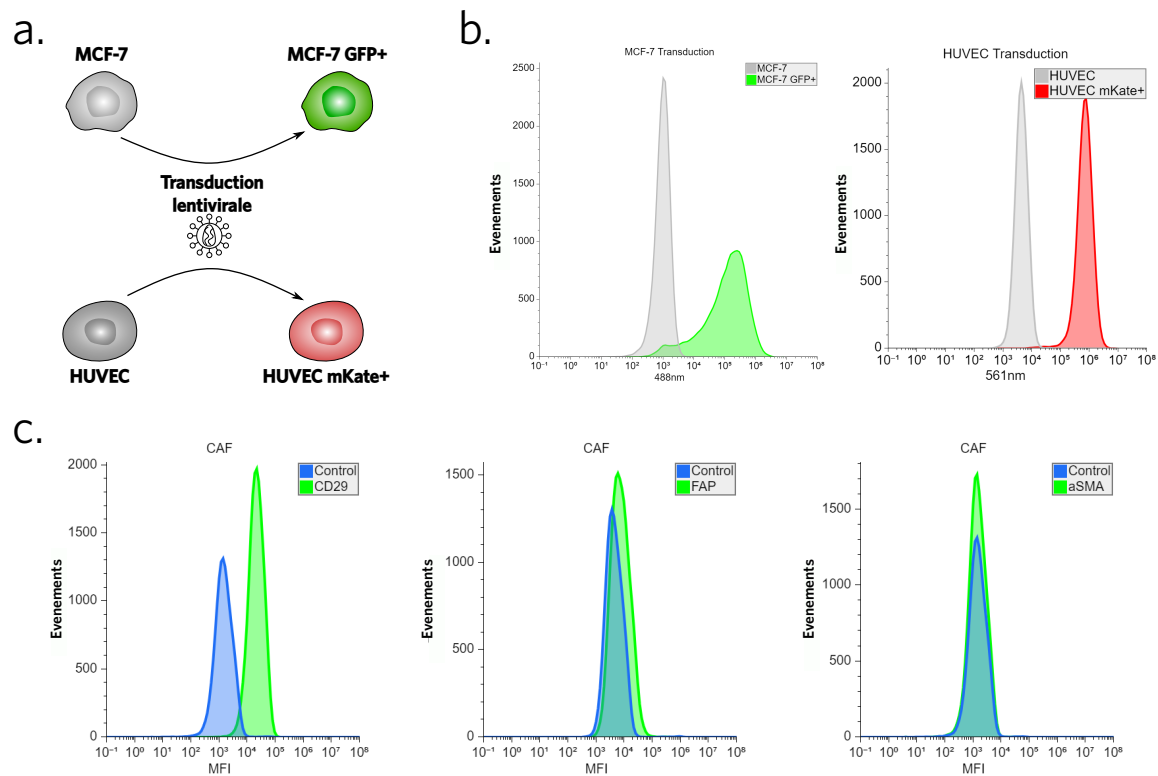


Figure 20: Expression des rapporteurs fluorescents et de marqueurs spécifiques

- Représentation schématique de la transduction lentivirale des lignées MCF-7 et HUVEC avec les rapporteurs GFP et mKate, respectivement.
- Histogramme du nombre d'événements de la fluorescence 488nm des MCF-7, avant et après transduction (gauche), et 561nm des HUVEC avant et après transduction (droite) par cytométrie en flux.
- Histogramme du nombre d'événements pour les marqueurs CD29, FAP, αSMA par la lignée CAF par cytométrie en flux. La lignée apparaît CD29pos, FAPneg, αSMAneg. 104 événements cellulaires sont représentés sur chaque histogramme.

Pour introduire un deuxième type cellulaire stromal, le choix des fibroblastes a été fait pour leur abondance et leur impact sur le microenvironnement. L'utilisation de deux lignées primaires différentes, une associée au cancer du sein (CAF), et l'autre issue de tissu mammaire sain (NMF pour fibroblastes mammaires normaux), a été fait pour mieux identifier l'impact spécifique des CAF. Ces cellules étant particulièrement hétérogène (**Chapitre 1.2.1**), l'expression de différents marqueurs a été vérifiée par cytométrie en flux. La lignée de CAF s'est révélée CD29pos, FAPneg, αSMAneg, ce qui semble indiquer

un sous-type CAF-S3 selon la caractérisation de Costa et collègues [41]. Ces résultats indiquent l'obtention de plusieurs lignées cellulaires pertinentes pour la création d'un modèle de cancer du sein et de son microenvironnement.

2.2 Optimisation et caractérisation de la bioencre

En plus des cellules, la création d'un modèle par bioimpression nécessite l'utilisation d'une bioencre, qui associe cellules et hydrogel. Dans le cas du cancer du sein, ces biomatériaux doivent reproduire les caractéristiques de la MEC tout en ayant les propriétés mécaniques requises pour la bioimpression. Cette section portera sur l'optimisation et la caractérisation de la bioencre utilisée au cours de ces travaux. L'objectif de cette étude était d'évaluer l'impact biologique de la fonctionnalisation d'une bioencre à base collagénique, ainsi que ses propriétés mécaniques pour s'assurer de son adéquation avec la technique de bioimpression par microextrusion.

2.2.1 Optimisation des propriétés biologiques

L'hydrogel utilisé, basé sur des précédents travaux au sein de l'équipe [145], est composé de collagène de type I (Col), composant majeur de la MEC tumorale [32]. Ce biomatériau a été couplé à l'acide hyaluronique, un glycosaminoglycane sur-représenté dans la MEC du cancer du sein [35] et possédant des propriétés mécaniques permettant de moduler la rhéologie de l'encre. Ces polymères ont été greffés avec des groupements méthacrylates (MA), qui forment des liaisons covalentes en présence de radicaux libres permettant une photo-polymérisation de l'hydrogel. A partir de précédents travaux au sein du laboratoire démontrant les capacités biologiques de cette composition [145], les concentrations de collagène métacrylé (ColMA) et d'acide hyaluronique métacrylé (HAMA) ont été établies à 2mg/mL et 10mg/mL, respectivement. Afin de rendre cette encre plus spécifique de la MEC tumorale, une fonctionnalisation pour intégrer un composant reproduisant la laminine a été envisagée. Le peptide IKVAV, initialement présent sur la chaîne α -1 de la laminine-111 (**Figure 21a**), est connu pour sa capacité à être un point d'encrage pour les intégrines à la surface cellulaire [146]. Il a notamment été démontré que ce peptide augmente la croissance tumorale, ainsi que les processus d'angiogenèse, et pourrait expliquer en partie l'importance des laminines dans les différents processus cancéreux [147].

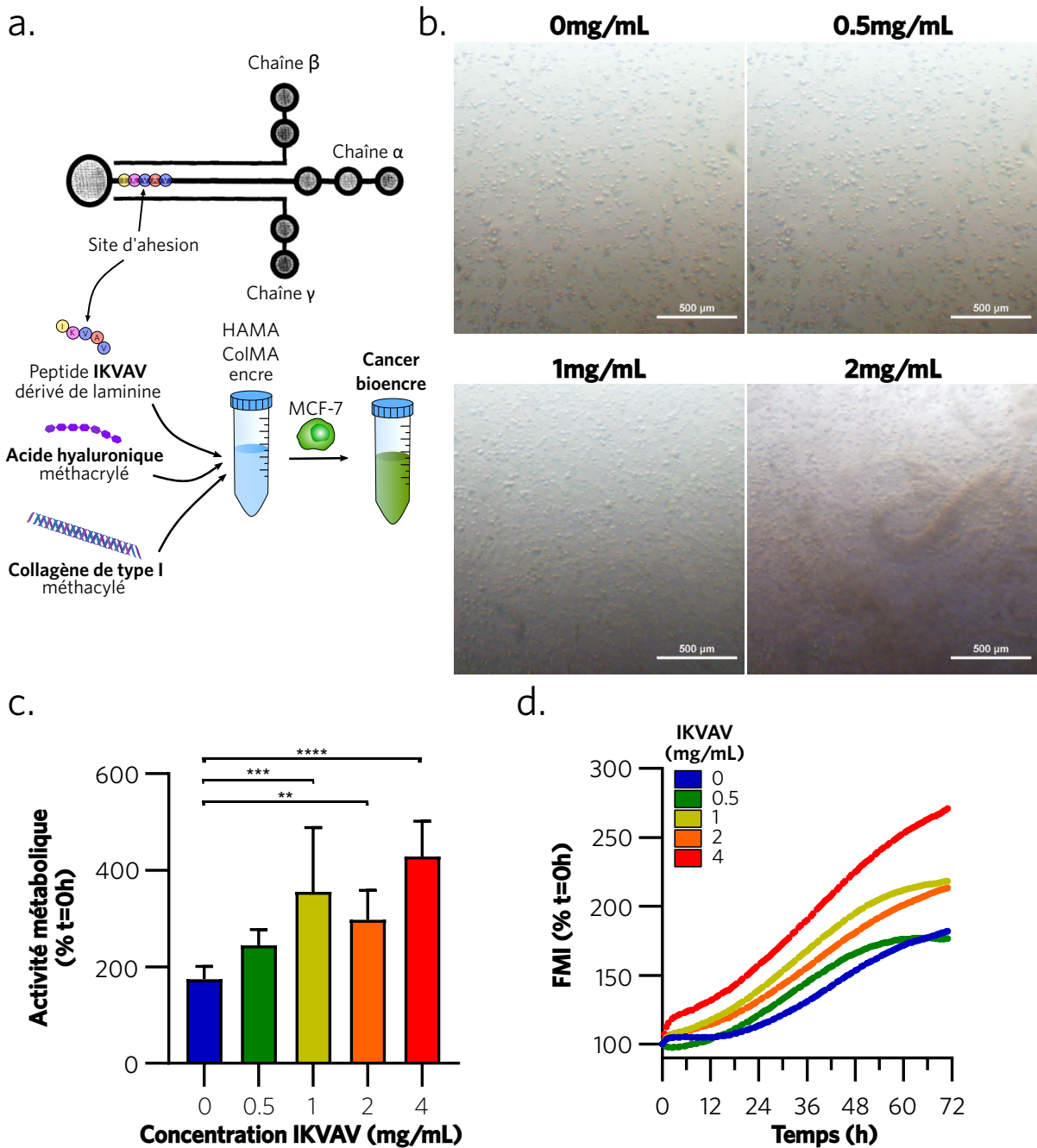


Figure 21: Composition et fonctionnalisation de la bioencre

- Représentation schématique de la laminine avec ses 3 chaînes et la présence du site d'adhésion aux intégrines IKVAV, dont le peptide synthétique est intégré à la composition de la bioencre.
- Imagerie en contraste de phase de l'hydrogel ensemencés avec 5M/mL de cellules MCF-7, avec différentes concentrations de peptides. Echelle, 500 μm .
- Activité métabolique après 7 jours de culture (N=3, n=5-12).
- Intensité moyenne de fluorescence (FMI) des cellules MCF-7 en culture dans les hydrogels (N=3, n=6-11).

Les résultats expriment la moyenne \pm écart-type (c) et la moyenne seule (d). Les statistiques ont été calculés par un test Kruskal-Wallis suivi d'un test post-hoc de Dunn. **p<0.01 ;***p<0.001

;****p<0.0001.

Afin de comprendre l'effet d'une telle fonctionnalisation sur l'activité des cellules cancéreuses dans le cadre de la bioencres ColMA-HAMA, des concentrations entre 0 et 4mg/mL de peptide ont été ajoutées, avec 5M/mL de cellules MCF-7 (**Figure 21a**). L'observation par imagerie à contraste de phase a montré une répartition homogène des cellules dans l'ensemble des conditions. On a cependant observé qu'à 2mg/mL, la bioencres présentait une densité optique plus élevée, avec l'apparition de fibres qui réduisent l'homogénéité de la bioencres (**Figure 21b**). Ces objets opaques résulteraient de l'agrégation des peptides, limitant leur solubilisation et leur intégration homogène dans l'encre.

Pour évaluer le devenir des cellules en culture dans cet hydrogel, les cellules encapsulées ont été incubées avec de la resazurine, permettant de quantifier l'activité métabolique de l'échantillon. Ces incubations ont été effectuées le jour même de l'ensemencement, puis à plusieurs temps.

A 7 jours de culture, l'activité métabolique a augmenté de près de 200% dans la condition sans peptide. La condition contenant 0.5mg/mL de peptide ne montrait pas de différence significative avec le contrôle, mais on observait une augmentation significative de l'activité métabolique à 1, 2 et 4mg/mL, avec une activité métabolique multipliée par 2 par rapport au contrôle. Aucune différence significative n'a été détectée entre ces conditions (**Figure 21c**), laissant supposer que l'effet sur l'activité métabolique arrivait à saturation à partir de 1mg/mL.

Pour confirmer ces résultats, ces cultures ont été répliquées avec des cellules MCF-7 exprimant le rapporteur fluorescent GFP (MCF-7 GFP+). Ce rapporteur nous permettait de suivre les cellules par microscopie à épifluorescence afin d'observer dans le temps l'évolution des cellules, et notamment leur croissance en quantifiant l'intensité du signal. Ce suivi a été effectué pendant les premières 72h de culture des modèles en imagerie de suivi temporel, avec une image toutes les deux heures.

Ces résultats se sont révélés proches de ceux obtenus précédemment, avec une évolution similaire des courbes pour les conditions à 0 et 0.5mg/mL de peptide IKVAV. De la même manière ici, on retrouvait des courbes avec des tendances croissantes plus importantes dans les autres conditions, notamment équivalentes entre 1 et 2mg/mL. La condition à 4mg/mL était cependant supérieure à ces deux dernières (**Figure 21d**). Cette différence pourrait s'expliquer par la temporalité, l'étude étant ici sur 72h, il n'est pas exclu que les courbes puissent atteindre un même niveau d'intensité de fluorescence en poussant l'étude

sur 7 jours. Une étude sur cette durée serait cependant complexe en raison de la nécessité du changement de milieu, et l'absence de repaire dans l'hydrogel permettant d'acquérir strictement la même zone après ce déplacement du système.

Par conséquent, le peptide IKVAV possédait une propriété promotrice de la croissance tumorale dans cet hydrogel, justifiant son intégration dans la composition finale de la bioencres utilisée dans cette étude. Le choix d'une concentration à 1mg/mL est apparu comme le plus adapté, puisque cette concentration a permis d'obtenir un effet biologique significatif, sans pour autant augmenter la densité optique ni l'inhomogénéité de l'hydrogel. Ces deux caractéristiques sont critiques, la première pour l'observation du modèle et l'acquisition des données par microscopie, et la seconde pour le processus de microextrusion qui peut être perturbé par la présence de particules volumineuses et denses au sein de la bioencres.

2.2.2 Caractérisation mécanique

Les propriétés mécaniques de l'hydrogel, notamment visco-élastiques, peuvent influencer non seulement la bioactivité [148] mais aussi l'impression du biomatériau. Dans le cadre de la microextrusion, la bioencres doit avoir une viscosité permettant l'extrusion par la buse, en ayant des forces de cisaillements relativement faibles afin de ne pas endommager les parois cellulaires et ainsi affecter la viabilité des cellules imprimées. La bioencres doit aussi être suffisamment visqueuse pour maintenir sa forme après la déposition du matériaux, l'inverse amenant à une perte de résolution et de contrôle spatial de la géométrie imprimée. Ces deux caractéristiques, s'opposant l'une à l'autre, complexifient l'obtention d'une bioencres idéale.

La viscosimétrie de l'hydrogel ColMA (2mg/mL) HAMA (10mg/mL) IKVAV (1mg/mL) a été réalisée. La viscosité diminuait de manière non linéaire avec le taux de cisaillement (**Figure 22a**), s'écartant donc du comportement d'un fluide newtonien. Ce comportement décroissant est dit rhéofluidifiant (shear thinning), décrit par une diminution de la viscosité avec l'augmentation des forces de cisaillements. Cette propriété est particulièrement intéressante pour la microextrusion puisqu'elle implique que lors de l'extrusion, avec la pression exercée sur l'hydrogel et son écoulement, la viscosité va diminuer réduisant les forces de cisaillements en surface des cellules favorisant une plus haute viabilité. A l'inverse, après déposition, l'hydrogel sera en position statique avec moins de contraintes de cisaillements ce qui favorisera une viscosité plus importante. Cette propriété était attendue grâce à l'incorporation du HA dans l'hydrogel.

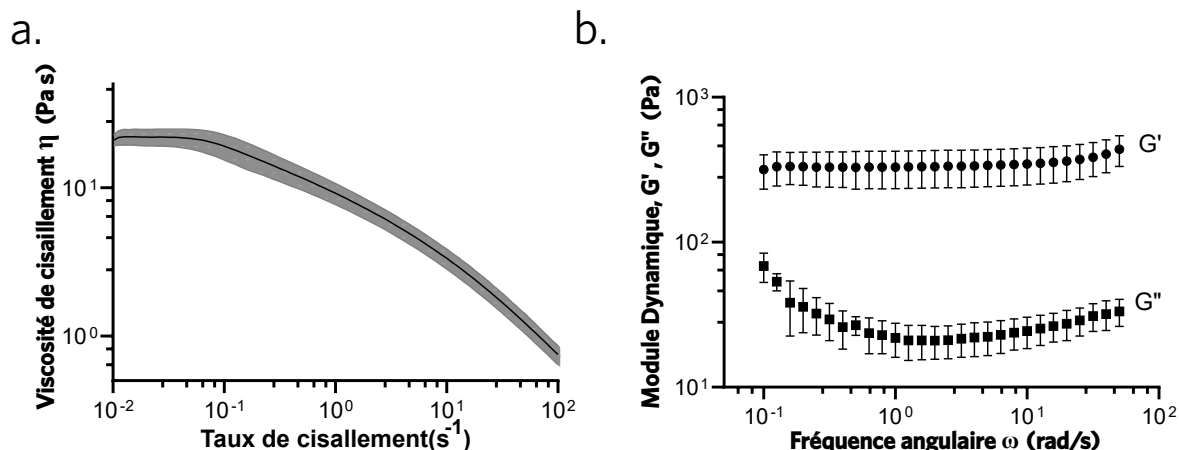


Figure 22: Caractérisation mécanique de la bioencre

- a. Viscométrie de l'hydrogel à température ambiante (25°C) (N=3).
 b. Rhéologie de l'hydrogel après photo-polymérisation à l'UV, à 37°C. G' , module de conservation ; G'' , module de dissipation (N=3).

Les résultats expriment la moyenne \pm écart-type.

D'autre part, l'hydrogel après polymérisation a pu être caractérisé par rhéologie pour mieux distinguer les composantes visqueuse et élastique de ce matériau. Comme prévu le module de conservation (G') est ici supérieur au module de perte (G'') (**Figure 22b**), traduisant un comportement à prédominance élastique, donc plus proche du solide que du liquide. Cela confirme la capacité de photo-polymérisation de l'hydrogel étudié, et l'applicabilité de cette méthode pour obtenir des dépôts en volume lors de la bioimpression. D'autre part, le module de conservation s'élevait à $G' = 334 \pm 82$ Pa (**Figure 22b**), indiquant que la rigidité serait environ inférieure d'un facteur 10 face aux mesures établies par élastographie acoustique sur des tumeurs *in vivo* [149]. Cette faible rigidité initiale peut s'expliquer par la différence de méthode de mesure, mais surtout par l'absence de cellules lors de la caractérisation de l'hydrogel, contrairement au tissu tumoral richement cellularisé. Cette caractérisation ne prend pas en compte non plus l'évolution temporelle de la rigidité de cet environnement en présence de cellules. Cette question sera adressée plus tard dans ce manuscrit.

Ces résultats ont démontré l'intérêt de cette bioencre pour la modélisation du cancer, tant au niveau de sa bioactivité pro-tumorale, que de ses propriétés mécaniques adaptées à la culture des cellules ainsi qu'à la bioimpression par microextrusion.

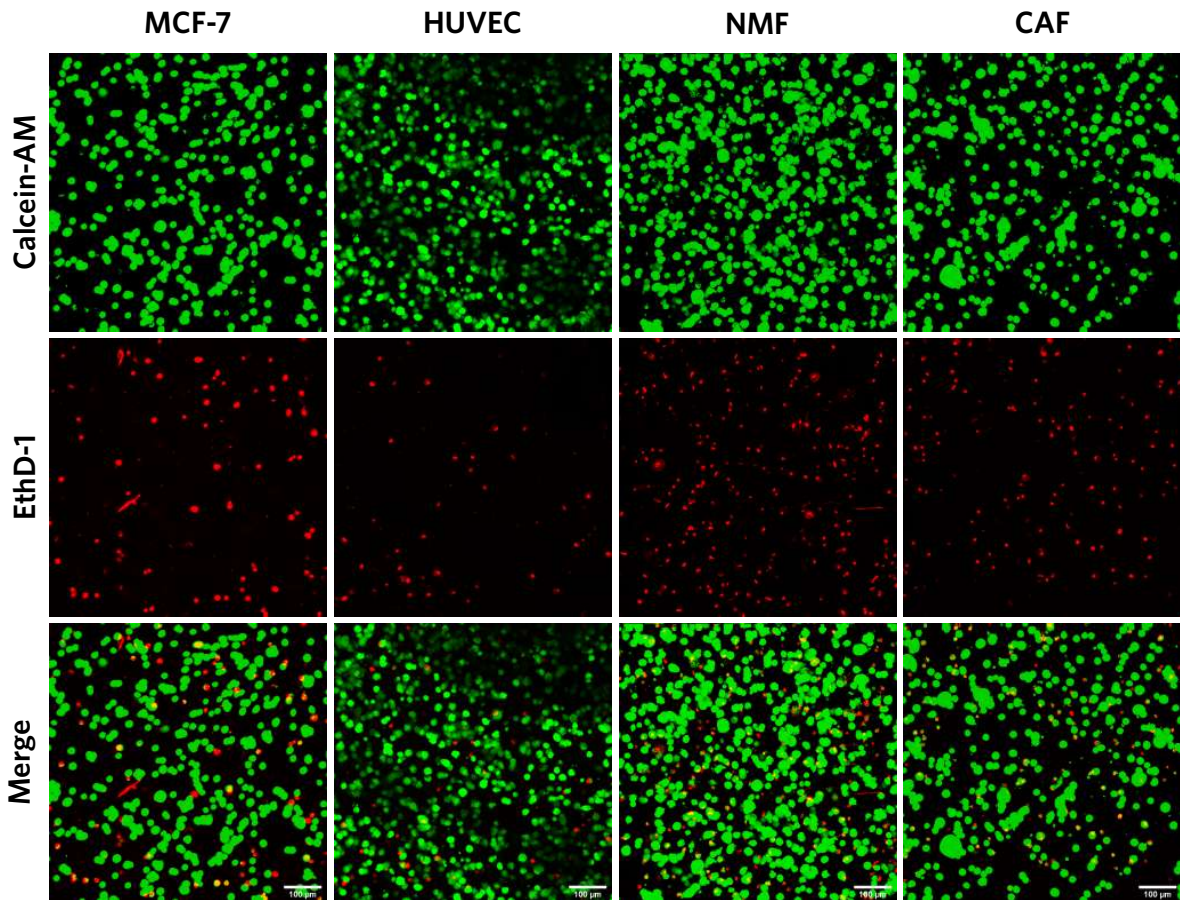
2.3 Bioimpression

Après avoir caractérisé les propriétés biologiques et mécaniques de la bioencre, le deuxième objectif a été d'évaluer l'imprimabilité de cette bioencre cellularisée. Pour se faire, l'impact du processus sur les différents types cellulaires utilisés ainsi que la capacité d'impression d'une géométrie reproductible ont été étudiés.

2.3.1 Viabilité post-impression

Le processus de bioimpression peut être endommageant pour les cellules. On retrouve notamment des variations d'hygroscopie, de température et de CO₂ lors de la préparation des encres, des forces de cisaillements et une exposition aux UV durant l'impression. Afin de s'assurer que la viabilité cellulaire post-impression est bien compatible avec la mise en culture des modèles, les cellules ont été marquées 24h après l'impression à la Calcein-AM, marquant en vert les cellules vivantes, et l'EthD-1, marquant en rouge les cellules mortes.

a.



b.

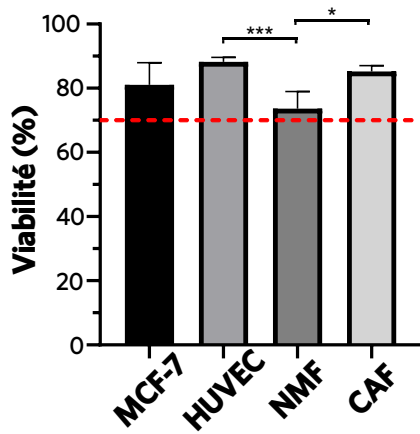


Figure 23: Viabilité cellulaire post-impresion

- a. Projection d'une acquisition 3D de marquage de viabilité cellulaire à 24h après l'impresion avec les cellules vivantes (vert - Calcein-AM) et mortes (rouge - EthD-1). Barre d'échelle, 100μm.
- b. Quantifications de la viabilité 24h post-impresion par test Live/Dead, la ligne rouge pointillée indique 70% de viabilité (N=3, n=5-18).

Les résultats représentent la moyenne \pm écart-type. Les comparaisons ont été faites avec le test Kruskal-Wallis, suivi du test post-hoc de Dunn. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$

L'acquisition en 3D par imagerie confocale des gels bioimprimés a permis la quantification de la viabilité des différents types cellulaires. Il est apparu que dans l'ensemble des impressions, quel que soit le type cellulaire, la viabilité moyenne est supérieure à 70% (**Figure 23a,b**). Ce seuil est extrapolé de la norme ISO-10993-5, admise en ingénierie comme limite de viabilité au-delà de laquelle un matériau est considéré non cytotoxique. On a cependant observé une légère diminution significative pour la condition NMF par rapport aux autres conditions, malgré une viabilité toujours acceptable (**Figure 23b**). Ces résultats ont confirmé la compatibilité de la bioimpression de cet hydrogel avec des cellules viables, et donc la possibilité de mise en culture des structures fabriquées.

2.3.2 Impression et reproductibilité du modèle

Après avoir vérifié la viabilité des cellules imprimées, l'objectif a été d'étudier la possibilité de bioimprimer un modèle avec une organisation spatiale reproductible.

Le design choisi comportait un centre cancéreux, entouré par une périphérie stromale, imprimés en monocouche pour atteindre un modèle en forme de disque. Ce choix a été fait pour s'affranchir des limites imposées par les modèles sphériques de Langer et Blanco-Fernandez [120, 139], et en s'inspirant des travaux de Wang et Jiang [137, 150].

Le processus de bioimpression se déroulait en trois étapes, I) la déposition de la bioencre cancéreuse, II) la déposition de la bioencre stromale, III) la photopolymérisation UV (**Figure 24a**). Cette méthode a été optimisée empiriquement pour obtenir un modèle monocouche d'environ 5mm de diamètre total. Le temps total d'impression d'un seul modèle était légèrement inférieur à 1 minute, on peut donc parler d'une production à moyen débit, effectuée dans des plaques 24 puits (**Figure 24b**).

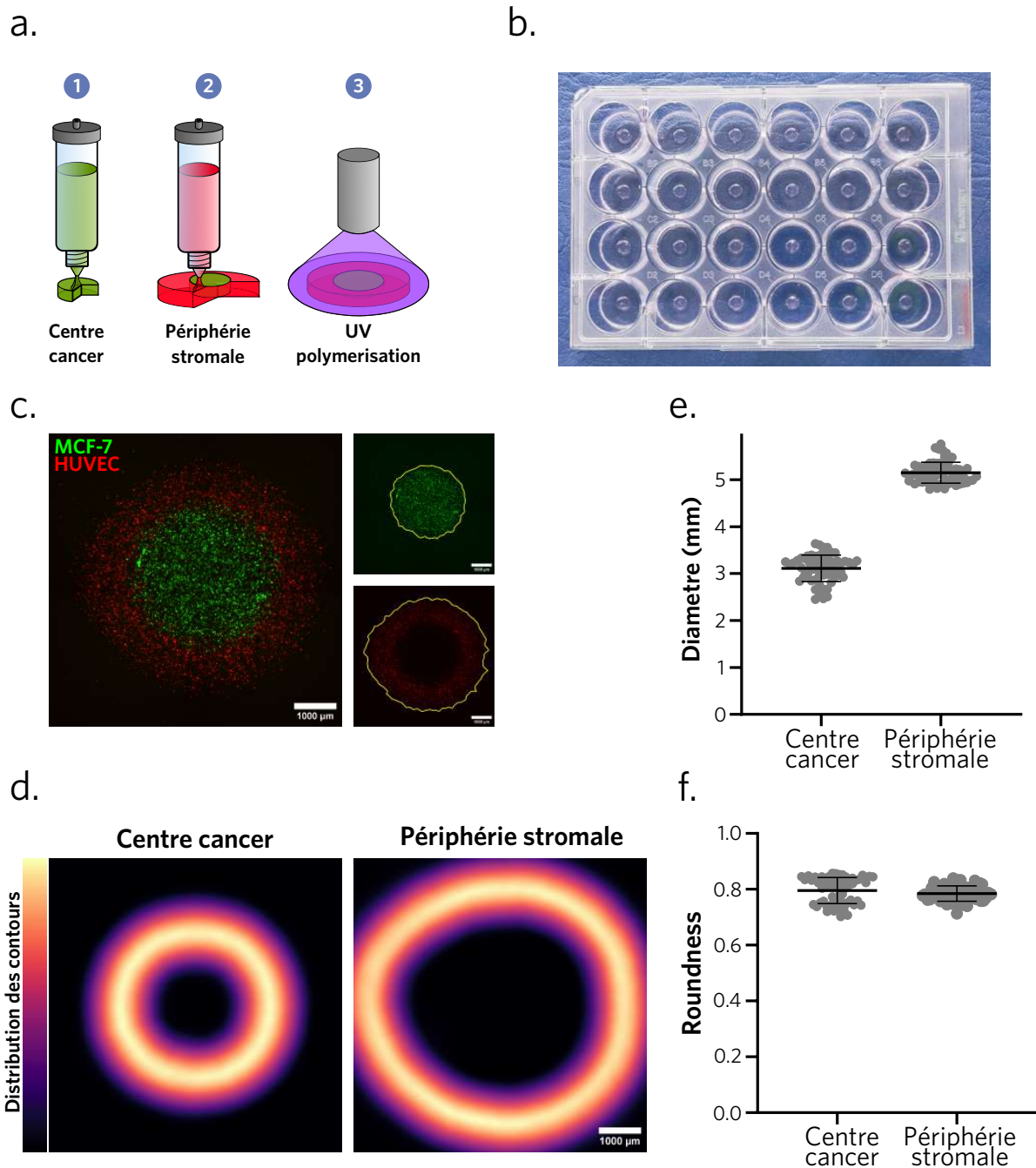


Figure 24: Impression du modèle et reproductibilité

- Schéma simplifié du processus de bioimpression en 3 étapes : 1. Impression de la bioencore avec des cellules cancéreuses au centre ; 2. Impression de la bioencore contenant les cellules stromales en périphérie ; photopolymérisation avec la lumière UV.
- Photographie représentative d'une plaque 24 puits avec un modèle imprimé au fond de chaque puit.
- Image en épifluorescence d'un modèle imprimé avec des MCF-7 GFP+ au centre et des HUVEC mKate+ en périphérie et segmentation computationnelle des deux zones.
- Distribution statistique des contours
- Quantification du diamètre des zones centrale et périphérique du modèle.
- Score de rondeur (roundness) des zones centrale et périphérique du modèle.

Les résultats expriment la moyenne \pm écart-type (N=3, n=62).

Un des avantages théoriques de la bioimpression est l'automatisation et la reproductibilité des modèles produits.

Afin de confirmer cette reproductibilité, le modèle a été imprimé en incorporant des cellules MCF-7 GFP+ dans la bioencore cancéreuse, et des HUVEC transduites pour le rapporteur mKate (HUVEC mK+) dans la bioencore stromale. Le signal fluorescent émis par ces rapporteurs a été acquis par microscopie à épifluorescence directement après l'impression, afin de pouvoir segmenter les zones cancéreuses et stromales. Le modèle peut être caractérisé par les contours de ces deux parties distinctes à l'aide d'un programme d'analyse d'image développé spécifiquement pour cette tâche (appendix B). Les contours des modèles ont donc été détectés (**Figure 24c**), et cumulés pour obtenir une distribution moyenne des contours.

Les contours du centre cancéreux sont apparus homogènes et symétriques, la périphérie stromale était elle aussi homogène mais avec un léger décalage sur la partie gauche du modèle (**Figure 24d**). Ce décalage était attribuable à l'impression, puisque cette zone est celle où la buse commence et finit le tour, ce qui engendre parfois une sur-déposition de bioencore à cet endroit.

Enfin, on peut caractériser ces contours par leur diamètre, ainsi que leur score de 'rondure' (roundness). Un score de 1 caractérise un cercle parfait sans rugosité de surface, tandis qu'un score qui tend vers 0 représente une forme qui s'approche d'un périmètre infini pour une surface finie (forme dite fractale).

Le diamètre de la zone centrale était de 3.09 ± 0.28 mm, avec un score de 0.79 ± 0.05 . La zone périphérique avait un diamètre de 5.14 ± 0.22 mm pour un score de 0.78 ± 0.03 (**Figure 24e,f**). Dans les deux cas, l'écart type du diamètre comme du score était assez faible, indiquant une bonne reproductibilité dans la création des modèles. La diminution du score de rondure de la zone périphérique par rapport au centre n'était pas significative malgré la déformation de la distribution observée.

Ces résultats ont confirmé la fiabilité du processus de bioimpression par microextrusion pour imprimer un modèle de cancer du sein avec son microenvironnement comportant deux compartiments, cancéreux et stromal, distincts, de manière reproductible.

Le modèle obtenu est représenté en **Figure 25**, et correspondait à l'objectif fixé de produire par bioimpression un modèle de l'ordre du millimètre contenant deux zones distinctes, cancéreuse et stromale, reproduisant la tumeur et son microenvironnement. Le

modèle de cancer du sein sera appelé BpBCM (pour *Bioprinted Breast Cancer Model*) dans la suite de ce manuscrit pour simplifier le propos.

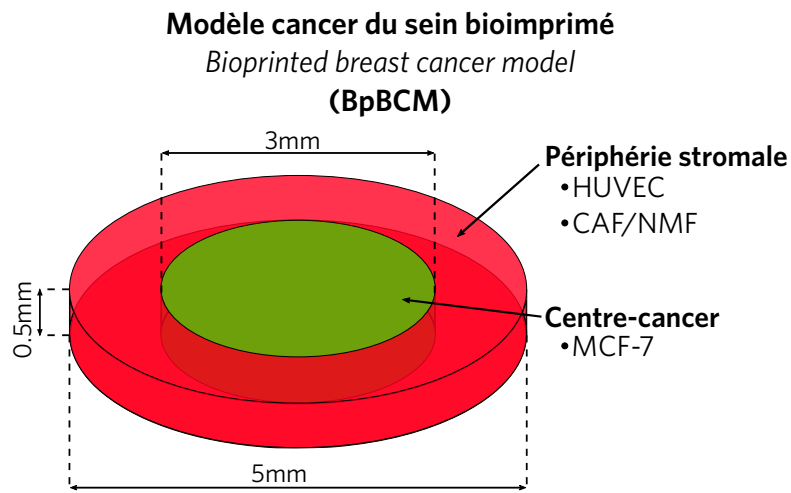


Figure 25: Représentation schématique du modèle de cancer du sein bioimprimé (Bp-BCM)

Chapitre 3

Caractérisation et maturation du modèle

Un aspect important des modèles biologiques incorporant des cellules réside dans leur maturation. Les cellules, étant en effet métaboliquement actives, sont capables de façonner leur environnement, et inversement d'être influencées par celui-ci. L'évolution d'un modèle tumoral est un processus dynamique qui se déploie à la fois dans l'espace et le temps. Par conséquent, se limiter à une caractérisation initiale s'avèrerait réducteur, surtout dans la perspective de décrypter les intercommunications dans le microenvironnement. Cette partie s'attachera à caractériser la maturation du modèle, d'une part au niveau cellulaire et d'autre part au niveau matriciel.

3.1 Maturation des cellules cancéreuses

Dans un premier temps cette étude s'est intéressée au devenir des cellules MCF-7 imprimées dans le cœur du modèle, pour l'instant en présence d'une encre non cellularisée en compartiment stromal.

3.1.1 Évolution de la viabilité

La viabilité cellulaire post-impression des MCF-7 a été caractérisée de manière globale dans la partie précédente. Cependant, cette description a été faite à un seul temps et ne prenait pas en compte la position spatiale des cellules étudiées. Afin d'intégrer ces deux paramètres, des acquisitions d'images confocales 3D ont été effectuées à jour 1 et jour 7 dans le centre du modèle, après un marquage Live/Dead. Deux zones ont été distinguées dans ces images, en fonction de la profondeur par rapport à la surface du modèle en contact du milieu. La zone dite en surface, à moins de 200 μ m du milieu, est

distinguée du cœur tumoral, au-dessus de cette distance (**Figure 26a**). Cette distance correspond à la limite de diffusion à partir des structures vasculaires dans le tissu tumoral [151].

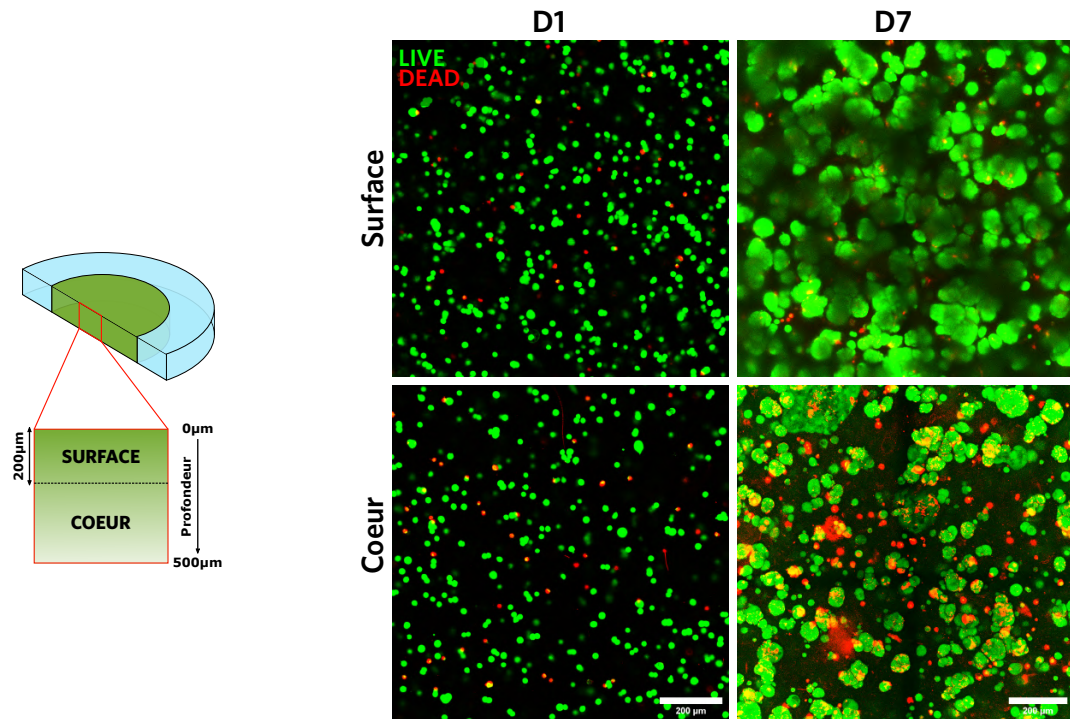
La viabilité à jour 1 était homogène et apparaissait similaire entre la surface et le cœur. A jour 7, les cellules vivantes étaient développées en sphéroïde, tandis qu'il semblait que la répartition des cellules, particulièrement des cellules mortes, n'était plus homogène (**Figure 26a**).

Afin de quantifier ces paramètres, ces images 3D ont encore été analysées par un algorithme spécifique, permettant de récupérer la position spatiale, le volume, et le marqueur exprimé par les cellules ou sphéroïdes (appendix C).

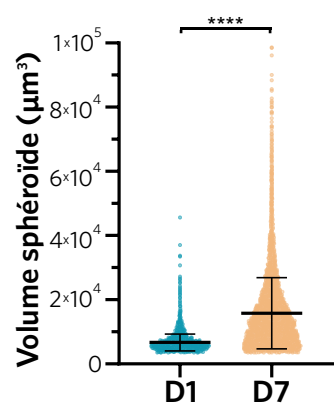
La distribution du volume des sphéroïdes a permis de confirmer une augmentation significative du volume à jour 7, comparé à jour 1 (**Figure 26b**). La viabilité moyenne de la surface par rapport au cœur n'était pas significativement différente à jour 1. Inversement, il existait une différence significative à jour 7, avec une diminution de la viabilité dans le cœur tumoral. La viabilité moyenne restait cependant élevée (>80%), même au cœur du modèle (**Figure 26c**).

Pour mieux comprendre ces différences, la distribution spatiale des sphéroïdes, vivants et morts, est représentée en **Figure 26d**. Elle a mis en évidence une différence significative entre la profondeur des sphéroïdes vivants à jour 1 par rapport à jour 7. Cependant, cette différence était légère en termes de distribution, et ne suffisait pas à elle seule à expliquer la différence de viabilité observée. La distribution des cellules mortes était plus informative. A jour 1, une accumulation de cellules mortes est apparue en surface du modèle, dans ce qui était la première couche cellulaire sur une épaisseur <50 μm (**Figure 26d**). Cette observation a été attribuée au processus de photopolymérisation, qui induit un phénomène de synérèse, c'est-à-dire de contraction du gel, augmentant les forces mécaniques exercées en surface, probablement responsable de cette diminution de viabilité. Inversement, à jour 7, très peu de cellules mortes étaient présentes en surface alors qu'on constatait dans le même temps une accumulation dans le cœur tumoral (**Figure 26d**). Cette différence majeure de distribution semblait expliquer en partie les différences de viabilités observées entre la surface et le cœur du modèle.

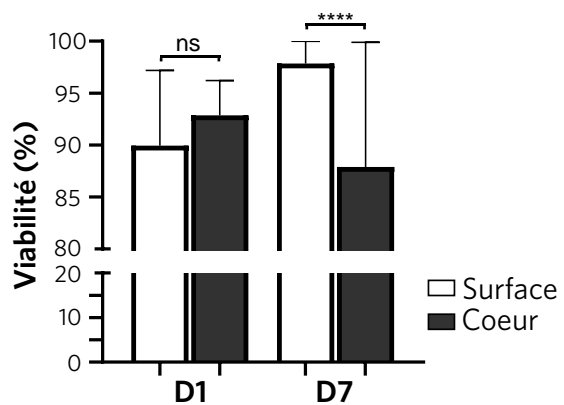
a.



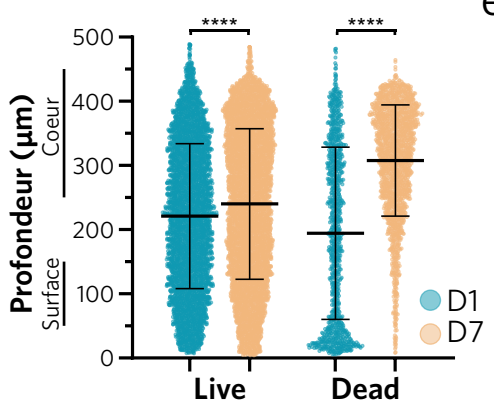
b.



c.



d.



e.

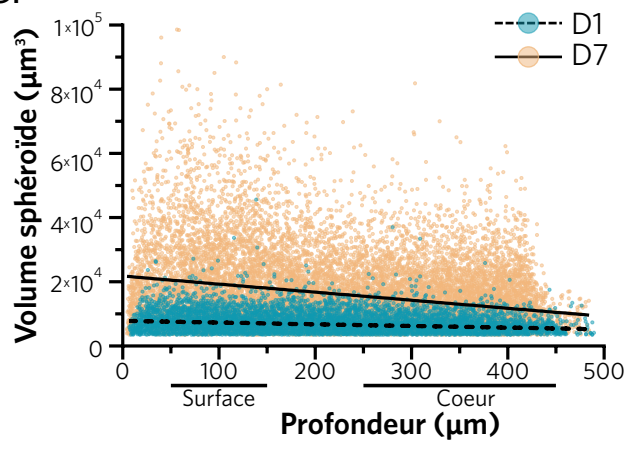


Figure 26: Évolution de la viabilité des cellules cancéreuses à 7 jours

- a. Schéma de la zone imagée ainsi que de la séparation cœur/surface, le cœur correspondant au 200µm à partir du haut du modèle en contact avec le milieu, et le cœur de cette limite jusqu'à la lame de verre. Imagerie confocale avec une coupe représentative de la surface et du cœur tumoral, à jour 1 et 7. Les cellules vivantes sont marquées avec le marqueur Live (vert) et les cellules mortes avec le marqueur Dead (rouge).
- b. Distribution du volume de l'ensemble des sphéroïdes à jour 1 et jour 7.
- c. Viabilité moyenne dans les zones de la surface et du cœur tumoral.
- d. Distribution de la profondeur des cellules marquées Live et Dead à jour 1 et 7.
- e. Distribution du volume des sphéroïdes en fonction de la profondeur dans le modèle à jour 1 (pente de la courbe de tendance : -5.254) et jour 7 (pente de la courbe de tendance : -25.10).

Les données sont représentées avec la moyenne \pm écart-type. Chaque point représente un sphéroïde sur les graphes de distribution. Les p-values ont été calculées avec les tests two-tailed Mann-Whitney (b) et Kruskal-Wallis (c,d) suivi d'un test post-hoc de Dunn (N=3, n=18). ns: non significatif ; ****p<0.0001

Un autre aspect expliquant ce gradient pouvait être la présence d'une différence de volumes de sphéroïdes entre la surface et le cœur. Pour vérifier cette hypothèse, la corrélation entre profondeur et volume des sphéroïdes de cellules vivantes a été évaluée. Ainsi, une corrélation significative entre ces deux paramètres est apparue, et celle-ci était marquée à jour 7 par une diminution de la taille des sphéroïdes avec l'augmentation de la profondeur (**Figure 26e**). Les sphéroïdes les plus proches de la surface étaient donc plus volumineux, participant ainsi au gradient de viabilité.

L'ensemble de ces données suggèraient l'apparition d'un cœur nécrotique au cours du processus de maturation, avec encore des viabilités élevées dans le modèle et une augmentation de la taille des sphéroïdes indiquant les capacités de croissance des cellules.

3.1.2 Apparition d'un coeur hypoxique

L'apparition d'un gradient de viabilité suggèrait que les cellules au cœur du modèle pouvaient manquer de certains facteurs en comparaison avec les cellules en surface. La limite de diffusion de l'oxygène depuis le milieu jusqu'aux cellules du cœur, pourrait entraîner l'apparition d'un phénotype cellulaire hypoxique dans cette zone.

Afin d'évaluer cette hypothèse, des cellules MCF-7 ont été transduites avec un rapporteur d'hypoxie HRE-dUnaG [152], induisant l'expression d'une fluorescence verte sous le contrôle du promoteur HRE (Hypoxia Response Element). Ces cellules ont ensuite été incorporées dans la bioencore et imprimées dans le centre cancéreux du BpBCM.

Dans un premier temps, l'expression de ce rapporteur a été suivie par imagerie au cours du temps, capturant une image du modèle et de la fluorescence verte toutes les deux heures, pendant 7 jours. Afin d'avoir un contrôle de la fluorescence basale du rapporteur, la fluorescence des cellules au sein du modèle a été comparée à ces mêmes cellules cultivées

en 2D. Les BpBCM comme les cultures contrôles étaient maintenues dans un incubateur à 21% d'oxygène.

L'expression de HRE-dUnaG était en limite de détection à jour 1 post-impression, alors qu'une fluorescence importante a pu être observée à jour 7 (**Figure 27a**). L'aspect dynamique de ce changement phénotypique a pu être quantifié grâce à la fluorescence moyenne (MFI) du modèle et des cellules en 2D. Alors que les cellules 2D ne montraient pas d'augmentation des niveaux de fluorescences au cours des 7 jours, les cellules du modèle bioimprimé avaient un niveau de fluorescence croissant à partir du jour 5 (**Figure 27b**). Une différence significative de la quantification du niveau de fluorescence a été observée entre les BpBCM et le contrôle en 2D (**Figure 27c**). Le point d'inflexion spécifiquement observé à jour 5 pourrait révéler l'existence d'un seuil de densité cellulaire, à partir duquel les cellules entraient en hypoxie dans le BpBCM.

L'apparition d'une zone hypoxique a posé la question de sa colocalisation avec la zone nécrotique, dans le cœur du modèle. Avec les précédents résultats exprimant une différence de volume de sphéroïde, la variabilité de la prolifération était une seconde hypothèse à interroger pour mieux comprendre le type de gradient apparaissant dans le BpBCM.

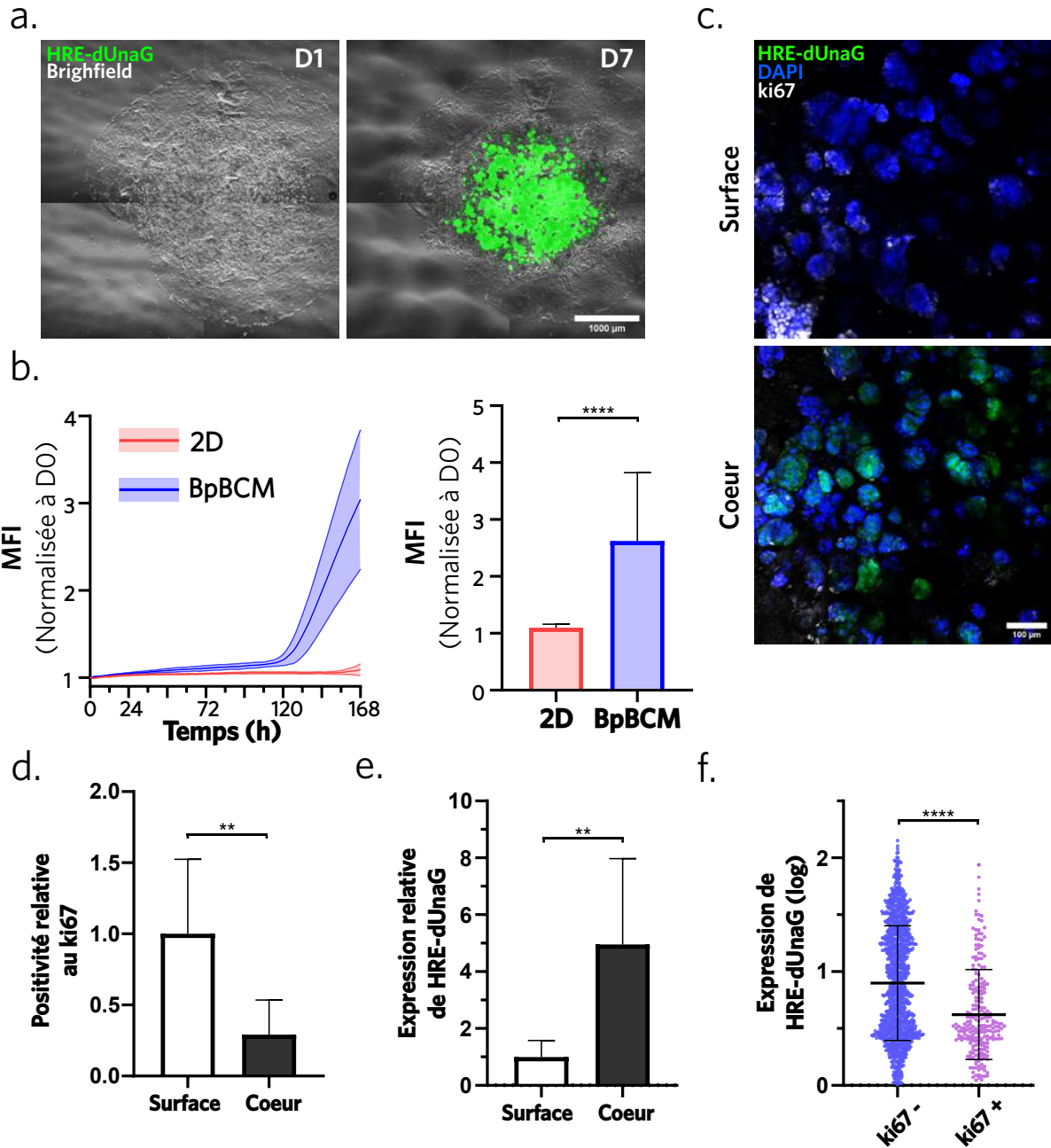


Figure 27: Apparition d'un cœur hypoxique et d'une surface proliférative au sein du modèle

- a. Image en contraste de phase d'un modèle à jour 1 et jour 7 contenant des cellules cancéreuses exprimant le rapporteur d'hypoxie HRE-dUnaG (vert).
- b. Quantification au cours du temps de la fluorescence du rapporteur d'hypoxie (gauche), et comparaison à jour 7 de la fluorescence dans le modèle et sur les cellules en 2D servant de contrôle négatif (a,b:N=3, n=12-16).
- c. Image confocale en surface et dans le cœur d'un même modèle, avec le rapporteur HRE-dUnaG (vert), noyaux marqués au DAPI (bleu) et le ki67 (blanc). Barre d'échelle, 100µm.
- d. Positivité au marqueur ki67 en surface et dans le cœur tumoral.

- e. Niveau de fluorescence du rapporteur hypoxique en surface et dans le coeur tumoral.
- f. Distribution de l'intensité de fluorescence des sphéroïdes selon leur statut ki67 positif/négatif (c,d,e,f:N=3, n=8)

Les données sont représentées avec la moyenne \pm écart-type. Les p-values ont été calculées avec le test Mann-Whitney (two-tailed). **p<0.01; ****p<0.0001

Afin d'étudier ces phénomènes, les modèles incorporant les cellules HRE-dUnaG ont été co-marqués pour l'antigène ki67, marqueur prolifératif, par immunofluorescence. L'acquisition 3D a ici aussi permis de segmenter les différents sphéroïdes cellulaires, en quantifiant leur niveau d'expression de HRE-dUnaG, ainsi que leur positivité au marquage ki67. La quantification de l'expression des marqueurs ainsi que de la position des sphéroïdes a une fois de plus mis à profit l'algorithme développé précédemment (appendix C) Le marquage ki67 a été identifié dans les sphéroïdes en surface, alors que celui-ci semblait plus rare dans les sphéroïdes du coeur (**Figure 27c**). Inversement, le rapporteur HRE-dUnaG n'était pas détectable en surface du modèle alors qu'il était observable dans la majorité des sphéroïdes du coeur. Ces observations sont confirmées par les quantifications, qui ont mise en évidence une diminution significative de la positivité au marqueur ki67 (**Figure 27d**) et une augmentation significative de l'expression de HRE-dUnaG (**Figure 27e**) dans le coeur par rapport à la surface. L'évaluation du niveau d'expression du rapporteur en fonction du statut négatif ou positif au ki67 des sphéroïdes a permis d'observer une diminution significative de la fluorescence dans les sphéroïdes prolifératifs (**Figure 27f**). Ceci a mis en évidence la corrélation inverse entre hypoxie et prolifération au sein d'un sphéroïde. L'ensemble de ces résultats a confirmé la maturation d'un coeur hypoxique au sein du modèle, contrastant avec une surface proliférative, et reproduisant de manière pertinente l'organisation d'une tumeur *in vivo*.

3.2 Modulation de la maturation cellulaire en présence du stroma

La caractérisation de l'évolution des cellules MCF-7 seules a déjà permis de mettre en évidence la complexité spatio-temporelle de la maturation d'un modèle de cancer du sein. Cependant, comprendre comment se comporte une tumeur en présence de son microenvironnement permet de s'approcher d'un contexte clinique pertinent. Cette partie se concentrera donc sur l'intégration du microenvironnement dans le modèle, et plus particulièrement sur la maturation des cellules cancéreuses et endothéliales dans ce contexte.

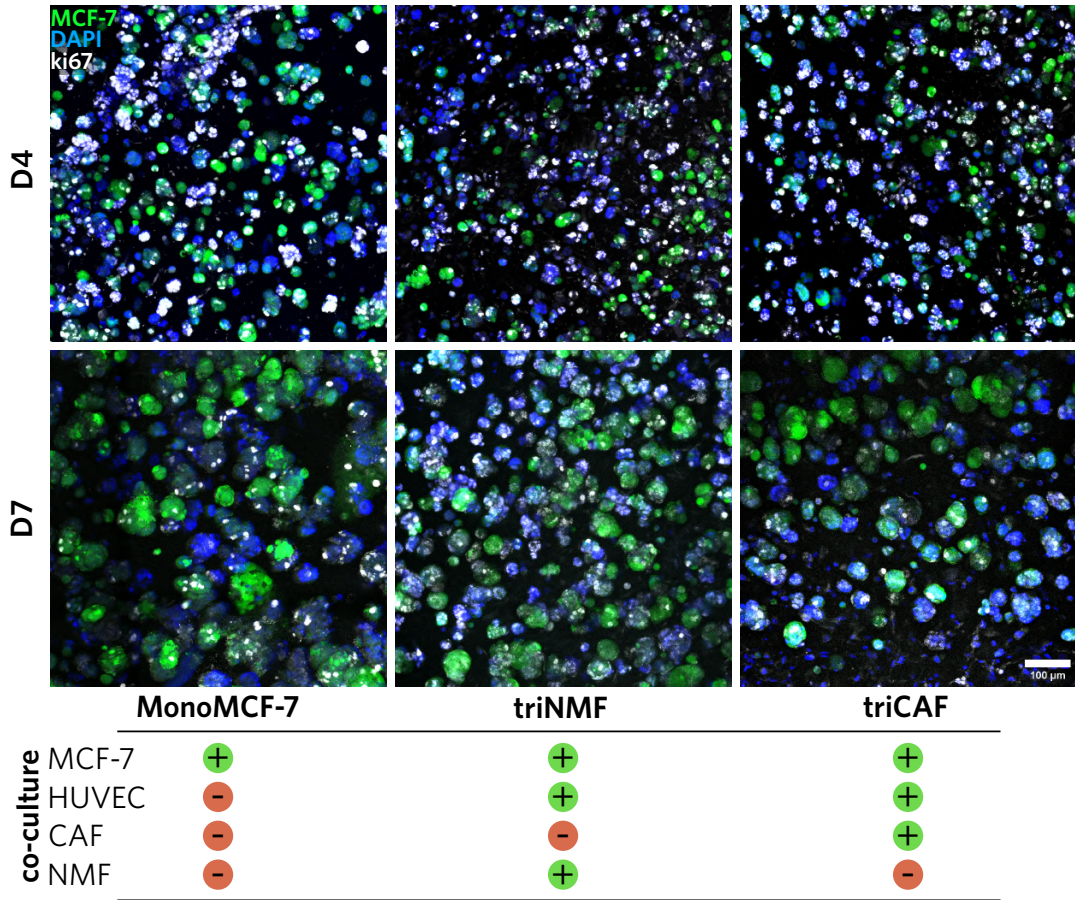
3.2.1 Prolifération des cellules cancéreuses

La prolifération des cellules cancéreuses, étudiée précédemment par la positivité au marquage ki67, est un aspect important de la pathologie. C'est donc un marqueur important, dont la modulation potentielle par le microenvironnement pourrait être d'intérêt dans le domaine.

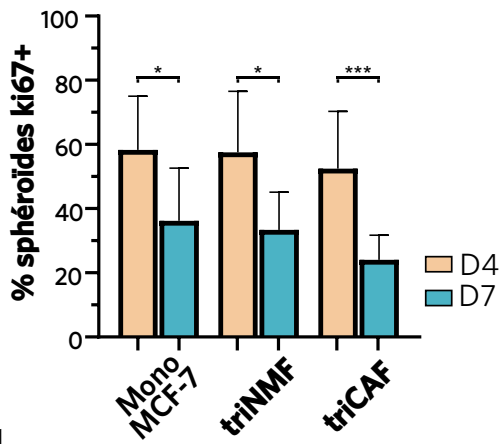
Pour tester cette hypothèse, des modèles contenant des cellules MCF-7 GFP+ ont été marqués à jour 4 et 7 pour ki67. Ces BpBCM incorporent différentes périphéries stromales pour évaluer la possibilité que les CAF puissent moduler la maturation différemment des NMF. Les BpBCM ont donc été cultivés en mono-culture de cellules MCF-7 dans le centre cancéreux (MonoMCF-7), ou en tri-culture avec des HUVEC, couplées soit avec des NMF (triNMF) soit avec des CAF (triCAF) dans la périphérie stromale.

Les quantifications par segmentation 3D (appendix C) ont révélé que le pourcentage de sphéroïdes positif au ki67 ne différait pas significativement d'une condition de culture à une autre (**Figure 28a,b**). Cependant, on constatait systématiquement une diminution de la prolifération entre jour 4 et jour 7, indiquant un comportement similaire dans ces trois conditions. À l'inverse, le volume moyen des sphéroïdes augmentait significativement à jour 7 comparé au jour 4, dans toutes les conditions. Là-aussi, aucune différence significative d'une condition à une autre n'a été détectée (**Figure 28c**).

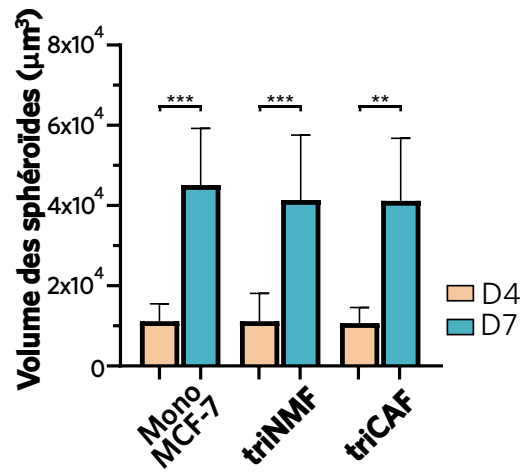
a.



b.



c.



d.

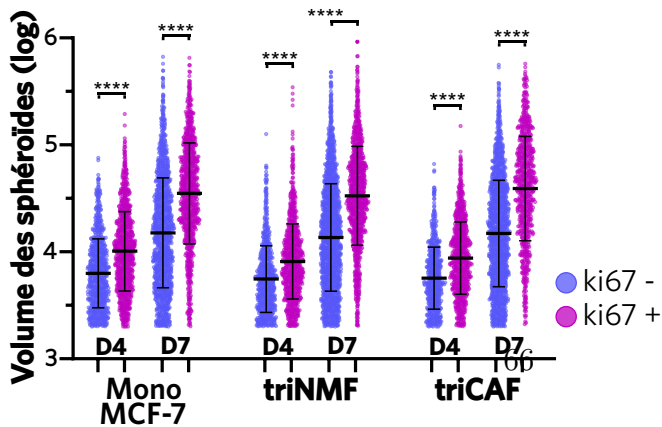


Figure 28: Croissance du centre cancéreux avec l'introduction de la périphérie stromale

- a. Immunomarquage du marqueur ki67 (gris), dans le modèle imprimé avec des MCF-7 GFP+ (vert) et le marqueur nucléaire DAPI (bleu), seul ou en co-culture avec des NMF et HUVEC (triNMF) ou CAF et HUVEC (triCAF). Barre d'échelle, 100µm.
- b. Quantification de la positivité moyenne au ki67 des sphéroïdes à jour 4 et 7.
- c. Volume moyen des sphéroïdes à jour 4 et 7.
- d. Distribution du volume des sphéroïdes à jour 4 et 7 en fonction de leur positivité au marqueur ki67.

Les données sont représentées avec la moyenne \pm écart-type, chaque point représente un sphéroïde (d) (N=3, n=10-13). Les p-values ont été calculées avec le test de Kruskal-Wallis suivi d'un test post-hoc Dunn. *p<0.05;**p<0.01;***p<0.001;****p<0.0001.

Pour s'assurer de l'absence de modulation de la prolifération entre les conditions, l'algorithme de segmentation et de caractérisation des sphéroïdes individuels a encore été mis à profit. En effet, l'hypothèse d'une variabilité du volume des sphéroïdes, selon leur statut prolifératif, n'était pas exclue par la comparaison des moyennes pouvant invisibiliser des mécanismes compensatoires. La distribution des sphéroïdes, en fonction de leur volume, et différenciée par leur statut ki67 a donc été représentée (**Figure 28d**). Ici encore, on a observé des comportements similaires entre les différentes conditions, avec une absence de différence significative. On a cependant constaté qu'à jour 4 comme à jour 7, les sphéroïdes prolifératifs sont significativement plus volumineux que ceux non prolifératifs.

Dans l'optique d'éliminer la possibilité de mécanisme compensatoire par intercommunication des différentes cellules, d'autres co-cultures ont été essayées. Dans cette expérience, les cellules MCF-7 ont été cultivées en bi-culture avec les HUVEC, les CAF, ou les NMF. Cette fois aussi, les mêmes tendances ont été observées, avec une diminution de la prolifération et une augmentation du volume à jour 7 par rapport à jour 4, mais aucune différence entre les bi-cultures elles-mêmes n'a été observée (**Figure 29a,b**). Il ne semblait donc pas y avoir de mécanisme compensatoire entre les fibroblastes et les cellules endothéliales sur la modulation de la prolifération, avec une absence de différence en bi-culture comme en tri-culture.

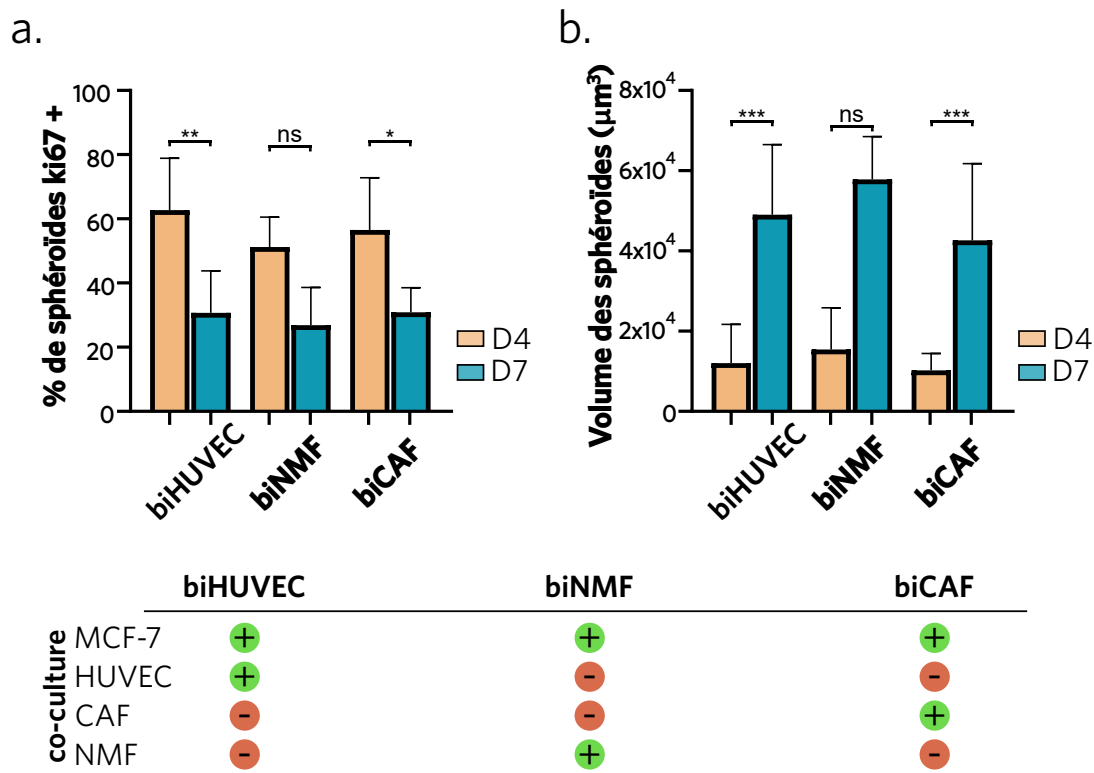


Figure 29: Bi-culture des modèles et modulation de la croissance tumorale

a. Quantification de la positivité moyenne au ki67 des sphéroïdes à jour 4 et 7.

b. Volume moyen des sphéroïdes à jour 4 et 7.

Les données sont représentées avec la moyenne \pm écart-type (N=3, n=4-12). Les p-values ont été calculées avec le test de Kruskal-Wallis suivi d'un test post-hoc Dunn. ns :non significatif *p<0.05;**p<0.01;***p<0.001.

Il apparaît que le stroma ne modulait pas la prolifération des MCF-7 au sein du BpBCM. Néanmoins, ces résultats indiquaient le maintien d'une capacité de prolifération des cellules cancéreuses malgré la présence d'autres types cellulaires en périphérie, ce qui était attendu grâce au design en disque de notre modèle. Une coque sphérique complète autour du centre cancéreux aurait en effet pu inhiber la prolifération en augmentant la distance au milieu (**Chapitre 1.4**), qui a été caractérisée plus tôt comme critique dans la maturation du cœur cancéreux.

3.2.2 Maturation endothéliale

Si la maturation des MCF-7 était maintenant bien caractérisée dans le BpBCM, le devenir des cellules stromales et notamment des HUVEC dans ce modèle restait à établir. En effet, le phénotype des cellules endothéliales dans le microenvironnement tumoral est dit microvasculaire. Les cellules s'organisent en un réseau capillaire composé de segment de

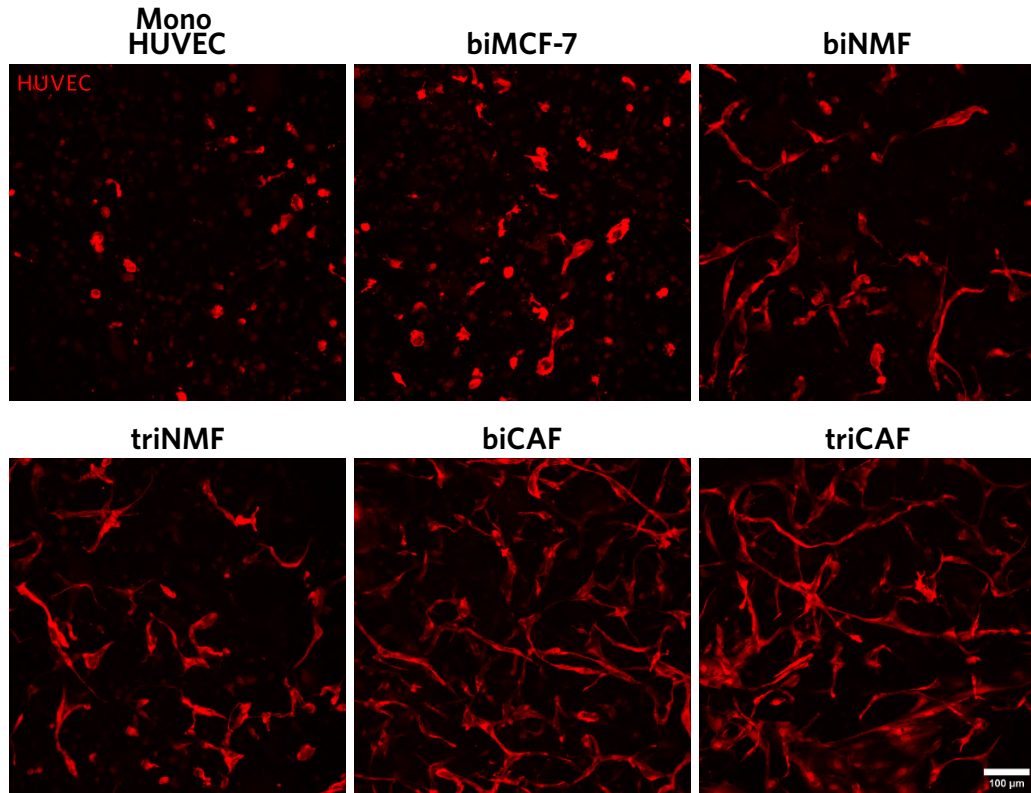
cellules interconnectées pour former des structures tubulaires de l'ordre d'une dizaine de microns de diamètre. Ce réseau a pour but de vasculariser le tissu tumoral, et sa fonction est intimement lié à sa structure.

Afin de caractériser cette structure, les modèles BpBCM ont de nouveau été bioimprimés avec différentes conditions de co-culture. Cette fois, la partie stromale contenait systématiquement des HUVEC mK+, pour pouvoir capturer leur organisation par imagerie confocale. En l'absence de MCF-7 dans le centre cancéreux, on distinguait la condition en monoculture (MonoHUVEC) et les conditions en bi-culture avec des NMF (biNMF) ou des CAF (biCAF). Le parallèle de ces conditions en présence de cellules MCF-7 au centre étaient dites biMCF-7, triNMF et triCAF.

Après 7 jours de culture de ces modèles, l'acquisition confocale des HUVEC dans le stroma du BpBCM a permis de récupérer les informations de l'organisation 3D de ces cellules. Un algorithme d'analyse des réseaux a été utilisé [153] (appendix D) pour quantifier les différentes composantes structurales des cellules imagées.

a.

	MonoHUVEC	biMCF-7	biNMF	triNMF	biCAF	triCAF
co-culture HUVEC	+	+	+	+	+	+
MCF-7	-	+	-	+	-	+
CAF	-	-	-	-	+	+
NMF	-	-	+	+	-	-



b.

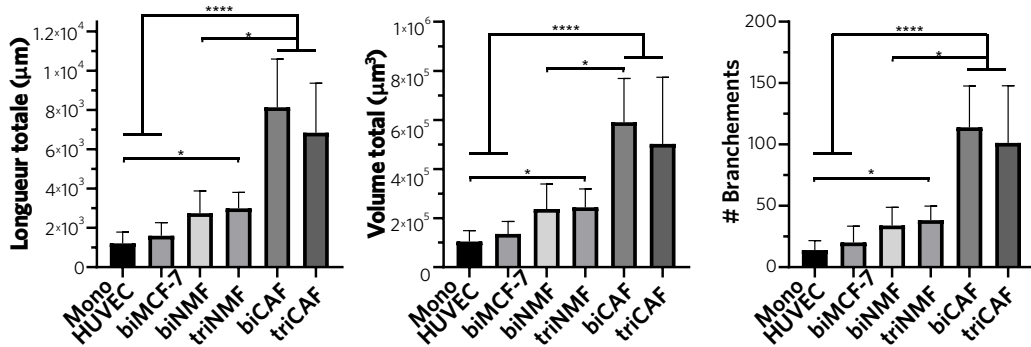


Figure 30: Maturation des structures microvasculaire dans la périphérie stromale

- Projection d'une acquisition 3D de cellules HUVEC mKate+ (rouge) dans la périphérie stromale en co-culture avec différents types cellulaires. Barre d'échelle, 100µm.
- Quantification 3D des réseaux pour évaluer la longueur totale, le volume et le nombre de branchements dans les réseaux microvasculaire

Les données sont représentées avec la moyenne \pm écart-type (N=3, n=14). Les p-values ont été calculées avec le test de Kruskal-Wallis suivi d'un test post-hoc Dunn. *p<0.05;****p<0.0001.

Les HUVEC restaient individualisées à jour 7 en monoculture, et semblaient avoir un phénotype proche dans la condition biMCF-7. L'introduction d'un partenaire fibroblastique dans le stroma a abouti à des phénotypes plus allongés, se rapprochant de réseaux. Cet effet est apparu plus marqué dans les conditions incorporant des CAF par rapport aux NMF (**Figure 30a**). La quantification des caractéristiques structurales a soutenu ces observations. En effet, on a observé une augmentation significative de la longueur, du volume et du nombre de branchements dans la condition triNMF comparée à la condition MonoHUVEC. Les conditions bi et triCAF montraient aussi une augmentation significative de ces paramètres par rapport aux conditions MonoHUVEC et biMCF-7. L'amplification de cet effet des fibroblastes, des CAF par rapport aux NMF, était appuyée par une augmentation significative des trois paramètres étudiés lors de la comparaison de ces deux conditions (**Figure 30b**). On notera cependant que les différents couples sans et avec MCF-7 se comportaient de manière similaire, sans différence phénotypique observable, ni différence significative dans les quantifications. Il semblerait donc que l'impact des cellules cancéreuses était marginal face à celui des fibroblastes dans le BpBCM.

Afin d'affiner la caractérisation des BpBCM contenant la condition de co-culture démontrant la plus grande complexité structurale, les modèles triCAF ont été immunomarqués pour VE-cadherin. Cette protéine est exprimée à la jonction inter-cellulaire des cellules endothéliales lorsque celles-ci forment un endothélium continu. Un marquage le long de ces jonctions a bien été retrouvé dans cette condition (**Figure 31a**), confirmant la maturation des HUVEC dans le stroma du BpBCM. La tridimensionnalité des réseaux formés par les HUVEC en présence de CAF peut être observée en **Figure 31b**.

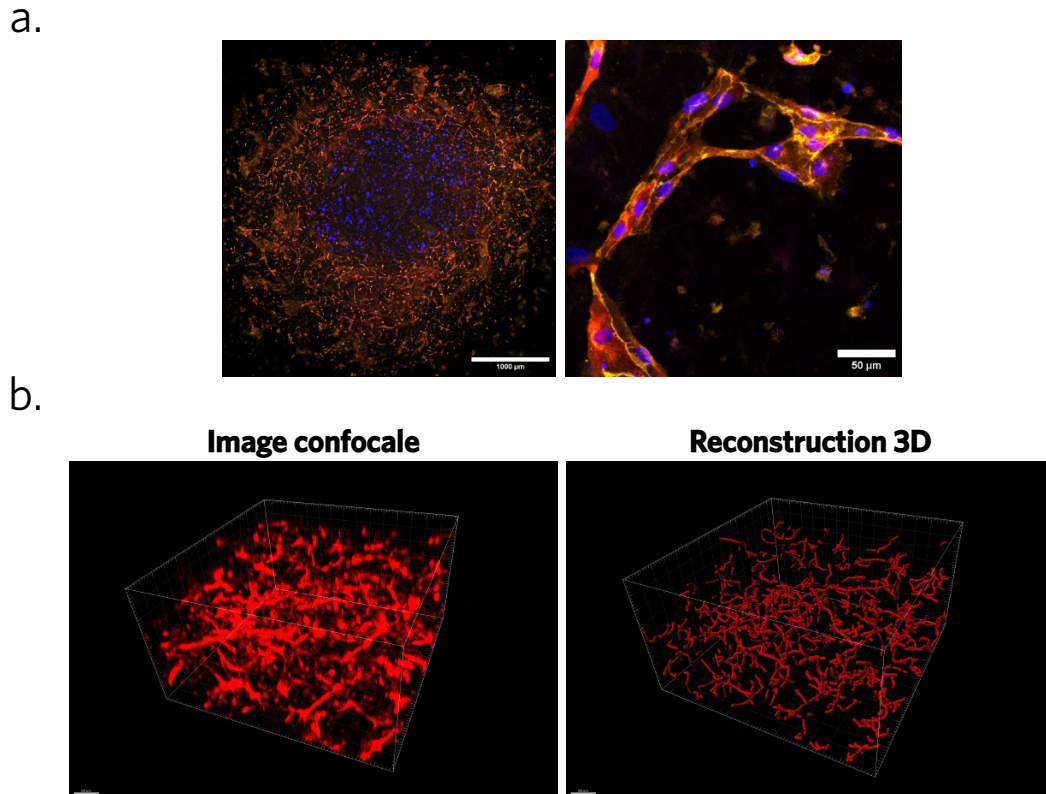


Figure 31: Marqueur de maturation et organisation 3D des réseaux microvasculaires
a. Immunomarquage d'un modèle en condition triCAF pour VE-cadherin (jaune) avec des HUVEC mKate+ (rouge) et un marquage nucléaire DAPI (bleu). Barres d'échelle, 1000 μ m ; 50 μ m.
b. Visualisation 3D d'un réseau microvasculaire dans la condition triCAF ainsi que sa reconstruction computationnelle en réseau. Barres d'échelle, 80 μ m.

Ces résultats indiquaient une modulation des fibroblastes sur la maturation des cellules endothéliales dans le BpBCM. Il est aussi apparu que les CAF ont un effet promoteur plus important que leur contrepartie saine, les NMF.

3.3 Maturation de la matrice extracellulaire

Les fibroblastes sont notamment connus pour leur rôle dans le remodelage matriciel, qui est lui-même impliqué dans le développement de réseaux microvasculaires (**Chapitre 1.2.1**). Les résultats précédents suggèraient une différence dans le comportement des CAF et des NMF qui s'est reflété sur les cellules endothéliales. Cette partie visait à répondre à l'hypothèse d'un remodelage matriciel altérés par les CAF, qui pourrait expliquer ce phénomène. Plus particulièrement, la composition et les propriétés mécaniques de la MEC ont été étudiées.

3.3.1 Composition protéique

La composition de la MEC est un élément essentiel du microenvironnement tumoral, comme décrit en introduction de ce manuscrit. De nombreuses familles de protéines telles que les collagènes, les laminines ou les protéines matricellulaires sont impliquées dans les processus cancéreux et évoluent de manière dynamique au cours du développement de la pathologie (**Chapitre 1.2.1**).

Afin de pouvoir étudier la composition matricielle, des BpBCM en triculture, soit avec des NMF, soit avec des CAF ont été imprimés et leur protéine en ont été extraites à jour 1 et à jour 7. Cette extraction s'est concentrée sur les protéines extracellulaires à l'aide d'un protocole permettant de favoriser l'extraction des protéines longues, fibrillaires, et peu solubles [154]. Ces protéines extraites ont ensuite été digérées en peptides et quantifiés par spectrométrie de masse. L'identification de ces peptides a permis, en comparant leur séquence à des banques de données, d'imputer la protéine qui y est associée, et de faire des mesures semi-quantitatives. Ces deux dernières étapes, après l'extraction, ont été réalisées en collaboration avec Jean-William Dupuy, de la plateforme de protéomique de Bordeaux. La suite de l'analyse a été réalisée avec un algorithme développé spécifiquement pour ces données, adapté des travaux de Schessner et collègues [155] (appendix E).

Un total de 5226 protéines a été identifié dans les différents échantillons. Parmi celles-ci 2408 protéines ont pu être quantifiées et comparées sur l'ensemble des échantillons. Les protéines identifiées ont pu être associées à des processus biologiques en faisant correspondre leur identifiant à la base de données de Gene Ontology (GO) [156, 157]. L'ensemble de ces protéines est représenté en **Figure 32**. L'abondance relative des protéines entre les échantillons est représentée par le z-score et les protéines ont été clustérisées en fonction de leur expression relative afin de mettre en évidence les modulations principales. Les 10 clusters les plus importants ont été associés avec les processus GO les plus fréquents parmi des protéines qu'ils contiennent.

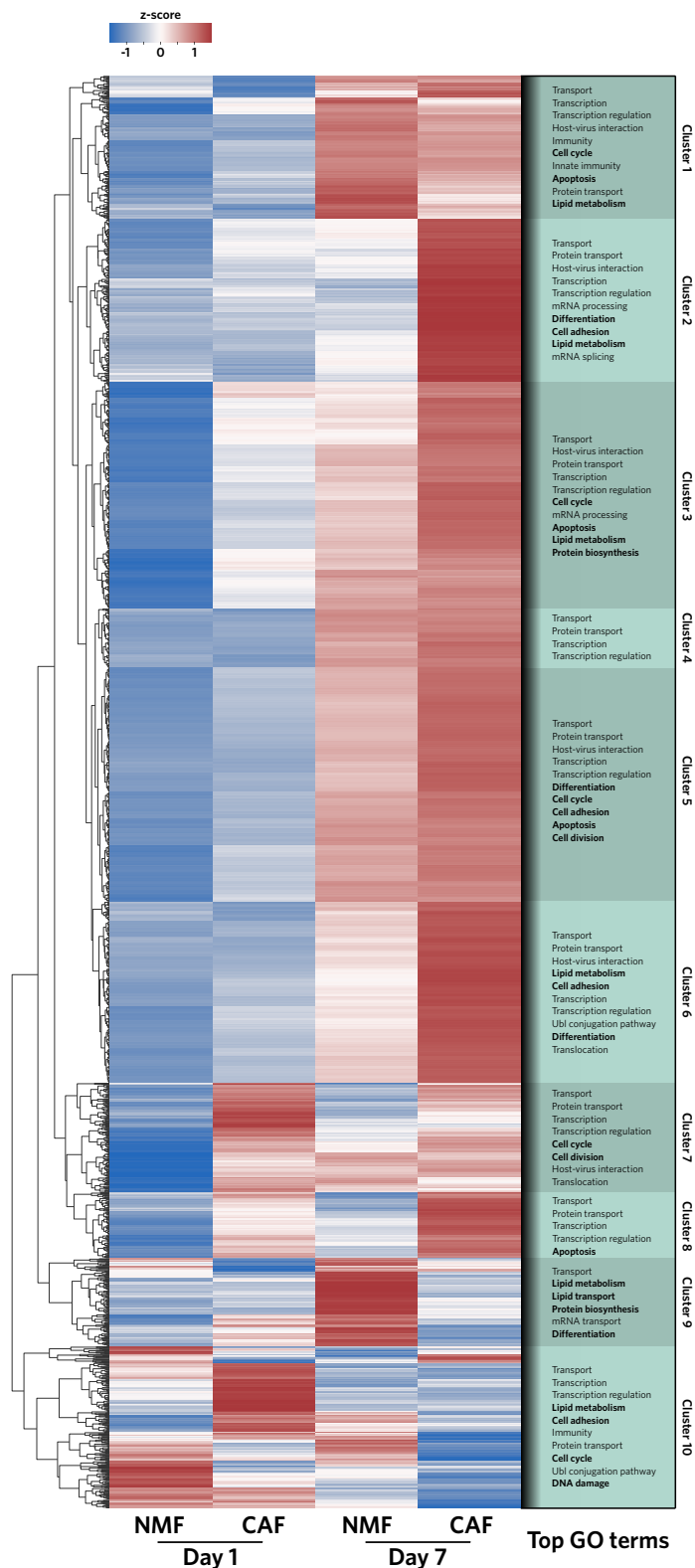


Figure 32: Heatmap des 2408 protéines quantifiées par protéomique
 Représentation du z-score, normalisé sur chaque protéine, et clusterisé par méthode euclidienne afin d'identifier les modulations principales. Les clusters d'intérêt ont été analysés pour compter la fréquence

d'apparition des termes de processus biologiques issus de Gene Ontology. Les termes les plus représentés dans chaque cluster sont listés par ordre décroissant. Les données représentent la moyenne de N=3 répliques biologiques.

Une surexpression protéique générale a été observée dans les conditions à jour 7 comparée à jour 1. Comme attendu, l'expression protéique était différente entre la condition NMF et la condition CAF, que ce soit à jour 1 ou jour 7.

La surexpression à jour 7 de protéines liées à l'apoptose dans le Cluster 1,3, 5 et 7 apparaissait cohérente avec les résultats de la partie 3 sur l'apparition d'un cœur nécrotique. De manière intéressante, des protéines d'adhésion cellulaire étaient surexprimées dans la condition CAF jour 7 par rapport aux autres conditions, dont la condition NMF jour 7. On retrouvait cependant aussi une augmentation de ce processus à jour 7, pour les deux types de BpBCM, dans le cluster 5. Inversement le cluster 10 montrait une augmentation à jour 1 de l'adhésion cellulaire. Cela suggérait une modulation différentielle des protéines de ce processus, avec à la fois des diminutions et augmentations d'expression.

Les clusters 7 et 8 semblaient associés à des protéines plus spécifiquement exprimées par les CAF, avec une surexpression à la fois à jour 1 et 7. A l'inverse, aucun des clusters principaux ne semblait mettre en évidence des protéines spécifiques aux NMF.

L'apparition du processus d'adhésion cellulaire renforçait l'hypothèse d'une modulation du remodelage matriciel. Afin de mieux comprendre, les données concernant certaines protéines majeures de la MEC ont été extraites de cet ensemble.

Dans un premier temps, on observait que les différents sous-types de collagène font l'objet d'un remodelage important de jour 1 à 7 (**Figure 33**). De manière surprenante, certains collagènes, le COL1A1, COL3A1 et COL5A3 étaient surexprimés à jour 1 par rapport au jour 7 par les CAF. Ces différents collagènes participent en effet à la formation de fibrilles, il était donc surprenant de les voir diminuer avec le temps. Cette observation pourrait être expliquée par une augmentation de la dégradation de ces protéines par les enzymes remodelant la MEC. D'autres sous-types augmentaient de jour 1 à 7, dans les conditions NMF comme CAF : un collagène impliqué dans la membrane basale (COL4A1/2), un fibrillaire servant de connecteur avec cette membrane (COL7A1), et trois collagènes qui s'associent aux fibrilles et participent à l'interaction avec les protéines membranaires des cellules (COL6A1/2/3, COL12A1, COL18A1). Enfin, le collagène fibrillaire COL1A2, le COL5A1 et le COL15A1 augmentaient spécifiquement dans les condition CAF, notamment à jour 7. Ces tendances étaient inversées par rapport aux autres chaînes décrites plus tôt pour le collagène I et V, ce qui indique une recombinaison des différentes sous-unités collagéniques. Le collagène XV est associé à la membrane basale et suivait la tendance croissante

d'autres sous-types de collagène de cette structure. La fibronectine, qui est aussi une protéine fibrillaire non collagénique, était aussi augmentée à jour 7 dans les deux conditions.

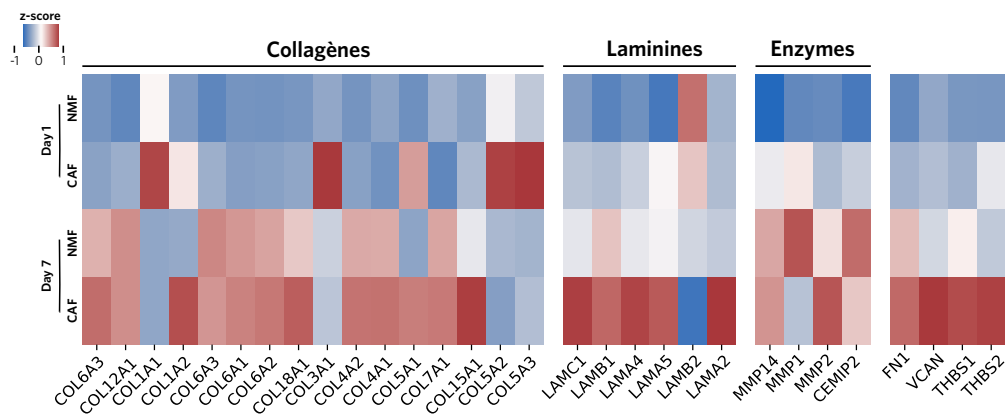


Figure 33: Heatmap des différents sous-types de protéines matricielles

Représentation du z-score, normalisé sur chaque protéine, des sous-groupes principaux de protéines matricielles quantifiées. Les collagènes, laminines, enzymes et protéines matricielles sont représentées. Les données représentent le z-score normalisé sur 3 réplicas biologiques.

Les chaînes de laminines détectées, excepté LAMB2, sont surexprimées dans la condition CAF jour 7. Il semblerait donc que la condition CAF se caractérise par une augmentation des laminines, malgré une diminution des laminines se complexant avec la chaîne $\beta 2$ (**Figure 33**). L'augmentation de LAMA2/4/5 concomitante avec celle de LAMB1 et LAMC1 suggérait une potentielle augmentation des laminines 211, 411 et 511. Bien que non quantifiée, la LAMA1 a bien été détectée dans les échantillons, n'excluant pas la possibilité de laminine 111 sûrement en faible quantité. Le remodelage matriciel est aussi dicté par la capacité des cellules à dégrader la matrice en place. Cette capacité est médiée, pour les collagènes notamment, par la famille enzymatique des métalloprotéinases (MMP). Les MMP-1,2 et 14 ont été quantifiées, et étaient présentes plus abondamment à jour 7, excepté pour la MMP-1 dans la condition CAF. Une autre protéine de dégradation matricielle détectée, la hyaluronidase membranaire (CEMIP2), était aussi augmentée à jour 7 (**Figure 33**).

Enfin, les protéines matricielles quantifiées, qui ne participent pas à la structure mais plutôt aux fonctions biologiques de la MEC augmentaient aussi à jour 7, mais de manière spécifique à la condition CAF. Il s'agissait du versican (VCAN) et des thrombospondin de type 1 et 2 (THBS1,2) (**Figure 33**). Certaines protéines matricielles, comme la Tenascin-C, la periostin et l'ostéopontin, ont pu être détectées mais pas quantifiées dans

les échantillons.

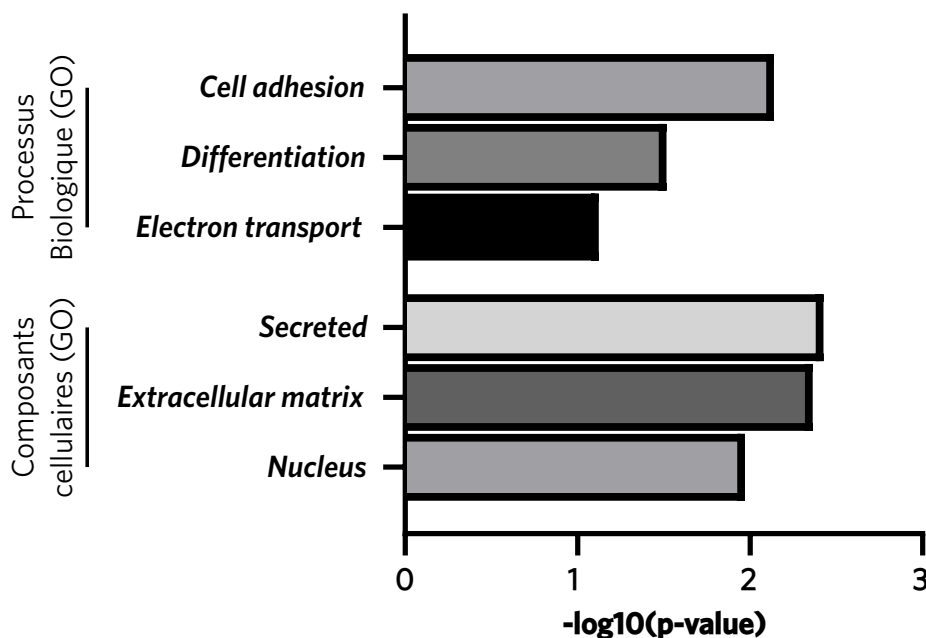


Figure 34: Analyse d'enrichissement à jour 7 des CAF par rapport aux NMF

Les résultats illustrent la p-value associée aux termes surexprimé, calculée par le test statistique exact de Fisher. Les 3 annotations sélectionnées pour les processus biologiques et les composants cellulaires ont été choisis par ordre décroissant de p-value.

A l'échelle de l'ensemble des protéines identifiées, l'analyse d'enrichissement a révélé que la régulation de ces protéines matricielles était parmi les plus significatives. On a en effet constaté une surexpression à jour 7, des CAF par rapport aux NMF, des protéines associées au processus d'adhésion cellulaire. De la même façon, les composants surexprimés de façon la plus significative étaient ceux sécrétés et ceux de la MEC (**Figure 34**).

L'ensemble de ces données indiquaient une modulation majeure de la composition de la MEC par les CAF. Plus particulièrement, une augmentation des différents composants de la MEC, notamment des laminines et des protéines matricielles, a pu être démontrée.

3.3.2 Propriétés mécaniques

La composition protéique d'une matrice est intrinsèquement liée à ses propriétés mécaniques. En effet les polymères, protéiques ou glyco-saccharidiques, sont les principaux éléments

qui modulent la rhéologie de la MEC. Le Chapitre 1 a permis la description des propriétés mécaniques de l'hydrogel initial par rhéologie. Cependant, les changements majeurs de composition entre les conditions CAF et NMF, mais aussi entre les jours 1 et 7, suggèrent une maturation importante de cette matrice. Cela a soulevé l'hypothèse d'une évolution des propriétés mécaniques matricielles après maturation avec les différents fibroblastes.

Pour comparer ces conditions sur les modèles imprimés et maturés, la méthode de rhéologie utilisée précédemment n'était pas adaptée en raison de la contrainte de taille des modèles. Pour cette raison, la microscopie par force atomique (AFM) a été utilisée dans cette étude. Cette technologie permet en effet de venir mesurer localement le module élastique avec une résolution de l'ordre du micromètre. Ces travaux ont été réalisés en collaboration avec Anthony Vial et Michael Molinari, du CBMN de Bordeaux. Une pointe colloïdale fixée à un levier permet, lors de son indentation vers le modèle, d'observer une déformation de ce levier corrélée à l'élasticité de l'échantillon. Cette méthode de mesure a été appliquée sur la partie stromale des BpBCM en triculture avec des CAF ou des NMF après 7 jours de maturation (**Figure 48**).

Dans un premier temps, la topographie des échantillons est apparue similaire entre la condition NMF et la condition CAF (**Figure 35a**). Un gradient de hauteur a été constaté, qui correspond au rayon de courbure de la surface du modèle, qui trouve son origine dans la tension de surface de la bioencres lors de l'impression. Les deux types de modèles sont bien similaires sur cet aspect, en raison de la reproductibilité du processus de bioimpression.

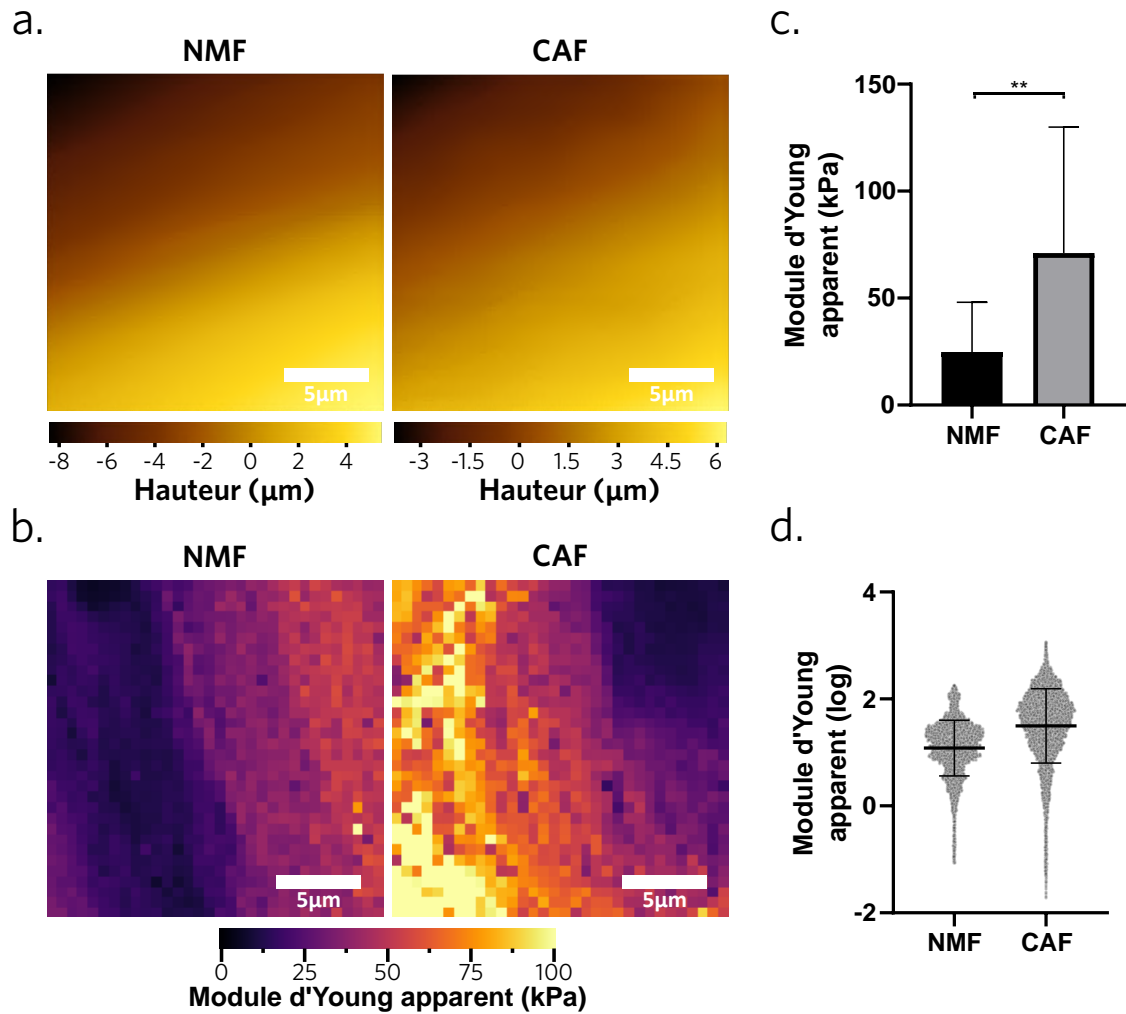


Figure 35: Évaluation des propriétés mécaniques par microscopie à force atomique des BpBCM maturés

- a. Image topographique représentative des modèles avec des NMF et CAF.
- b. Représentation spatiale du module d'Young, image associée à l'image topographique.
- c. Module d'Young moyen par zone d'acquisition (N=2, n=12-19).
- d. Distribution de l'ensemble des valeurs E calculées à partir des courbes (n=14151, 17613).

Les données sont représentées avec la moyenne \pm écart-type. Les p-values ont été calculées avec le test Mann-Whitney two-tailed. **p<0.01

Sur la même zone d'observation, le module élastique semblait cependant plus élevé dans la condition CAF que dans la condition NMF (**Figure 35b**). On a aussi identifié, malgré l'homogénéité de la topographie, des variations d'élasticité au sein d'une même zone d'acquisition. La comparaison des moyennes d'élasticité entre les zones scannées a montré une augmentation significative du module d'Young en condition CAF avec une moyenne de 71.08 kPa pour 27.87 kPa pour la condition NMF (**Figure 35c**). La variabilité observée sur les scans était aussi observable dans les quantifications, avec une

distribution de l'ensemble des valeurs mesurées relativement variable (**Figure 35d**).

Ces résultats ont démontré que la modification des composés de la MEC se conjugue avec une augmentation du module élastique, donc de la rigidité, de la zone stromale. Il apparaissait cohérent que l'augmentation des protéines du réseau matriciel aboutisse à une rigidification de la MEC.

Chapitre 4

Réponse aux traitements et modulation stromale paracrine

4.1 Évaluation de la réponse du BpBCM à la radiothérapie

L'accumulation des modulations phénotypiques du BpBCM par les CAF, affectant la maturation endothéliale, la composition protéique, et les propriétés mécaniques de la MEC, suggérait une potentielle modulation d'autres aspects de la tumeur. Tous ces éléments interviennent dans la réponse aux traitements (**Chapitre 1.2.1**). Ainsi, les résultats précédents soulèvent la possibilité d'une modulation de la réponse aux traitements en présence de CAF, par rapport aux cellules NMF saines. Cette partie s'est concentrée sur l'évaluation de la capacité de réponse du BpBCM aux traitements et plus particulièrement à la modulation spécifique des CAF sur l'effet de la radiothérapie.

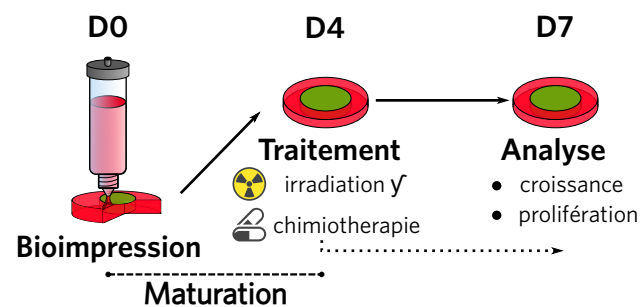
4.1.1 Optimisation du protocole de traitement

Un modèle de cancer du sein doit pouvoir répondre aux traitements afin de servir de plateforme pour étudier les mécanismes impliqués dans cette réponse. Cela implique aussi la capacité à mesurer cette réponse et à quantifier les valeurs relatives des traitements dans différentes conditions. Ainsi, le premier temps de cette étude a été consacré à vérifier cette capacité dans le modèle qui est apparu jusqu'ici comme le plus pertinent, la condition triCAF, afin d'établir le protocole de traitement pour les futures expériences.

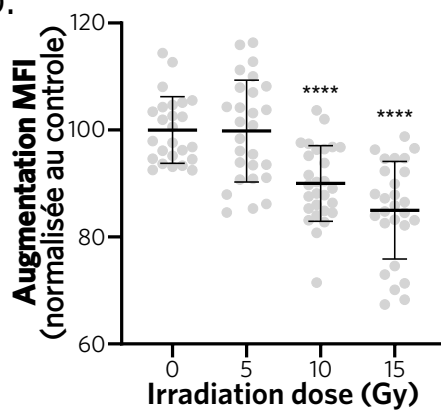
Pour cela, les modèles ont été imprimés, en incorporant des cellules MCF-7 GFP+, et maturés pendant 4 jours. Les modèles ont ensuite été traités à différentes doses de radiothérapie et de chimiothérapie par paclitaxel. L'irradiation des modèles a été effectuée

en dose unique entre 0 et 15 Gy. La chimiothérapie, à des doses entre 0 et 50ng/mL de paclitaxel, a été appliquée continuellement sur 3 jours dans le milieu de culture. A jour 7, les modèles étaient analysés pour évaluer la réponse aux traitements (**Figure 36a**). La quantification a été effectuée en évaluant le niveau de fluorescence du rapporteur GFP. En effet, ce rapporteur étant exprimé par les cellules, on a pu estimer le nombre de cellules, donc la croissance tumorale, en quantifiant la fluorescence moyenne dans le centre du modèle. L'hypothèse était donc qu'un traitement efficace pourrait tuer des cellules et ralentir la croissance des cellules encore vivantes, ce qui devrait être visible par une diminution de la fluorescence GFP.

a.



b.



c.

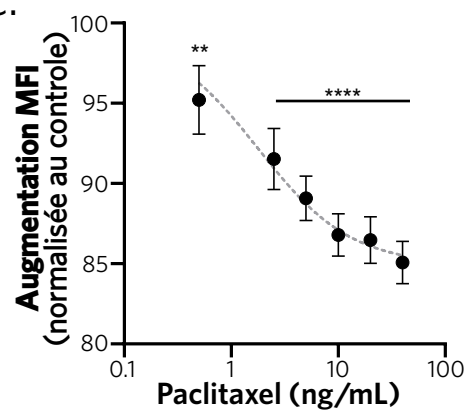


Figure 36: Traitement radio/chimiothérapeutique de modèles triCAF

- Protocole de traitement des modèles, contenant une période de maturation post-impression, suivi d'un traitement à jour 4 et effectif sur une période de 72h.
- Evaluation de la fluorescence GFP moyenne des cellules MCF-7 à 72h post-traitement en fonction du traitement par γ -irradiation à 0, 5, 10 et 15 Gy (N=3, n=12-16).
- Evaluation de la fluorescence GFP moyenne des cellules MCF-7 à 72h post-traitement en fonction du traitement par paclitaxel à 0, 0.5, 2.5, 5, 10, 20, 50 ng/mL (c, N=3, n=24-27).

Les données sont représentées avec la moyenne \pm écart-type. Les p-values ont été calculées avec le test de Kruskal-Wallis suivi d'un test post-hoc Dunn. **p<0.01;****p<0.0001.

A 72h post-irradiation, une absence de différence significative entre le contrôle non traité et la condition à 5 Gy a été observée. Cela suggérait une dose insuffisante pour induire une réponse du modèle. Cependant, à 10 et 15 Gy, une diminution significative était visible, suggérant cette fois-ci une réponse du modèle (**Figure 36b**). La diminution du signal de la condition à 15 Gy par rapport à celle à 10 Gy était non significative bien qu'elle semblait indiquer un effet dose.

De la même façon, pour le traitement par paclitaxel, on a observé un effet significatif du traitement dès 0.5ng/mL. La décroissance du signal GFP suit ensuite l'augmentation des doses de traitement (**Figure 36c**). On constate que l'effet de la chimiothérapie a suivi une courbe effet-dose typique d'un traitement chimiothérapeutique.

Ces résultats ont confirmé la capacité du modèle à répondre aux traitements, mais aussi la capacité de mesurer de manière semi-quantitative cet effet, permettant la comparaison de différents traitements et de modèles incorporant différents types cellulaires.

4.1.2 Modulation de la réponse à la radiothérapie par les CAF

Après avoir testé différentes doses de traitement, le protocole de traitement a été fixé : 4 jours de maturation suivi d'une irradiation à 10 Gy avec une quantification de l'effet à 72h post-traitement. Le choix de l'irradiation plutôt que la radiothérapie a été fait car ce traitement est utilisé de manière systématique après la chirurgie, en local sur la zone concernée, touchant à la fois les cellules tumorales restantes et le microenvironnement, pathologique comme sain. La chimiothérapie est pour sa part réservée à certains sous-types tumoraux ou à des grades plus élevés, et la variété des protocoles de chimiothérapie réduirait la généralisation des résultats obtenus.

La dose choisie correspondait à la première dose efficace identifiée dans l'étude précédente. Bien que toujours élevée, la dose est plus proche de celle effectuée en clinique, qui se fait par fractionnement de traitement à 2 Gy sur plusieurs jours. L'objectif de cette expérience était d'évaluer la réponse à ce protocole radiothérapeutique des modèles en condition triCAF et triNMF, afin de déterminer si ces deux types cellulaires induisaient une réponse différentielle.

Pour cela, les modèles traités, incorporant une fois encore les cellules MCF-7 GFP+, ont été marqués au ki67 (**Figure 37a**). Cela a permis d'améliorer la précision de la mesure de l'effet thérapeutique en estimant à la fois la prolifération ainsi que le volume des sphéroïdes, avec l'algorithme décrit précédemment (appendix C).

A 72h post-traitement, on a constaté une diminution significative du volume moyen des

sphéroïdes à 10 Gy comparé au contrôle non irradié pour les modèles triNMF. De manière intéressante, une absence de différence était observable dans la condition triCAF après traitement (**Figure 37b**). Cela indiquait un potentiel effet protecteur des CAF sur la croissance tumorale après radiothérapie.

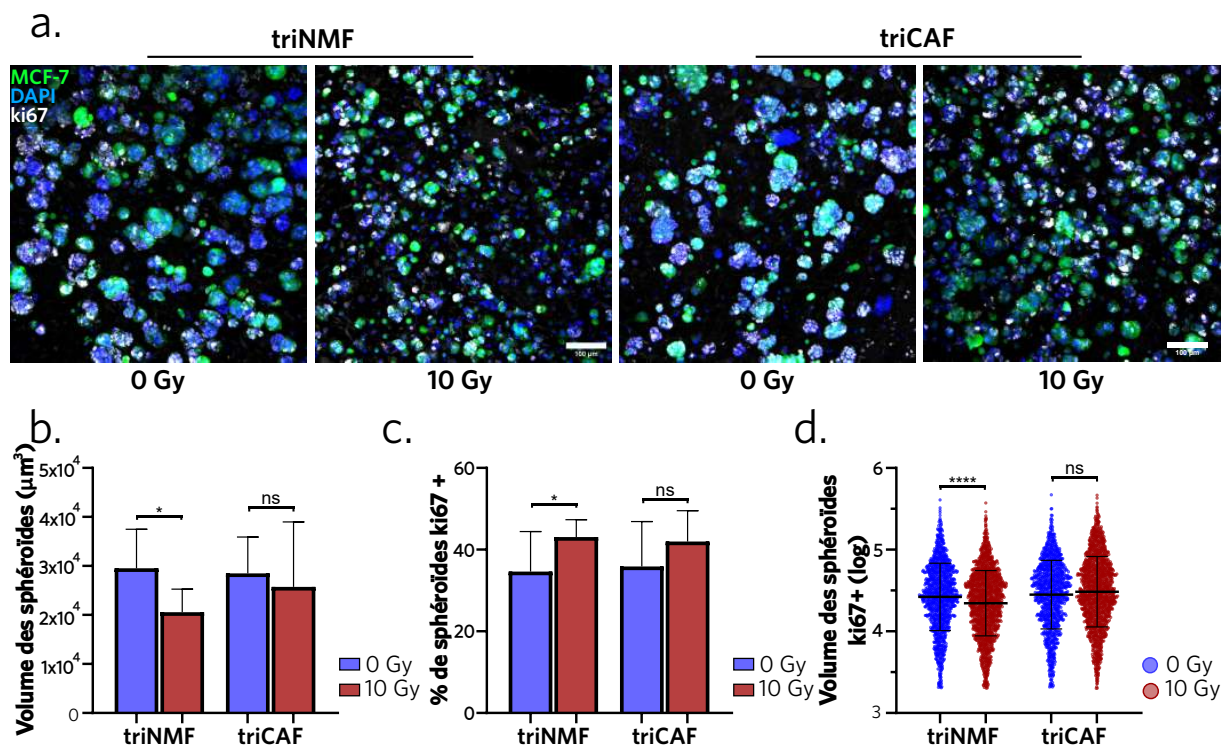


Figure 37: réponse différentielle à la radiothérapie entre les modèles triCAF et triNMF
a. Immunomarquage de ki67 (gris), dans le modèle imprimé avec des MCF-7 GFP+ (vert) et le marqueur nucléaire DAPI (bleu), en co-culture avec des NMF et HUVEC (triNMF) ou CAF et HUVEC (triCAF), 72h post-irradiation à 0 Gy et 10 Gy. Barre d'échelle, 100µm.

b. Volume moyen des sphéroïdes GFP+ dans les modèles 72h après irradiation.

c. Positivité des sphéroïdes au marqueur ki67 post-irradiation.

d. Distribution du volume des sphéroïdes positifs au marqueur ki67.

Les données sont représentées avec la moyenne \pm écart-type (N=3, n=15-16). Les p-values ont été calculées avec le test de Kruskal-Wallis suivi d'un test post-hoc Dunn. ns: non significatif; *p<0.05; ****p<0.0001.

Pour la prolifération, on a observé une tendance inverse avec une augmentation significative de la positivité des sphéroïdes au marqueur ki67 pour les triNMF, et non significative pour les triCAF (**Figure 37c**). Ce comportement inverse entre volume et prolifération correspondait à ce qui a été observé lors de la caractérisation de la prolifération dans le modèle (**Chapitre 2.2.2**). Il était cependant inattendu que la condition triNMF aient

une augmentation de la prolifération, là où les BpBCM triCAF ne semblaient pas en avoir.

Afin de mieux comprendre cette régulation de la prolifération, nous nous sommes intéressés à la distribution du volume des sphéroïdes prolifératifs. Ici, une diminution significative du volume a pu être observée dans le cas des modèles triNMF post-irradiation, contrairement au triCAF dont le volume reste stable (**Figure 37d**). Ces résultats renforçaient ceux du volume moyen. L'information supplémentaire apportée par cette analyse était la présence de sphéroïdes prolifératifs plus volumineux dans la condition triCAF. La condition triNMF présentait donc plus de sphéroïdes prolifératifs, mais de plus petit volume, tandis que la condition triCAF se caractérisait par des sphéroïdes prolifératifs plus volumineux. Cette différence de volume a permis de préciser les résultats observés en **Figure 37c**.

Ensemble, ces résultats indiquaient un effet protecteur des CAF relativement aux NMF face à la radiothérapie. Cet effet se caractérisait principalement par un volume plus important des sphéroïdes cancéreux.

4.2 Modulation paracrine

Les différences d'efficacité de traitements suggéraient une communication entre les CAF et les cellules cancéreuses qui pourrait induire ces comportements. La communication paracrine est une des méthodes principales pour les cellules d'échanger des signaux et d'induire une modulation phénotypique de leur environnement (**Chapitre 1.2.1**).

Ici, les facteurs paracrines sécrétés par les modèles, en fonction de leur stroma et d'un traitement radiothérapeutique, ont été étudiés. Plus spécifiquement, la sécrétion de cytokine et de sphingolipide a été quantifiée dans ces contextes, et l'effet de leur inhibition sur la réponse aux traitements a été caractérisé.

4.2.1 Sécrétion de cytokines

Les cytokines représentent une classe de protéines de signalisation cellulaire jouant un rôle essentiel dans le contrôle du développement de la tumeur et de son microenvironnement.

Afin de mieux comprendre les cytokines relarguées par les BpBCM, il est apparu intéressant de détecter et comparer leur niveau d'expression. Pour cela, des milieux ont été conditionnés par les BpBCM, triNMF ou triCAF, traités par radiothérapie à 10 Gy ou non. Ces milieux ont été collectés 72h après le traitement afin d'être analysés en utilisant un kit de quantification sur puce détectant 105 cytokines.

Sur l'ensemble des répliques, 91 cytokines ont été détectées au moins une fois (**Figure 38**). Certaines protéines, fortement sécrétées, sont détectées dans l'ensemble des répliques. D'autres cytokines sont détectées plus souvent dans certaines conditions que dans d'autres, notamment le CXCL-1 (ou GRO- α) qui est quantifié 5 fois dans les conditions CAF mais seulement 2 fois dans les conditions NMF.

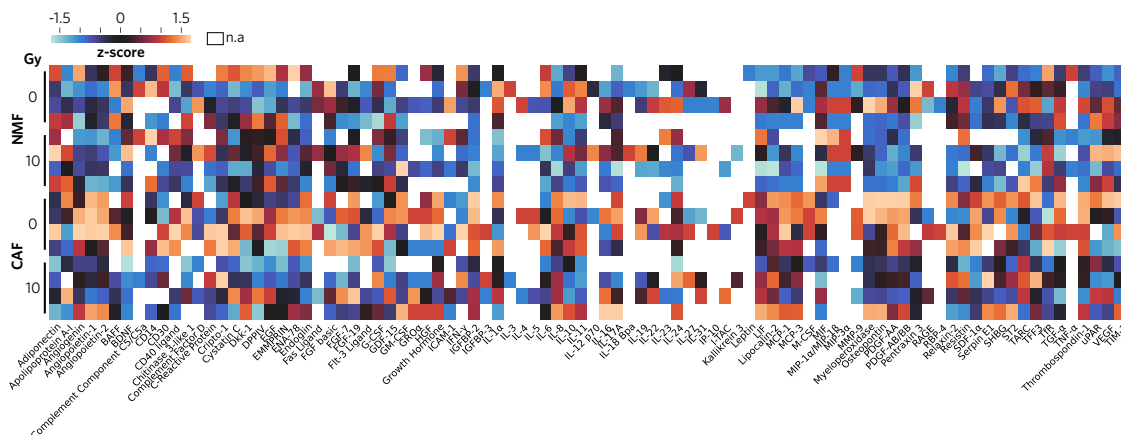
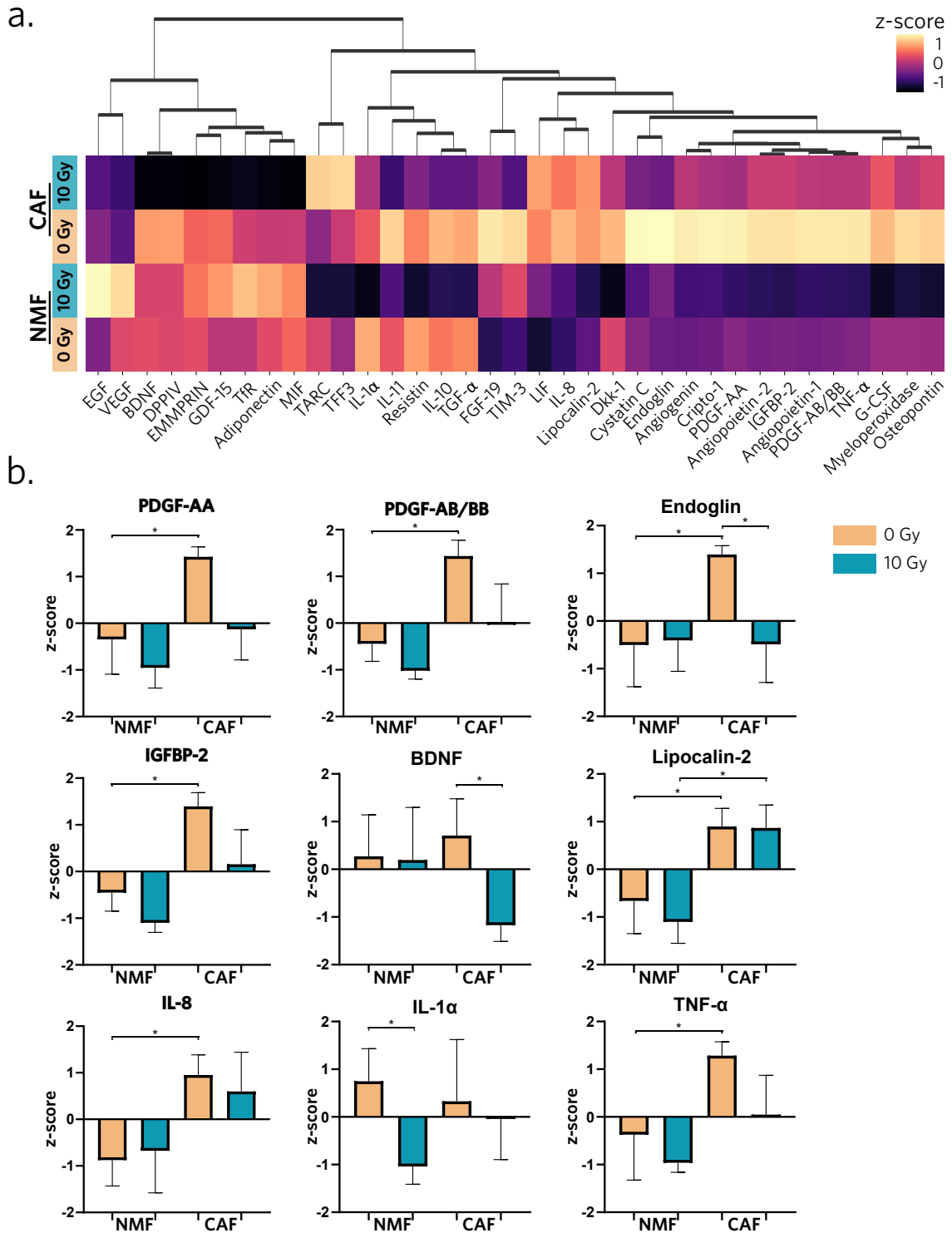


Figure 38: Heatmap de l'ensemble des cytokines détectées

La figure représente l'ensemble des résultats des cytokines arrays quantifiées pour les 91 protéines détectées au moins une fois. Les résultats ont été normalisés par z-score pour chaque répliques, les protéines non détectées sont représentées en blanc. (N=4, n=16)

Les 35 protéines systématiquement détectées ont été conservées pour la suite de l'analyse, afin d'observer les régulations de sécrétion. Globalement, on a constaté une diminution de protéines dans les milieux conditionnés après irradiation, en condition triNMF comme en condition triCAF (**Figure 39a**). Il semblait que les niveaux moyens post-irradiation étaient plus élevés dans 15 protéines pour la condition triNMF, pour 20 pour la condition triCAF. La modulation majeure de cette sécrétion de cytokine était cependant visible en condition basale, non irradiée, entre la condition triNMF et la condition triCAF. Cette dernière est en effet la condition avec les plus hauts niveaux de sécrétion.



Les données sont représentées avec la moyenne \pm écart-type (N=4, n=16). Les p-values ont été calculées par 2-Way ANOVA ajustées par le test de Benjamini-Hochberg. *p<0.05.

Plus précisément, on a constaté une augmentation significative de la sécrétion des BpBCM triCAF par rapport aux triNMF non irradiés pour les cytokines : PDGF-AA et AB/BB, endoglin, IGFBP-2, Lipocalin-2, IL-8 et TNF α . L'effet de l'irradiation a aussi été retrouvé dans la diminution significative de l'endoglin et du BDNF pour les triCAF, et de l'IL-1 α pour les triNMF (**Figure 39b**).

Cette étude a mis en évidence des profils sécrétoires différents en présence de CAF ou de NMF, modulés par l'irradiation.

4.2.2 Modulation de la radiosensibilité par CXCL-1

Ces différences suggèrent que l'effet protecteur des CAF observé plus tôt pourrait être lié à la sécrétion d'une ou plusieurs de ces cytokines.

Parmi les différentes protéines détectées, CXCL-1 semblait intéressant car sa détection a été plus fréquente dans les modèles triCAF que triNMF, ainsi que par la corrélation entre expression de CXCL-1 par le stroma et mauvais pronostic clinique [158] (**Chapitre 1.2.1**).

Les expériences suivantes ont visé à déterminer l'implication de la communication par CXCL-1 médiée par les CAF dans la réponse à la radiothérapie.

Afin de confirmer plus précisément la différence d'expression du CXCL-1 par ces deux types cellulaires, les ARN messagers codant pour CXCL-1 ont été quantifiés par RT-qPCR. Comme attendu, l'expression de CXCL-1 est apparue supérieure dans le cas des cellules CAF que des cellules NMF (**Figure 40a**).

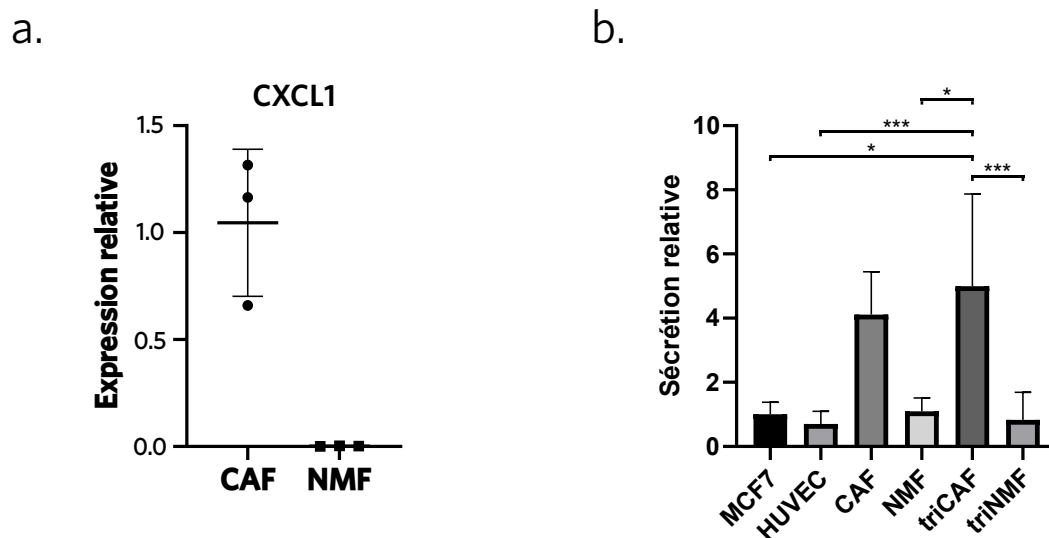


Figure 40: Expression et sécrétion de CXCL-1

- a.** Expression relative de l'ARN messager codant pour CXCL-1 quantifier par RT-qPCR (N=3).
b. ELISA pour la protéine CXCL-1 sur milieu conditionnés dans les cellules incluses dans le gel (N=3, n=2-10).

Les données sont représentées avec la moyenne \pm écart-type. Les p-values ont été calculées avec le test de Kruskal-Wallis suivi d'un test post-hoc Dunn. *p<0.05, ***p<0.001

Pour s'assurer que cet effet de sécrétion soit bien dû au CAF, et non aux autres types cellulaires, une quantification de CXCL-1 dans les milieux conditionnés a été réalisée par ELISA. Les milieux ont été conditionnés soit avec les différentes lignées, seules, incorporées dans la bioencore, soit en condition triCAF et triNMF.

Les MCF-7, les HUVEC, les NMF, et la combinaison de ces trois types cellulaires dans la condition triNMF sécrétaient une quantité similaire de CXCL-1. En comparaison, la condition triCAF a induit des niveaux de sécrétion significativement augmentés, en accord avec nos précédentes quantifications (**Figure 40b**).

La sécrétion de CXCL-1 était donc bel et bien spécifique des CAF, et pourrait donc être impliquée dans la réponse à la radiothérapie.

Afin d'évaluer cette hypothèse, des CRISPR KO pour CXCL-1 ont été créés par Catherine Gratas, de l'équipe PETRY partenaire de cette thèse (**Figure 41a**). Ces CRISPR, nommés sg37 et sg38, ont été transduits dans les cellules CAF afin d'inhiber l'expression de CXCL-1.

Cependant, pour une raison inconnue, l'expression relative du transcrite de CXCL-1 est apparue très variable, ne permettant pas de conclure à une inhibition efficace de l'expression de CXCL-1 (**Figure 41b**).

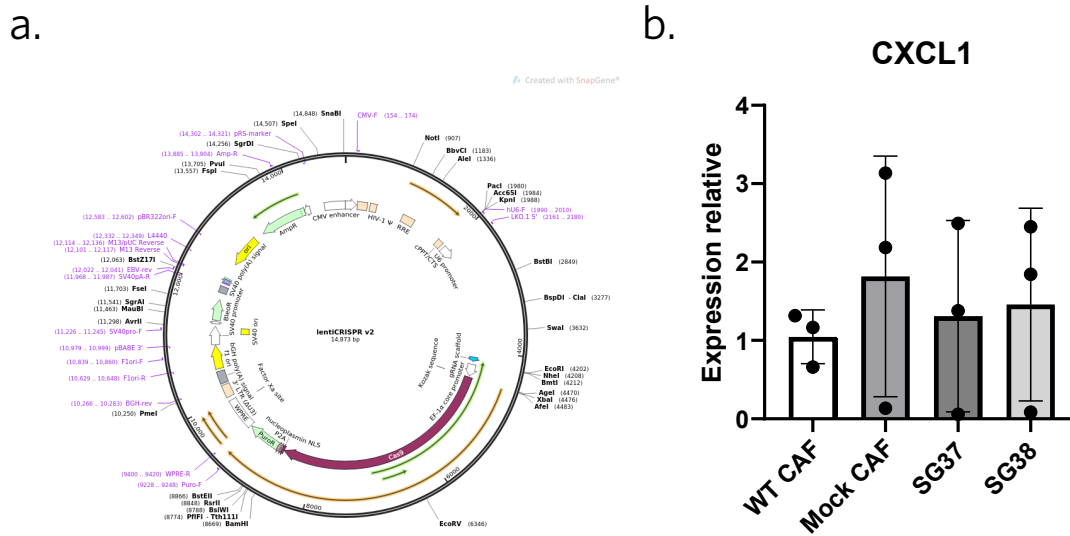


Figure 41: CRISPR KO du CXCL-1

- a. Design du plasmide pour le CRISPR KO CXCL-1.
 b. Expression relative de l'ARN messager codant pour CXCL-1 quantifier par RT-qPCR.
 Les données sont représentées avec la moyenne \pm écart-type (N=3).

La stratégie adoptée pour inhiber CXCL-1 a donc été l'utilisation d'anticorps monoclonaux permettant d'empêcher le ligand CXCL-1 d'interagir avec son récepteur CXCR2. Des modèles triCAF traités par radiothérapie à 10 Gy ont été incubés avant et après irradiation avec cet anticorps. De la même manière que précédemment, les modèles contenant des MCF-7 GFP+ ont été marqués pour ki67, et analysés en 3D pour extraire les informations d'expression du marqueur prolifératif et le volume des sphéroïdes. Aucune différence significative n'est cependant apparue en présence de l'anticorps isotype contrôle, ni en présence de l'anticorps anti-CXCL-1, comparé au contrôle sans anticorps (**Figure 42a,b**).

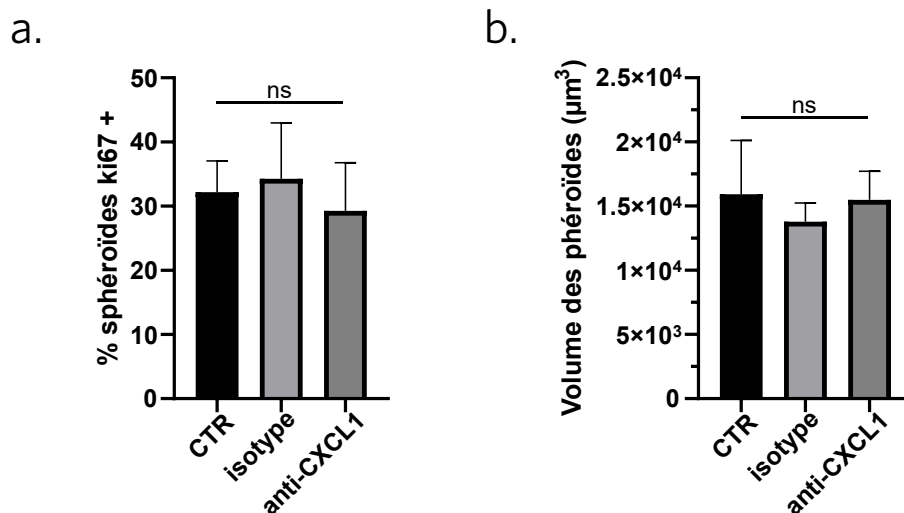


Figure 42: Effet de CXCL-1 sur la réponse à la radiothérapie des modèles triCAF

- Positivité au ki67 des sphéroïdes irradiés à 10 Gy traités ou non avec un anticorps anti-CXCL1 ou un isotype.
- Volume moyen des sphéroïdes irradiés à 10 Gy traités ou non avec un anticorps anti-CXCL1 ou un isotype.

Les données sont représentées avec la moyenne \pm écart-type (N=3, n=12-16). Les p-values ont été calculées avec le test de Kruskal-Wallis suivi d'un test post-hoc Dunn. ns : non significatif.

Ces résultats semblaient indiquer que l'inhibition de CXCL-1 ne permettait pas de radiosensibiliser les BpBCM en utilisant une stratégie médiée par les anticorps.

4.2.3 Modulation endothéliale de la radiosensibilité et sphingolipides

Les comparaisons de réponse aux traitements ont été effectuées jusqu'ici dans des modèles en triculture, incluant des cellules endothéliales HUVEC. Cependant, ce type cellulaire est aussi impliqué dans les communications paracrines, et est capable de recevoir comme d'envoyer des signaux dans le contexte d'une exposition au traitement, et notamment à la radiothérapie (**Chapitre 1.2.1**).

Afin de mieux comprendre l'effet de ces cellules sur la radiosensibilité des BpBCM, une comparaison entre la réponse à une irradiation de 10 Gy a été faite dans des BpBCM comportant des CAF seules en compartiment stromal (biCAF) ou accompagnées d'HUVEC (triCAF).

Cette fois-ci les sphéroïdes n'ont pas exprimé non plus de différence d'expression de ki67 entre la condition bi- et triCAF. Une diminution significative du volume des sphéroïdes

en condition biCAF par rapport à la condition contenant des HUVEC apparaît cependant (**Figure 43**).

Ce résultat suggère un effet radioprotecteur des cellules endothéliales dans le BpBCM.

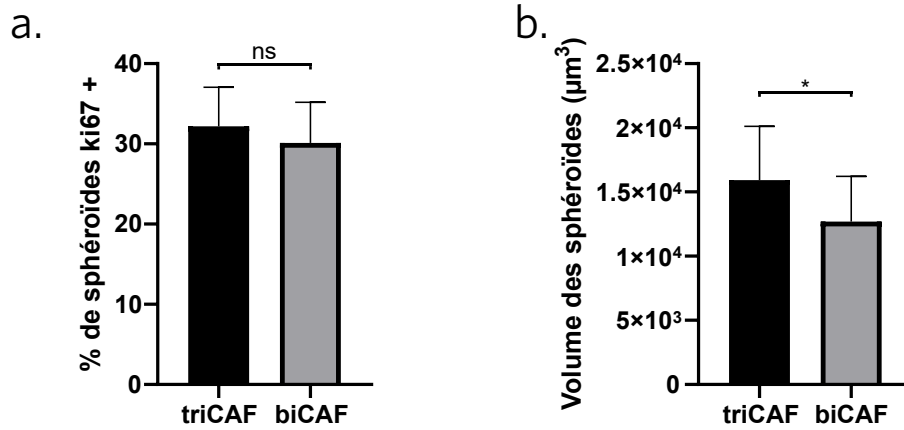


Figure 43: Effet des cellules endothéliales sur la radiosensitivité

a. Positivité au ki67 des modèles après irradiation à 10 Gy en présence d'un stroma contenant des CAF et des HUVEC (triCAF) ou seulement des CAF (biCAF).

b. Volume moyen des sphéroïdes irradiés à 10 Gy en présence d'un stroma contenant des CAF et des HUVEC (triCAF) ou seulement des CAF (biCAF).

Les données sont représentées avec la moyenne \pm écart-type (N=3, n=14). Les p-values ont été calculées avec le test de Kruskal-Wallis suivi d'un test post-hoc Dunn. ns : non significatif.*p<0.05

L'implication des cellules endothéliales dans la réponse à la radiothérapie pourrait être médiées par les céramides (**Chapitre 1.2.1**).

Afin d'évaluer la sécrétion de sphingolipides par les BpBCM, des modèles biCAF et triCAF, mais aussi biNMF et triNMF, ont été traités par irradiation à 10 Gy. Les milieux conditionnés pendant 72h ont ensuite été quantifiés pour la présence des différents sphingolipides par Aline Perrin, de l'équipe de collaborateurs de François Paris.

En s'intéressant aux sphingolipides totaux, on constate une concentration plus élevée en sphingomyéline comme attendu (**Figure 44a**). Peu de tendances sont apparues sur ce graphe, pour les différents sous-types céramide, excepté une possible diminution des sphingomyélines pour la condition triCAF.

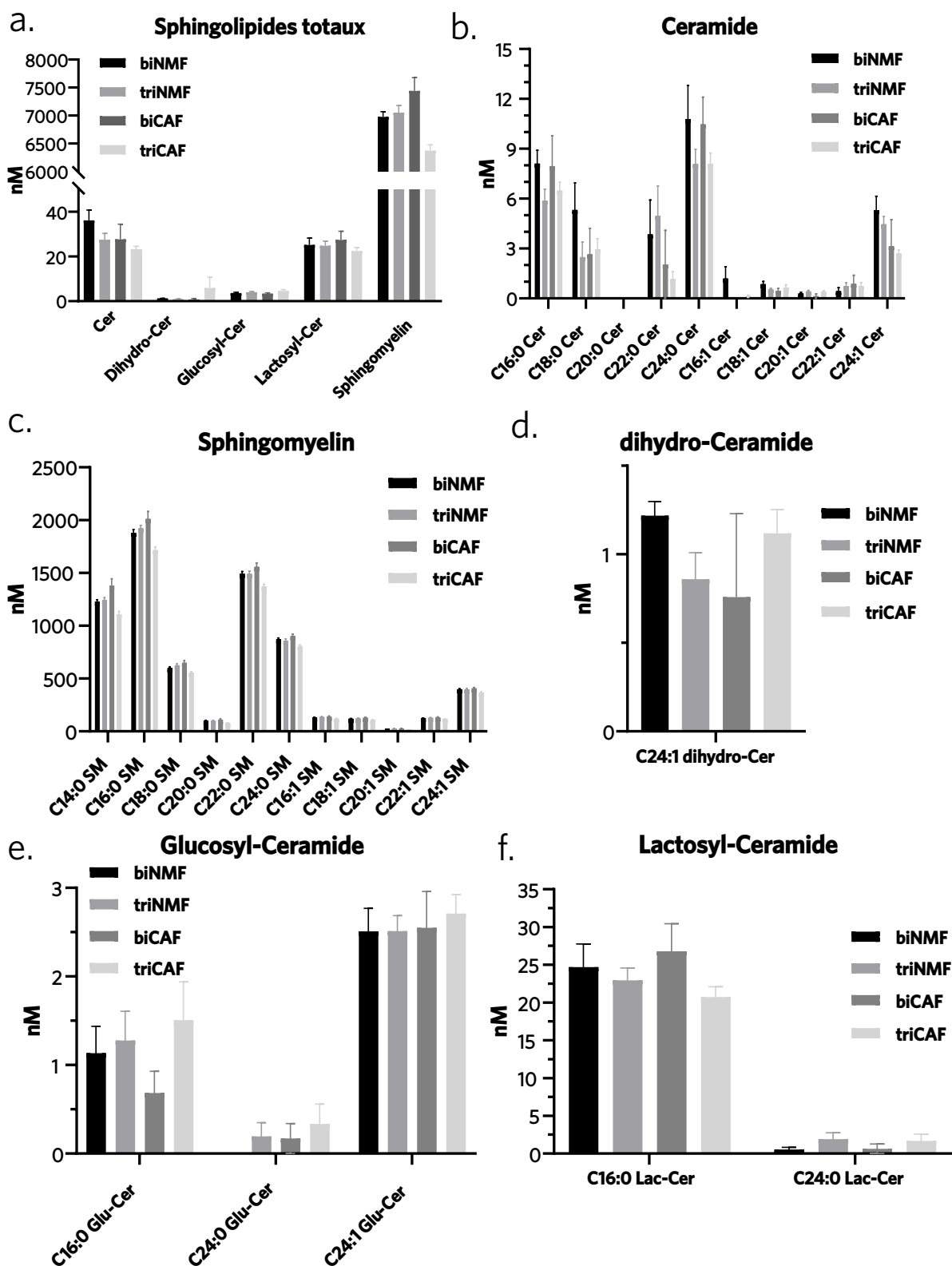


Figure 44: Quantification des lipides sécrétés

- a. Comparaison de la régulation des sphingolipides totaux dans les milieux conditionnés pour les conditions irradiées à 10 Gy en bi ou triculture.
- b. Détail de la concentration mesurée des différents sous-types de céramide (b), sphingomyéline (c), dihydro-céramide (d), glucosyl-céramide (e), et lactosyl-céramide (f).

Les données sont représentées avec la moyenne \pm écart-type (N=3, n=4-12). Statistiques en cours d'analyse.

En se concentrant sur les céramides, on constate une absence de différence en condition triculture, CAF comme NMF, notamment pour C16:0, C24:0 (**Figure 44b**). D'autres céramides comme le C18:0 et le C22:0 ne semblaient pas non plus être modulés en condition CAF spécifiquement. Il semblait donc qu'il n'y avait pas de modulation de certains céramides avec la présence de cellules endothéliales, contrairement à l'hypothèse initiale issue des résultats de l'équipe partenaire.

Ce constat semblait équivalent pour les sphingomyélines, dihydrocéramides et glucosyl-céramides, pour lesquelles les différentes valeurs quantifiées étaient très similaires (**Figure 44a,c,d,e**).

L'ensemble de ces résultats confirmait la sécrétion de céramides dans les modèles, sans pour autant mettre en évidence de modulation en présence des cellules endothéliales.

Afin d'établir l'impact de ces sécrétions de céramides sur la réponse à la radiothérapie, une inhibition globale des céramides a été effectuée à l'aide d'un anticorps polyclonal à spectre large permettant de cibler l'ensemble des céramides [93]. Des modèles triCAF irradiés à 10 Gy ont été analysés comme précédemment pour la prolifération au ki67 et le volume des sphéroïdes, afin d'évaluer une modulation de la réponse au traitement.

Aucune différence significative de prolifération ni de volume des sphéroïdes de MCF-7 n'a pu être observée avec le blocage des céramides par rapport au contrôle non traité ou traité avec un isotype contrôle (**Figure 45a,b**). Ces résultats indiquaient qu'un blocage des céramides dans les BpBCM n'induit ni d'effet radioprotecteur ni d'augmentation de la radiosensibilité.

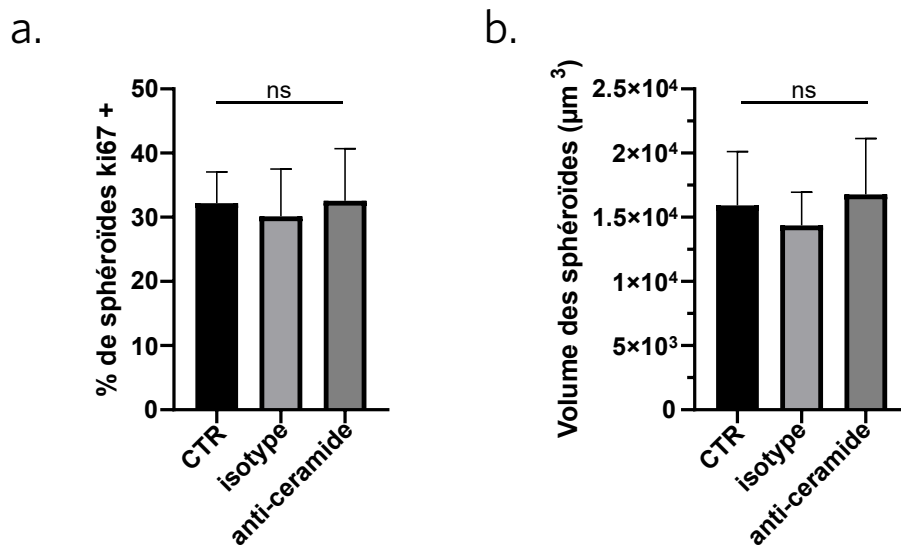


Figure 45: inhibition des céramides pendant la radiothérapie

- Positivité au ki67 des sphéroïdes dans les BpBCM irradiés à 10 Gy après traitement par anticorps anti-ceramide ou un isotype.
- Volume moyen des sphéroïdes dans les BpBCM irradiés à 10 Gy après traitement par anticorps anti-ceramide ou un isotype.

Les données sont représentées avec la moyenne \pm écart-type (N=3 , n=13-16). Les p-values ont été calculées avec le test de Kruskal-Wallis suivi d'un test post-hoc Dunn. ns : non significatif.

L'ensemble de ces résultats montrait une sécrétion de céramide, sans pour autant mettre en évidence d'effet de cette communication sur la réponse à la radiothérapie. Cette absence d'effet, au vu des résultats de l'équipe partenaire, pourrait suggérer la sécrétion de signaux par les fibroblastes compensant l'effet des céramides après irradiation.

Ce chapitre a mis en évidence les capacités de réponse aux traitements du modèle BpBCM, ainsi que la complexité des modulations paracrine qui ont lieu au sein de cette reproduction du microenvironnement tumoral. Il a conclu les résultats de cette thèse en complétant le développement et la caractérisation du modèle, pour montrer son application à l'étude de la réponse aux traitements et aux mécanismes de résistance médiés par le microenvironnement.

Chapitre 5

Discussion, perspectives et conclusion

5.1 Modèles cellulaires

La création d'un modèle de cancer du sein avec son microenvironnement nécessitait de faire un choix judicieux des cellules utilisées afin de répondre au mieux à l'objectif du modèle et aux questions qu'on cherchait élucidées grâce à celui-ci. Dans ce travail, les cellules utilisées ont été les MCF-7, les cellules endothéliales de cordon ombilical humain (HUVEC), les fibroblastes associés au cancer (CAF) et les fibroblastes mammaires sains (NMF). Nous discuterons dans cette section de ces choix et ainsi que de la possibilité d'incorporer d'autres types cellulaires, qui n'ont pas été retenus pour ce travail, au modèle.

5.1.1 Cellules cancéreuses du sein

Les cellules cancéreuses MCF-7 font partie de la lignée la plus représentée dans la littérature depuis 40 ans. Il s'agit de cellules HR+, décrites comme peu agressives et non métastatiques [159]. Cette propriété limite la capacité d'étude de phénomènes de migration dans le modèle développé ici bien qu'il s'agisse d'un facteur important, les métastases représentant la première cause de décès par cancer du sein. Cependant, nous nous sommes intéressés dans cette étude à l'interaction paracrine des cellules avec leur microenvironnement, et plus particulièrement à la prolifération des MCF-7 dans le cadre d'un modèle de tumeur primaire. Les perspectives de ce modèle étaient, dès le début, son application à l'étude des communications paracrines dans le microenvironnement tumoral. Notamment, le mécanisme de modulation de la prolifération médié par les céramides, caractérisé par l'étude partenaire, avait déjà été étudié dans cette lignée, et semblait dépendant de la protéine p53 [93]. Une autre lignée telle que les MDA-MB-231, possédant une p53 mutée n'aurait donc pas pu être adaptée à cette question.

L'homogénéité des MCF-7 permet l'établissement d'un modèle reproductible et comparable,

non seulement d'une expérience à l'autre, mais aussi à l'ensemble de la littérature. Inversement, le manque d'hétérogénéité comparé à la situation *in vivo* limite la généralisation des résultats obtenus à la pathologie humaine. On retrouve en effet une grande diversité phénotypique intra et inter-tumoral dans le cancer du sein [160]. L'hétérogénéité au sein d'une même tumeur est responsable en partie de l'échappement et la résistance aux traitements, et cet aspect est partiellement perdu avec la lignée MCF-7, homogénéisée au cours des multiples passages cellulaires. D'un autre côté, la différence des phénotypes tumoraux d'un patient à l'autre modifie de manière majeure la réponse aux traitements comme cela a été décrit en introduction de ce manuscrit avec les différents sous-types de la pathologie (**Chapitre 1.1.3**).

Atteindre l'exhaustivité avec un seul modèle est donc impossible et le choix d'un modèle reproductible d'étude, qui permet des conclusions partielles qui seront à approfondir dans des situations plus précises, a été fait dans ce travail.

Une manière de s'approcher de ces situations, plus proches de la clinique, serait d'intégrer au modèle des cellules primaires de patients. Certains modèles biofabriqués ont d'ailleurs déjà incorporer des cellules cancéreuses primaires [60, 120, 161]. Cette approche permet d'étudier un phénotype précis associé à un patient et de rendre plus fidèlement l'hétérogénéité intrinsèque de la tumeur. L'utilisation de tels modèles est d'ailleurs indiquée pour servir de plateforme pour la médecine personnalisée [128, 160]. Yi *et al.* [161] ont par exemple démontré la capacité de modèles bioimprimés de glioblastome, à partir de cellules primaires de 3 patients différents, à répondre à la thérapie de manière similaire à leur donneur.

Cette approche pourrait théoriquement être appliquée à notre modèle, l'intégration des cellules primaires au processus de bioimpression, une fois extraite des explants tumoraux, ne modifierait pas la technique utilisée ni sa résolution. On note notamment que l'hydrogel utilisé dans cette étude possède une composition proche de celle décrite par Sokol et collègues [162]. Leur hydrogel est basé sur un mélange de collagène de type I, d', de laminine et de fibronectine, et est capable de supporter la croissance de cellules épithéliales mammaires primaires en structure glandulaire. On notera cependant que la concentration en est inférieure d'un facteur mille à celle décrite dans le modèle bioimprimé présenté dans ce manuscrit, ce qui pourrait influencer sur le phénotype des cellules primaires de patients.

5.1.2 Cellules endothéliales

Les HUVEC sont isolées à partir de cordons ombilicaux humains. Il s'agit donc de cellules primaires, ce qui leur donne une capacité de maturation, notamment en réseaux vasculaires, plus difficilement atteignable avec des lignées immortalisées. Wan et collègues ont cependant récemment développé une lignée immortalisée d'HUVEC gardant ses

capacités de formation microvasculaire jusqu'à au moins 20 passages, contre 10 passages pour des cellules non immortalisées [163]. L'utilisation de cellules immortalisées dans le cadre de notre modèle pourrait permettre d'homogénéiser les différentes études réalisées. En effet, comme toute lignée primaire, on retrouve une variabilité inter-donneur importante qui peut influencer sur les propriétés biologiques étudiées.

Cependant, les HUVEC sont isolées de macro-vaisseaux et elles sont utilisées ici pour reproduire des structures microvasculaires. Il a notamment été montré que les cellules endothéliales avaient des phénotypes variés en fonction de leur origine, avec par exemple une perméabilité augmentée par rapport à des cellules microvasculaires cérébrales [164]. Une approche pour répondre à cette spécificité serait d'utiliser des cellules primaires microvasculaires mammaires pour le modèle. Bien que la littérature sur le sujet soit moins complète que pour les fibroblastes, il semble aussi que les cellules endothéliales du microenvironnement tumoral peuvent aussi développer un phénotype 'associé au cancer' (**Chapitre 1.2.1**). L'expression de marqueurs endothéliaux, spécifiques des zones tumorales comme TEM-1, a été corrélée à un mauvais pronostic [165]. Ce phénotype participe aussi à la régulation de la réponse immunitaire, avec une modification de l'expression de protéines de surface permettant la transmigration vers la tumeur [166]. Un autre aspect de ces cellules endothéliales est leur organisation structurale plus désordonnées que dans le tissu sain. Néanmoins, il n'est pas encore clair que cette désorganisation soit due au phénotype endothélial initial. Nos résultats sur la maturation microvasculaire dans le modèle démontrent l'importance des fibroblastes dans l'expression de leur phénotype en réseaux. L'intégration de cellules endothéliales associées au cancer dans le modèle BpBCM serait un outil puissant pour répondre à ces questions.

5.1.3 Fibroblastes

Deux types différents de fibroblastes ont été choisis pour cette étude. Des cellules primaires dites associées au cancer (CAF), isolées à partir d'un explant de la tumeur et sélectionnées notamment pour leur absence d'expression du facteur de Von Willebrand, et de la cytokératine 18. Afin de mieux comprendre les effets spécifiques induit par le changement phénotypique de fibroblastes sains en CAF, le choix a été fait d'intégrer des fibroblastes mammaires normaux (NMF) à cette étude. Ceux-ci ont été sélectionnés sur les mêmes critères à partir de tissu mammaire non pathologique.

Comme indiqué précédemment, l'utilisation de cellules primaires entraînent une variabilité inévitable dans les phénotypes cellulaires étudiés et leur effet. Au-delà de cela, les types cellulaires utilisés ici proviennent de donneurs différents, avec donc un profil génétique initial différent, ce qui constitue une limite majeure dans la comparaison de ces cellules. Malgré cette absence de couplage, nos résultats, notamment sur la maturation microvasculaire,

s'accordent avec la littérature sur le sujet. Koch et collègues ont notamment caractérisé cette différents en comparant CAF et NMF couplés par donneur sur plusieurs patients, et concluent aussi à un effet pro-angiogénique des CAF dans un modèle biofabriqué et un groupe a présenté des résultats similaires à partir d'un modèle *in vivo* [101, 167].

Enfin, la caractérisation des CAF a permis de mettre en évidence leur sous-type, identifié CD29pos, mais α SMA^{neg} et FAP^{neg}. Ces marqueurs semblent correspondre au sous-type S3 identifié par Costa et collègues [41] (**Chapitre 2.1**). Cette caractérisation est particulièrement intéressante, mais aussi surprenante, de par sa rareté dans la littérature. La plupart des études s'intéressant aux CAF, surtout dans les milieux non spécialistes de ce type cellulaire, se basent quasiment exclusivement sur l'expression d' α SMA pour affirmer l'appartenance des fibroblastes à la catégorie CAF [37]. Les travaux de cette thèse se démarquent donc par leur originalité dans l'étude d'un sous-type de CAF peu représenté dans la littérature, permettant de faire avancer la compréhension des CAF-S3 jusqu'alors peu caractérisés.

L'utilisation de ce sous-type est par ailleurs pertinente vis-à-vis de la géométrie du modèle, puisque sa localisation a été identifiée comme majoritairement juxta-tumorale, correspondant à sa localisation en périphérie du BpBCM. L'étude des sécrétions protéiques des CAF comparées aux NMF réalisés dans cette étude trouve aussi sa pertinence dans l'absence d'expression d' α SMA par ce sous-type, suggérant un rôle plus paracrine que mécanique. L'ensemble des CAF ont néanmoins des rôles paracrines important, notamment le type S1 α SMA^{pos} qui possède des propriétés immunomodulatrices. On notera cependant que la sécrétion de protéines matricielles joue tout de même un rôle sur les propriétés mécaniques de la MEC, suggérant un effet conjugué avec les capacités contractiles des CAF α SMA^{pos}. La sécrétion de collagène par ces dernières a été quantifiée comme atténuée, contrastant avec nos résultats et renforçant la pertinence d'étudier ces différents sous-types [168]. On notera cependant que cette étude base ses quantifications sur des milieux conditionnés de CAF cultivées en 2D, une méthodologie qui apparait moins pertinente que celle employée dans les travaux de cette thèse. La caractérisation des CAF utilisées dans cette étude pourrait bénéficier d'être approfondie, par exemple par analyse en single-cell RNAseq, comme cela a pu être fait pour les CAF-S1 [47]. La réplicabilité des résultats obtenus dans cette étude avec des CAF-S3 de différents donneurs devra par ailleurs être effectuées dans de futurs travaux pour généraliser les résultats obtenus à l'ensemble des CAF-S3.

5.1.4 Intégration d'autres types cellulaires

Le modèle développé dans cette étude est un outil puissant par sa versatilité. Il est en effet possible, sans modifier le processus de bioimpression, d'échanger un type cellulaire pour un autre afin de répondre à une question spécifique. Le microenvironnement tumoral du

cancer du sein étant composé de bien plus que des cellules endothéliales et des fibroblastes (**Chapitre 1.2.1**), nous discuterons ici d'autres types cellulaires qui pourraient être étudié à l'aide de ce modèle. Les adipocytes sont le deuxième type cellulaire stromal le plus fréquent après les fibroblastes dans le microenvironnement du cancer du sein. On les retrouve spécifiquement dans ce cancer car le sein est un tissu initialement fortement adipeux en condition saine. Plusieurs modèles bioimprimés se sont en effet intéressés à cette question [141, 142].

L'étude des mécanismes de résistance aux traitements, notamment médiés par des facteurs paracrines pourrait être pertinente, avec par exemple le CXCL1 qui a été étudié dans ce manuscrit étant aussi sécrété par les adipocytes associés au cancer [57, 169]. Ce type cellulaire pourrait être intégré soit directement dans la périphérie stromale, ou en rajoutant un troisième compartiment autour des deux premiers, qui pourrait peut-être plus fidèlement reproduire l'organisation tumorale.

Dans un second temps, on pourrait envisager l'intégration de cellules du système immunitaire dans le modèle. Les interactions entre cette population hétérogène, comprenant les macrophages, lymphocytes T CD4+ et CD8+, NK et d'autres types encore (**Chapitre 1.2.1**), est un sujet de recherche majeur dans le microenvironnement tumoral du sein. Son étude a notamment été propulsé par l'émergence des immunothérapies, nécessitant le rétablissement de la fonction du système immunitaire dans l'environnement immuno-modulé par les cellules tumorales [81]. Des modèles bioimprimés de cancer du sein s'intéressent notamment à ces thérapies sur un modèle bioimprimé contenant un vaisseau macroscopique dans lequel circule les lymphocytes ciblant la tumeur [170]. Un modèle sur puce microfluidique a pu identifier le rôle des CAF sur l'interaction cellulaire entre les cellules immunitaires et les cellules tumorales [60], suggérant un impact de ces cellules sur l'efficacité de l'immunothérapie. La variabilité de ces populations complexifie grandement leur étude, mais la versatilité de notre modèle pourrait permettre l'isolation d'effets spécifiques d'un type cellulaire par rapport à l'autre.

Enfin, l'étude d'autres types cellulaires spécifiques aux niches métastatiques, osseuse par exemple, pourrait aussi être pertinente. Elle demanderait cependant le développement d'un nouveau modèle plus spécifique de ces niches, comme cela a pu être fait dans d'autres modèles biofabriqués [140, 171].

Il faut cependant garder en mémoire que ces travaux de thèse n'avaient pas pour objectif de reconstituer l'entière complexité du microenvironnement tumoral. Au contraire, l'intérêt était de développer un modèle à la complexité maîtrisée, permettant de répondre à des

questions précises, ici ciblées sur les cellules endothéliales et les fibroblastes. Ajouter d'autres types cellulaires au modèle viendrait complexifier, non seulement sa fabrication et sa mise en culture, mais aussi sa lecture et donc la capacité que nous aurions à comprendre le rôle de tous ces acteurs.

5.2 Matrice extracellulaire

Dans ce travail, nous avons utilisé un bioencres basé sur du collagène de type I, de l'acide hyaluronique et sur le peptide IKVAV dérivé de la laminine (**Chapitre 2.2.1**). D'autres modèles biofabriqués ont fait le choix d'utiliser des matériaux non dégradables par les cellules humaines comme l'alginate [172, 173] ou la soie [174]. L'absence d'enzyme capable de dégrader de tels polymères limite le remodelage matriciel, rendant plus pertinent le choix fait dans ce travail.

D'autres équipes ont basé leur bioencres sur de la MEC mammaire décellularisée, humaine, porcine ou de rat [139, 175, 176]. Gonzalez-Callejo et collègues ont d'ailleurs caractérisé la composition protéique de ce biomatériau. On y retrouve un ensemble de collagènes, glycoprotéines et protéines matricielles, détectés aussi bien dans la matrice native que dans celle décellularisée. Cependant, aucune comparaison quantitative sur l'abondance relative de ces différentes protéines n'est effectuée [139]. Le travail de Peter A. Mollica démontre la pertinence pour la culture de lignées cancéreuses mammaires, et quantifie une abondance relative de facteur de croissance similaire entre la matrice décellularisée de rat, et d'humain. De manière intéressante, cette comparaison a aussi été effectuée avec le collagène de type I issu des queues de rat, qui semble contenir une abondance plus importante de facteurs que les deux matrices décellularisées. Cela démontre que d'un point de vue des facteurs de croissance, l'utilisation de collagène I n'est pas inférieure à celle de la MEC décellularisée. Ils ont cependant montré une prolifération plus importante et des changements phénotypiques dans cette matrice, la rendant pertinente pour l'étude des mécanismes cancéreux [175]. Ces travaux suggèrent qu'il pourrait être pertinent, dans les futurs travaux basés sur le BpBCM développé dans cette thèse, de remplacer le collagène bovin par de la MEC mammaire humaine décellularisée. Celle-ci est accessible en tant que déchet opératoire, et notre équipe a déjà démontré la capacité d'adaptation de la bioencres en associant l' à la MEC d'arnion et de chorion humains décellularisés [177]. D'autre part, l'utilisation de HAMA à haute concentration (10mg/mL) apparaît limitante dans les processus de migration cellulaire. Des expériences préliminaires cherchant à quantifier la migration n'ont d'ailleurs pas abouties pour cette raison. Le développement d'un hydrogel permettant d'améliorer cette propriété pourrait être envisagé dans de futurs travaux, par exemple en diminuant la concentration en et en introduisant un hydrogel

granulaire pouvant favoriser la microporosité du gel. De tels hydrogels ont déjà montrés leur intérêts dans des applications en bioimpression du cancer [119, 121].

Malgré cette discussion sur le choix de la bioencre initiale, les travaux de cette thèse caractérisent pour la première fois le remodelage matriciel important qui se produit au cours de la maturation d'un modèle bioimprimé du cancer du sein et de son microenvironnement stromal (**Chapitre 3.3.1**).

Les résultats de protéomique suggèrent en effet qu'en seulement 7 jours, les fibroblastes du microenvironnement modifient drastiquement la composition de la MEC. Notamment, l'augmentation à jour 7 du collagène de type VI, détectée en abondance, est cohérente avec son rôle pro-cancéreux et métastatiques dans le cancer du sein [34, 178]. L'augmentation plus spécifique des CAF des collagènes COL1A2, COL5A1 participant à la formation de fibrilles est aussi cohérente avec l'accumulation décrite lors de la fibrose des tumeurs du sein [32]. La tendance inverse des COL5A2/3 et COL1A1 avec une diminution à jour 7 vient cependant nuancer cette affirmation. Notre hypothèse est que la formation des fibrilles entre jour 1 et 7 a potentiellement agi sur la solubilité des différentes sous-unités, les fibres plus longues et denses étant plus dures à extraire et à identifier. La protéomique est en effet limitée par le protocole d'extraction, qui a été ici choisi spécifiquement pour maximiser la récupération des protéines matricielles [154].

La surexpression des sous-unités de laminine permettant la formation des laminines 211, 411 et 511 est particulièrement intéressante pour leur participation à la progression tumorale [179]. L'absence de quantification de LAMA1 malgré sa détection suggère une faible quantité de cette chaîne, qui participe à la formation de la laminine 111 dont l'expression est souvent altérée dans les cancers du sein [180]. On ne retrouve cependant pas non plus de quantification des chaînes de la lamine 332 qui est connue comme surexprimée dans les cancers du sein agressifs [179].

L'expression des métalloprotéinases suit aussi une tendance cohérente avec la pathologie, les MMP-2 et 14 étant retrouvées en plus grande quantité à jour 7. La spécificité de l'expression du versican, et des thrombospondins 1/2 est particulièrement intéressante, ces protéines étant associées à des mauvais pronostics de la pathologie. La détection d'autres protéines comme la Tenascin C, l'osteopontin et la periostin est aussi remarquable mais nécessitera des méthodologies plus précises et ciblées de type ELISA ou immunomarquages pour comprendre leur modulation par les CAF et au cours du temps.

La complexité matricielle caractérisée dans cette étude donne des perspectives dans l'utilisation de ce modèle pour étudier des thérapies ciblées de protéines de la MEC, comme les nanobodies ciblant la tenascin C par exemple [181, 182].

On regrettera cependant que la méthode utilisée ne donne pas d'information sur l'organisation

structurelle de ces différents éléments. Cette organisation est en effet particulière dans l'environnement du cancer, avec un alignement des fibres de collagène [30]. Des immunomarquages pour les différents sous-types de collagène, un marquage au picosirius red, ou la microscopie confocale bi-photonique de 2^{de} harmonique, pourraient être utilisés pour mesurer la présence et l'organisation spatiale des différents collagènes. Ces techniques permettraient de vérifier si les CAF induisent cette organisation particulière des fibres de collagènes.

Par ailleurs, cette thèse établit, à notre connaissance, la première mesure de l'impact des CAF sur les propriétés mécaniques de la MEC d'un modèle *ex vivo* (**Chapitre 3.3.2**). Cette mesure a pu être faite en utilisant la microscopie à force atomique pour la spectrométrie de force. Une pointe colloïdale (ou sphérique) a été utilisée pour cette étude pour étudier les propriétés mécaniques d'un hydrogel [183]. Cette pointe permet une détermination plus précise de ces propriétés mécaniques aux dépens d'une moins bonne résolution en topographie de surface. Des résultats préliminaires avec une pointe pyramidale suggèrent qu'elles permettraient d'observer les fibrilles de collagène en surface du modèle. Cette méthode a permis la mesure semi-quantitative du module d'Young apparent.

L'ordre de grandeur des valeurs obtenues est d'ailleurs proche de ceux évalués dans des tumeurs de patientes, avec un module élastique mesuré à 71kPa pour les CAF et 28kPa pour les NMF. Wu et collègues ont quantifié une moyenne de E à 26kPa dans le cas de tumeur bénigne pour 52kPa pour les tumeurs malignes [149]. La dispersion de leur donnée semble aussi cohérente avec celle observée dans nos échantillons. Les travaux de Thomas A. Krouskop décrivent des valeurs de 28kPa pour du tissu glandulaire sain, pour 106kPa dans un carcinome invasif [184]. Enfin, Samani et collègues ont trouvé des valeurs en moyenne plus faible avec un Young's modulus de 3kPa pour le tissu sain et de 42kPa pour la tumeur invasive [185], mais suivant la même tendance à l'augmentation.

Bien que mesurées avec des méthodologies différentes, la cohérence entre ces données cliniques et celles du BpBCM suggèrent une évaluation pertinente de cette caractéristique matricielle. On nuancera cependant la proximité de ces résultats avec ceux de notre étude, la quantification du module d'Young apparent dans cette dernière n'étant pas absolue mais semi-quantitative. De même, la mesure par microscopie de force atomique permet une mesure locale et non globale du tissu d'intérêt.

Ces informations sur la mécanique des tissus cancéreux sont particulièrement intéressantes pour leur implication dans la régulation mécano-transduite des cellules induisant des capacités de résistance, notamment à la chimiothérapie [186].

Ces résultats amènent des perspectives intéressantes dans l'étude de l'augmentation de

la rigidité des tissus tumoraux, et notamment de leur mise en lien avec l'évolution de la composition matricielle. L'inhibition de la sécrétion de certaines protéines matricielles, par exemple la fibronectine, pourrait être réalisée pour mieux comprendre leur impact sur les propriétés mécaniques de la MEC cancéreuse.

5.3 Bioimpression

5.3.1 Choix de la technologie

L'utilisation de la bioimpression par microextrusion a été mise en œuvre dans ce projet pour la biofabrication du modèle BpBCM. Cette technologie est la plus fréquemment utilisée pour réaliser ce type de modèle du cancer du sein [124, 134, 139, 141, 170, 175, 176, 187–191].

Pour justifier cette popularité, on peut citer son accessibilité technique et économique, mais aussi ses caractéristiques spécifiques (**Chapitre 1.4**) : un volume d'impression important et la possibilité d'impression en multimatériaux. D'autres équipes ont utilisé des technologies différentes. Vinson et ses collaborateurs ont par exemple utilisé la technologie de bioimpression assistée par laser pour faire des dépositions précises de cellules MCF-7 ou MDA-MB231 en présence de progéniteur adipocytaire [142]. Campbell *et al.* ont utilisés l'impression par jet d'encre à technologie thermique et ont caractérisé que cette technologie induisait des modifications d'expression génique [192]. Il serait attendu que toutes les technologies d'impression induisent ce type de modulation en raison du stress imposé aux cellules durant le procédé.

Cependant, on peut argumenter que n'importe quelle technique de culture *in vitro* induit un stress non négligeable aux cellules étudiées, que ce soit par l'étape d'extraction, les différentes étapes de passage des cellules, et l'utilisation de milieux supplémentés avec un grand nombre de facteurs. Ces mécanismes ne sont donc pas exclusifs de la bioimpression et doivent être pris en compte pour toutes études *ex vivo* dans l'interprétation et la généralisation des résultats obtenus.

On peut aussi questionner l'utilisation de rayon UV-A (longueur d'onde supérieure à 315nm) pour la photopolymérisation de l'hydrogel en présence de cellules. Les UV sont en effet responsables de dégâts à l'ADN, induisant une mortalité et des mutations indésirables [193]. La fluence de l'irradiation lors du processus de bioimpression est de l'ordre de 600J/m², alors que Roza et collègues décrivent des dommages à l'ADN linéaires avec la dose, mais qui semblent significatifs à partir de doses de l'ordre de 10kJ/m², soit 1000 fois supérieures aux doses de notre expérience. La mortalité cellulaire de fibroblastes primaires

apparaît d'ailleurs négligeable jusqu'à des doses de 100kJ/m^2 . Il semblerait donc que l'utilisation d'UV-A dans le cadre de notre méthodologie soit relativement sûre et peu impactante pour le devenir cellulaire.

D'autres stratégies de biofabrication, et notamment la microfluidique, sont utilisées dans l'étude du cancer du sein. Nguyen et collègues ont notamment pu caractériser l'impact des CAF sur les interactions cellulaires dans un contexte d'immunothérapie [60]. Ce procédé permet l'obtention de modèles répliquables. Cependant, l'échelle de ces modèles est souvent inférieure à celle des nodules tumoraux, alors que ces distances sont critiques dans les processus de diffusion des facteurs paracrines, mais aussi de la migration cellulaire. L'échelle des modèles est d'ailleurs un point essentiel dans le développement des différents gradients, notamment de viabilité et d'hypoxie, qui ont pu être mis en évidence dans cette thèse. Le processus de biofabrication des puces microfluidiques est aussi plus laborieux que celui de microextrusion, ne permettant pas d'obtenir un débit de production du même ordre de grandeur.

Ce débit de production est essentiel dans la perspective d'un criblage moyen débit de traitements. La reproductibilité du processus mise en évidence dans ce manuscrit soutient la pertinence du modèle dans un tel contexte. Le choix de l'utilisation de la bioimpression ou de la microfluidique doit donc se faire selon l'objectif du modèle, les deux approches étant pertinentes pour créer des modèles reproduisant la pathologie.

Une autre perspective serait de complexifier le modèle pour s'approcher encore plus de la pathophysiologie humaine. De futurs travaux pourraient intégrer ce modèle à un système sur puce contenant une connexion entre structures microvasculaire et macrovasculaire perfusées comme cela a pu être fait pour l'étude de l'immunothérapie [170].

Cette approche permettrait une étude plus approfondie des mécanismes métastatiques, ainsi que du traitement par immunothérapie, qui gagneraient à répliquer l'ensemble du processus migration cellulaire du compartiment vasculaire au compartiment tumoral et inversement. Cependant, cette approche aurait un objectif complètement différent, la complexification du processus de biofabrication entraînerait une perte de débit de production.

5.3.2 Design du modèle

Dans ce travail, nous avons choisi d'organiser le modèle en deux zones distinctes : centrale cancéreuse et périphérie stromale. Ces différentes zones sont aussi retrouvées dans les tumeurs extraites de patients, bien qu'on y observe une plus grande hétérogénéité. Dans une étude utilisant la transcriptomique spatiale pour caractériser cette organisation de

Seo et collègues, on retrouve des incursions stromales et notamment endothéliales dans le cœur tumoral, vascularisant la tumeur, avec plus ou moins d'hétérogénéité selon le sous-type tumoral [194]. Au cours de notre étude, nous n'avons pas observé d'invasion du stroma dans le centre cancéreux. Certaines de nos observations laissent penser qu'une culture plus longue pourraient permettre de voir des prolongements endothéliaux vers cette zone. Notamment, l'utilisation d'un hydrogel plus permissif à la migration pourrait favoriser ces événements.

Un autre choix du design a été de l'imprimer en monocouche, afin d'avoir une forme finale en disque. Cette stratégie a été utilisée précédemment [137, 150, 161] pour sa capacité à simplifier le processus de biofabrication, mais aussi la capacité d'analyse du modèle. En effet, l'unique couche que nous utilisons en combinaison avec un hydrogel transparent permet l'imagerie du modèle, en imagerie temporelle par épifluorescence mais aussi après fixation et marquage, tout en gardant intacte sa structure 3D. On notera cependant que Yi et collègues, dans leurs travaux, ont recouvert le modèle en disque imprimé par une lamelle de verre, complexifiant le procédé de fabrication et donc le débit de production des modèles [161].

D'autres études ont utilisé une géométrie en sphère, avec un cœur de cellules cancéreuses et une coque de cellules stromales [120, 139]. Cette approche, bien que plus proche de l'organisation d'une tumeur *in vivo* comporte plusieurs limites. Premièrement, l'absence de vascularisation active, avec un flux dynamique, amplifie plus que nécessaire la formation d'une zone nécrotique et hypoxique. Ensuite, cette méthode crée des modèles plus épais et plus denses, moins favorables à l'imagerie, et qui nécessitent un travail plus laborieux pour acquérir des données, notamment par histologie, perdant alors l'organisation 3D.

5.4 Maturation cellulaire

Ce travail de thèse se distingue ensuite par sa caractérisation de la maturation dans le temps des modèles, en étudiant le BpBCM dans ses trois dimensions spatiales, et dans sa quatrième dimension, temporelle. Outre les travaux sur la MEC développés précédemment, l'évolution des phénotypes cellulaires a été étudiée.

L'apparition d'un cœur nécrotique et hypoxique dans le BpBCM en monoculture de MCF-7 a dans un premier temps montré une évolution qui reproduit cette caractéristique tumorale (**Chapitre 3.1.1**). L'appellation 'nécrotique' reste cependant à nuancer, la viabilité moyenne de cette zone s'élevant toujours à plus de 80%. Le gradient est en lui-même plus informatif que la distinction cœur/surface et indique, en 7 jours seulement,

une maturation des cellules cancéreuses.

Il en est de même pour l'apparition d'une zone hypoxique (**Chapitre 3.1.2**). De manière intéressante, la croissance rapide du signal du rapporteur après jour 5 suggère que ce phénomène est plus lié à l'augmentation de la densité cellulaire dans le modèle qu'à la distance au milieu initiale. Cela paraît cohérent avec une consommation de l'oxygène et des nutriments par les cellules en surface, induisant une déplétion relative de ces facteurs pour les cellules du cœur. Ces phénomènes d'hypoxie ont aussi été décrit pour des modèles en sphéroïdes, et les cellules se développant en sphéroïde dans le BpBCM suggéraient que ce mécanisme pouvait être à l'œuvre ici aussi malgré la taille relativement faible (50-100 μm) des sphéroïdes dans le gel. L'imagerie confocale a cependant bien permis de mettre en évidence un gradient de cette hypoxie du cœur jusqu'à la surface. Ce gradient a pu être mis en parallèle avec un gradient inverse de prolifération marqué par ki67. Ce comportement est cohérent avec la sortie de cycle cellulaire des cellules hypoxiques décrit dans la littérature [195]. Cependant, il semblerait que les cellules cancéreuses puissent s'affranchir de cette diminution de prolifération, il serait donc intéressant de voir si d'autres types cellulaires plus agressifs, comme les MDA-MB231, seraient capables de garder cette capacité proliférative de manière plus importante par rapport au MCF-7.

Une limite de ce travail est l'orientation du gradient décrit de la surface en contact avec le milieu vers le bas du modèle en contact avec la lame de verre. Si cela nous permet de nous affranchir des contraintes liées à la diffusion des facteurs à travers la zone stromale, le gradient radial présent dans les tumeurs et dans certains modèles en sphéroïdes ou bioimprimés [120, 139, 161] n'est pas reproduit fidèlement. La direction du gradient pourrait jouer un rôle sur les communications intercellulaires et l'organisation de la tumeur et de son microenvironnement.

Un autre aspect est que la mesure de l'hypoxie a été faite sur l'expression par les cellules d'un rapporteur sous le contrôle du promoteur HRE (Hypoxia Responsive Element). Si le phénotype cellulaire est en fine l'information la plus importante, il pourrait être intéressant d'utiliser un marquage au pimonidazole, dépendant du niveau d'oxygène dans les cellules, ou une sonde pour mesurer directement le niveau d'O₂ dans le cœur du modèle.

L'étude s'est ensuite concentrée sur l'impact du microenvironnement stromal (**Chapitre 3.2.1**), et a pu montrer que les cellules conservaient leur capacité de prolifération lors de l'ajout de cellules en périphérie.

Cependant, ces résultats invalident aussi l'hypothèse d'une modulation de la prolifération des MCF-7 par les cellules stromales. Cette hypothèse était cependant celle attendue en raison de la littérature abondante sur l'effet promoteur des CAF, sur la croissance tumorale [196] (**Chapitre 1.2.1**). L'ensemble des études sur le sujet se basent néanmoins sur des

lignées de CAF α SMApos, probablement du sous-type S1, mais dont la caractérisation laisse souvent à désirer. Il se pourrait donc que cette thèse soit la première étude à décrire un effet différentiel des CAF-S3 par rapport au CAF-S1 sur ce paramètre, avec une absence d'effet sur la prolifération cellulaire basale. Ces résultats sont d'autant plus surprenants au vu de l'ensemble des modifications de l'environnement identifiées, que ce soit au niveau matriciel ou cytokinique.

Enfin, cette étude s'est intéressée à la maturation des cellules endothéliales dans les BpBCM (**Chapitre 3.2.2**). L'étude structurale des cellules a permis d'observer des différences selon les partenaires en présence des HUVEC. Cette caractérisation est particulièrement intéressante car la fonction des cellules endothéliales est liée à leur organisation en réseaux microvasculaires. Ces travaux ont confirmé l'effet important des fibroblastes sur la maturation endothéliale, déjà décrit dans la littérature, notamment pour les HUVEC [163]. Au-delà de cet effet, cette étude appuie aussi les résultats plus récents sur la comparaison des NMF et des CAF, concluant à un effet pro-angiogénique de ces dernières [101, 167]. Cet effet pourrait donc être médié aussi bien par les CAF-S3 que par les CAF-S1 qui ont fait l'objet de ces différentes études. Une comparaison des deux sous-types de CAF permettrait de conclure plus précisément sur l'importance relative de ces différents sous-types dans ces mécanismes pro-angiogéniques.

L'augmentation de la complexité des réseaux en présence de CAF est concomitante avec les modifications matricielles et sécrétoires provoquées par ces cellules. On peut donc supposer que ces deux mécanismes sont liés. Les forces mécaniques induites par les CAF ont été démontrées comme participant à cet effet promoteur [50]), ce qui correspondrait à l'augmentation de rigidité matricielle observée ici.

Du point de vue de sa composition, la fibronectine retrouvée est connue pour son effet sur la morphogénèse vasculaire, associé à sa capacité d'interaction avec l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$ via le motif RGD [197]. L'augmentation du collagène de type XV, spécifique à la condition CAF, pourrait par ailleurs jouer un rôle dans la stabilisation de ces micro-vaisseaux [198]. Le remodelage matriciel, induit notamment par MMP-2, est aussi lié au processus de développement des cellules endothéliales [197].

A l'inverse, la surexpression des Thrombospondin-1/2 par les CAF est surprenante face à ces résultats car elles sont décrites comme inhibitrices de l'angiogénèse [197]. Leur capacité à se lier à interagir avec un grand nombre de protéines, notamment la fibronectine, rend cependant leurs fonctions très diverses, la communauté étant encore partagée sur leur effet pro ou anti-tumoral [179].

Enfin, cette étude n'a pas mis en évidence d'effet amplificateur des MCF-7, par rapport aux

fibroblastes. Boudreau et Myers décrivaient déjà en 2003 que l'impact direct des cellules cancéreuses était surestimé par rapport à celui des fibroblastes [199]. En effet, ces idées sont issues d'expériences *in vivo* ayant caractérisé une augmentation de l'angiogenèse après injection de cellules cancéreuses. L'effet direct leur a donc été imputé. Cependant, les résultats de cette thèse et d'autres travaux semblent suggérer que cet impact serait aussi en même temps indirect, et médié par le reste du microenvironnement. La transformation de fibroblastes sains en CAF apparaît comme une composante essentielle de l'angiogenèse tumorale. Les stratégies thérapeutiques ciblant les structures microvasculaires bénéficieraient donc probablement d'un ciblage concomitant des CAF.

Ces éléments ouvrent des perspectives sur le rôle spécifique des CAF, notamment du sous-type S3, dans la progression tumorale et le microenvironnement cellulaire. Ils confirment la pertinence du modèle dans l'étude de ces mécanismes et justifient son utilisation dans de futurs travaux s'y intéressant.

5.5 Réponse aux traitements et communication paracrine

Cette étude s'est ensuite concentrée sur la réponse aux traitements du BpBCM, et particulièrement de la radiothérapie (**Chapitre 4.1.2**).

L'optimisation du traitement a dans un premier temps été faite sur le modèle en triculture contenant des CAF. On pourrait regretter que ces conditions de traitement n'aient pas été comparées avec des cultures en 2D, comme c'est le cas dans beaucoup d'études sur des modèles cancer 3D. Cependant, dans le cadre de cette thèse, ce type de comparaison est apparu comme peu pertinent. On observe en effet trop de facteurs variants entre les deux conditions, ne permettant pas d'interpréter une différence si elle apparaît. La démonstration d'une réponse cohérente du modèle, avec un effet dose face à la radiothérapie et la chimiothérapie, semble suffisante pour conclure à une pertinence du modèle pour ce type d'étude.

Dans un second temps la réponse à la radiothérapie des modèles en présence de CAF a été comparée à celle avec des NMF. Les résultats semblent indiquer un ralentissement du cycle des sphéroïdes prolifératifs dans la condition NMF par rapport à la condition CAF, entraînant un volume tumoral plus élevé dans cette dernière, suggérant un effet radioprotecteur. Bien qu'il n'ait pas encore été décrit dans les CAF-S3, cet effet est décrit dans la littérature pour les tumeurs solides (**Chapitre 1.2.1**) [51, 54, 55, 200]. Cet effet a été rapporté comme la résultante d'une communication paracrine, médiée notamment par des mécanismes d'accumulation des espèces réactives à l'oxygène (ROS), provoquant

une meilleure réparation de l'ADN après irradiation. CXCL-1 et CXCL-12 ont été mis en lumière dans ce contexte [55, 57]. D'autres études suggèrent d'autres facteurs paracrines comme les exosomes [54].

L'exploration de la communication paracrine a donc fait l'objet de la suite de ces travaux, au vu de la littérature décrivant son importance dans la résistance à la radiothérapie (**Chapitre 1.2.1**).

Cette étude a pu mettre en évidence la régulation de plusieurs cytokines entre les conditions CAF et NMF en situation basale comme après traitement (**Chapitre 4.2.1**). Parmi ces cytokines, l'endogline, marqueur de l'activation endothéliale, et l'IGFBP2 sont corrélées à la progression tumorale [62, 201, 202].

L'IL-8, une cytokine pro-inflammatoire, est capable d'activer des voies de signalisation promotrices de la prolifération, de la survie et de la migration cellulaire, affectant aussi bien les cellules cancéreuses que les endothéliales [203].

On retrouve d'autres facteurs impliqués dans le contrôle des cellules endothéliales. Notamment, les PDGF jouent un rôle critique dans le recrutement cellulaire du microenvironnement tumoral et l'angiogenèse [204]. De même la lipocaline 2 est un régulateur de l'angiogenèse dans le cancer du sein [205], qui pourrait expliquer en partie le développement angiogénique supérieur en présence de CAF.

Le BDNF est aussi impliqué dans l'activation de multiple voies métaboliques dont PI3K/Akt, surexprimé dans le cancer et prédictif de la réponse thérapeutique [206]. Sa diminution en présence de CAF en condition irradiée est donc inattendue, d'autres études mettant en avant une augmentation de sa sécrétion [207], possiblement avec un sous-type de CAF différent.

On retrouve la cytokine immunomodulatrice $TNF\alpha$ déjà décrite dans le sécrétome des CAF [38]. Cette dernière est aussi impliquée dans la résistance aux thérapies induisant un stress oxydant, comme la radiothérapie, médiée par CXCL-1 [76, 200].

De manière générale, cette évaluation du sécrétome a montré principalement des différences basales, atténuées en condition irradiée. Au vu de la littérature, nous nous attendions à la surexpression de certaines cytokines en condition irradiée. Cependant, cette normalisation des facteurs cytokiniques après traitement pourrait être liée à la réduction du métabolisme cellulaire entraîné par celui-ci.

Une quantification plus précise et plus large de ces cytokines pourrait être réalisé par spectrométrie de masse sur les milieux conditionnés. Cette méthode permettrait une comparaison plus exhaustive des différentes conditions, avec une meilleure sensibilité et une plus grande reproductibilité. Cette méthode permettrait potentiellement d'identifier avec

plus de certitude de nouvelles modulations de sécrétion. Inversement, l'étude spécifique de certaines cytokines nécessitera la confirmation de ces différences de sécrétion par des méthodes plus résolues dans leur quantification.

C'est cette stratégie qui a été adoptée pour l'étude du CXCL-1, qui est apparue comme un sujet d'intérêt (**Chapitre 4.2.2**) pour son impact sur le microenvironnement tumoral (**Chapitre 1.2.1**), et par sa présence plus fréquente dans les sécrétions des CAF que des NMF.

La confirmation de l'augmentation de CXCL-1 en condition CAF a pu être confirmée en vérifiant les quantités protéiques par ELISA et PCR. Ces méthodes ont permis de s'assurer que les CAF étaient bien les responsables principaux de cette sécrétion, l'expérience précédente ayant été réalisée sur des modèles en triculture ne permettant d'isoler les sécrétions des différents types cellulaires.

Si l'inhibition de CXCL-1 par invalidation génétique à l'aide de l'outil CRISPR-Cas9 a échoué au cours de ces travaux, cette méthode serait plus fiable que celle utilisée par la suite avec des anticorps anti-CXCL-1. En effet, la séquence du CXCL-1 est peu propice à son invalidation, une stratégie par sh ou siRNA pourrait alors être utilisée dans de futurs travaux pour obtenir une inhibition constitutive de CXCL-1 permettant de réduire les niveaux d'expression.

L'inhibition par anticorps n'a finalement pas permis de moduler la radiosensibilité des modèles, contrairement à l'hypothèse initiale. On peut imaginer un échec de la stratégie d'inhibition, cependant les clones utilisés pour ce projet ont été choisis pour correspondre à ceux ayant déjà été utilisés dans des études s'intéressant à ce type de mécanisme [55]. La confirmation de ces résultats par d'autres stratégies permettrait d'ouvrir une perspective d'étude des mécanismes compensatoires qui empêchent la modulation par CXCL-1 de la radiorésistance dans le modèle développé ici par rapport aux autres études sur le sujet.

L'hypothèse d'un impact des cellules endothéliales sur cette transcommunication a fait l'objet de la suite de cette étude (**Chapitre 4.2.3**).

Cette hypothèse nous a permis de mettre en évidence l'effet protecteur des cellules endothéliales en comparant des modèles en biculture sans cellules endothéliales avec des modèles en triculture. Ce phénomène semble concorder avec les études montrant un phénomène de radio/chimiorésistance induite par ce type cellulaire [69, 76], mais semble contraster avec l'étude l'équipe collaboratrice qui mettait en évidence une protection sur la prolifération [93]. Coupler cette expérience avec l'inhibition constitutive de CXCL-1 pour essayer de mettre en évidence une possible médiation de la radiorésistance par ce facteur était l'objectif initial, qui n'a malheureusement pas pu être effectué. Une

nouvelle campagne d'expériences avec l'inhibition par anticorps ou les nouvelles stratégies d'inhibition constitutive pourrait évaluer cette hypothèse.

L'hypothèse de la médiation par des facteurs lipidiques a tout de même été étudiée, et notamment des sphingolipides [71, 93] (**Chapitre 1.2.1**).

Afin de vérifier la sécrétion de ces facteurs dans les conditions irradiées, une quantification a été effectuée permettant de mettre en évidence la présence de lipides dans les milieux conditionnés. De manière surprenante, nos résultats mettent évidence une absence d'augmentation générale des céramides avec l'ajout de cellules endothéliales.

L'hypothèse initiale postulait que l'ajout de ces cellules, connues pour leur sécrétion de céramides après irradiation, aurait dû augmenter leur quantité dans les milieux conditionnés. Ce résultat pourrait s'expliquer par une augmentation de la consommation lipidique avec l'ajout de cellules, compensant leur capacité sécrétoire.

Multiplier les conditions d'études permettrait dans de futurs travaux de mieux comprendre cette régulation. En effet, une comparaison avec la condition non irradiée permettrait de confirmer l'augmentation de la sécrétion de céramide identifiée dans d'autres modèles, notamment 2D. Pour évaluer la consommation, une variation des concentrations cellulaires dans les modèles pourrait permettre d'identifier un effet dose sur la quantité de lipides.

Enfin, l'inhibition des céramides dans les tricultures a été effectuée pour identifier une modulation de la radiosensibilité. Le choix de cette condition, malgré sa plus faible teneur en lipide, a été fait pour inclure les cellules endothéliales, jusque là identifiée dans ces mécanismes de communication lipidique.

L'inhibition a une fois de plus été réalisée avec des anticorps ayant déjà montré leur efficacité dans d'autres études [93], mais n'a pas mis en évidence d'effet significatif. Une fois de plus, on peut mettre en cause la stratégie d'inhibition, ou des mécanismes compensatoires. Une inhibition constitutive par invalidation de l'acide sphingomyelinase, ou de la caveolin-1, responsables de la sécrétion de céramide par les cellules endothéliales [93] permettrait d'avoir une inhibition plus efficace et spécifique de ce type cellulaire au sein de la triculture.

L'évaluation de mécanismes compensatoires pourrait être effectuée en réalisant cette expérience sur des modèles en biculture contenant seulement des cellules endothéliales en compartiment stromal.

De futurs travaux pourraient enfin porter sur l'hypothèse d'un lien entre CXCL-1 et céramide. Le CXCL-1 serait en effet impliqué dans la régulation des espèces réactives à l'oxygène (ROS) via l'inhibition de la superoxyde dismutase [55]. Les mécanismes identifiés

de sécrétion de céramide sont dépendant du stress oxydant dû à l'irradiation [93]. Une modulation de la sécrétion de céramide médiée par un contrôle des ROS dans les cellules endothéliales par le CXCL-1 sécrété par les CAF est donc envisageable, et nécessitera des recherches plus approfondies. Ce type d'interaction est au cœur de la complexité du microenvironnement tumoral, qui sollicite l'implication de tous les éléments le composant, régulant la tumeur dans son ensemble, du développement à la réponse aux traitements.

5.6 Conclusion

L'émergence des techniques de biofabrication, en particulier la bioimpression, a révolutionné notre approche des modèles d'étude en cancérologie au cours de la dernière décennie. Ces avancées ont permis de surmonter en partie les limitations des modèles *in vivo* et 2D, grâce à la combinaison de complexité et de flexibilité offerte par ces technologies innovantes. L'impératif de mieux comprendre le microenvironnement tumoral dans son ensemble, ainsi que sa corrélation avec la réponse aux traitements, a amplifié la pertinence de ces approches novatrices.

Dans ce contexte, cette thèse s'est focalisée sur trois objectifs principaux. Tout d'abord, elle a réalisé avec succès le développement d'un modèle de cancer du sein, mettant en lumière une zone cancéreuse centrale entourée d'un stroma composé de fibroblastes et de cellules endothéliales. Cette création, rendue possible par l'association de ces cellules à une bioencre, a abouti à la fabrication reproductible de modèles de 5 mm de diamètre, démontrant ainsi la fiabilité du processus sans impacter de manière significative la viabilité cellulaire.

Ensuite, cette thèse s'est attelée à caractériser le modèle développé, en étudiant son évolution et sa maturation. Cette analyse approfondie a révélé la complexité du microenvironnement tumoral, avec la formation d'un cœur nécrotique et hypoxique au centre de la zone cancéreuse, l'émergence de réseaux microvasculaires et le remodelage matriciel. De plus, elle a mis en lumière l'impact crucial des fibroblastes associés au cancer sur ces mécanismes, fournissant ainsi une description complète des propriétés matricielles jusqu'alors non documentées.

Enfin, cette thèse a exploré les caractéristiques du modèle dans le contexte de la réponse aux traitements et des modulations paracrines associées. Les résultats ont souligné une fois de plus l'influence significative des fibroblastes associés au cancer sur la réponse et les sécrétions liées aux traitements, bien que l'inhibition de CXCL-1 ou des céramides n'ait pas abouti à une modulation de la radiosensibilité dans ce contexte. Cette conclusion renforce cependant la pertinence du modèle pour l'étude de ces mécanismes complexes. Dans l'ensemble, ces travaux enrichissent notre compréhension du microenvironnement

du cancer du sein. Ils ouvrent de nouvelles perspectives pour l'étude des mécanismes de remodelage matriciel et de communication paracrine médiés par les fibroblastes associés au cancer. En fournissant une plateforme pour cibler et comprendre ces mécanismes, ces recherches contribueront au développement de thérapies plus ciblées et efficaces, participant ainsi à l'amélioration de la prise en charge thérapeutique.

Chapitre 6

Matériels et méthodes

6.1 Culture cellulaire

6.1.1 Obtention des lignées cellulaires

Les cellules MCF-7 ont été acquises auprès de ATCC (HTB22, USA). Les lignées primaires de fibroblastes associés aux cancer (CAF, HC-6071, lot 070616Y44 du 08/13/21) et de fibroblastes mammaires normaux (NMF, H-6071, lot 051715/18y56 du 04/07/21) ont été achetées chez Cell Biologics (USA). Ces cellules ont été isolées de donneurs, dans la zone mammaire tumorale ou saine, respectivement. Les cellules étaient testées pour l'absence d'expression du facteur de von Willebrand, et de la cytokératine 18. Les cellules endothéliales primaires ont été isolées de cordons ombilicaux humains (HUVEC) de donneurs selon un protocole décrit précédemment [208]. Ces cellules ont été sélectionnées par leur expression du marqueur membranaire CD31. Une seule lignée d'un même donneur a été utilisée au cours de ces travaux (lignée 19-33).

6.1.2 Transduction des lignées

L'ensemble des transductions ont été réalisés à partir de vecteur lentiviraux. Les cellules MCF-7 ont été transduites avec le rapporteur Green Fluorescent Protein (GFP) sous le contrôle du promoteur EF1 α (Flash Therapeutics, France), induisant une expression d'une protéine fluorescente verte avec une longueur d'onde d'excitation de 488nm dans le cytoplasme. Les HUVEC ont été transduites avec le rapporteur mKate (mK) sous le contrôle du même promoteur (Flash Therapeutics, France), mais induisant une fluorescence rouge avec une longueur d'onde d'excitation de 561nm. Les cellules MCF-7 ont aussi été transduites avec le rapporteur HRE-dUnaG [152], qui nous a d'ailleurs envoyé ses plasmides, sous le contrôle du promoteur HRE (Hypoxia Responsive Element), induisant

une fluorescence verte en condition hypoxique (Vector Builder, USA). Enfin, les CAF ont été transduites pour un construct CRISPR-Cas9 préparé par Catherine Gratas de l'équipe PÉTRY (Nantes) ciblant le gène CXCL1 (séquence : sg37= GAGAGAGCAGCGCGGGC-CAT ; sg38 = CGATGATTTTCTTAACTATG), aussi sous le contrôle du promoteur EF1 α .

Les cellules étaient transduites par incubation avec les lentivirus (MOI : GFP= 40; mK= 40; HRE-dUnaG=2 ; sg37/sg38=8) sur la nuit à 37°C, 5% CO₂, avant de renouveler les milieux. 72h après l'infection, les cellules infectées avec HRE-dUnaG, sg37 et sg38 ont été sélectionnées par une incubation de 4 jours en présence de puromycine à 500ng/mL(REF).

6.1.3 Amplification et maintien des lignées

Toutes les lignées étaient maintenues en incubateur à 37°C en condition humide avec 5% de CO₂. Les MCF-7 étaient amplifiées en milieu Dulbecco's modified Eagle's High Glucose medium (DMEM HG, Gibco), supplémenté avec 10% (v/v) de sérum foetal bovin (FBS). Les HUVEC étaient amplifiées dans du milieu Endothelial Basal Medium 2 supplémenté avec un kit pour la culture microvasculaire (EGM2-MV, Lonza). Les CAF ainsi que les NMF étaient amplifiées dans un mélange 1 :1 de DMEM HG 10% FBS : EGM2-MV. Les cellules étaient passées une fois à 95% de confluence (HUVEC : 5-6 jours ; MCF-7 : 5 jours ; CAF : 7 jours ; NMF : 8 jours). Le passage était effectué par un rinçage au Phosphate-Buffered Saline 1X (PBS, Gibco), suivi du détachement des cellules adhérentes par une incubation de 3 minutes en trypsin-EDTA 0.05% (Gibco). Les cellules détachées étaient ensuite centrifugées à 1100 rpm, puis le culot cellulaire solubilisé et compté. Les cellules étaient ensuite réensemencées à des densités variant de 5000 à 10000 cellules/cm². Les cellules étaient régulièrement testées pour la présence de mycoplasme par RT-PCR.

6.2 Caractérisation des lignées

6.2.1 PCR

L'extraction de l'ARN total a été réalisée en utilisant le kit RNeasy® Plus Micro (Qiagen) selon le protocole du fabricant. La concentration finale et la pureté de l'ARN (OD_{260/280}) ont été déterminées à l'aide d'un NanoPhotometer® P 330 (Implen GmbH, Munich, Allemagne). L'ARN a été transcrit en ADNc en utilisant le kit Maxima Reverse Transcriptase (Thermo Scientific™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, États-Unis), conformément au protocole du fabricant et en utilisant 300 ng d'ARN total. Les expériences de RT-qPCR ont été réalisées à l'aide d'un système de détection de PCR en temps réel CFX Connect™ (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, États-Unis) et analysées avec le logiciel

CFX Manager™, version 3.0 (Bio-Rad Laboratories).

Les amorces spécifiques utilisées sont décrites dans le **table 6.1**. L'expression des gènes cibles a été quantifiée en utilisant les valeurs de seuil de cycle (Ct) et les niveaux d'expression relative de l'ARNm ont été calculés comme suit : $2^{(Ct_{\text{gène de référence}} - Ct_{\text{gène cible}})}$. Les gènes de référence utilisés étaient la protéine ribosomique humaine de la sous-unité latérale de la tige P0 (Rplp0) et la glyceraldéhyde 3-phosphate dehydrogenase (Gapdh).

Amorces PCR			
Gène	5' ⇒ 3'	3' ⇒ 5'	paires de base
Gapdh	GGCATTGCTCTCAATGACAA	TGTGAGGGAGATGCTCAGTG	223
Rplp0	CACTGGCTGAAAAGGTCAAGG	GTGTGAGGGGCTTAGTCGAA	187
CXCL-1	AGGCAGGGGAATGTATGTGC	AAGCCCCTTTGTTCTAAGCCA	225

Table 6.1: Amorces utilisées pour les quantifications relatives d'expression d'ARN

6.2.2 Cytométrie

Les CAF ont été évalués pour l'expression des marqueurs CD29, α SMA, et FAP par cytométrie en flux. Les cellules cultivées en flasque étaient détachées par incubation en trypsine-EDTA 0.05%, et 2.10⁶ cellules étaient remises en suspension en PBS avant d'être fixées en paraformaldéhyde à 4% pendant 15 minutes. Après rinçage en PBS, les cellules étaient incubées pendant 30 minutes en PBS supplémenté avec 3% (w/v) de bovine serum albumine (BSA). Les concentrations et références des anticorps utilisés sont disponibles en **table 6.2**. Les cellules étaient ensuite rincées au PBS et remises en suspension à 1.10⁶ cellules/mL puis passées en cytométrie en flux sur le Accuri™ C6 Flow cytometer (BD Biosciences). Les données ont ensuite été analysées sur floreada.io (<https://floreada.io>). Les doublets et les débris cellulaires ont été filtrés par une première gate basée sur le FSC-H et le SSC-H, avant de tracer les histogrammes de fluorescence. Le même protocole de cytométrie a été utilisé avec les cellules vivantes, non fixées et non marquées, transduites pour GFP et mKate.

Anticorps cytométrie			
Cible	Dilution	Couplage	Référence
CD29 humain	5 μ L/10 ⁶ cells	Alexa 488nm	303015, Biolegend
α SMA humain	5 μ L/10 ⁶ cells	Alexa 594nm	IC1420T, R&D Systems
FAP humain	0.25 μ L/10 ⁶ cells	Alexa 488nm	FAB3715G, R&D Systems

Table 6.2: Table des anticorps utilisés en cytométrie

6.3 Bioimpression

6.3.1 Préparation des bioencres

Le collagène de type I bovin (Sigma-Aldrich) et l'acide hyaluronique (1.5-1.8x106kDa, Sigma-Aldrich, France) ont dans un premier temps été métacrylés selon une procédure établie dans de précédents travaux [145], cette tâche était réalisé par Léo Comperat, ingénieur de l'équipe. Les solutions de ColMA (dissout en acide acétique 0.02M) à 6mg/mL, de HAMA à 30mg/mL (solubilisé en DMEM HG), d'IKVAV à 25mg/mL (solubilisé en acide acétique 0.02M) et de phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinate à 10mg/mL (LAP, solubilisé en DMEM HG, TCI chemicals) étaient ensuite mélangées pour obtenir une concentration finale de ColMA : 2mg/mL ; IKVAV : 1mg/mL ; HAMA : 10mg/mL ; LAP : 1mg/mL. Le pH des solutions de ColMA et d'IKVAV étaient tamponnés par l'ajout de NaOH 1M, et leur osmolarité par du PBS 10X. Le volume final était complété avec du DMEM HG. Un exemple de la composition d'un volume de 1mL d'encre est disponible en **table 6.3**.

Volume total	1mL				
Composant	Ci	Cf	Unité	mL	μ L
ColMA	6	2	mg/mL	0.33	333.33
IKVAV	25	1	mg/mL	0.04	40
NaOH	1		mM	0.01	11.67
PBS 10X	10	1		0.03	33.33
HAMA	30	10	mg/mL	0.33	333.33
LAP	10	1	mg/mL	0.1	100
DMEM HG	1		N/A	0.15	148.33

Table 6.3: Composition de la bioencre HAMA/ColMA/IKVAV pour un volume final de 1mL

Cette encre était enfin mélangée aux cellules d'intérêt pour obtenir les différentes bioencres imprimées dans le modèle. La bioencre cancéreuse contenait 5M/mL de cellules MCF-7. La bioencre stromale pouvait contenir tous les autres types cellulaires, tous à une concentration de 5M/mL. Pour l'expérience visant le développement des réseaux microvasculaires, une concentration de 20M/mL de HUVEC a été choisie pour accélérer le développement des réseaux. La **Figure 46** illustre les différentes encres réalisées dans le cadre de ce projet.

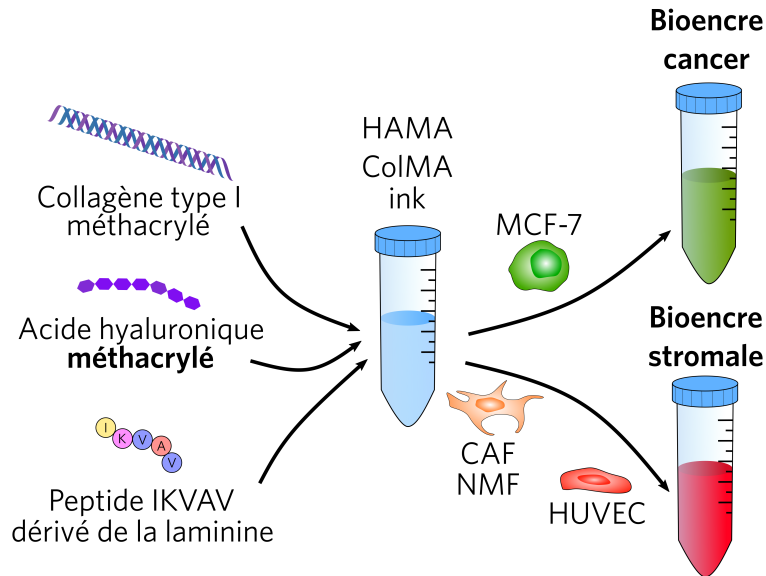


Figure 46: Représentation schématique de l'obtention des différentes bioencres

6.3.2 Design et conception sur ordinateur

Le design choisi pour ce travail se compose d'une zone avec des cellules cancéreuses, le centre tumoral (CT), entourée d'une périphérie stromale (PS). CT a un diamètre théorique de 3mm, alors que PS a un diamètre de 5mm. L'épaisseur du modèle, devant être suffisamment fine pour permettre l'imagerie, est d'une seule couche d'impression. Afin de réaliser cette structure avec la bioimprimante du laboratoire, le Computer Assisted Design a été réalisé sur BioCAD (RegenHU, Suisse). Un premier cercle de 1.2mm de diamètre a été dessiné, chemin qui sera suivi par la tête d'impression numéro 2 contenant la bioencre cancéreuse. Après cela, une pré-polymérisation de 5 secondes à l'UV (365nm) centrée sur ce premier cercle est effectuée. Celle-ci prévient le déplacement du motif lors de l'impression de PS. Cette partie se fait en suivant un cercle de 3.3mm de diamètre centré sur le premier. Une photo-polymérisation finale de 30 secondes est ensuite effectuée. Finalement, et de manière optionnelle, un point à côté du modèle peut être marqué pour venir déposer du milieu de culture avec une troisième tête d'impression en jet d'encre (**Figure 47**).

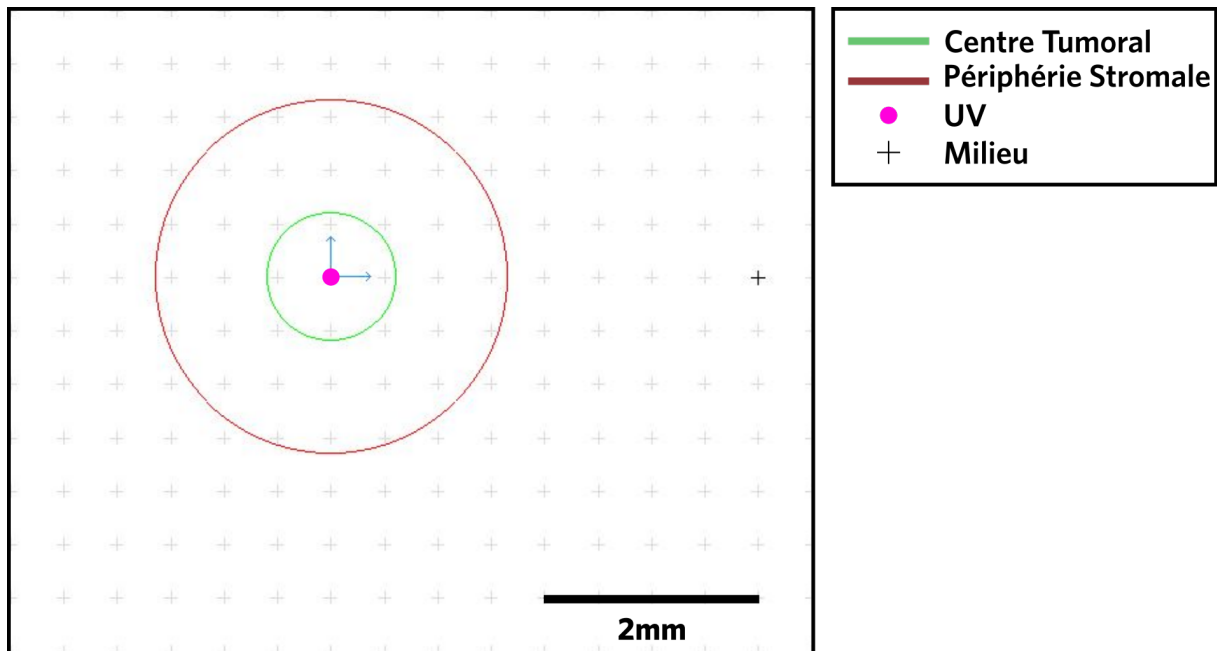


Figure 47: Modèle CAD pour l'impression du BpBCM

6.3.3 Bioimpression par extrusion

Des buses coniques de 0.41mm de diamètre étaient remplies avec les bioencres cancéreuse et stromale, montées respectivement sur les têtes 2 et 1 de la bioimprimante RegenHU 3D Discovery (RegenHU, Suisse). Les têtes se déplacent à une vitesse de 25mm/s, et un délai de 250ms est appliqué avant le début du mouvement. Cette pression est comprise entre 2kPa et 6kPa. La tête jet d'encre numéro 4 était utilisée pour déposer le milieu avec une ouverture de la valve électro-aimantée de 300µm pendant 2.5s et une pression de 15kPa afin de déposer un volume d'environ 1mL.

L'impression a été faite dans des plaques 24 puits en série (Starsted). Avant chaque impression, des lamelles de verre de 12mm de diamètre étaient déposées au fond de chaque puit pour améliorer l'adhérence de la bioencre. La hauteur de cette surface de verre était mesurée dans chaque puit par la tête 'SHM' (Surface Height Measurement) de la bioimprimante qui utilise un laser pour faire cette calibration. De la même manière, la longueur des buses étaient mesurées en utilisant la fonction 'NLM' (Needle Length Measurement). Ces deux informations combinées permettent de respecter une distance de 100µm entre la buse et le verre, évitant l'écrasement et donc la mort des cellules.

6.3.4 Maintien en culture et traitement des modèles

Les modèles ont été maintenus dans 1mL de milieu EGM2-MV. Le milieu était renouvelé 4 jours après impression.

Le traitement par les anticorps anti-CXCL1 (MAB275-500, R&D Systems) ainsi que l'isotype contrôle (MAB004, R&D Systems) étaient dilués à 5µg/mL dans le milieu de culture. Les modèles ont été traités à partir du jour 0 dans cette condition. Les autres traitements ont été effectués à partir de ce jour 4 post-impression. Pour le traitement chimio-thérapeutique, du Paclitaxel (ACROS Organics) solubilisé en diméthylsulfoxyde à des concentrations entre 2.5 et 50ng/mL. L'anticorps anti-céramide (ALX-804-196-T050, Enzo Life Sciences) ainsi que l'isotype contrôle ont été dilués à 2µg/mL.

L'irradiation a été réalisée à jour 4 avec un irradiateur γ (IONISOS) à un débit de dose de 3.07Gy/min-1. Les doses totales ont été délivrées en une seule fois, représentant 5, 10, ou 15 Gy selon les conditions. Le milieu était changé avant irradiation pour garder les sécrétions post-traitement.

6.4 Marqueurs et imagerie

6.4.1 Activité métabolique

Afin de suivre l'activité métabolique des modèles imprimés, 500µL de milieu avec 10% de resazurin (v/v) était incubé avec les cellules pendant 3h. La fluorescence des milieux conditionnés était ensuite mesurée (excitation : 530 nm ; émission : 590 nm ; Victor X3, Perkin Elmer), avant de rincer les modèles en PBS et de renouveler leur milieu. Ces mesures étaient effectuées à jour 0,3,7 et 14 afin d'assurer un suivi temporel, et normalisées sur l'activité métabolique du même modèle à jour 0. Seuls les résultats à jour 7 sont présentés dans ce manuscrit.

6.4.2 Microscopie

Les images en épifluorescence, contraste de phase et timelapse ont été acquises sur le Lumascope LS720 (Etaluma) avec un objectif 4X. Les acquisitions timelapse ont été faites en incubateur à 37°C à 5% de CO2 en condition humide durant toute la durée de l'expérience. Des images étaient acquises toutes les deux heures pour le suivi temporel. L'imagerie confocale était effectuée sur le microscope SPE7 (Leica Microsystems). Les modèles étaient imagés sur 200 ou 500 µm d'épaisseur tous les 5 µm en utilisant un objectif 10X. L'imagerie du modèle dans son ensemble pour les marquages VE-Cadherin a été réalisée sur le microscope Stellaris (Leica Microsystems).

6.4.3 Live/Dead

L'essai de viabilité cellulaire a été effectué afin d'évaluer la survie des cellules après leur impression. Les échantillons imprimés ont été incubés avec du calcein-AM ("Live", 1 μ L/mL, Invitrogen) et de l'homodimère d'éthidium ("Dead", 4 μ L/mL, Invitrogen) pendant 20 minutes. Par la suite, ils ont été lavés avec du PBS avant acquisition en microscopie confocale.

6.4.4 Immunofluorescence

Afin d'effectuer des marquages par immunofluorescence, les modèles étaient dans un premier temps rincés au PBS avant d'être incubé 30 minutes en paraformaldéhyde 4% (w/v) à 4°C. Après 3 rinçages au PBS, les modèles étaient perméabilisés dans du Triton 0.5% pendant 20 minutes à température ambiante suivis d'une heure d'incubation avec du bovine serum albumine (BSA) 2.5% (w/v) pour faire un blocage protéique. Les anticorps étaient ensuite solubilisés dans une solution de BSA 1% + Triton 0.1%. Les modèles étaient incubés sur la nuit, retournés sur une goutte de 100 μ L solution. 3 rinçages au PBS étaient effectués le lendemain, avant l'incubation de l'anticorps secondaire et du DAPI à 1 μ g/mL(Thermo Scientific) sur la nuit suivante. Enfin, après un cycle de rinçage similaire au précédent, les modèles étaient conservés dans une solution de Fructose-Glycérol [209]. Les références et concentrations des anticorps utilisés sont synthétisées dans la **table 6.4**.

Anticorps primaire				
Espèce	Cible	Dilution	Couplage	Référence
Lapin	ki67 humain	1/1000	X	ab15580, Abcam
Souris	CD31 humain	1/200	X	sc53411,Santa Cruz
Lapin	VE-Cad humain	1/40	X	D87F2,Ozyme

Anticorps secondaire				
Espèce	Cible	Dilution	Couplage	Référence
Ane	Lapin	1/400	Alexa 637	ab150075, Abcam
Chèvre	Lapin	1/500	Alexa 488	A110029,Thermofisher

Table 6.4: Table des anticorps utilisés en en immunofluorescence

Les modèles étaient conservés à 4°C pour être imagés par microscopie confocale dans les 2 semaines suivantes ou à -20°C pour une utilisation plus tardive.

6.5 Caractérisation des propriétés mécaniques

6.5.1 Rhéologie

La viscosimétrie de l'encre a été effectuée sur le Kinexus pro+ rheometer (Malvern Instruments). Les mesures de viscosité de cisaillement rotationnel ont été réalisées en mode écoulement avec des taux de cisaillement variant de 0.01 à 500 s⁻¹. Les mesures ont été effectuées en triplicata et à 25 °C. La rhéologie de l'encre a été testée avec le même instrument sur des hydrogels entièrement photopolymérisés stabilisés à 37°C avant et pendant les mesures. Des balayages de fréquence à une contrainte constante de 0.1% avec une fréquence angulaire de 0.1 à 100 rad.s⁻¹ ont été réalisés pour déterminer les modules d'élasticité et de perte (G' et G'' , respectivement).

6.5.2 Microscopie à force atomique

Les expériences de microscopie à force atomique ont été réalisées sur un AFM Bruker Bioscope Resolve monté sur un microscope inversé Zeiss Axio Observer. La matrice d'hydrogels a été déposée dans une boîte en verre de fond de 50 mm (Willco Wells HBST-5040). Pour les mesures du module d'Young apparent, des sondes colloïdales sur mesure ont été utilisées. Pour les préparer, des sondes AFM sans pointe NPO10-C (Bruker) ont été mises en contact avec un peu de colle UV durcissable Norland NOA 63, uniquement à l'extrémité du levier. Ensuite, le levier a été approché d'une microsphère de silice (diamètre = 7.75 μm) pour coller une seule sphère à son extrémité. La sonde a ensuite été exposée à une illumination UV pendant la nuit pour polymériser la colle.

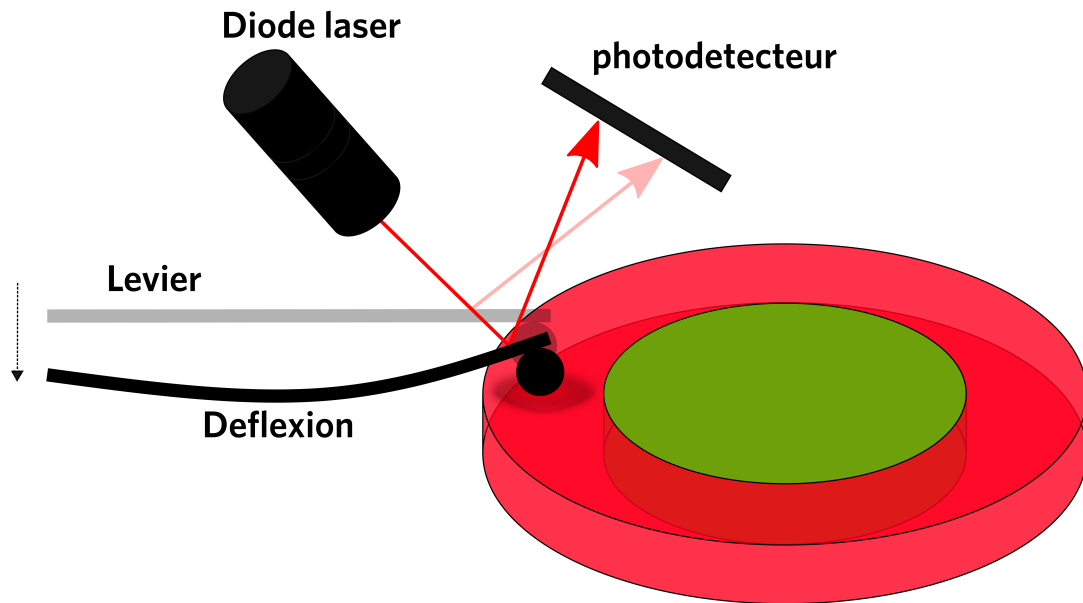


Figure 48: Microscopie à Force Atomique en spectrométrie de force

Les mesures AFM avec ces sondes ont été réalisées en mode PeakForce Tapping. La constante de raideur de la sonde a été calibrée en réalisant une courbe force-distance sur une surface en verre propre combinée à une méthode de bruit thermique. L'échantillon a été visualisé au microscope optique pour différencier les deux zones de l'hydrogel. La sonde a ensuite été positionnée sur la région d'intérêt et l'échantillon a été sondé à plusieurs endroits. Le setpoint PeakForce était généralement réglé à quelques nN avec une amplitude PeakForce typique de 500 à 1000 nm (**Figure 48**). Toutes les courbes PeakForce d'une image ont été enregistrées et analysées ultérieurement à l'aide du logiciel Nanoscope Analysis (Bruker). Pour l'ajustement du module d'Young apparent, un modèle d'indenteur sphérique de Hertz a été utilisé. La ligne de base a été corrigée, le rayon de la pointe a été modifié pour correspondre aux dimensions de la sphère et l'ajustement a été réalisé sur la courbe d'extension, uniquement pour des indentations inférieures à 2 μm . Les valeurs du module d'Young apparent ajustées ont ensuite été extraites et tracées.

6.5.3 Quantifications protéiques

6.5.4 ELISA

La quantification du CXCL-1 dans les milieux conditionnés a été réalisée avec le Kit d'immunoessai GRO α humain ProQuantumTM (Invitrogen), en suivant les instructions du fournisseur.

6.5.5 Cytokine array

Pour chaque condition, des échantillons de milieux conditionnés ont été collectés 72 heures après le traitement et les milieux de 4 modèles de la même condition ont été regroupés pour obtenir un volume final de 1.5mL. Le kit Proteome profiler Human XL Cytokine Array Kit (R&D Systems) a été utilisé pour quantifier la sécrétion de cytokines selon le protocole du fournisseur. En bref, les membranes ont été incubées dans un tampon de blocage avant une incubation sur la nuit à 4°C dans les milieux conditionnés. Les membranes ont ensuite été lavées et révélées. Le signal a été capturé sur l'ImageQuant LAS 4000 Mini (GE Healthcare) avec une incrémentation de 1 à 10 minutes. L'expérience a été répliquée 4 fois avec différents lots de membranes et la normalisation pour les quantifications ultérieures était basée sur le signal de fond.

6.5.6 Extraction des protéines matricielles

Afin d'effectuer l'extraction, 120 modèles d'une condition étaient regroupés dans un même tube. Le protocole d'extraction protéique a été adapté de Hill [154]. Après 3 rinçages au PBS, les modèles étaient mis en solution saline (50mM Tris-HCL, 0.25% CHAPS, 25mM EDTA, 3M NaCl, protease inhibitor 10µL/mL, pH 7.4) et mixé. Après centrifugation à 15000rpm à 4°C pendant 15 minutes, l'éluât était récupéré et constituait la fraction 1. La nouvelle solubilisation et centrifugation dans ce même tampon répétées 2 fois permettaient de récupérer la fraction 2 et 3. L'ensemble de ces fractions 1, 2 et 3 représentent la fraction cellulaire de l'extraction matricielle. Le culot était ensuite solubilisé dans un tampon d'urée (8M urée, 100mM ABC, 25mM TCEP, pH 8) pendant 30 minutes à température ambiante. Après centrifugation (15000 rpm, 4°C, 15 minutes), l'éluât récupéré constitue la fraction 4. Le culot était digéré dans une solution à 100mM de CNBr dans du TFA à 86% sur la nuit. L'échantillon était ensuite lyophilisé et rincé à l'eau trois fois de suite avant de finalement solubiliser les protéines restantes dans le tampon urée. L'éluât récupéré après centrifugation de cette solution est la fraction 5. Ensemble, la fraction 4 et 5 représente la partie matricielle de cette extraction protéique, et est celle utilisée pour la suite de l'analyse protéomique (**Figure 49**).

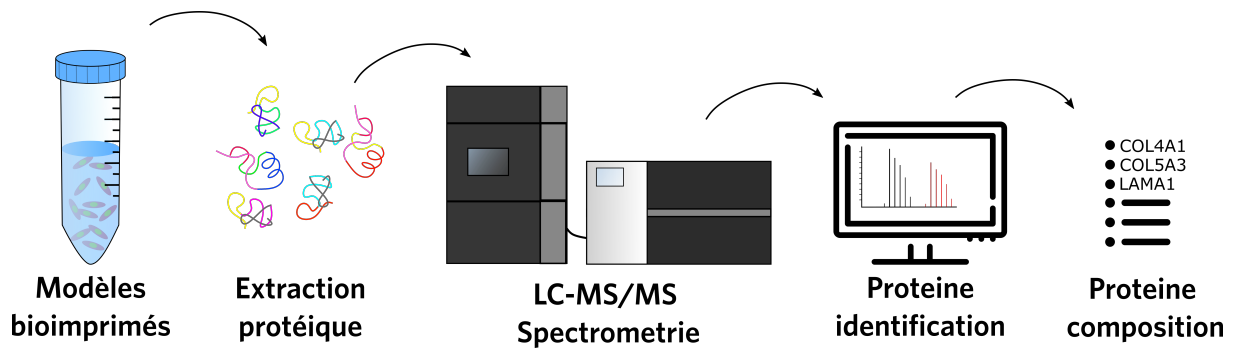


Figure 49: Protocole de quantification protéomique

6.5.7 LC-MS/MS Spectrométrie de masse

Trois fractions extracellulaires indépendantes des conditions triNMF et triCAF extraites le jour 1 et le jour 7 ont été analysées par spectrométrie de masse pour comparer la composition en protéines. Les protéines ont été chargées sur un gel SDS-PAGE à 10% d'acrylamide et visualisées par coloration bleue colloïdale. La migration a été arrêtée lorsque les échantillons venaient juste d'entrer dans le gel de résolution et la région non résolue du gel a été découpée en un seul segment. Les étapes de préparation des échantillons et de digestion des protéines par la trypsine ont été réalisées comme décrit précédemment [210]. Les analyses NanoLC-MS/MS ont été réalisées à l'aide d'un système Ultimate 3000 RSLC Nano-UPHLC (Thermo Scientific, États-Unis) couplé à un spectromètre de masse Orbitrap Fusion™ Lumos™ Tribrid™ (Thermo Fisher Scientific, Californie, États-Unis) avec nanospray. Chaque extrait de peptide a été chargé sur une précolonne PepMap C18 de 300 μm de diamètre interne sur 5 mm (Thermo Scientific, États-Unis) à un débit de 10 $\mu\text{L}/\text{min}$. Après une étape de désalinisation de 3 minutes, les peptides ont été séparés sur une colonne EasySpray de 50 cm (75 μm de diamètre interne, billes de C18 de 2 μm , taille de pore de 100 Å, ES903, Thermo Fisher Scientific) avec un gradient linéaire de 4 à 40% de solvant B (acide formique à 0.1% dans 80% d'ACN) en 57 minutes. Le débit de séparation a été réglé à 300 nL/min. Le spectromètre de masse a fonctionné en mode ion positif à une tension d'aiguille de 1,9 kV. Les données ont été acquises à l'aide du logiciel Xcalibur 4.4 en mode dépendant des données. Les scans MS (m/z 375-1500) ont été enregistrés à une résolution de $R = 120000$ (@ m/z 200), avec un AGC standard et un temps d'injection en mode automatique, suivi d'un cycle de devoir de vitesse maximale de 3 secondes pour l'acquisition MS/MS. Les ions précurseurs (états de charge de 2 à 7) ont été isolés dans le quadropôle avec une fenêtre de masse de 1,6 Th et fragmentés avec une énergie de collision normalisée HCD@28%. Les données MS/MS ont été acquises dans la cellule Orbitrap avec une résolution de $R = 30000$ (@ m/z 200), avec un AGC standard et

un temps d'injection maximal en mode automatique. Les précurseurs sélectionnés ont été exclus pendant 60 secondes.

6.6 Analyse bioinformatique

6.6.1 Analyse des données d'imagerie

L'analyse d'images a été réalisée à l'aide d'algorithmes Python 3.8 personnalisés [211] disponibles en appendix D. En bref, la segmentation d'images en 3D a été réalisée avec la bibliothèque `pyclesperanto` (<https://github.com/clEsperanto/pyclesperanto>) pour le comptage et la quantification des marqueurs. L'analyse du réseau microvasculaire a été effectuée à l'aide du package `Qiber3D` [153]. `FIJI` [212] et `Imaris 8.0` (Oxford Instruments) ont été utilisés pour la représentation visuelle. Lorsque possible, les quantifications de 3 acquisitions distinctes provenant de différentes zones dans le modèle ont été moyennées pour obtenir une valeur par modèle.

6.6.2 Analyse des données de quantifications protéiques

L'identification des protéines et la quantification sans marquage (LFQ) ont été réalisées dans `Proteome Discoverer 3.0`. Le noeud `CHIMERYYS` utilisant le modèle de prédiction `inferys-2.1` fragmentation a été utilisé pour l'identification des protéines en mode batch en recherchant dans une base de données `Uniprot Homo sapiens` (82408 entrées, version de septembre 2023) et une base de données `UniProt Bos taurus` (37500 entrées, version de novembre 2023). Deux coupures enzymatiques manquées étaient autorisées pour la trypsine. Des longueurs de peptides de 7 à 30 acides aminés, un maximum de 3 modifications, des charges entre 2 et 4 et une tolérance de masse de fragment de 20 ppm ont été définies. L'oxydation (M) et la carbamidométhylation (C) ont été respectivement recherchées comme modifications dynamiques et statiques par le logiciel `CHIMERYYS`. La validation des peptides a été effectuée à l'aide de l'algorithme `Percolator` [213] et seuls les peptides de "haute confiance" ont été conservés, correspondant à un taux de fausses découvertes de 1% au niveau du peptide. Le noeud détecteur de fonction `Minora` (LFQ) a été utilisé avec le mappage des caractéristiques et le quantificateur d'ions précurseurs. Les paramètres de normalisation ont été sélectionnés comme suit : (1) Peptides uniques, (2) Abondance des précurseurs basée sur l'intensité, (3) Mode de normalisation : quantité totale de peptides à partir d'`Homo sapiens`, (4) Calcul de l'abondance des protéines : abondances cumulées, (5) Calcul du ratio des protéines : ratio par paires et (6) Les valeurs manquantes sont remplacées par des valeurs aléatoires échantillonnées dans les 5% inférieurs des valeurs détectées. Les données quantitatives ont été considérées pour

les master protéines, quantifiées par un minimum de 2 peptides uniques, des variations de pliage ≥ 2 et une valeur p statistique ajustée en utilisant la correction de Benjamini-Hochberg pour un FDR inférieur à 0,05.

Les données ont été ensuite analysées et affichées à l'aide d'un algorithme Python spécifique adapté de Schnesser *et al.* [155] (appendix E). Plus précisément, l'analyse d'enrichissement a été effectuée en faisant correspondre les noms d'entrée des protéines identifiées aux annotations de la base de données GO pour les protéines humaines [156, 157] (database de novembre 2023). Le test exact de Fisher a été utilisé pour calculer les p-values pour la surexpression des processus biologiques et des composants cellulaires.

La quantification des intensités des spots de l'array de cytokines a été réalisée à l'aide d'un macro FIJI développé précédemment [214], et les données brutes ont été normalisées et traitées en Python.

6.6.3 Analyse statistique

La moyenne \pm l'écart type est affichée pour toutes les données. Les comparaisons statistiques ont été effectuées dans GraphPad 8.0 (Prism). Le test ANOVA non paramétrique de Kruskal-Wallis a été utilisé pour les tests d'hypothèses multiples, suivi d'un test de Dunn en post-hoc ou par un test de Benjamini-Hochberg pour corriger les p-values. Le test t de Mann-Whitney non paramétrique a été utilisé pour les tests d'hypothèses simples. Les différences sont considérées comme significatives pour $p < 0.05$. Les détails sur le nombre d'échantillon (n) et de répliques biologiques (N) des différentes expériences sont détaillés dans la figure associée.

6.6.4 Représentation des données

Les graphes ont été générés dans GraphPad Prism 8.0, excepté les heatmap qui ont été générées via la librairie seaborn de Python 3.8. Les figures ainsi que schémas ont été formatés en utilisant le logiciel open source Inkscape (Inkscape Project).

Appendix A

Valorisation des travaux

Les travaux de cette thèse ont été valorisés à travers différentes communications scientifiques:

1. Article en préparation: Theo Desigaux, Leo Comperat, Nathalie Dusserre, Marie-Laure Stachowicz, Malou Lea, Jean-William Dupuy, Anthony Vial, François Paris, Jean-Christophe Fricain, Hugo Oliveira, "Cancer-associated fibroblasts shape microenvironment dynamics in a 4D bioprinted breast cancer model".
2. Présentation orale invitée: "Bioprinting technologies for tissue and disease modeling", 2023, **Workshop Matrice Extracellulaire (international)**, Institut du Médicament de Strasbourg, Strasbourg, France.
3. Présentation poster: T. Desigaux, L. Comperat, N. Dusserre, M.-L. Stachowicz, M. Lea, H. Oliveira, F. Paris, J.-C. Fricain, "3D bioprinted breast cancer model to decipher tumor-stroma interaction", **EACR - Goodbye Flat Biology (international)**, 2023, European Association for Cancer Research, Berlin, Allemagne.
4. Présentation poster: T. Desigaux, L. Comperat, N. Dusserre, M.-L. Stachowicz, H. Oliveira, F. Paris, J.-C. Fricain, "3D bioprinted model for breast cancer cell-stroma interaction during treatment-induced stress", 2022, **Journées des Jeunes Chercheurs**, Fondation ARC, Paris, France.
5. Présentation poster: T. Desigaux, L. Comperat, N. Dusserre, M.-L. Stachowicz, H. Oliveira, F. Paris, J.-C. Fricain, "3D bioprinted model for breast cancer cell-stroma interaction during treatment-induced stress", 2022, **ESB2022 (international)**, European Society for Biomaterials, Bordeaux, France.
6. Présentation orale: "Modèle bioimprimé de cancer du sein pour l'étude des interactions cancer-microenvironnement", 2021, **Journées Scientifiques 2021**, Ecole de

l'INSERM Liliane Bettencourt, Lyon, France.

7. Présentation poster: T. Desigaux, L. Comperat, N. Dusserre, M.-L. Stachowicz, H. Oliveira, F. Paris, J.-C. Fricain, "3D bioprinted model for breast cancer-endothelial cells interaction study during treatment-induced stress", 2021, **Journées des Jeunes Chercheurs**, Fondation ARC, Paris, France.

Ce travail a aussi communiqué au grand public par des présentations vulgarisées:

1. Présentation orale: Prix Kerner, 2021, **Journées des Jeunes Chercheurs**, Fondation ARC, Paris, France - **Prix du Public**.
2. Présentation orale: **Ma Thèse en 180 secondes**, 2023 - **Demi-finaliste national**.

Enfin, les compétences en analyses développées au cours de ce projet ont permis la participation annexe à des publications du laboratoire:

1. L. Comperat, L. Chagot, S. Massot, M.-L. Stachowicz, N. Dusserre, C. Médina, **T. Desigaux**, J.-W. Dupuy, J.-C. Fricain, H. Oliveira, Harnessing Human Placental Membrane-Derived Bioinks: Characterization and Applications in Bioprinting and Vasculogenesis. *Adv. Healthcare Mater.* 2023, 2303370. <https://doi.org/10.1002/adhm.202303370>
2. Touya, N.; Al-Bourgol, S.; **Desigaux, T.**; Kérouredan, O.; Gemini, L.; Kling, R.; Devillard, R. Bone Laser Patterning to Decipher Cell Organization. *Bioengineering* 2023, 10, 155. <https://doi.org/10.3390/bioengineering10020155>

Appendix B

Code source - analyse de la reproductibilité

```
# -*- coding: utf-8 -*-
"""
Created on Mon Feb 20 12:40:52 2023

@author: Theo Desigaux
"""

##Imports

#Basics
import numpy as np
from pathlib import Path
import os
import copy

#interface
from tkinter import *
from tkinter import filedialog

#data management and export
from pandas import DataFrame as df
from pandas import ExcelWriter

#plotting
from matplotlib import pyplot as plt

#image analysis and processing
from scipy import ndimage as ndi
from skimage.io import imread, imsave
from skimage import morphology
```

```

from skimage.measure import regionprops
import distancemap as dm
from skimage import measure

##Variables
image_res=1024
d_in_pixel=54
d_in_um=200

scale=d_in_um/d_in_pixel #in μm/pixel
spacing=2500 #in μm

overlap=0.17

img_per_model=4

image_name='2023-05-06 Repro #3'

number_image_per_lign=2

##find path function
def ask_path():
    """
    Open a window to prompt the path to the directory that needs to be analyzed.
    Expected arrangement of the data is the following:
    path/Conditions/Replicates/Tif files

    Return a string that gives the path to the folder.

    D7 will infer number of cells based on area--> useful for cells in aggregates

    """
    root = Tk()
    root.withdraw()
    path = filedialog.askdirectory()
    print(f'Selected folder path: {path}')
    return path

##Stitch function
#function to crop a part of an image to reduce overlap
def crop_img(img, side, overlap):

```

```

"""Will crop an image for a percent of its side
"""
if side=='left':
    cropped_img=[]
    for lign in img:
        cropped_img.append(lign[int(overlap*len(img)):])

if side=='top':
    cropped_img=img[int(overlap*len(img)):]

return cropped_img

#combine the different images in one
def concatenate(channel,path,roi_start):
    print(f'concatenating roi_{roi_start}_{channel}')

    #list of roi from left to right each time
    roi_list=[roi_start, roi_start+1, roi_start+3, roi_start+2]

    #find image name
    img_list=os.listdir(f'{path}/ROI-1')
    img_list.remove('thumbnail')
    image_name=img_list[0].split('_ROI')[0]

    i=1
    final_img=[]
    for roi in roi_list:
        #concatenate lign by lign
        #print(f'lign:{str(l)}')

        #get image
        img=imread(f'{path}/ROI-{roi}/{image_name}_ROI-{roi}_{channel}_000000.tif')
        if channel=='F3':
            img=img[:, :, 0]
        if channel=='F2':
            img=img[:, :, 1]

        #verify if we are at the begining of the lign
        if (i-1)/number_image_per_lign==1 or i-1==0: #if i-1 is a multiple of image
            ↪ number/lign
            lign=copy.deepcopy(img)
            #set column count to 1
            c=1
            #print('debut ligne')

```



```

##if not concatenate new image to the first one
else:
    lign=np.concatenate((lign,crop_img(img, overlap=overlap, side='left')),
        ↪ axis=1)
    #keep column count
    c+=1
    #print('suite ligne')

##verify if we are the end of a lign
if c/number_image_per_lign==1:
    ##verify if we are at the first lign
    if len(final_img)==0:
        #copy first line to begin the final img
        final_img=copy.deepcopy(lign)
        #print('debut image')

    else:
        #concatenate next lings to complete the image
        final_img=np.concatenate((final_img, crop_img(lign,
            ↪ overlap=overlap, side='top')), axis=0)
        #print('concatenate lign')

##append i to keep track of the image count
#print(roi,i,c)
i+=1

return final_img

```

```

#measure the size diameter of a model
def process_img(img, name, channel, path):
    print(f'processing roi_{name}')
    if channel=='F2':
        #remove background
        masked=img*(img>40)
        #gauss
        img_g=ndi.filters.gaussian_filter(masked,sigma=25)

    #gauss image
    if channel=='F3':
        #remove background
        masked=img*(img>30)
        #gauss

```

```

img_g=ndi.filters.gaussian_filter(masked,sigma=25)

#thresh
img_t = ndi.binary_fill_holes(img_g > 0)

#erode contours to compensate gaussian blur
img_t=ndi.binary_erosion(img_t, iterations=40)

#label image
labeled,_=ndi.label(img_t)

#measure
measures=regionprops(labeled)
areas=[]
for region in measures:
    areas.append(region.area)

index = areas.index(max(areas))

#find center of mass of the area
center = measures[areas.index(max(areas))].centroid

if len(areas)>1:
    #remove small objects
    labeled=morphology.remove_small_objects(labeled, max(areas))

#plot
fig,ax=plt.subplots(1,1, figsize=(4,4), sharey=True)
ax.imshow(img, cmap='gray')
ax.contour(labeled, [0.5], linewidths=1.2, colors='y')
ax.axis('off')
plt.tight_layout()
plt.savefig(fname=f'{path_up}/Contours/{name}.png', format='png', dpi=300)

perimeter=measures[index].perimeter
roundness=(np.pi * 4 *
↪ measures[index].area)/np.square((measures[index].perimeter))
d=((roundness*perimeter/np.pi)*scale)/1000 #in mm

#isolate perimeter
coord_contours=measure.find_contours(labeled.astype(bool))
contoured=np.zeros_like(labeled)

```

```

for coord in coord_contours[0]:
    contoured[int(coord[0]),int(coord[1])]=True

#center the perimeter in the center of the image
#create a blank image
centered=np.zeros_like(labeled)
img_center=len(centered)/2

for col in list(range(0,len(centered))):
    for row in list(range(0,len(centered))):
        if contoured[col,row]:
            #find the spacement position relative to center
            x_dif=col-center[0]
            y_dif=row-center[1]

            try:
                #apply new position in centered imaged
                centered[int(img_center+x_dif),int(img_center+y_dif)]=True
            except:
                pass

            row+=1
        col+=1

#create a distance map from the perimeter
distance=np.invert(dm.distance_map_from_binary_matrix(centered))

#saveimg
dilated=morphology.binary_dilation(contoured, morphology.disk(5))

contoured_img=np.array([img, dilated*255])

imsave(f'{path}/{name}.tiff', contoured_img, check_contrast=False)

return d, roundness, distance

#run program

#give main folder with experiment replicates
path=ask_path()

#create list to store perimeters

```

```

dmap_list_F2=[]
dmap_list_F3=[]

#create list to receive results
results=[['g_diameter','g_roundness','r_diameter','r_roundness']]

#counter for lign in the results df
r1=1

#iterate over each replicate
for replicate in os.listdir(path):
    if replicate!='results' and replicate[-2:]!='py':

        raw_path=f'{path}\\{replicate}\\data\\raw images'

        #define rois to analyze in path (might be automated)
        rois_list=os.listdir(raw_path)
        roi=[]
        for i in rois_list:
            if i[-4:]!='.epf':
                roi.append(int(i[4:]))
        roi.sort()

        img_start=[]

        for i in list(range(0,len(roi))):
            if i%img_per_model==0:
                img_start.append(roi[i])

        #define excluded ROIs due to experimental error
        #these ROIs are wells that would be excluded in a classical experiment due to
        ↪ manipulator mistake

        exclude_list=False
        if replicate=='2023-05-06 Reproducibility #4':
            exclude_list=[1,5,13, 45, 77, 73, 81, 85, 89, 93]

        if exclude_list!=False:
            for a in exclude_list:
                img_start.remove(a)

        for r in img_start:
            #iterate over channels
            print(r)

```

```

results.append([])
for channel in ['F2', 'F3']:

    print(channel)
    d, roundness, distance= process_img(concatenate(channel, raw_path, r),
    ↪ str(f'{r}_{channel}'), channel,
    ↪ path=f'{path}\\{replicate}\\data\\contours')
    results[r1].append(d)
    results[r1].append(roundness)

    if channel=='F2':
        dmap_list_F2.append(distance)

    if channel=='F3':
        dmap_list_F3.append(distance)

    r1+=1

data=df(results)

writer = ExcelWriter(f'{path}/results/Analysis.xlsx', engine='xlsxwriter')
data.to_excel(writer, sheet_name='test', header=True, index=True)
writer.save()

#mean perimeters
mean_dmap_F2=np.sum(i for i in dmap_list_F2)/len(dmap_list_F2)
mean_dmap_F3=np.sum(i for i in dmap_list_F3)/len(dmap_list_F3)

imsave(f'{path}/results/mean_inner_perimeter.tiff', mean_dmap_F2)
imsave(f'{path}/results/mean_outer_perimeter.tiff', mean_dmap_F3)

```

Appendix C

Code source - analyse de la prolifération

Le code utilisé pour analyser la prolifération dans l'algorithme ci-dessous a été adapté pour l'analyse des modèles pour l'expérience hypoxie avec le rapporteur hypoxique HRE-dUnaG. De même, le code utilisé pour l'analyse de la viabilité était basé sur le même algorithme de segmentation 3D.

Seul le code de l'analyse de la prolifération utilisé dans les autres expériences sera décrit ci-dessous.

```
# -*- coding: utf-8 -*-
"""
Created on Tue Oct 18 16:32:59 2022

@author: theod

"""

##Imports
#basic
import numpy as np
import os

#image analysis
import matplotlib.pyplot as plt
from skimage.io import imread, imsave
import pyclesperanto_prototype as cle
from skimage.morphology import remove_small_objects
from skimage.measure import regionprops, label
from skimage.segmentation import watershed
from skimage.feature import peak_local_max
```

```

from scipy import ndimage as ndi
from scipy.ndimage import gaussian_filter
from skimage.filters import threshold_otsu as to

#data handling and export
from pandas import ExcelWriter
import pandas as pd

def show(image_to_show, labels=False):
    """
    This function generates three projections: in X-, Y- and Z-direction and shows
    ↪ them.
    """
    projection_x = cle.maximum_x_projection(image_to_show)
    projection_y = cle.maximum_y_projection(image_to_show)
    projection_z = cle.maximum_z_projection(image_to_show)

    fig, axs = plt.subplots(1, 3, figsize=(45, 15))
    cle.imshow(projection_x, plot=axs[0], labels=labels)
    cle.imshow(projection_y, plot=axs[1], labels=labels)
    cle.imshow(projection_z, plot=axs[2], labels=labels)

def segmentation_3d(img, voxel_size_x = 0.734,
                    voxel_size_y = 0.734,
                    voxel_size_z = 4.997):

    # select a specific OpenCL / GPU device and see which one was chosen
    cle.select_device('RTX')

    input_gpu = cle.push(img)

    resampled = cle.create([int(input_gpu.shape[0] * voxel_size_z),
    ↪ int(input_gpu.shape[1] * voxel_size_y), int(input_gpu.shape[2] *
    ↪ voxel_size_x)])
    cle.scale(input_gpu, resampled, factor_x=voxel_size_x, factor_y=voxel_size_y,
    ↪ factor_z=voxel_size_z, centered=False)

    equalized_intensities_stack = cle.create_like(resampled)
    a_slice = cle.create([resampled.shape[1], resampled.shape[0]])

```

```

num_slices = resampled.shape[0]
mean_intensity_stack = cle.mean_of_all_pixels(resampled)

corrected_slice = None
for z in range(0, num_slices):
    # get a single slice out of the stack
    cle.copy_slice(resampled, a_slice, z)
    # measure its intensity
    mean_intensity_slice = cle.mean_of_all_pixels(a_slice)
    # correct the intensity
    correction_factor = mean_intensity_slice/mean_intensity_stack
    corrected_slice = cle.multiply_image_and_scalar(a_slice, corrected_slice,
    ↪ correction_factor)
    # copy slice back in a stack
    cle.copy_slice(corrected_slice, equalized_intensities_stack, z)

background_subtracted = cle.top_hat_box(resampled, radius_x=5, radius_y=5,
    ↪ radius_z=5)

segmented = cle.voronoi_otsu_labeling(background_subtracted, spot_sigma=5,
    ↪ outline_sigma=1)

segmented=cle.pull(segmented)
resampled=cle.pull(resampled)

return segmented, resampled

def watershed_segment(image, object_size):
    """

    Parameters
    -----
    image : np.array
        dimensions (z,x,y)
        boolean image
    object_size : tuple
        dimensions (z,x,y)
        size to find local maxima, will affect final objects size

    Returns
    -----
    labeled : np.array (z,x,y)

```


Segmented labeled image

```
"""  
  
#watershed and label gfp  
distance=ndi.distance_transform_edt(image)  
coords=peak_local_max(distance, footprint=np.ones(object_size), labels=image)  
mask=np.zeros(distance.shape, dtype=bool)  
mask[tuple(coords.T)] = True  
markers, _ = ndi.label(mask)  
labeled = watershed(-distance, markers, mask=image, watershed_line=True)  
  
return labeled  
  
def ki67_quantification(image, save_path, show_results=False):  
  
    """  
ki67 quantification based on GFP staining, that is used to infer the number of  
cells based on single cell volume quantification in previous experiments.  
  
image : np.array  
3 channel image of shape [z, 1024, 1024, 3] with channels in this order:  
ki67, gfp, dapi  
voxel size must be x=y=0.734, z=4.997  
  
returns a % of ki67 positive cells in the stack  
    """  
  
#recover each channel  
ki=image[:,:,:,:0]  
gfp=image[:,:,:,:1]  
  
#z-correction between the different wavelength  
empty_slice=np.zeros((1,ki.shape[1],ki.shape[2]))  
  
ki=np.concatenate((ki,empty_slice), axis=0)  
gfp=np.concatenate((empty_slice,gfp), axis=0)  
  
##pre-processing  
#segment image using clesperanto method  
labeled_ki, resampled_ki=segmentation_3d(ki)  
labeled_gfp, resampled_gfp=segmentation_3d(gfp*(gfp>10))  
  
##gfp
```

```

#remove small objects
cleaned_gfp=remove_small_objects(labeled_gfp>0, min_size=2000)

#watershed and label gfp
label_gfp = watershed_segment(cleaned_gfp, object_size=(80,60,60))
label_gfp=label_gfp*remove_small_objects(label_gfp, min_size=2000)

##ki67
##ki67
g_ki=gaussian_filter(resampled_ki*(label_gfp>0),2)
ki_to=0.5*to(g_ki)
ki_threshed=g_ki>ki_to
label_ki=label(remove_small_objects(ki_threshed, min_size=500))
if len(np.unique(label_ki))>1:
    ki_intensity=np.mean([i.mean_intensity for i in regionprops(label_ki,
    ↪ resampled_ki)])
    ki_area=np.max([i.area for i in regionprops(label_ki)])
    if ki_intensity>230:
        ki_area=2499
    while ki_area>3000:
        ki_to=ki_to*1.1
        ki_threshed=g_ki>ki_to
        label_ki=label(remove_small_objects(ki_threshed, min_size=500))
        ki_intensity=np.mean([i.mean_intensity for i in regionprops(label_ki,
        ↪ resampled_ki)])
        ki_area=np.mean([i.area for i in regionprops(label_ki)])
        if ki_intensity>230:
            ki_area=2499

label_ki=watershed_segment(label_ki, object_size=(40,30,30))

#remove false positive nuclei
ki_props=regionprops(label_ki, resampled_ki)
removed_ki=[]

for reg in ki_props:
    if reg.mean_intensity<10:
        removed_ki.append(reg.label)

label_ki[np.isin(label_ki, removed_ki)]=0

##positive nuclei
counted_ki=label_gfp*(label_ki>0)

```

```

#get gfp properties and verify for each spheroid the ki_67 status
props_gfp=regionprops(label_gfp)
spheroid_properties=pd.DataFrame(columns=['volume', 'z coordinate', 'ki67'])

#iterate over each spheroid and check ki67 positivity
for sphero in props_gfp:

    ki_67_status='negative'
    if sphero.label in counted_ki:
        ki_67_status='positive'

    new_lign={'volume': sphero.area,
             'z coordinate': sphero.centroid[0],
             'ki67': ki_67_status
            }

    spheroid_properties=pd.concat([spheroid_properties, pd.DataFrame([new_lign])],
    ↪ axis=0)

##quantification

#compute ratio

↪ positive_spheroids=len(spheroid_properties[spheroid_properties['ki67']=='positive'])
↪ negative_spheroids=len(spheroid_properties[spheroid_properties['ki67']=='negative'])

ratio=(positive_spheroids/(positive_spheroids+negative_spheroids))*100

ki_spot=len(np.unique(label_ki))-1
cell_number=np.sum(spheroid_properties['volume'])/2500
cell_ratio=(ki_spot/cell_number)*100

#save ki67 mask mip to verify quantification
verif=np.max(counted_ki>0, axis=0)*255
base=np.max(resampled_ki*(label_gfp>0), axis=0)
total=np.concatenate([base,verif], axis=1)

if show_results:
    plt.imshow(total, cmap='gray')

imsave(f'{save_path}_MIP_detected.png', total.astype('uint8'),
↪ check_contrast=False)

return ratio, spheroid_properties, cell_ratio

```

```

#####
#ANALYSIS
#####

base_path='I:\\Experiments data\\PhD project\\Figure 2\\Cancer cell proliferation'
condition_list=['Mono', 'biCAF', 'TriCAF', 'biHUV', 'biNMF', 'TriNMF']

raw_results=pd.DataFrame(columns=['day','condition','experiment
↪ replicate','filename','image replicate', '%ki67', 'volume', 'cell ratio'])
spheroid_properties_results=pd.DataFrame(columns=['day', 'condition', 'file',
↪ 'volume', 'z coordinate', 'ki67'])

start_file='2023-11-11 Prolif - 2_A1 - MonoA1 - Mono - 1.tif'

if start_file==False:
    analyze=True

else:
    analyze=False
    raw_results=pd.read_excel(f'{base_path}\\results\\Analysis results.xlsx',
↪ sheet_name='raw')
    spheroid_properties_results=pd.read_excel(f'{base_path}\\results\\Analysis
↪ results.xlsx', sheet_name='spheroid_properties')

#iterate over D4 and D7
for day in ['D4','D7']:

    #iterate over each replicate
    for r in os.listdir(f'{base_path}\\{day}'):

        #iterate over each file
        for file in os.listdir(f'{base_path}\\{day}\\{r}'):

            if file==start_file:
                analyze=True

            if analyze:

                ratio=np.nan
                volume=np.nan

```

```

spheroid_properties=pd.DataFrame(columns=['volume'])
#find condition
condition=None
for c in condition_list:
    if c in file:
        condition=c

#find image replicate
image_replicate=file[-5]

print(f'analyzing {file}')
#recover image

try:
    image=imread(f'{base_path}\\{day}\\{r}\\{file}')
    #find %ki67 and volume
    ratio, spheroid_properties, cell_ratio=ki67_quantification(image,
    ↪ save_path=f'{base_path}\\results\\image_analysis\\{day}\\{r}\\{file[:-4]}')
except:
    print(f'Failed to analyze file: {base_path}\\{day}\\{r}\\{file}')

#append to results
new_row={
    'day': day,
    'condition':condition,
    'experiment replicate': r,
    'filename': file[:-6],
    'image replicate':image_replicate,
    '%ki67': ratio,
    'volume': np.mean(spheroid_properties['volume']),
    'cell ratio': cell_ratio
}

raw_results=pd.concat([raw_results, pd.DataFrame([new_row])])

#add informations to spheroid properties
sphero_day=[day]*len(spheroid_properties)
sphero_cond=[condition]*len(spheroid_properties)
sphero_file=[file]*len(spheroid_properties)

spheroid_properties['day']=sphero_day
spheroid_properties['condition']=sphero_cond
spheroid_properties['file']=sphero_file

```

```

spheroid_properties_results=pd.concat([spheroid_properties_results,
↳ spheroid_properties])

#save to a xlsx file
#create a writer to save the data along analysis
writer = ExcelWriter(f'{base_path}\\results\\Analysis results.xlsx',
↳ engine='xlsxwriter')
raw_results.to_excel(writer, sheet_name='raw', header=True,
↳ index=False)
spheroid_properties_results.to_excel(writer,
↳ sheet_name='spheroid_properties')
writer.close()

#####
#post processing
#####

##recover results from excel file after filling out informations not found by
# the algorithm due to typos/difference in file naming

raw_results=pd.read_excel(f'{base_path}\\results\\Analysis results.xlsx')
spheroid_properties=pd.read_excel(f'{base_path}\\results\\Analysis results.xlsx',
↳ sheet_name='spheroid_properties')

sphero_props=spheroid_properties.dropna(subset='condition')
#complete spheroid properties conditions with the conditions filled in raw results
#iteration
for index, sphero in spheroid_properties.iterrows():
    if sphero['file'][-6] in spheroid_properties:

        if isinstance(sphero['condition'], float):
            file=sphero['file'][:-6]
            cond=list(raw_results[raw_results['filename']==file]['condition'])[0]
            sphero['condition']=cond

    sphero_props=pd.concat([sphero_props, pd.DataFrame(sphero).T], axis=0)

#group replicates from the same model
grouped_data=raw_results.groupby('filename')
meaned_data=grouped_data[['experiment replicate','%ki67']].mean()

#recover condition column
meaned_data['condition']=''

```

```

meaned_data['day']=''
for fn in meaned_data.index:

    ↪ meaned_data.loc[fn, 'condition']=raw_results[raw_results['filename']==fn]['condition'].tolist

    ↪ meaned_data.loc[fn, 'day']=raw_results[raw_results['filename']==fn]['day'].tolist()[0]

for_gp=pd.DataFrame()
for condition in condition_list:
    for day in ['D4', 'D7']:
        day_data=meaned_data[meaned_data['day']==day]
        day_cond_data=day_data[day_data['condition']==condition]['%ki67'].tolist()

        for_gp=pd.concat([for_gp, pd.DataFrame(day_cond_data, columns=[f'{day}
        ↪ {condition}']), axis=1)

####volume

meaned_data=grouped_data[['experiment replicate', 'volume']].mean()

#recover condition column
meaned_data['condition']=''
meaned_data['day']=''
for fn in meaned_data.index:

    ↪ meaned_data.loc[fn, 'condition']=raw_results[raw_results['filename']==fn]['condition'].tolist

    ↪ meaned_data.loc[fn, 'day']=raw_results[raw_results['filename']==fn]['day'].tolist()[0]

for_gp_vol=pd.DataFrame()
for condition in condition_list:
    for day in ['D4', 'D7']:
        day_data=meaned_data[meaned_data['day']==day]
        day_cond_data=day_data[day_data['condition']==condition]['volume'].tolist()

        for_gp_vol=pd.concat([for_gp_vol, pd.DataFrame(day_cond_data, columns=[f'{day}
        ↪ {condition}']), axis=1)

writer = ExcelWriter(f'{base_path}\\results\\Analysis results.xlsx',
    ↪ engine='xlsxwriter')

```

```

raw_results.to_excel(writer, sheet_name='raw', header=True, index=False)
meaned_data.to_excel(writer, sheet_name='meaned', header=True, index=False)
for_gp.to_excel(writer, sheet_name='graphpad format', header=True, index=False)
for_gp_vol.to_excel(writer, sheet_name='graphpad format - volume', header=True,
↳ index=False)
spheroid_properties.to_excel(writer, sheet_name='spheroid properties', header=True,
↳ index=False)
writer.close()

```

```

#draw box plots
import seaborn as sns
sns.barplot(meaned_data, x='condition', y='%ki67', hue='day')
plt.show()

```

```

raw_results_D4=raw_results[raw_results['day']=='D4']
raw_results_D7=raw_results[raw_results['day']=='D7']

```

```

def convert_str_tolist(string):
    new_str=string.replace('[', '')
    new_str=new_str.replace(']', '')

    return list(map(int, new_str.split(' ')))

```

```

volume_D4=pd.DataFrame()
for condition in condition_list:
    ↳ list_of_list=raw_results_D4[raw_results_D4['condition']==condition]['volume'].explode().tolist()
    list_of_volumes=[]
    for sublist in list_of_list:
        new_sublist=convert_str_tolist(sublist)
        for i in new_sublist:
            list_of_volumes.append(i)

    volume_D4=pd.concat([volume_D4, pd.DataFrame(list_of_volumes,
↳ columns=[condition])], axis=1)

```

```

volume_D7=pd.DataFrame()
for condition in condition_list:
    ↳ list_of_list=raw_results_D7[raw_results_D7['condition']==condition]['volume'].explode().tolist()

```



```

list_of_volumes=[]
for sublist in list_of_list:
    new_sublist=convert_str_tolist(sublist)
    for i in new_sublist:
        list_of_volumes.append(i)

volume_D7=pd.concat([volume_D7, pd.DataFrame(list_of_volumes,
↪ columns=[condition])], axis=1)

writer = ExcelWriter(f'{base_path}\\results\\Analysis results.xlsx',
↪ engine='xlsxwriter')
raw_results.to_excel(writer, sheet_name='raw', header=True, index=False)
meaned_data.to_excel(writer, sheet_name='meaned', header=True, index=False)
for_gp.to_excel(writer, sheet_name='graphpad format', header=True, index=False)
volume_D4.to_excel(writer, sheet_name='D4', header=True, index=False)
volume_D7.to_excel(writer, sheet_name='D7', header=True, index=False)
writer.close()

```

Appendix D

Code source - analyse des structures microvasculaire

```
# -*- coding: utf-8 -*-
"""
Created on Fri May 13 09:19:23 2022

@author: Theo Desigaux
"""

from Qiber3D import Network, config
from Qiber3D.helper import Example, change_log_level

from tkinter import *
from tkinter import filedialog
from pandas import DataFrame as df
from pandas import ExcelWriter
import os
from skimage.io import imread,imsave
import numpy as np

##Define threshold for small fragments
config.extract.thinning.sliver_threshold=10

##Define voxel size in [x,y,z] in  $\mu\text{m}$ 
config.extract.voxel_size=[0.72,0.72,2]
```

```

def save(data, filename, path, condition_list):
    """
    Parameters
    -----
    file : Pd dataframe
           data to save in a excel file
    filename : String
              Name to give to the saved xlsx file
    path : String
          Directory

    Returns
    -----
    None.

    """
    writer = ExcelWriter(path+'/'+filename+'.xlsx', engine='xlsxwriter')
    c=0
    for condition in data:
        condition.to_excel(writer, sheet_name=condition_list[c], header=True,
            ↪ index=True)
        c+=1
    print('Saved')

    ##end excel save
    writer.save()

def ask_path():
    """
    Open a window to prompt the path to the directory that needs to be analyzed.
    Expected arrangement of the data is the following:
    path/Conditions/Replicates/Tif files

    Return a string that gives the path to the folder.

    D7 will infer number of cells based on area--> useful for cells in aggregates

    """
    root = Tk()
    root.withdraw()
    path = filedialog.askdirectory()

```

```

print(f'Selected folder path: {path}')
return path

def run(filename):
    """
    Iterate over the conditions and images in the folder indicated by prompted path.

    Analyze the network structure in each stack of each image and return an excel file
    → with all measured values.

    Indicate the filename.

    """

    #define folder to analyze
    print('Select the folder to analyze')
    path=ask_path()

    #define folder to save networks picture
    print('Select the folder to extract pictures')
    photo_folder=ask_path()

    #create a header for the first column that will contain the depth of each image
    global_headers=['# Vessels', '# Segments', '# Branchpoints', 'Total length', 'Total
    → volume', 'Average Vessel length', 'Average Vessel volume', 'Average
    → branchpoints', 'Average Radius']

    #create a table for the data
    #individual_headers=['Length', 'Volume', 'Branchpoint', 'Radius']

    #create list that will contain the values
    condition_list=[]
    data_list=[]
    data=[]

    c=0
    ##Iterate over each condition folder
    for condition in os.listdir(path):
        if condition[-5:]!='.xlsx':
            print(condition)
            condition_list.append(condition)
            data.append([])
            data_list.append([])
            file_list=[]

```

```

##List of files in the condition folder
files=os.listdir(path+'/'+condition)

##Iterate over each file=each replicate of this condition
#keep a count of each replicate so that we can add the number in the
↪ column header
r=0
for file in files:
    print(file)
    file_list.append(file)
    img=imread(f'{path}/{condition}/{file}')
    img=np.max(img, axis=0)
    imsave(f'{photo_folder}/{file}_MIP.png',img)

    try:
        #create the network
        net = Network.load(path+'/'+condition+'/'+file)

        #increment the list
        data_list[c].append([])

        #add all measured parameters
        data_list[c][r].append( net.number_of_fibers)
        data_list[c][r].append(len(net.segment))
        data_list[c][r].append(len(net.cross_point_dict))
        data_list[c][r].append(net.length)
        data_list[c][r].append(net.volume)
        data_list[c][r].append(net.length/net.number_of_fibers)
        data_list[c][r].append(net.volume/net.number_of_fibers)

        ↪ data_list[c][r].append(len(net.cross_point_dict)/net.number_of_fibers)
        data_list[c][r].append(net.average_radius)

    try:
        #save an image of the network
        net.render.overview(out_path=f'{photo_folder}/{file}',
        ↪ color_mode='fiber', image_resolution=1024)
        del net

    except:
        print('render failed for this image')

```

```

except:
    print(f"""\Analysis of file {file} failed due to an unexpected
↪ error """)
    data_list[c].append(['n.a']*9)

#create a pd and save it after each file
data[c]=df(data_list[c], columns=global_headers, index=file_list)

#save to a xlsx file
save(data, f'{filename}', path, condition_list)

r+=1

c+=1

return(data, condition_list)

```

Appendix E

Code source - analyse des données de protéomiques

```
# -*- coding: utf-8 -*-
"""
Created on Tue Aug 1 12:40:26 2023

@author: Theo Desigaux
"""

##IMPORTS
import pandas as pd
import numpy as np
from pandas import ExcelWriter

from matplotlib import pyplot as plt
import seaborn as sns

#folder to save results
save_path='I:\\Experiments data\\PhD Project\\Figure
↳ 4\\Proteomics\\Proteomics_newanalysis\\'

#####

##DATA RETRIIVAL

##recover raw data from proteomics experiment
data_path='I:\\Experiments data\\PhD Project\\Figure
↳ 4\\Proteomics\\Proteomics_newanalysis\\jcf221215_Quan_D1CAF_vs_D7CAF_vs_D1NMF_vs_D7NMF_Proteins.
data=pd.read_excel(data_path, sheet_name='Proteins')

##DATA PREPROCESSING
```

```

#keep only master proteins
m_data=data[data['Master']=='Master Protein']

#exclude contaminants
c_data=m_data[m_data['Description'].str.contains('Homo sapiens')]

#keep only High FDR confidence
hf_data=c_data[c_data['Protein FDR Confidence: Combined']=='High']

hf_data=hf_data[hf_data['# Unique Peptides']>0]

#keep only relevant columns (protein identification = Accession + abundance and
↪ ratios + p-value)
columns_to_keep=['Accession', 'Abundances (Normalized): F1: Sample, Replicate 1, D1
↪ CAF', 'Abundances (Normalized): F2: Sample, Replicate 2, D1 CAF', 'Abundances
↪ (Normalized): F3: Sample, Replicate 3, D1 CAF',
                'Abundances (Normalized): F4: Sample, Replicate 1, D1
↪ NMF', 'Abundances (Normalized): F5: Sample, Replicate 2, D1
↪ NMF', 'Abundances (Normalized): F6: Sample, Replicate 3, D1 NMF',
                'Abundances (Normalized): F7: Sample, Replicate 1, D7 CAF',
↪ 'Abundances (Normalized): F8: Sample, Replicate 2, D7
↪ CAF', 'Abundances (Normalized): F9: Sample, Replicate 3, D7 CAF',
                'Abundances (Normalized): F10: Sample, Replicate 1, D7
↪ NMF', 'Abundances (Normalized): F11: Sample, Replicate 2, D7
↪ NMF', 'Abundances (Normalized): F12: Sample, Replicate 3, D7 NMF']

p_values_to_keep=['Accession', 'Abundance Ratio Adj. P-Value: (D1 CAF) / (D1 NMF)',
↪ 'Abundance Ratio Adj. P-Value: (D1 CAF) / (D7 CAF)',
'Abundance Ratio Adj. P-Value: (D1 NMF) / (D7 NMF)', 'Abundance Ratio Adj. P-Value:
↪ (D7 CAF) / (D7 NMF)']

ratio_to_keep=['Accession', 'Abundance Ratio: (D1 CAF) / (D1 NMF)', 'Abundance Ratio:
↪ (D1 CAF) / (D7 CAF)', 'Abundance Ratio: (D1 NMF) / (D7 NMF)', 'Abundance Ratio:
↪ (D7 CAF) / (D7 NMF)']

a_data=hf_data[columns_to_keep]
p_vals=hf_data[p_values_to_keep]
ratios=hf_data[ratio_to_keep]

#replace accession by entry to match uniprot GO file
a_data.rename(columns={'Accession':'Entry'}, inplace=True)
a_data.set_index('Entry', inplace=True)

p_vals.rename(columns={'Accession':'Entry'}, inplace=True)
p_vals.set_index('Entry', inplace=True)

```



```

ratios.rename(columns={'Accession':'Entry'}, inplace=True)
ratios.set_index('Entry', inplace=True)

##save datas
writer=ExcelWriter(f'{save_path}data.xlsx', engine='xlsxwriter')
a_data.to_excel(writer, sheet_name='raw')
p_vals.to_excel(writer, sheet_name='p_vals')
ratios.to_excel(writer, sheet_name='ratios')
writer.close()

##renormalize fold changes
from statsmodels.stats.multitest import multipletests
import math

def p_value_to_log(p_value):
    return -math.log10(p_value)

#recover file from previous data pre-process
ratios=pd.read_excel(f'{save_path}data.xlsx',index_col=0, sheet_name='ratios')

def ratio_to_fold(x):
    if not np.isnan(x):
        return math.log2(x)
    else:
        return np.nan

fold=ratios.applymap(ratio_to_fold)

fold.columns=['fold (D1 CAF) / (D1 NMF)', 'fold (D1 CAF) / (D7 CAF)', 'fold (D1 NMF) /
↳ (D7 NMF)', 'fold (D7 CAF) / (D7 NMF)']

#find proteins with high p_values= no difference
similar_bool=p_vals>0.5
similar_bool.columns=fold.columns
similar=fold[similar_bool]

#find median displacement
displacement=similar.median(skipna=True)

#recalibrate fold changes
fold_change=fold-displacement

```

```

log_pvals=p_vals.applymap(p_value_to_log)
log_pvals.columns=['-log10(adj. p_val (D1 CAF) / (D1 NMF))', '-log10(adj. p_val (D1
↪ CAF) / (D7 CAF))', '-log10(adj. p_val (D1 NMF) / (D7 NMF))', '-log10(adj. p_val
↪ (D7 CAF) / (D7 NMF))']

```

```

results=pd.concat([a_data, fold_change, p_vals, log_pvals], axis=1)

```

```

##save datas

```

```

writer=ExcelWriter(f'{save_path}data.xlsx', engine='xlsxwriter')
a_data.to_excel(writer, sheet_name='raw')
p_vals.to_excel(writer, sheet_name='p_vals')
ratios.to_excel(writer, sheet_name='ratios')
fold_change.to_excel(writer, sheet_name='fold change')
results.to_excel(writer, sheet_name='results')
writer.close()

```

```

#recover file from previous data pre-process

```

```

results=pd.read_excel(f'{save_path}data.xlsx', sheet_name='results', index_col=0)

```

```

#####
#####

```

```

#plot volcano plot using datas computed from the proteomics platform

```

```

import seaborn as sns
from matplotlib import pyplot as plt

```

```

def volcano_plot(data, conditions, save=False, filename=None):

```

```

    significant=pd.DataFrame(columns=[f'fold {conditions}',f'-log10(adj. p_val
↪ {conditions})'])
    non_significant=pd.DataFrame(columns=[f'fold {conditions}',f'-log10(adj. p_val
↪ {conditions})'])

```

```

    for index, row in data.iterrows():

```

```

        #check if significant:

```

```

        if np.isnan(row[f'Abundance Ratio Adj. P-Value: {conditions}']):

```

```

            None

```

```

        elif row[f'Abundance Ratio Adj. P-Value: {conditions}']<0.05 and (row[f'fold
↪ {conditions}']>1 or row[f'fold {conditions}']<-1 ):

```

```

            significant=pd.concat([significant, row], axis=1)

```

```

        else:

```

```

            non_significant=pd.concat([non_significant, row], axis=1)

```

```

significant=significant.transpose()
non_significant=non_significant.transpose()

fig, ax=plt.subplots()
if non_significant.shape[1]>0:
    sns.scatterplot(x=f'fold {conditions}', y = f'-log10(adj. p_val
    ↪ {conditions}'), data= non_significant, color='grey',
    ↪ edgecolor='lightgrey')

if significant.shape[1]>0:
    sns.scatterplot(x=f'fold {conditions}', y = f'-log10(adj. p_val
    ↪ {conditions}'), data= significant, color='black', edgecolor='lightgrey')
plt.axhline(y=p_value_to_log(0.05), color='black', linewidth=1)
plt.axvline(x=1, color='black', linewidth=1)
plt.axvline(x=-1, color='black', linewidth=1)
plt.title(conditions)
plt.xlabel('Fold Change')
plt.ylabel('-log10 P-Value')

# Set the x-axis limits centered around 0
x_max_abs = max(abs(max(data[f'fold {conditions}']), abs(min(data[f'fold
    ↪ {conditions}'])))
plt.xlim(-x_max_abs, x_max_abs)

if save:
    plt.savefig(f'{filename}.svg')

return fig

volcano_plot(results, '(D1 CAF) / (D7 CAF)', save=True,
    ↪ filename=f'{save_path}Figures\\D1 CAFvsD7 CAF bf')
volcano_plot(results, '(D1 NMF) / (D7 NMF)', save=True,
    ↪ filename=f'{save_path}Figures\\D1 NMFvsD7 NMF bf')
volcano_plot(results, '(D7 CAF) / (D7 NMF)', save=True,
    ↪ filename=f'{save_path}Figures\\D7 CAFvsD7 NMF bf')
volcano_plot(results, '(D1 CAF) / (D1 NMF)', save=True,
    ↪ filename=f'{save_path}Figures\\D1 CAFvsD1 NMF bf')

#####
#####

##DATA ANNOTATION

#import uniprot file

```

```

import json
with open('I:\\Experiments data\\PhD Project\\Figure
↳ 4\\Proteomics\\Proteomics\\uniprotkb_organism_id_9606_2023_08_09.json','r') as
↳ read_file:
    annot=json.load(read_file)

annotations=pd.DataFrame(annot['results'])
del annot

annotated_data=results.copy()

annotated_data['protName']=''
annotated_data['Gene Names']=''

##primaryAccession
#iterate over each protein in our data, find it in annotations using accession
for entry in annotated_data.index:

    prot=annotations[annotations['primaryAccession']==entry]

    if len(prot)!=0:
        #import protein name:
        ↳ test['proteinDescription']['submissionNames'][0]['fullName']['value']
        protDes=prot['proteinDescription'].tolist()[0]

        try:
            protName=protDes[list(protDes.keys())[0]]['fullName']['value']
        except:
            protName=protDes[list(protDes.keys())[0]][0]['fullName']['value']

        annotated_data.at[entry,'protName']=protName

        #import protein gene name: test['genes'][0]['geneName']['value']
        if list(prot['genes'])==[np.nan]:
            geneName=''
        else:
            gene=list(prot['genes'])[0][0]
            if 'geneName' in gene:
                geneName=gene['geneName']['value']
            else:
                geneName=''

        annotated_data.at[entry,'Gene Names']=geneName

        #import protein annotation

```

```

##keywords--> iterate --> 'category' and 'name' test['keywords'][1]['name']
keywords=pd.DataFrame(columns=['category','name'])
protkw=list(prot['keywords'])[0]

for kw in protkw:
    dic=np.array(['category','name'],[kw['category'],kw['name']])
    new_lign= pd.DataFrame(dic, columns=dic[0])
    new_lign.drop(index=0, inplace=True)
    keywords=pd.concat([keywords, new_lign])

#iterate over unique categories and make a list of it
for cat in np.unique(keywords['category']):

    catnames=list(keywords[keywords['category']==cat]['name'])

    try:
        annotated_data.at[entry,cat]=catnames
    except:
        annotated_data[cat]=''
        annotated_data.at[entry,cat]=catnames

##save datas
writer=ExcelWriter(f'{save_path}data.xlsx', engine='xlsxwriter')
a_data.to_excel(writer, sheet_name='raw')
p_vals.to_excel(writer, sheet_name='p_vals')
ratios.to_excel(writer, sheet_name='ratios')
fold_change.to_excel(writer, sheet_name='fold change')
annotated_data.to_excel(writer, sheet_name='results')
writer.close()

#recover file from previous annotation
annotated_data=pd.read_excel(f'{save_path}data.xlsx', sheet_name='results',
↪ index_col=0)

#####

#####

#recover file from previous annotation
annotated_data=pd.read_excel(f'{save_path}data.xlsx', sheet_name='results',
↪ index_col=0)

#enrichment analysis

```

```

from scipy.stats import fisher_exact
from collections import Counter

def enrichment_analysis(data, condition1, condition2, annotation_type='Biological
↳ process', save=True):
    """

    Parameters
    -----
    data : pandas.DataFrame
        Contains proteins with associated GO terms and differential pvalues between
        ↳ conditions of interest
    condition1 : str
        DESCRIPTION. The default is 'D7 CAF'.
    condition2 : str
        DESCRIPTION. The default is 'D7 NMF'.
    annotation_type : GO term, optional
        DESCRIPTION. The default is 'Biological process'.

    Returns
    -----
    None.

    """

    condition = f'({condition1}) / ({condition2})'

    enrichment_df=data[[f'-log10(adj. p_val {condition})', f'fold
↳ {condition}',annotation_type]]

    enrichment_df.dropna(axis=0,inplace=True, subset=[annotation_type])

    terms_list=list(enrichment_df[annotation_type].dropna(axis=0))
    terms=[]

    for term in terms_list:
        if term[0]=='[':
            term_list=term.split('[')[1].split(']')[0].split(', ')
            for subterm in term_list:
                terms.append(subterm)

        else:

```

```

        terms.append(term)

terms=np.array(terms)
strings_to_remove=[]
for term in terms:
    if len(term)<3:
        strings_to_remove.append(term)
mask = ~np.isin(terms, strings_to_remove)
terms=list(terms[mask])

term_counts=Counter(terms)

top_terms=[term for term, count in term_counts.items() if count>20]

#surexpression by condition1
#create a df to store the contingency matrix
contingency_df_condition1=pd.DataFrame(columns=top_terms, index=[0])

#create a df for statistics
test_results_condition1 = pd.DataFrame(columns=["term", "odds_ratio", "pval", "n
↳ significant", "n insignificant"])

#iterate over each term
for term in top_terms:

    #create a contingency df
    term_contingency=pd.DataFrame(np.zeros([2,2]),columns=['sig','non_sig'],
↳ index=['in term','not in term'])

    #iterate over each protein
    for prot in enrichment_df.index:

        #check if sig:
        sig=enrichment_df.at[prot,f'-log10(adj. p_val
↳ {condition}')>p_value_to_log(0.05) and enrichment_df.at[prot,f'fold
↳ {condition}']>1

        #check if in term:
        if isinstance(enrichment_df.at[prot,annotation_type], float):
            in_term=False
        else:
            in_term=term in enrichment_df.at[prot,annotation_type]

        #add value to contingency matrix

```

```

    if sig:

        if in_term:
            term_contingency.at['in term', 'sig']+=1

        else:
            term_contingency.at['not in term', 'sig']+=1

    else:

        if in_term:
            term_contingency.at['in term', 'non_sig']+=1

        else:
            term_contingency.at['not in term', 'non_sig']+=1

contingency_df_condition1.at[0,term]=term_contingency

odds,p_val=fisher_exact(term_contingency)
new_row={'term': term,
        'odds_ratio': odds,
        'pval': p_val,
        'n significant': term_contingency.at['in term', 'sig'],
        'n insignificant': term_contingency.at['in term', 'non_sig']}
}

test_results_condition1.loc[len(test_results_condition1)]=new_row

rej,pval_adj,_,_ = multiplerejects(test_results_condition1.pval, alpha=0.1,
↳ method='fdr_bh')
test_results_condition1.insert(0, "significant", rej)
test_results_condition1.insert(0, "pval_adj", pval_adj)

print(test_results_condition1[test_results_condition1['pval_adj']<0.05]['term'])

#####

#surexpression by condition2
#create a df to store the contingency matrix
contingency_df_condition2=pd.DataFrame(columns=top_terms, index=[0])

#create a df for statistics
test_results_condition2 = pd.DataFrame(columns=["term", "odds_ratio", "pval", "n
↳ significant", "n insignificant"])

```



```

#iterate over each term
for term in top_terms:

    #create a contingency df
    term_contingency=pd.DataFrame(np.zeros([2,2]),columns=['sig', 'non_sig'],
    ↪ index=['in term', 'not in term'])

    #iterate over each protein
    for prot in enrichment_df.index:

        #check if sig:
        sig=enrichment_df.at[prot,f'-log10(adj. p_val
        ↪ {condition}')]>p_value_to_log(0.05) and enrichment_df.at[prot,f'fold
        ↪ {condition}']<-1

        #check if in term:
        if isinstance(enrichment_df.at[prot,annotation_type], float):
            in_term=False
        else:
            in_term=term in enrichment_df.at[prot,annotation_type]

        #add value to contingency matrix
        if sig:

            if in_term:
                term_contingency.at['in term', 'sig']+=1

            else:
                term_contingency.at['not in term', 'sig']+=1

        else:

            if in_term:
                term_contingency.at['in term', 'non_sig']+=1
            else:
                term_contingency.at['not in term', 'non_sig']+=1

    contingency_df_condition2.at[0,term]=term_contingency

    odds,p_val=fisher_exact(term_contingency)
    new_row={'term': term,
            'odds_ratio': odds,
            'pval': p_val,

```

```

        'n significant': term_contingency.at['in term','sig'],
        'n insignificant': term_contingency.at['in term','non_sig']
    }

    test_results_condition2.loc[len(test_results_condition2)]=new_row

rej,pval_adj,_,_ = multipletests(test_results_condition2.pval, alpha=0.1,
    ↪ method='fdr_bh')
test_results_condition2.insert(0, "significant", rej)
test_results_condition2.insert(0, "pval_adj", pval_adj)

print(test_results_condition2[test_results_condition2['pval_adj']<0.05]['term'])

#####
#plot enrichment

#select top ten pvalues
top_condition1=test_results_condition1.nsmallest(10, 'pval')

top_condition2=test_results_condition2.nsmallest(10, 'pval')

sns.barplot(x=-np.log10(top_condition1['pval']), y=top_condition1['term'])
plt.xlabel('P-value (-log10)')
plt.ylabel(annotation_type)
plt.title(f'{condition1} overexpressed processes')
if save:
    plt.savefig(f'{save_path}\\Figures\\Enrichment\\{condition1} vs {condition2} -
    ↪ {annotation_type}.svg')
plt.show()

sns.barplot(x=-np.log10(top_condition2['pval']), y=top_condition2['term'])
plt.xlabel('P-value (-log10)')
plt.ylabel(annotation_type)
plt.title(f'{condition2} overexpressed processes')
if save:
    plt.savefig(f'{save_path}\\Figures\\Enrichment\\{condition2} vs {condition1} -
    ↪ {annotation_type}.svg')
plt.show()

if save:
    #save a file with all datas
    writer = ExcelWriter(f'{save_path}\\Figures\\Enrichment\\{condition1} vs
    ↪ {condition2} - {annotation_type}.xlsx', engine='xlsxwriter')
    test_results_condition1.to_excel(writer, sheet_name=condition1)
    test_results_condition2.to_excel(writer, sheet_name=condition2)

```

```

writer.close()

enrichment_analysis(annotated_data, condition1='D7 CAF', condition2='D7 NMF',
↳ annotation_type='Cellular component')
enrichment_analysis(annotated_data, condition1='D1 CAF', condition2='D1 NMF')
enrichment_analysis(annotated_data, condition1='D1 CAF', condition2='D7 CAF')
enrichment_analysis(annotated_data, condition1='D1 NMF', condition2='D7 NMF')

#####

#####

##GLOBAL HEATMAP

#recover file from previous annotation
abundancies=pd.read_excel(f'{save_path}data.xlsx', sheet_name='raw', index_col=0)

#drop proteins with only full nan values for each replicate
abundancies.dropna(axis=0, how='all', inplace=True)

##group and mean replicates
abundancies.columns=[col[-6:] for col in abundancies.columns]

##plot with each replicate
cluster=sns.clustermap(abundancies,
                        method='average', metric='euclidean',
                        cmap='vlag',
                        cbar=True,
                        z_score=0,
                        figsize=[5,8],
                        col_cluster=False)
plt.setp(cluster.ax_heatmap.xaxis.get_majorticklabels(), rotation=45)
cluster.ax_heatmap.yaxis.set_label_text('')
cluster.cax.set_position([.03, .01, .03, 0.12]) # [x, y, width, height]
cluster.cax.xaxis.set_label_position('bottom')
cluster.cax.xaxis.set_label_text('Z-Score')
cluster.ax_heatmap.set_xticklabels(cluster.ax_heatmap.get_xticklabels(), fontsize=12)
cluster.ax_heatmap.set_yticklabels(cluster.ax_heatmap.get_yticklabels(), fontsize=12)
cluster.savefig(f'{save_path}\\Figures\\heatmaps\\total replicates hm.svg')

```

```

mean_abundance=abundancies.groupby(abundancies.columns, axis=1).mean()

cond_order=['D1 NMF', 'D1 CAF', 'D7 NMF', 'D7 CAF']

#clusterize and get list of reorganized data
# Perform clustering and get the row order
row_cluster_r = sns.clustermap(mean_abundance[cond_order],
                                method='average', metric='euclidean',
                                cmap='vlag',
                                cbar=True,
                                z_score=0,
                                col_cluster=False,
                                figsize=[20, 70],
                                row_cluster=True) # Perform clustering on rows

# Get the reordered row indices
row_order = row_cluster_r.dendrogram_row.reordered_ind
row_labels=[mean_abundance.index[i] for i in row_order]

#draw clustermap and
cluster_r=sns.clustermap(mean_abundance[cond_order],
                          method='average', metric='euclidean',
                          cmap='vlag',
                          cbar=True,
                          z_score=0,
                          col_cluster=False,
                          figsize=[10,30]
                          )

plt.setp(cluster_r.ax_heatmap.xaxis.get_majorticklabels(), rotation=65)
cluster_r.ax_heatmap.yaxis.set_label_text('')
cluster_r.cax.set_position([.03, .01, .03, 0.12]) # [x, y, width, height]
cluster_r.cax.xaxis.set_label_position('bottom')
cluster_r.cax.xaxis.set_label_text('Z-Score')
cluster_r.ax_heatmap.set_xticklabels(cluster_r.ax_heatmap.get_xticklabels(),
↪  fontsize=12)
cluster_r.ax_heatmap.set_yticks(list(range(0,len(row_labels))))
cluster_r.ax_heatmap.set_yticklabels(row_labels, fontsize=1)
cluster_r.savefig(f'{save_path}\\Figures\\heatmaps\\total mean hm.svg')

#recover file from previous annotation
annotated_data=pd.read_excel(f'{save_path}data.xlsx', sheet_name='results',
↪  index_col=0)

```

```

##manually select clusters that make sense format= list of duple with start and end
↪ entries
clusters=[['Q9Y295', 'Q9NPR2'],
          ['Q13813', 'O75818'],
          ['Q70UQ0', 'Q9NTJ3'],
          ['P11908', 'Q02338'],
          ['P43121', 'Q63ZY3'],
          ['AOAOA0MSY7', 'Q9UIC8'],
          ['Q86XP3', 'Q9H2W6'],
          ['H3BTS6', 'P25940'],
          ['Q9ULV4', 'Q5T9A4'],
          ['Q5T3F8', 'P35221']
          ]

cluster_cols=[f'{i[0]} to {i[1]}' for i in clusters]

#recover all terms in the biological process annotation column
mean_abundance_annot=mean_abundance.copy()
mean_abundance_annot['Biological process']=np.nan
for ind in mean_abundance_annot.index:
    mean_abundance_annot.at[ind, 'Biological process']=annotated_data.at[ind,
    ↪ 'Biological process']

#iterate over index to add the biological process column

terms_list=list(mean_abundance_annot['Biological process'].dropna(axis=0))
terms=[]

for term in terms_list:
    if term[0]=='[':
        term_list=term.split('[')[1].split(']')[0].split(', ')
        for subterm in term_list:
            terms.append(subterm)

    else:
        terms.append(term)

terms=np.array(terms)
strings_to_remove=[]
for term in terms:
    if len(term)<3:
        strings_to_remove.append(term)
mask = ~np.isin(terms, strings_to_remove)
terms=list(terms[mask])

```

```

terms_f=np.unique(terms)

#df to store cols and their annotations with the counts
cluster_annot=pd.DataFrame(0, index=terms_f, columns=cluster_cols)

#count the occurrence of each annotation in each cluster
#iterate over each cluster
for clust in clusters:

    #find the list of entries in the cluster
    start=row_labels.index(clust[0])
    end=row_labels.index(clust[1])

    entry_list=row_labels[start:end+1]

    #iterate over each term
    for t in cluster_annot.index:

        #iterate over each protein
        for ent in entry_list:
            if isinstance(mean_abundance_annot.at[ent, 'Biological process'],str):
                if t in mean_abundance_annot.at[ent, 'Biological process']:
                    cluster_annot.at[t,f'{clust[0]} to {clust[1]}']+=1

#save the results in an excel file to edit the figure after
writer = ExcelWriter(f'{save_path}\\Figures\\heatmaps\\clusterized_heatmap
↳ annotations.xlsx', engine='xlsxwriter')
cluster_annot.to_excel(writer)
writer.close()

#####

#####

##HEATMAPS AND SPECIFIC PROTEINS

#recover data
data=pd.read_excel(f'{save_path}data.xlsx', sheet_name='results', index_col=0)

data_nonan=data.dropna(subset=['Gene Names'])

```

```

data_nonan.set_index('Gene Names', inplace=True)

def prot_group_hm(data, gene_name_term, name, exclude_list=[], save=False):

heatmap_data = data[['Abundances (Normalized): F1: Sample, Replicate 1, D1 CAF',
↳ 'Abundances (Normalized): F2: Sample, Replicate 2, D1 CAF', 'Abundances
↳ (Normalized): F3: Sample, Replicate 3, D1 CAF',
    'Abundances (Normalized): F4: Sample, Replicate 1, D1
↳ NMF', 'Abundances (Normalized): F5: Sample, Replicate 2, D1
↳ NMF', 'Abundances (Normalized): F6: Sample, Replicate 3, D1 NMF',
    'Abundances (Normalized): F7: Sample, Replicate 1, D7 CAF',
↳ 'Abundances (Normalized): F8: Sample, Replicate 2, D7
↳ CAF', 'Abundances (Normalized): F9: Sample, Replicate 3, D7 CAF',
    'Abundances (Normalized): F10: Sample, Replicate 1, D7
↳ NMF', 'Abundances (Normalized): F11: Sample, Replicate 2, D7
↳ NMF', 'Abundances (Normalized): F12: Sample, Replicate 3, D7
↳ NMF']]

hm_data = heatmap_data[heatmap_data.index.str.contains(gene_name_term)]

for term in exclude_list:
    hm_data.drop(index=[term], inplace=True)

#drop line with only nan values
hm_data.dropna(axis=0, how='all', inplace=True)

#replace values still here with
hm_data=hm_data.fillna(0)

hm_data.columns=[col[-6:] for col in hm_data.columns]

#extract results for each single protein
if save:
    conds=['D1 NMF', 'D1 CAF', 'D7 NMF', 'D7 CAF']
    writer = ExcelWriter(f'{save_path}\\Figures\\Proteins\\{name}.xlsx',
↳ engine='xlsxwriter')
    for gene in hm_data.index:
        results={}

        for cond in conds:
            try:
                results[cond]=hm_data.at[gene,cond].tolist()
            except:

```

None

```
results=pd.DataFrame(results)

results.to_excel(writer, sheet_name=gene)

writer.close()

#draw heatmap with all replicates
cluster_r=sns.clustermap(hm_data,
                          method='average', metric='euclidean',
                          cmap='vlag',
                          cbar=True,
                          z_score=0,
                          )

plt.setp(cluster_r.ax_heatmap.xaxis.get_majorticklabels(), rotation=65)
cluster_r.ax_heatmap.yaxis.set_label_text('')
cluster_r.cax.set_position([.03, .01, .03, 0.12]) # [x, y, width, height]
cluster_r.cax.xaxis.set_label_position('bottom')
cluster_r.cax.xaxis.set_label_text('Z-Score')
cluster_r.ax_heatmap.set_xticklabels(cluster_r.ax_heatmap.get_xticklabels(),
→ fontsize=12)
cluster_r.ax_heatmap.set_yticklabels(cluster_r.ax_heatmap.get_yticklabels(),
→ fontsize=12)
if save:
    cluster_r.savefig(f'{save_path}\\\\Figures\\replicates_{name}_heatmap.svg')
else:
    plt.show()

##group and mean replicates
mean_abundance=hm_data.groupby(hm_data.columns, axis=1).mean()

cond_order=['D1 NMF', 'D1 CAF', 'D7 NMF', 'D7 CAF']

cluster=sns.clustermap(mean_abundance[cond_order],
                        method='average', metric='euclidean',
                        cmap='vlag',
                        cbar=True,
                        col_cluster=False,
                        z_score=0,
                        figsize=[5,8])
```



```

plt.setp(cluster.ax_heatmap.xaxis.get_majorticklabels(), rotation=45)
cluster.ax_heatmap.yaxis.set_label_text('')
cluster.cax.set_position([.03, .01, .03, 0.12]) # [x, y, width, height]
cluster.cax.xaxis.set_label_position('bottom')
cluster.cax.xaxis.set_label_text('Z-Score')
cluster.ax_heatmap.set_xticklabels(cluster.ax_heatmap.get_xticklabels(),
↳ fontsize=12)
cluster.ax_heatmap.set_yticklabels(cluster.ax_heatmap.get_yticklabels(),
↳ fontsize=12)
if save:
    cluster.savefig(f'{save_path}\\Figures\\grouped_{name}_heatmap.svg')

    #save a file with all datas
    writer = ExcelWriter(f'{save_path}\\Figures\\{name}.xlsx',
↳ engine='xlsxwriter')
    hm_data.to_excel(writer, sheet_name='Raw data')
    mean_abundance.to_excel(writer, sheet_name='mean data')
    writer.close()
else:
    plt.show()

return mean_abundance

#collagen
collagens=prot_group_hm(data_nonan, 'COL', 'Collagen',
↳ exclude_list=['COLGALT1', 'PCOLCE'], save=True)

#laminins
laminins=prot_group_hm(data_nonan, 'LAMA|LAMB|LAMC', 'Laminin', save=True)

#mmp
mmps=prot_group_hm(data_nonan, 'MMP', 'MMP', save=True)

##specific proteins
def specific_protein_barplot(data, prot, exclude_list=[], save=False):

    prot_data =data[data['protName'].str.contains(prot)]

    print(prot_data['protName'])

    protName=prot_data.at[prot_data.index[0], 'protName']

    for term in exclude_list:
        prot_data.drop(index=[term], inplace= True)

```

```

prot_data = prot_data[['Abundances (Normalized): F1: Sample, Replicate 1, D1 CAF',
↳ 'Abundances (Normalized): F2: Sample, Replicate 2, D1 CAF', 'Abundances
↳ (Normalized): F3: Sample, Replicate 3, D1 CAF',
        'Abundances (Normalized): F4: Sample, Replicate 1, D1
↳ NMF', 'Abundances (Normalized): F5: Sample, Replicate 2, D1
↳ NMF', 'Abundances (Normalized): F6: Sample, Replicate 3, D1 NMF',
        'Abundances (Normalized): F7: Sample, Replicate 1, D7 CAF',
↳ 'Abundances (Normalized): F8: Sample, Replicate 2, D7
↳ CAF', 'Abundances (Normalized): F9: Sample, Replicate 3, D7 CAF',
        'Abundances (Normalized): F10: Sample, Replicate 1, D7
↳ NMF', 'Abundances (Normalized): F11: Sample, Replicate 2, D7
↳ NMF', 'Abundances (Normalized): F12: Sample, Replicate 3, D7
↳ NMF']]

#replace values still here with
prot_data=prot_data.fillna(0)

prot_data.columns=[col[-6:] for col in prot_data.columns]

conds=['D1 NMF', 'D1 CAF', 'D7 NMF', 'D7 CAF']

results={}

for cond in conds:
    results[cond]=prot_data.at[prot_data.index[0],cond].tolist()

results=pd.DataFrame(results)

if save:
    #save a file with all datas
    writer = ExcelWriter(f'{save_path}\\Figures\\Proteins\\{protName}.xlsx',
↳ engine='xlsxwriter')
    results.to_excel(writer, sheet_name='Raw data')
    writer.close()

return results

fn=specific_protein_barplot(data_nonan, 'Fibronectin',
↳ exclude_list=['FNDC3B', 'FNDC3A'], save=True)
fibronectin=pd.DataFrame(fn.mean(), columns=['FN1']).T

hyal=specific_protein_barplot(data_nonan, 'hyaluronidase', exclude_list=[], save=True)
hyaluronidase=pd.DataFrame(hyal.mean(), columns=['CEMIP2']).T

```

```

vers=specific_protein_barplot(data_nonan, 'Versican core protein', exclude_list=[],
↪ save=True)
versican=pd.DataFrame(vers.mean(), columns=['VCAN']).T

thsb2=specific_protein_barplot(data_nonan, 'Thrombospondin 2', exclude_list=[],
↪ save=True)
thrombo2=pd.DataFrame(thsb2.mean(), columns=['THBS2']).T

thsb1=specific_protein_barplot(data_nonan, 'Thrombospondin-1', exclude_list=[],
↪ save=True)
thrombo1=pd.DataFrame(thsb1.mean(), columns=['THBS1']).T

mp=pd.concat([collagens, laminins, mmps, hyaluronidase, fibronectin, versican,
↪ thrombo1, thrombo2)][['D1 NMF', 'D1 CAF', 'D7 NMF', 'D7 CAF']].T

z_mp=(mp-mp.mean())/mp.std()

mp_map=sns.clustermap(z_mp,
                       method='average', metric='euclidean',
                       cmap='vlag',
                       cbar=True,
                       col_cluster=False,
                       row_cluster=False,
                       figsize=[10,4])

plt.setp(cluster.ax_heatmap.xaxis.get_majorticklabels(), rotation=45)
mp_map.ax_heatmap.yaxis.set_label_text('')
mp_map.cax.set_position([.03, .01, .03, 0.12]) # [x, y, width, height]
mp_map.cax.xaxis.set_label_position('bottom')
mp_map.cax.xaxis.set_label_text('Z-Score')
mp_map.savefig(f'{save_path}\\Figures\\grouped matricellular proteins heatmap.svg')

```

Appendix F

Liste des abréviations

α SMA : α Smooth Muscle Actin
BpBCM : Bioprinted Breast Cancer Model - Modèle de cancer du sein bioimprimé
CAF : Fibroblastes associés au cancer
CAV1 : Cavéoline-1
ColMA : Collagène métacrylé
CXCL : C-X-C Ligand
ER : Récepteur aux oestrogènes
FAP : Fibroblasts Activation Protein
FGF : Fibroblasts Growth Factor
HA : Acide hyaluronique
HAMA : Acide hyalyuronique métacrylé
HER2 : Human Epidermal growth factor Receptor-2
HIF : Hypoxia induced factor
HR : Récepteurs aux hormones
HUVEC : Cellules endothéliales de cordon ombilical humain
HYAL : Hyaluronidase
IL : Interleukine
MEC : Matrice Extracellulaire
MMP : Matrix Metalloprotéinase
NMF : Fibroblastes mammaires normaux
PDGF/R : Platelet-derived growth factor/receptor
PI3K : Phosphoinositide 3-kinase
PlGF : Placental Growth Factor
PR : Récepteur à la progestérone
ROS : Reactive Oxygen Species
TAM : Tumor-associated macrophages

TGF β : Transforming Growth factor β

TNF α : Tumor Necrosis Factor α

VEGF : Vascular endothelial growth factor

Références Bibliographiques

1. Loibl, S., Poortmans, P., Morrow, M., Denkert, C. & Curigliano, G. Breast cancer. eng. Lancet (London, England) **397**, 1750–1769. ISSN: 1474-547X (May 2021).
2. Lakhani, S. R., Ellis, I. O., Schnitt, S. J. & Tan, P. H. WHO Classification of Tumours of the Breast. en.
3. Giaquinto, A. N. et al. Breast Cancer Statistics, 2022. en. CA: A Cancer Journal for Clinicians **72**. eprint: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.3322/caac.21754>, 524–541. ISSN: 1542-4863. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.3322/caac.21754> (2023) (2022).
4. Vaupel, P., Briest, S. & Höckel, M. Hypoxia in breast cancer: pathogenesis, characterization and biological/therapeutic implications. eng. Wiener Medizinische Wochenschrift (1946) **152**, 334–342. ISSN: 0043-5341 (2002).
5. H[ouml]ckel, M. & Vaupel, P. Biological consequences of tumor hypoxia. en. Seminars in Oncology **28**, 36–41. ISSN: 00937754. <http://www2.us-elsevierhealth.com/inst/serve?action=searchDB&searchDBfor=art&artType=abs&id=asonc02802f0036> (2023) (Apr. 2001).
6. Types of Breast Cancer — Saint John’s Cancer Institute en-US. <https://www.saintjohnscancer.org/breast/breast-cancer/types-of-breast-cancer/> (2024).
7. Gote, V., Nookala, A. R., Bolla, P. K. & Pal, D. Drug Resistance in Metastatic Breast Cancer: Tumor Targeted Nanomedicine to the Rescue. en. International Journal of Molecular Sciences **22**. Number: 9 Publisher: Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 4673. ISSN: 1422-0067. <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/9/4673> (2024) (Jan. 2021).
8. Kennecke, H. et al. Metastatic Behavior of Breast Cancer Subtypes. en. Journal of Clinical Oncology **28**, 3271–3277. ISSN: 0732-183X, 1527-7755. <https://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2009.25.9820> (2023) (July 2010).
9. Langley, R. R. & Fidler, I. J. The seed and soil hypothesis revisited—The role of tumor-stroma interactions in metastasis to different organs. en. International Journal of Cancer **128**, 2527–2535. ISSN: 00207136. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ijc.26031> (2023) (June 2011).

10. Sancho-Garnier, H. & Colonna, M. [Breast cancer epidemiology]. fre. *Presse medicale* (Paris, France) **48**, 1076–1084. ISSN: 2213-0276. <https://doi.org/10.1016/j.lpm.2019.09.022> (2023) (Oct. 2019).
11. *Diet, activity and cancer* en-US. <https://www.wcrf.org/diet-activity-and-cancer/> (2024).
12. Antoniou, A. et al. Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. eng. *American Journal of Human Genetics* **72**, 1117–1130. ISSN: 0002-9297 (May 2003).
13. Shih, H. A. et al. BRCA1 and BRCA2 Mutation Frequency in Women Evaluated in a Breast Cancer Risk Evaluation Clinic. *Journal of Clinical Oncology* **20**. Publisher: Wolters Kluwer, 994–999. ISSN: 0732-183X. <https://ascopubs.org/doi/abs/10.1200/jco.2002.20.4.994> (2024) (Feb. 2002).
14. Lalloo, F. & Evans, D. G. Familial breast cancer. eng. *Clinical Genetics* **82**, 105–114. ISSN: 1399-0004 (Aug. 2012).
15. Sung, H. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. en. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* **71**. eprint: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.3322/caac.21660>, 209–249. ISSN: 1542-4863. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.3322/caac.21660> (2023) (2021).
16. Daubisse-Marliac, L. et al. Breast cancer incidence and time trend in France from 1990 to 2007: a population-based study from two French cancer registries. *Annals of Oncology* **22**, 329–334. ISSN: 0923-7534. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0923753419386739> (2024) (Feb. 2011).
17. Blamey, R. W. et al. Survival of invasive breast cancer according to the Nottingham Prognostic Index in cases diagnosed in 1990-1999. eng. *European Journal of Cancer* (Oxford, England: 1990) **43**, 1548–1555. ISSN: 0959-8049 (July 2007).
18. Blamey, R. W. et al. Reading the prognosis of the individual with breast cancer. eng. *European Journal of Cancer* (Oxford, England: 1990) **43**, 1545–1547. ISSN: 0959-8049 (July 2007).
19. Reiner, A., Reiner, G., Spona, J., Schemper, M. & Holzner, J. H. Histopathologic characterization of human breast cancer in correlation with estrogen receptor status. A comparison of immunocytochemical and biochemical analysis. eng. *Cancer* **61**, 1149–1154. ISSN: 0008-543X (Mar. 1988).
20. MacGrogan, G. et al. Time for reappraisal of progesterone-receptor testing in breast cancer management. eng. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* **23**, 2870–2871, author reply 2871. ISSN: 0732-183X (Apr. 2005).
21. Balma, M. et al. Non-conventional and Investigational PET Radiotracers for Breast Cancer: A Systematic Review. *Frontiers in Medicine* **9**. ISSN: 2296-858X. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmed.2022.881551> (2024) (2022).

22. Bauer, K. R., Brown, M., Cress, R. D., Parise, C. A. & Caggiano, V. Descriptive analysis of estrogen receptor (ER)-negative, progesterone receptor (PR)-negative, and HER2-negative invasive breast cancer, the so-called triple-negative phenotype. en. *Cancer* **109**. eprint: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/cncr.22618>, 1721–1728. ISSN: 1097-0142. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/cncr.22618> (2024) (2007).
23. Sørlie, T. et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. eng. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 10869–10874. ISSN: 0027-8424 (Sept. 2001).
24. Sorlie, T. et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. eng. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 8418–8423. ISSN: 0027-8424 (July 2003).
25. Sørlie, T. Molecular portraits of breast cancer: tumour subtypes as distinct disease entities. eng. *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)* **40**, 2667–2675. ISSN: 0959-8049 (Dec. 2004).
26. Waks, A. G. & Winer, E. P. Breast Cancer Treatment: A Review. en. *JAMA* **321**, 288. ISSN: 0098-7484. <http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jama.2018.19323> (2021) (Jan. 2019).
27. Effect of radiotherapy after breast-conserving surgery on 10-year recurrence and 15-year breast cancer death: meta-analysis of individual patient data for 10801 women in 17 randomised trials. *Lancet* **378**, 1707–1716. ISSN: 0140-6736. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3254252/> (2024) (Nov. 2011).
28. Zhang, M., Song, J., Yang, H., Jin, F. & Zheng, A. Efficacy and safety of PD-1/PD-L1 inhibitors in triple-negative breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Acta Oncologica* **61**. Publisher: Taylor & Francis eprint: <https://doi.org/10.1080/0284186X.2022.2106795>, 1105–1115. ISSN: 0284-186X. <https://doi.org/10.1080/0284186X.2022.2106795> (2023) (Sept. 2022).
29. Hasebe, T. et al. Histopathologic factors significantly associated with initial organ-specific metastasis by invasive ductal carcinoma of the breast: a prospective study. eng. *Human Pathology* **39**, 681–693. ISSN: 0046-8177 (May 2008).
30. Provenzano, P. P. et al. Collagen reorganization at the tumor-stromal interface facilitates local invasion. eng. *BMC medicine* **4**, 38. ISSN: 1741-7015 (Dec. 2006).
31. Luparello, C. Aspects of Collagen Changes in Breast Cancer. en. *Journal of Carcinogenesis & Mutagenesis* **S13**. ISSN: 21572518. <https://www.omicsonline.org/aspects-of-collagen-changes-in-breast-cancer-2157-2518.S13-007.php?aid=14212> (2023) (2013).
32. Kauppila, S., Stenbäck, F., Risteli, J., Jukkola, A. & Risteli, L. Aberrant type I and type III collagen gene expression in human breast cancer in vivo. eng. *The Journal of Pathology* **186**, 262–268. ISSN: 0022-3417 (Nov. 1998).

33. Insua-Rodríguez, J. & Oskarsson, T. The extracellular matrix in breast cancer. *Advanced Drug Delivery Reviews. Extracellular Matrix (ECM) and ECM-like materials: Therapeutic Tools and Targets in Cancer Treatment* **97**, 41–55. ISSN: 0169-409X. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X15300235> (2023) (Feb. 2016).
34. Karousou, E. et al. Collagen VI and Hyaluronan: The Common Role in Breast Cancer. en. *BioMed Research International* **2014**. Publisher: Hindawi, e606458. ISSN: 2314-6133. <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/606458/> (2023) (July 2014).
35. Wu, M. et al. A novel role of low molecular weight hyaluronan in breast cancer metastasis. en. *The FASEB Journal* **29**. eprint: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1096/fj.14-259978>, 1290–1298. ISSN: 1530-6860. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1096/fj.14-259978> (2023) (2015).
36. Delpech, B. et al. Serum hyaluronan (hyaluronic acid) in breast cancer patients. en. *International Journal of Cancer* **46**. eprint: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/ijc.2910460309>, 388–390. ISSN: 1097-0215. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ijc.2910460309> (2023) (1990).
37. Nurmik, M., Ullmann, P., Rodriguez, F., Haan, S. & Letellier, E. In search of definitions: Cancer-associated fibroblasts and their markers. en. *International Journal of Cancer* **146**. eprint: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/ijc.32193>, 895–905. ISSN: 1097-0215. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ijc.32193> (2020) (2020).
38. Buchsbaum, R. J. & Oh, S. Y. Breast Cancer-Associated Fibroblasts: Where We Are and Where We Need to Go. *Cancers* **8**. ISSN: 2072-6694. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4773742/> (2020) (Jan. 2016).
39. Hu, D. et al. Cancer-associated fibroblasts in breast cancer: Challenges and opportunities. eng. *Cancer Communications (London, England)* **42**, 401–434. ISSN: 2523-3548 (May 2022).
40. Toullec, A. et al. Oxidative stress promotes myofibroblast differentiation and tumour spreading. eng. *EMBO molecular medicine* **2**, 211–230. ISSN: 1757-4684 (June 2010).
41. Costa, A. et al. Fibroblast Heterogeneity and Immunosuppressive Environment in Human Breast Cancer. en. *Cancer Cell* **33**, 463–479.e10. ISSN: 15356108. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1535610818300114> (2020) (Mar. 2018).
42. De, P., Aske, J. & Dey, N. Cancer-Associated Fibroblast Functions as a Road-Block in Cancer Therapy. en. *Cancers* **13**. Number: 20 Publisher: Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 5246. <https://www.mdpi.com/2072-6694/13/20/5246> (2021) (Jan. 2021).

43. Erdogan, B. & Webb, D. J. Cancer-associated fibroblasts modulate growth factor signaling and extracellular matrix remodeling to regulate tumor metastasis. *Biochemical Society Transactions* **45**, 229–236. ISSN: 0300-5127. <https://doi.org/10.1042/BST20160387> (2022) (Feb. 2017).
44. Liu, T. et al. Cancer-associated fibroblasts: an emerging target of anti-cancer immunotherapy. *Journal of Hematology & Oncology* **12**, 86. ISSN: 1756-8722 (Aug. 2019).
45. Yu, Y. et al. Cancer-associated fibroblasts induce epithelial-mesenchymal transition of breast cancer cells through paracrine TGF- signalling. *British Journal of Cancer* **110**, 724–732. ISSN: 1532-1827 (Feb. 2014).
46. Bernard, S. et al. CXCL1 derived from mammary fibroblasts promotes progression of mammary lesions to invasive carcinoma through CXCR2 dependent mechanisms. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* **23**, 249–267. ISSN: 1083-3021. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6582941/> (2021) (Dec. 2018).
47. Kieffer, Y. et al. Single-Cell Analysis Reveals Fibroblast Clusters Linked to Immunotherapy Resistance in Cancer. *Cancer Discovery* **10**, 1330–1351. ISSN: 2159-8274. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-19-1384> (2022) (Sept. 2020).
48. Sapudom, J. et al. Matrix Remodeling and Hyaluronan Production by Myofibroblasts and Cancer-Associated Fibroblasts in 3D Collagen Matrices. *Gels* **6**. Number: 4 Publisher: Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 33. ISSN: 2310-2861. <https://www.mdpi.com/2310-2861/6/4/33> (2022) (Dec. 2020).
49. Orimo, A. et al. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell* **121**, 335–348. ISSN: 0092-8674 (May 2005).
50. Sewell-Loftin, M. K. et al. Cancer-associated fibroblasts support vascular growth through mechanical force. *Scientific Reports* **7**. Bandiera_abtest: a Cc_license_type: cc_by Cg_type: Nature Research Journals Number: 1 Primary_atype: Research Publisher: Nature Publishing Group Subject_term: Biomedical engineering;Cancer microenvironment;Tumour angiogenesis Subject_term_id: biomedical-engineering;cancer-microenvironment;tumour-angiogenesis, 12574. ISSN: 2045-2322. <https://www.nature.com/articles/s41598-017-13006-x> (2022) (Oct. 2017).
51. Fernández-Nogueira, P. et al. Cancer-Associated Fibroblasts in Breast Cancer Treatment Response and Metastasis. *Cancers* **13**. Number: 13 Publisher: Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 3146. ISSN: 2072-6694. <https://www.mdpi.com/2072-6694/13/13/3146> (2023) (Jan. 2021).
52. Yang, S. X., Polley, E. & Lipkowitz, S. New insights on PI3K/AKT pathway alterations and clinical outcomes in breast cancer. *Cancer Treatment Reviews* **45**, 87–96. ISSN: 0305-7372. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0305737216000360> (2024) (Apr. 2016).

53. Baer, R., Cintas, C., Therville, N. & Guillermet-Guibert, J. Implication of PI3K/Akt pathway in pancreatic cancer: When PI3K isoforms matter? *Advances in Biological Regulation. The PI3-kinase/Akt pathway: from signaling to diseases* **59**, 19–35. ISSN: 2212-4926. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S221249261530004X> (2024) (Sept. 2015).
54. Wang, Z., Tang, Y., Tan, Y., Wei, Q. & Yu, W. Cancer-associated fibroblasts in radiotherapy: challenges and new opportunities. *Cell Communication and Signaling* **17**, 47. ISSN: 1478-811X. <https://doi.org/10.1186/s12964-019-0362-2> (2021) (May 2019).
55. Zhang, H. *et al.* CAF-secreted CXCL1 conferred radioresistance by regulating DNA damage response in a ROS-dependent manner in esophageal squamous cell carcinoma. *en. Cell Death & Disease* **8**. Bandiera_abtest: a Cc_license_type: cc.by Cg_type: Nature Research Journals Number: 5 Primary_atype: Research Publisher: Nature Publishing Group Subject_term: Cancer therapeutic resistance;Cell signalling;DNA damage response;Oesophageal cancer Subject_term_id: cancer-therapeutic-resistance;cell-signalling;dna-damage-response;oesophageal-cancer, e2790–e2790. ISSN: 2041-4889. <https://www.nature.com/articles/cddis2017180> (2021) (May 2017).
56. Zou, A. *et al.* Elevated CXCL1 expression in breast cancer stroma predicts poor prognosis and is inversely associated with expression of TGF- signaling proteins. *BMC Cancer* **14**, 781. ISSN: 1471-2407. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-781> (2021) (Oct. 2014).
57. Wang, Y. *et al.* Cancer-associated Fibroblasts Promote Irradiated Cancer Cell Recovery Through Autophagy. English. *eBioMedicine* **17**. Publisher: Elsevier, 45–56. ISSN: 2352-3964. [https://www.thelancet.com/article/S2352-3964\(17\)30078-6/fulltext](https://www.thelancet.com/article/S2352-3964(17)30078-6/fulltext) (2024) (Mar. 2017).
58. Su, S. *et al.* CD10+GPR77+ Cancer-Associated Fibroblasts Promote Cancer Formation and Chemoresistance by Sustaining Cancer Stemness. *eng. Cell* **172**, 841–856.e16. ISSN: 1097-4172 (Feb. 2018).
59. Vaziri, N., Shariati, L., Zarrabi, A., Farazmand, A. & Haghjooy Javanmard, S. Cancer-Associated Fibroblasts Regulate the Plasticity of Breast Cancer Stemness through the Production of Leukemia Inhibitory Factor. *eng. Life (Basel, Switzerland)* **11**, 1298. ISSN: 2075-1729 (Nov. 2021).
60. Nguyen, M. *et al.* Dissecting Effects of Anti-cancer Drugs and Cancer-Associated Fibroblasts by On-Chip Reconstitution of Immunocompetent Tumor Microenvironments. *eng. Cell Reports* **25**, 3884–3893.e3. ISSN: 2211-1247 (2018).
61. Sobierajska, K., Ciszewski, W. M., Sacewicz-Hofman, I. & Niewiarowska, J. *en. in Tumor Microenvironment: Non-Hematopoietic Cells* (ed Birbrair, A.) 71–86 (Springer International Publishing, Cham, 2020). ISBN: 978-3-030-37184-5. https://doi.org/10.1007/978-3-030-37184-5_6 (2023).

62. Rakocevic, J. et al. Endothelial cell markers from clinician's perspective. Experimental and Molecular Pathology **102**, 303–313. ISSN: 0014-4800. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S001448001730076X> (2024) (Apr. 2017).
63. Senchukova, M. A., Nikitenko, N. V., Tomchuk, O. N., Zaitsev, N. V. & Stadnikov, A. A. Different types of tumor vessels in breast cancer: morphology and clinical value. en. SpringerPlus **4**, 512. ISSN: 2193-1801. <https://doi.org/10.1186/s40064-015-1293-z> (2023) (Sept. 2015).
64. Croix, B. S. Genes Expressed in Human Tumor Endothelium. en. Science **289**, 1197–1202. ISSN: 00368075, 10959203. <https://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.289.5482.1197> (2020) (Aug. 2000).
65. Liu, Z.-L., Chen, H.-H., Zheng, L.-L., Sun, L.-P. & Shi, L. Angiogenic signaling pathways and anti-angiogenic therapy for cancer. en. Signal Transduction and Targeted Therapy **8**. Number: 1 Publisher: Nature Publishing Group, 1–39. ISSN: 2059-3635. <https://www.nature.com/articles/s41392-023-01460-1> (2024) (May 2023).
66. Khosravi Shahi, P., Soria Lovelle, A. & Pérez Manga, G. Tumoral angiogenesis and breast cancer. en. Clinical and Translational Oncology **11**, 138–142. ISSN: 1699-3055. <https://doi.org/10.1007/S12094-009-0329-7> (2024) (Mar. 2009).
67. Sakurai, T. & Kudo, M. Signaling Pathways Governing Tumor Angiogenesis. Oncology **81**, 24–29. ISSN: 0030-2414. <https://doi.org/10.1159/000333256> (2024) (Dec. 2011).
68. Zhang, W. et al. Endothelial cells promote triple-negative breast cancer cell metastasis via PAI-1 and CCL5 signaling. en. The FASEB Journal **32**. eprint: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1096/fj.201700237RR>, 276–288. ISSN: 1530-6860. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1096/fj.201700237RR> (2023) (2018).
69. Hwang, H. J. et al. Endothelial cells under therapy-induced senescence secrete CXCL11, which increases aggressiveness of breast cancer cells. Cancer Letters **490**, 100–110. ISSN: 0304-3835. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304383520303499> (2023) (Oct. 2020).
70. Prasanna, P. G. et al. Therapy-Induced Senescence: Opportunities to Improve Anticancer Therapy. JNCI: Journal of the National Cancer Institute **113**, 1285–1298. ISSN: 0027-8874. <https://doi.org/10.1093/jnci/djab064> (2024) (Oct. 2021).
71. Garcia-Barros, M. Tumor Response to Radiotherapy Regulated by Endothelial Cell Apoptosis. en. Science **300**, 1155–1159. ISSN: 00368075, 10959203. <https://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.1082504> (2021) (May 2003).

72. Ketteler, J. *et al.* Progression-Related Loss of Stromal Caveolin 1 Levels Mediates Radiation Resistance in Prostate Carcinoma via the Apoptosis Inhibitor TRIAP1. en. Journal of Clinical Medicine **8**. Number: 3 Publisher: Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 348. <https://www.mdpi.com/2077-0383/8/3/348> (2021) (Mar. 2019).
73. Zhao, C. *et al.* Cancer-associated adipocytes: emerging supporters in breast cancer. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research **39**, 156. ISSN: 1756-9966. <https://doi.org/10.1186/s13046-020-01666-z> (2024) (Aug. 2020).
74. Mertz, D., Sentosa, J., Luker, G. & Takayama, S. Studying Adipose Tissue in the Breast Tumor Microenvironment In Vitro: Progress and Opportunities. eng. Tissue Engineering and Regenerative Medicine. ISSN: 2212-5469 (Sept. 2020).
75. Lengyel, E., Makowski, L., DiGiovanni, J. & Kolonin, M. G. Cancer as a Matter of Fat: The Crosstalk between Adipose Tissue and Tumors. English. Trends in Cancer **4**. Publisher: Elsevier, 374–384. ISSN: 2405-8033. [https://www.cell.com/trends/cancer/abstract/S2405-8033\(18\)30061-X](https://www.cell.com/trends/cancer/abstract/S2405-8033(18)30061-X) (2024) (May 2018).
76. Mao, Y., Keller, E. T., Garfield, D. H., Shen, K. & Wang, J. Stromal cells in tumor microenvironment and breast cancer. en. Cancer and Metastasis Reviews **32**, 303–315. ISSN: 1573-7233. <https://doi.org/10.1007/s10555-012-9415-3> (2023) (June 2013).
77. Bussard, K. M., Mutkus, L., Stumpf, K., Gomez-Manzano, C. & Marini, F. C. Tumor-associated stromal cells as key contributors to the tumor microenvironment. eng. Breast cancer research: BCR **18**, 84. ISSN: 1465-542X (Aug. 2016).
78. Krisnawan, V. E., Stanley, J. A., Schwarz, J. K. & DeNardo, D. G. Tumor Microenvironment as a Regulator of Radiation Therapy: New Insights into Stromal-Mediated Radioresistance. en. Cancers **12**. Number: 10 Publisher: Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2916. <https://www.mdpi.com/2072-6694/12/10/2916> (2021) (Oct. 2020).
79. Salemme, V., Centonze, G., Cavallo, F., Defilippi, P. & Conti, L. The Crosstalk Between Tumor Cells and the Immune Microenvironment in Breast Cancer: Implications for Immunotherapy. en. Frontiers in Oncology **11**, 610303. ISSN: 2234-943X. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2021.610303/full> (2021) (Mar. 2021).
80. Gil Del Alcazar, C. R. *et al.* Immune Escape in Breast Cancer During In Situ to Invasive Carcinoma Transition. Cancer Discovery **7**, 1098–1115. ISSN: 2159-8274. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-17-0222> (2023) (Oct. 2017).
81. Tower, H., Ruppert, M. & Britt, K. The Immune Microenvironment of Breast Cancer Progression. en. Cancers **11**. Number: 9 Publisher: Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 1375. <https://www.mdpi.com/2072-6694/11/9/1375> (2021) (Sept. 2019).
82. Komohara, Y. & Takeya, M. CAFs and TAMs: maestros of the tumour microenvironment. eng. The Journal of Pathology **241**, 313–315. ISSN: 1096-9896 (Feb. 2017).

83. Liang, P. *et al.* Monotherapy and Combination Therapy Using Anti-Angiogenic Nanoagents to Fight Cancer. *en. Advanced Materials* **33**. eprint: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/adma.202005155>, 2005155. ISSN: 1521-4095. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/adma.202005155> (2024) (2021).
84. Heath, V. L. & Bicknell, R. Anticancer strategies involving the vasculature. *en. Nature Reviews Clinical Oncology* **6**. Number: 7 Publisher: Nature Publishing Group, 395–404. ISSN: 1759-4782. <https://www.nature.com/articles/nrclinonc.2009.52> (2023) (July 2009).
85. Potiron, V. *et al.* Tumor vasculature remodeling by radiation therapy increases doxorubicin distribution and efficacy. *en. Cancer Letters* **457**, 1–9. ISSN: 03043835. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304383519302812> (2021) (Aug. 2019).
86. De Vlieghere, E., Verset, L., Demetter, P., Bracke, M. & De Wever, O. Cancer-associated fibroblasts as target and tool in cancer therapeutics and diagnostics. English. *Virchows Archiv* **467**. Place: New York Publisher: Springer WOS:000363055900002, 367–382. ISSN: 0945-6317 (Oct. 2015).
87. Nurmik, M., Ullmann, P., Rodriguez, F., Haan, S. & Letellier, E. In search of definitions: Cancer-associated fibroblasts and their markers. *eng. International Journal of Cancer* **146**, 895–905. ISSN: 1097-0215 (Feb. 2020).
88. Zhang, Y. S. *et al.* Bioprinting the Cancer Microenvironment. *en. ACS Biomaterials Science & Engineering* **2**, 1710–1721. ISSN: 2373-9878, 2373-9878. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsbiomaterials.6b00246> (2019) (Oct. 2016).
89. Fong, E. L. S., Harrington, D. A., Farach-Carson, M. C. & Yu, H. Heralding a new paradigm in 3D tumor modeling. *eng. Biomaterials* **108**, 197–213. ISSN: 1878-5905 (Nov. 2016).
90. Fröhlich, E. The Variety of 3D Breast Cancer Models for the Study of Tumor Physiology and Drug Screening. *eng. International Journal of Molecular Sciences* **24**, 7116. ISSN: 1422-0067 (Apr. 2023).
91. Jubelin, C. *et al.* Three-dimensional in vitro culture models in oncology research. *eng. Cell & Bioscience* **12**, 155. ISSN: 2045-3701 (Sept. 2022).
92. Moccia, C. & Haase, K. Engineering Breast Cancer On-chip-Moving Toward Subtype Specific Models. *eng. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* **9**, 694218. ISSN: 2296-4185 (2021).
93. Ketteler, J. *et al.* Caveolin-1 regulates the ASMase/ceramide-mediated radiation response of endothelial cells in the context of tumor–stroma interactions. *en. Cell Death & Disease* **11**, 228. ISSN: 2041-4889. <http://www.nature.com/articles/s41419-020-2418-z> (2020) (Apr. 2020).
94. Hickman, J. A. *et al.* Three-dimensional models of cancer for pharmacology and cancer cell biology: capturing tumor complexity in vitro/ex vivo. *eng. Biotechnology Journal* **9**, 1115–1128. ISSN: 1860-7314 (Sept. 2014).

95. Prunet, A. *et al.* A new agarose-based microsystem to investigate cell response to prolonged confinement. *Lab on a Chip* **20**. Publisher: Royal Society of Chemistry, 4016–4030. <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2020/lc/d01c00732c> (2024) (2020).
96. Imamura, Y. *et al.* Comparison of 2D- and 3D-culture models as drug-testing platforms in breast cancer. *eng. Oncology Reports* **33**, 1837–1843. ISSN: 1791-2431 (Apr. 2015).
97. Boix-Montesinos, P., Soriano-Teruel, P. M., Armiñán, A., Orzáez, M. & Vicent, M. J. The past, present, and future of breast cancer models for nanomedicine development. *eng. Advanced Drug Delivery Reviews* **173**, 306–330. ISSN: 1872-8294 (June 2021).
98. Yakavets, I. *et al.* Advanced co-culture 3D breast cancer model for investigation of fibrosis induced by external stimuli: optimization study. *en. Scientific Reports* **10**. Number: 1 Publisher: Nature Publishing Group, 21273. ISSN: 2045-2322. <https://www.nature.com/articles/s41598-020-78087-7> (2023) (Dec. 2020).
99. Hanley, C. J., Henriët, E., Sirka, O. K., Thomas, G. J. & Ewald, A. J. Tumor-Resident Stromal Cells Promote Breast Cancer Invasion through Regulation of the Basal Phenotype. *eng. Molecular cancer research: MCR* **18**, 1615–1622. ISSN: 1557-3125 (Nov. 2020).
100. Katsuta, E., Rashid, O. M. & Takabe, K. Clinical relevance of tumor microenvironment: immune cells, vessels, and mouse models. *en. Human Cell* **33**, 930–937. ISSN: 1749-0774. <https://doi.org/10.1007/s13577-020-00380-4> (2024) (Oct. 2020).
101. Orimo, A. *et al.* Stromal Fibroblasts Present in Invasive Human Breast Carcinomas Promote Tumor Growth and Angiogenesis through Elevated SDF-1/CXCL12 Secretion. English. *Cell* **121**. Publisher: Elsevier, 335–348. ISSN: 0092-8674, 1097-4172. [https://www.cell.com/cell/abstract/S0092-8674\(05\)00237-0](https://www.cell.com/cell/abstract/S0092-8674(05)00237-0) (2020) (May 2005).
102. Morton, J. J., Bird, G., Refaeli, Y. & Jimeno, A. Humanized Mouse Xenograft Models: Narrowing the Tumor–Microenvironment Gap. *Cancer Research* **76**, 6153–6158. ISSN: 0008-5472. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-1260> (2024) (Oct. 2016).
103. Shultz, L. D., Brehm, M. A., Garcia-Martinez, J. V. & Greiner, D. L. Humanized mice for immune system investigation: progress, promise and challenges. *eng. Nature Reviews. Immunology* **12**, 786–798. ISSN: 1474-1741 (Nov. 2012).
104. Díaz, L. *et al.* Ethical Considerations in Animal Research: The Principle of 3R's. *en. Revista de investigación clínica* **73**. Publisher: Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, 199–209. ISSN: 0034-8376. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0034-83762021000400199&lng=es&nrm=iso&tlng=en (2024) (Aug. 2021).
105. Groll, J. *et al.* Biofabrication: reappraising the definition of an evolving field. *en. Biofabrication* **8**, 013001. ISSN: 1758-5090. <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1758-5090/8/1/013001> (2020) (Jan. 2016).

106. Mencattini, A. *et al.* Direct imaging and automatic analysis in tumor-on-chip reveal cooperative antitumoral activity of immune cells and oncolytic vaccinia virus. *Biosensors and Bioelectronics* **215**, 114571. ISSN: 0956-5663. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S095656632200611X> (2024) (Nov. 2022).
107. Chen, M. B., Kamm, R. D. & Moeendarbary, E. English. in *Biomechanics in Oncology* (eds Dong, C., Zahir, N. & Konstantopoulos, K.) ISSN: 0065-2598 Journal Abbreviation: Adv.Exp.Med.Biol. WOS:000458011100011, 189–207 (Springer International Publishing Ag, Cham, 2018). ISBN: 978-3-319-95294-9.
108. Miollis, F. d. *Développement d'un système de culture in vitro 3D et microfluidique pour étudier* These de doctorat (Université de Lille (2018-2021), Jan. 2021). <https://www.theses.fr/fr/2021LILUI015> (2024).
109. Murphy, S. V. & Atala, A. 3D bioprinting of tissues and organs. en. *Nature Biotechnology* **32**, 773–785. ISSN: 1087-0156, 1546-1696. <http://www.nature.com/articles/nbt.2958> (2019) (Aug. 2014).
110. Jang, J., Yi, H.-G. & Cho, D.-W. 3D Printed Tissue Models: Present and Future. en. *ACS Biomaterials Science & Engineering* **2**, 1722–1731. ISSN: 2373-9878, 2373-9878. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsbiomaterials.6b00129> (2019) (Oct. 2016).
111. Bernal, P. N. *et al.* Volumetric Bioprinting of Organoids and Optically Tuned Hydrogels to Build Liver-Like Metabolic Biofactories. en. *Advanced Materials* **34**. eprint: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/adma.202110054>, 2110054. ISSN: 1521-4095. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/adma.202110054> (2023) (2022).
112. Foresti, D. *et al.* Acoustophoretic printing. *Science Advances* **4**. Publisher: American Association for the Advancement of Science, eaat1659. <https://www.science.org/doi/full/10.1126/sciadv.aat1659> (2024) (Aug. 2018).
113. Pedroza-González, S. C., Rodriguez-Salvador, M., Pérez-Benítez, B. E., Alvarez, M. M. & Santiago, G. T.-d. Bioinks for 3D Bioprinting: A Scientometric Analysis of Two Decades of Progress. *International Journal of Bioprinting* **7**, 333. ISSN: 2424-7723. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8126700/> (2024) (Apr. 2021).
114. Skylar-Scott, M. A. *et al.* Biomanufacturing of organ-specific tissues with high cellular density and embedded vascular channels. en. *Science Advances* **5**, eaaw2459. ISSN: 2375-2548. <http://advances.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/sciadv.aaw2459> (2019) (Sept. 2019).
115. Singh, N. *et al.* Coaxial cell printing of a human glomerular model in vitro of the glomerular filter en. preprint (In Review, Feb. 2022). <https://www.researchsquare.com/article/rs-1346352/v1> (2022).

116. Guillotin, B. *et al.* Laser assisted bioprinting of engineered tissue with high cell density and microscale organization. en. *Biomaterials* **31**, 7250–7256. ISSN: 01429612. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961210006927> (2020) (Oct. 2010).
117. Grigoryan, B. *et al.* Multivascular networks and functional intravascular topologies within biocompatible hydrogels. en. *Science* **364**, 458–464. ISSN: 0036-8075, 1095-9203. <https://www.science.org/doi/10.1126/science.aav9750> (2024) (May 2019).
118. Bernal, P. N. *et al.* Volumetric Bioprinting of Complex Living-Tissue Constructs within Seconds. en. *Advanced Materials* **31**. eprint: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/adma.201904209>, 1904209. ISSN: 1521-4095. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/adma.201904209> (2024) (2019).
119. Ribezzi, D. *et al.* Shaping Synthetic Multicellular and Complex Multimaterial Tissues via Embedded Extrusion-Volumetric Printing of Microgels. en. *Advanced Materials* **n/a**. eprint: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/adma.202301673>, 2301673. ISSN: 1521-4095. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/adma.202301673> (2023).
120. Langer, E. M. *et al.* Modeling Tumor Phenotypes In Vitro with Three-Dimensional Bioprinting. en. *Cell Reports* **26**, 608–623.e6. ISSN: 22111247. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211124718320503> (2020) (Jan. 2019).
121. Reynolds, D. S. *et al.* Microporogen-Structured Collagen Matrices for Embedded Bioprinting of Tumor Models for Immuno-Oncology. eng. *Advanced Materials (Deerfield Beach, Fla.)*, e2210748. ISSN: 1521-4095 (May 2023).
122. Jha, A. K. *et al.* Matrix metalloproteinase-13 mediated degradation of hyaluronic acid-based matrices orchestrates stem cell engraftment through vascular integration. eng. *Biomaterials* **89**, 136–147. ISSN: 1878-5905 (May 2016).
123. Bock, N. *et al.* GelMA, Click-Chemistry Gelatin and Bioprinted Polyethylene Glycol-Based Hydrogels as 3D Ex Vivo Drug Testing Platforms for Patient-Derived Breast Cancer Organoids. eng. *Pharmaceutics* **15**, 261. ISSN: 1999-4923 (Jan. 2023).
124. Duchamp, M. *et al.* Sacrificial Bioprinting of A Mammary Ductal Carcinoma Model. *Biotechnology journal* **14**, e1700703. ISSN: 1860-6768. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6844259/> (2020) (Oct. 2019).
125. Kingsley, D., Dias, A., Chrisey, D. & Corr, D. Single-step laser-based fabrication and patterning of cell-encapsulated alginate microbeads. *Biofabrication* **5** (2013).
126. Bahcecioglu, G., Basara, G., Ellis, B. W., Ren, X. & Zorlutuna, P. Breast cancer models: Engineering the tumor microenvironment. eng. *Acta Biomaterialia* **106**, 1–21. ISSN: 1878-7568 (2020).
127. Belgodere, J. A. *et al.* Engineering Breast Cancer Microenvironments and 3D Bioprinting. eng. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* **6**, 66. ISSN: 2296-4185 (2018).

128. Augustine, R. *et al.* 3D Bioprinted cancer models: Revolutionizing personalized cancer therapy. *Translational Oncology* **14**, 101015. ISSN: 1936-5233. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1936523321000073> (2024) (Apr. 2021).
129. Zhou, Z., He, J., Pang, Y. & Sun, W. Reconstruction of tumor microenvironment via in vitro three-dimensional models. *eng. Biofabrication*. ISSN: 1758-5090 (May 2023).
130. Mao, S. *et al.* Bioprinting of in vitro tumor models for personalized cancer treatment: a review. *English. Biofabrication* **12**. Place: Bristol Publisher: Iop Publishing Ltd WOS:000551672500001, 042001. ISSN: 1758-5082 (Oct. 2020).
131. Shukla, P., Yeleswarapu, S., Heinrich, M. A., Prakash, J. & Pati, F. Mimicking tumor microenvironment by 3D bioprinting: 3D cancer modeling. *eng. Biofabrication* **14**. ISSN: 1758-5090 (May 2022).
132. Datta, P., Ayan, B. & Ozbolat, I. T. Bioprinting for vascular and vascularized tissue biofabrication. *en. Acta Biomaterialia* **51**, 1–20. ISSN: 17427061. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1742706117300351> (2020) (Mar. 2017).
133. Han, J. *et al.* In vitro breast cancer model with patient-specific morphological features for personalized medicine. *en. Biofabrication* **14**. Publisher: IOP Publishing, 034102. ISSN: 1758-5090. <https://dx.doi.org/10.1088/1758-5090/ac6127> (2024) (Apr. 2022).
134. Reid, J. A. *et al.* A 3D bioprinter platform for mechanistic analysis of tumoroids and chimeric mammary organoids. *en. Scientific Reports* **9**. Number: 1 Publisher: Nature Publishing Group, 7466. ISSN: 2045-2322. <https://www.nature.com/articles/s41598-019-43922-z> (2024) (May 2019).
135. Zhu, W. *et al.* Engineering a biomimetic three-dimensional nanostructured bone model for breast cancer bone metastasis study. *eng. Acta Biomaterialia* **14**, 164–174. ISSN: 1878-7568 (Mar. 2015).
136. Grolman, J. M., Zhang, D., Smith, A. M., Moore, J. S. & Kilian, K. A. Rapid 3D Extrusion of Synthetic Tumor Microenvironments. *en. Advanced Materials* **27**, 5512–5517. ISSN: 09359648. <http://doi.wiley.com/10.1002/adma.201501729> (2020) (Oct. 2015).
137. Wang, Y. *et al.* 3D Bioprinting of Breast Cancer Models for Drug Resistance Study. *ACS Biomaterials Science & Engineering* **4**. Publisher: American Chemical Society, 4401–4411. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.8b01277> (2024) (Dec. 2018).
138. Jiang, T. *et al.* Engineering bioprintable alginate/gelatin composite hydrogels with tunable mechanical and cell adhesive properties to modulate tumor spheroid growth kinetics. *en. Biofabrication* **12**. Publisher: IOP Publishing, 015024. ISSN: 1758-5090. <https://doi.org/10.1088/1758-5090/12/1/015024> (2020) (Dec. 2019).
139. González-Callejo, P. *et al.* 3D bioprinted breast tumor-stroma models for pre-clinical drug testing. *eng. Materials Today. Bio* **23**, 100826. ISSN: 2590-0064 (Dec. 2023).

140. Zhou, X. *et al.* 3D Bioprinting a Cell-Laden Bone Matrix for Breast Cancer Metastasis Study. *eng. ACS applied materials & interfaces* **8**, 30017–30026. ISSN: 1944-8252 (Nov. 2016).
141. Chaji, S., Al-Saleh, J. & Gomillion, C. T. Bioprinted Three-Dimensional Cell-Laden Hydrogels to Evaluate Adipocyte-Breast Cancer Cell Interactions. *Gels* **6**. ISSN: 2310-2861. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7151014/> (2020) (Mar. 2020).
142. Vinson, B. T. *et al.* Laser direct-write based fabrication of a spatially-defined, biomimetic construct as a potential model for breast cancer cell invasion into adipose tissue. *en. Biofabrication* **9**. Publisher: IOP Publishing, 025013. ISSN: 1758-5090. <https://doi.org/10.1088%2F1758-5090%2Faa6bad> (2020) (May 2017).
143. Rønnov-Jessen, L., Petersen, O. W., Kotliansky, V. E. & Bissell, M. J. The origin of the myofibroblasts in breast cancer. Recapitulation of tumor environment in culture unravels diversity and implicates converted fibroblasts and recruited smooth muscle cells. *eng. The Journal of Clinical Investigation* **95**, 859–873. ISSN: 0021-9738 (Feb. 1995).
144. Mishra, P. J. *et al.* Carcinoma-associated fibroblast-like differentiation of human mesenchymal stem cells. *eng. Cancer Research* **68**, 4331–4339. ISSN: 1538-7445 (June 2008).
145. Oliveira, H. *et al.* Extracellular matrix (ECM)-derived biinks designed to foster vasculogenesis and neurite outgrowth: Characterization and bioprinting. *en. Bioprinting* **22**, e00134. ISSN: 2405-8866. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2405886621000075> (2021) (June 2021).
146. Tashiro, K. *et al.* A Synthetic Peptide Containing the IKVAV Sequence from the A Chain of Laminin Mediates Cell Attachment, Migration, and Neurite Outgrowth. *en. Journal of Biological Chemistry* **264**, 16174–16182. ISSN: 0021-9258. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021925818716049> (2021) (Sept. 1989).
147. Kikkawa, Y. *et al.* Laminin-111-derived peptides and cancer. *en. Cell Adhesion & Migration* **7**, 150–159. ISSN: 1933-6918, 1933-6926. <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/cam.22827> (2021) (Jan. 2013).
148. Engler, A. J., Sen, S., Sweeney, H. L. & Discher, D. E. Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification. *en. Cell* **126**, 677–689. ISSN: 00928674. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867406009615> (2019) (Aug. 2006).
149. Wu, H. *et al.* A Preliminary Comparative Study of Young's Modulus Versus Shear Modulus in the Diagnosis of Breast Cancer. *en-US. Ultrasound Quarterly* **35**, 88. https://journals.lww.com/ultrasound-quarterly/abstract/2019/03000/a_preliminary_comparative_study_of_young_s_modulus.15.aspx (2023) (Mar. 2019).
150. Jiang, T. *et al.* Bioprintable Alginate/Gelatin Hydrogel 3D In Vitro Model Systems Induce Cell Spheroid Formation. *eng. Journal of Visualized Experiments: JoVE*. ISSN: 1940-087X (2018).

151. Helmlinger, G., Yuan, F., Dellian, M. & Jain, R. K. Interstitial pH and pO₂ gradients in solid tumors in vivo: High-resolution measurements reveal a lack of correlation. en. Nature Medicine **3**. Number: 2 Publisher: Nature Publishing Group, 177–182. ISSN: 1546-170X. <https://www.nature.com/articles/nm0297-177> (2023) (Feb. 1997).
152. Erapanedi, R., Belousov, V. V., Schäfers, M. & Kiefer, F. A novel family of fluorescent hypoxia sensors reveal strong heterogeneity in tumor hypoxia at the cellular level. The EMBO Journal **35**. Publisher: John Wiley & Sons, Ltd, 102–113. ISSN: 0261-4189. <https://www.embopress.org/doi/full/10.15252/embj.201592775> (2023) (Jan. 2016).
153. Jaeschke, A., Eckert, H. & Bray, L. J. Qiber3D—an open-source software package for the quantitative analysis of networks from 3D image stacks. en. GigaScience **11**, giab091. ISSN: 2047-217X. <https://academic.oup.com/gigascience/article/doi/10.1093/gigascience/giab091/6521877> (2022) (Feb. 2022).
154. Hill, R. C., Calle, E. A., Dzieciatkowska, M., Niklason, L. E. & Hansen, K. C. Quantification of Extracellular Matrix Proteins from a Rat Lung Scaffold to Provide a Molecular Readout for Tissue Engineering*[S]. en. Molecular & Cellular Proteomics **14**, 961–973. ISSN: 1535-9476. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1535947620331959> (2022) (Apr. 2015).
155. Schessner, J. P., Voytik, E. & Bludau, I. A practical guide to interpreting and generating bottom-up proteomics data visualizations. en. PROTEOMICS **22**. eprint: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/pmic.202100103>, 2100103. ISSN: 1615-9861. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/pmic.202100103> (2023) (2022).
156. Ashburner, M. et al. Gene Ontology: tool for the unification of biology. en. Nature Genetics **25**. Number: 1 Publisher: Nature Publishing Group, 25–29. ISSN: 1546-1718. https://www.nature.com/articles/ng0500_25 (2024) (May 2000).
157. The Gene Ontology Consortium et al. The Gene Ontology knowledgebase in 2023. Genetics **224**, iyad031. ISSN: 1943-2631. <https://doi.org/10.1093/genetics/iyad031> (2024) (May 2023).
158. Zou, A. et al. Elevated CXCL1 expression in breast cancer stroma predicts poor prognosis and is inversely associated with expression of TGF- signaling proteins. BMC Cancer **14**, 781. ISSN: 1471-2407. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-781> (2021) (Oct. 2014).
159. Comşa, Ş., Cîmpean, A. M. & Raica, M. The Story of MCF-7 Breast Cancer Cell Line: 40 years of Experience in Research. en. ANTICANCER RESEARCH (2015).
160. Aleskandarany, M. A. et al. Tumour Heterogeneity of Breast Cancer: From Morphology to Personalised Medicine. Pathobiology **85**, 23–34. ISSN: 1015-2008. <https://doi.org/10.1159/000477851> (2024) (Feb. 2018).
161. Yi, H.-G. et al. A bioprinted human-glioblastoma-on-a-chip for the identification of patient-specific responses to chemoradiotherapy. en. Nature Biomedical Engineering **3**. Number: 7 Publisher: Nature Publishing Group, 509–519. ISSN: 2157-846X. <https://www.nature.com/articles/s41551-019-0363-x> (2020) (July 2019).

162. Sokol, E. S. *et al.* Growth of human breast tissues from patient cells in 3D hydrogel scaffolds. *Breast Cancer Research* **18**, 19. ISSN: 1465-542X. <https://doi.org/10.1186/s13058-016-0677-5> (2023) (Mar. 2016).
163. Wan, Z. *et al.* A robust vasculogenic microfluidic model using human immortalized endothelial cells and Thy1 positive fibroblasts. en. *Biomaterials* **276**, 121032. ISSN: 0142-9612. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961221003884> (2021) (Sept. 2021).
164. Uwamori, H., Ono, Y., Yamashita, T., Arai, K. & Sudo, R. Comparison of organ-specific endothelial cells in terms of microvascular formation and endothelial barrier functions. *Microvascular Research* **122**, 60–70. ISSN: 0026-2862. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0026286218302115> (2024) (Mar. 2019).
165. Davies, G., Cunnick, G. H., Mansel, R. E., Mason, M. D. & Jiang, W. G. Levels of expression of endothelial markers specific to tumour-associated endothelial cells and their correlation with prognosis in patients with breast cancer. en. *Clinical & Experimental Metastasis* **21**, 31–37. ISSN: 0262-0898. <http://link.springer.com/10.1023/B:CLIN.0000017168.83616.d0> (2024) (2004).
166. De Sanctis, F., Ugel, S., Facciponte, J. & Facciabene, A. The dark side of tumor-associated endothelial cells. *Seminars in Immunology. The mesenchymal and myeloid regulation of immunity* **35**, 35–47. ISSN: 1044-5323. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1044532318300265> (2024) (Feb. 2018).
167. Koch, M. K. *et al.* Stromal fibroblasts regulate microvascular-like network architecture in a bioengineered breast tumour angiogenesis model. eng. *Acta Biomaterialia* **114**, 256–269. ISSN: 1878-7568 (2020).
168. Fu, Z. *et al.* Cancer-associated fibroblasts from invasive breast cancer have an attenuated capacity to secrete collagens. en. *International Journal of Oncology* **45**, 1479–1488. ISSN: 1019-6439, 1791-2423. <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/ijo.2014.2562> (2023) (Oct. 2014).
169. Zhou, C. *et al.* Cancer-associated adipocytes promote the invasion and metastasis in breast cancer through LIF/CXCLs positive feedback loop. eng. *International Journal of Biological Sciences* **18**, 1363–1380. ISSN: 1449-2288 (2022).
170. Dey, M. *et al.* Chemotherapeutics and CAR-T Cell-Based Immunotherapeutics Screening on a 3D Bioprinted Vascularized Breast Tumor Model. en. *Advanced Functional Materials* **n/a**. eprint: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/adfm.202203966>, 2203966. ISSN: 1616-3028. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/adfm.202203966> (2022).
171. Chiou, A. & Fischbach, C. Tissue-engineered models for studies of bone metastasis. *Cancer Drug Discovery and Development* **0**, 95–116 (2018).
172. Berger Fridman, I. *et al.* High-throughput microfluidic 3D biomimetic model enabling quantitative description of the human breast tumor microenvironment. eng. *Acta Biomaterialia* **132**, 473–488. ISSN: 1878-7568 (Sept. 2021).

173. Dankó, T. *et al.* Characterisation of 3D Bioprinted Human Breast Cancer Model for In Vitro Drug and Metabolic Targeting. *International Journal of Molecular Sciences* **23**, 7444. ISSN: 1422-0067. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9267600/> (2022) (July 2022).
174. Shi, W. *et al.* Embedded Bioprinting of Breast Tumor Cells and Organoids Using Low-Concentration Collagen-Based Bioinks. en. *Advanced Healthcare Materials* **n/a**. eprint: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/adhm.202300905>, 2300905. ISSN: 2192-2659. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/adhm.202300905> (2023).
175. Mollica, P. A. *et al.* 3D bioprinted mammary organoids and tumoroids in human mammary derived ECM hydrogels. eng. *Acta Biomaterialia* **95**, 201–213. ISSN: 1878-7568 (2019).
176. Blanco-Fernandez, B. *et al.* Bioprinting Decellularized Breast Tissue for the Development of Three-Dimensional Breast Cancer Models. *ACS Applied Materials & Interfaces* **14**. Publisher: American Chemical Society, 29467–29482. ISSN: 1944-8244. <https://doi.org/10.1021/acsmi.2c00920> (2022) (July 2022).
177. Comperat, L. *et al.* Harnessing Human Placental Membrane-Derived Bioinks: Characterization and Applications in Bioprinting and Vasculogenesis. en. *Advanced Healthcare Materials* **n/a**. eprint: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/adhm.202303370>, 2303370. ISSN: 2192-2659. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/adhm.202303370> (2023).
178. Iyengar, P. *et al.* Adipocyte-derived collagen VI affects early mammary tumor progression in vivo, demonstrating a critical interaction in the tumor/stroma microenvironment. eng. *The Journal of Clinical Investigation* **115**, 1163–1176. ISSN: 0021-9738 (May 2005).
179. Insua-Rodríguez, J. & Oskarsson, T. The extracellular matrix in breast cancer. eng. *Advanced Drug Delivery Reviews* **97**, 41–55. ISSN: 1872-8294 (Feb. 2016).
180. Gudjonsson, T. *et al.* Normal and tumor-derived myoepithelial cells differ in their ability to interact with luminal breast epithelial cells for polarity and basement membrane deposition. *Journal of Cell Science* **115**, 39–50. ISSN: 0021-9533. <https://doi.org/10.1242/jcs.115.1.39> (2023) (Jan. 2002).
181. Yilmaz, A., Bieler, G., Spertini, O., Lejeune, F. J. & Rüegg, C. Pulse treatment of human vascular endothelial cells with high doses of tumor necrosis factor and interferon-gamma results in simultaneous synergistic and reversible effects on proliferation and morphology. en. *International Journal of Cancer* **77**, 592–599. ISSN: 00207136, 10970215. <http://doi.wiley.com/10.1002/%28SICI%291097-0215%2819980812%2977%3A4%3C592%3A%3AAID-IJC20%3E3.0.CO%3B2-7> (2020) (Aug. 1998).
182. Orend, G. & Chiquet-Ehrismann, R. Tenascin-C induced signaling in cancer. *Cancer Letters* **244**, 143–163. ISSN: 0304-3835. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304383506001418> (2023) (Dec. 2006).

183. Norman, M. D. A., Ferreira, S. A., Jowett, G. M., Bozec, L. & Gentleman, E. Measuring the elastic modulus of soft culture surfaces and three-dimensional hydrogels using atomic force microscopy. en. Nature Protocols **16**. Number: 5 Publisher: Nature Publishing Group, 2418–2449. ISSN: 1750-2799. <https://www.nature.com/articles/s41596-021-00495-4> (2023) (May 2021).
184. Krouskop, T. A., Wheeler, T. M., Kallel, F., Garra, B. S. & Hall, T. Elastic Moduli of Breast and Prostate Tissues under Compression. en. Ultrasonic Imaging **20**. Publisher: SAGE Publications Inc, 260–274. ISSN: 0161-7346. <https://doi.org/10.1177/016173469802000403> (2024) (Oct. 1998).
185. Samani, A., Zubovits, J. & Plewes, D. Elastic moduli of normal and pathological human breast tissues: an inversion-technique-based investigation of 169 samples. en. Physics in Medicine & Biology **52**, 1565. ISSN: 0031-9155. <https://dx.doi.org/10.1088/0031-9155/52/6/002> (2024) (Feb. 2007).
186. Rizzuti, I. F. et al. Mechanical Control of Cell Proliferation Increases Resistance to Chemotherapeutic Agents. Physical Review Letters **125**. Publisher: American Physical Society, 128103. <https://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevLett.125.128103> (2024) (Sept. 2020).
187. Chen, M. B. et al. On-chip human microvasculature assay for visualization and quantification of tumor cell extravasation dynamics. en. Nature Protocols **12**, 865–880. ISSN: 1754-2189, 1750-2799. <http://www.nature.com/articles/nprot.2017.018> (2020) (May 2017).
188. Reid, J. A. et al. A 3D bioprinter platform for mechanistic analysis of tumoroids and chimeric mammary organoids. en. Scientific Reports **9**. Publisher: Nature Publishing Group. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6522494/> (2020) (2019).
189. Nerger, B. A., Brun, P.-T. & Nelson, C. M. Microextrusion Printing Cell-Laden Networks of Type I Collagen with Patterned Fiber Alignment and Geometry. Soft matter **15**, 5728–5738. ISSN: 1744-683X. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6639139/> (2020) (July 2019).
190. Swaminathan, S., Hamid, Q., Sun, W. & Clyne, A. M. Bioprinting of 3D breast epithelial spheroids for human cancer models. en. Biofabrication **11**. Publisher: IOP Publishing, 025003. ISSN: 1758-5090. <https://doi.org/10.1088%2F1758-5090%2Faafc49> (2020) (Jan. 2019).
191. Shi, X. et al. 3D printed intelligent scaffold prevents recurrence and distal metastasis of breast cancer. Theranostics **10**, 10652–10664. ISSN: 1838-7640. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7482818/> (2020) (Aug. 2020).
192. Campbell, A. et al. Novel Combinatorial Strategy Using Thermal Inkjet Bioprinting, Chemotherapy, and Radiation on Human Breast Cancer Cells; an In-Vitro Cell Viability Assessment. eng. Materials (Basel, Switzerland) **14**, 7864. ISSN: 1996-1944 (Dec. 2021).

193. Roza, L., Van Der Schans, G. & Lohman, P. The induction and repair of DNA damage and its influence on cell death in primary human fibroblasts exposed to UV-A or UV-C irradiation. en. Mutation Research/DNA Repair Reports **146**, 89–98. ISSN: 01678817. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0167881785900598> (2024) (July 1985).
194. Seo, E. S. et al. Decoding spatial organization maps and context-specific landscapes of breast cancer. en. Pages: 2023.10.25.563904 Section: New Results. Oct. 2023. <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2023.10.25.563904v2> (2024).
195. Hubbi, M. E. & Semenza, G. L. Regulation of cell proliferation by hypoxia-inducible factors. American Journal of Physiology-Cell Physiology **309**. Publisher: American Physiological Society, C775–C782. ISSN: 0363-6143. <https://journals.physiology.org/doi/full/10.1152/ajpcell.00279.2015> (2024) (Dec. 2015).
196. Giorello, M. B., Borzone, F. R., Labovsky, V., Piccioni, F. V. & Chasseing, N. A. Cancer-Associated Fibroblasts in the Breast Tumor Microenvironment. en. Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia. ISSN: 1573-7039. <https://doi.org/10.1007/s10911-020-09475-y> (2021) (Jan. 2021).
197. Mongiat, M., Andreuzzi, E., Tarticchio, G. & Paulitti, A. Extracellular Matrix, a Hard Player in Angiogenesis. en. International Journal of Molecular Sciences **17**. Number: 11 Publisher: Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 1822. ISSN: 1422-0067. <https://www.mdpi.com/1422-0067/17/11/1822> (2024) (Nov. 2016).
198. Eklund, L. et al. Lack of type XV collagen causes a skeletal myopathy and cardiovascular defects in mice. eng. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **98**, 1194–1199. ISSN: 0027-8424 (Jan. 2001).
199. Boudreau, N. & Myers, C. Breast cancer-induced angiogenesis: multiple mechanisms and the role of the microenvironment. Breast Cancer Research **5**, 140. ISSN: 1465-542X. <https://doi.org/10.1186/bcr589> (2024) (June 2003).
200. Krisnawan, V. E., Stanley, J. A., Schwarz, J. K. & DeNardo, D. G. Tumor Microenvironment as a Regulator of Radiation Therapy: New Insights into Stromal-Mediated Radioresistance. en. Cancers **12**. Number: 10 Publisher: Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2916. <https://www.mdpi.com/2072-6694/12/10/2916> (2021) (Oct. 2020).
201. Zhang, J., Zhang, L., Lin, Q., Ren, W. & Xu, G. Prognostic value of endoglin-assessed microvessel density in cancer patients: a systematic review and meta-analysis. Oncotarget **9**, 7660–7671. ISSN: 1949-2553. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5800934/> (2024) (Dec. 2017).
202. Wei, L.-F. et al. IGFBP2 in cancer: Pathological role and clinical significance (Review). Oncology Reports **45**. Publisher: Spandidos Publications, 427–438. ISSN: 1021-335X. <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/or.2020.7892> (2024) (Feb. 2021).
203. Waugh, D. J. & Wilson, C. The Interleukin-8 Pathway in Cancer. Clinical Cancer Research **14**, 6735–6741. ISSN: 1078-0432. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-4843> (2024) (Nov. 2008).

204. Pandey, P. *et al.* New insights about the PDGF/PDGFR signaling pathway as a promising target to develop cancer therapeutic strategies. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **161**, 114491. ISSN: 0753-3322. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0753332223002792> (2024) (May 2023).
205. Yang, J., McNeish, B., Butterfield, C. & Moses, M. A. Lipocalin 2 is a novel regulator of angiogenesis in human breast cancer. *The FASEB Journal* **27**, 45–50. ISSN: 0892-6638. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3528324/> (2024) (Jan. 2013).
206. Malekan, M. *et al.* BDNF and its signaling in cancer. en. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* **149**, 2621–2636. ISSN: 1432-1335. <https://doi.org/10.1007/s00432-022-04365-8> (2024) (June 2023).
207. Dudás, J. *et al.* Fibroblasts produce brain-derived neurotrophic factor and induce mesenchymal transition of oral tumor cells. *Oral Oncology* **47**, 98–103. ISSN: 1368-8375. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1368837510003350> (2024) (Feb. 2011).
208. Bordenave, L. *et al.* Endothelial cell compatibility testing of three different Pellethanes. en. *Journal of Biomedical Materials Research* **27**. eprint: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/jbm.820271104>, 1367–1381. ISSN: 1097-4636. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jbm.820271104> (2024) (1993).
209. Dekkers, J. F. *et al.* High-resolution 3D imaging of fixed and cleared organoids. en. *Nature Protocols* **14**. Number: 6 Publisher: Nature Publishing Group, 1756–1771. ISSN: 1750-2799. <https://www.nature.com/articles/s41596-019-0160-8> (2022) (June 2019).
210. Champion, O. *et al.* LRP-1 Matricellular Receptor Involvement in Triple Negative Breast Cancer Tumor Angiogenesis. eng. *Biomedicines* **9**, 1430. ISSN: 2227-9059 (Oct. 2021).
211. Van Rossum, G. & Drake, F. L. *Python 3 Reference Manual* ISBN: 978-1-4414-1269-0 (CreateSpace, Scotts Valley, CA, Feb. 2009).
212. Schindelin, J. *et al.* Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. en. *Nature Methods* **9**. Number: 7 Publisher: Nature Publishing Group, 676–682. ISSN: 1548-7105. <https://www.nature.com/articles/nmeth.2019> (2024) (July 2012).
213. Käll, L., Canterbury, J. D., Weston, J., Noble, W. S. & MacCoss, M. J. Semi-supervised learning for peptide identification from shotgun proteomics datasets. en. *Nature Methods* **4**. Number: 11 Publisher: Nature Publishing Group, 923–925. ISSN: 1548-7105. <https://www.nature.com/articles/nmeth1113> (2024) (Nov. 2007).
214. Klemm, A. H. Semi-automated analysis of dot blots using ImageJ/Fiji. en. *F1000Research* **9**, 1385. ISSN: 2046-1402. <https://f1000research.com/articles/9-1385/v1> (2023) (Dec. 2020).