

THESE DE DOCTORAT

NANTES UNIVERSITE

ECOLE DOCTORALE N° 605

Biologie-Santé

Spécialité : *Cancérologie*

Par

Camille JUBELIN

Développement de modèles tri-dimensionnels de culture cellulaire *in vitro* pour l'étude de la progression tumorale et le criblage de molécules thérapeutiques

Thèse présentée et soutenue à Nantes, le 27/06/2023

Unité de recherche : Unité en Sciences Biologiques et Biotechnologiques – UMR CNRS 6286

Rapporteurs avant soutenance :

Annie SCHMID-ALLIANA Directrice de recherche INSERM, Institut de Biologie Valrose, UMR7277 CNRS – UMR1091 INSERM, Université Côte d'Azur

Laura BROUTIER Chargée de recherche INSERM, Centre de Recherche En Cancérologie de Lyon, UMR1052 INSERM – UMR5286 CNRS, Université Claude Bernard Lyon 1

Composition du Jury :

Président : Catherine BOISSON-VIDAL Directrice de recherche CNRS, Innovative Therapies in Haemostasis, UMR_S1140, Université Paris Cité
Examineurs : Frédéric LEZOT Chargé de recherche INSERM, Childhood Genetic Diseases Laboratory, INSERM UMR_S933, Sorbonne Université

Dir. de thèse : Dominique HEYMANN PU-PH, Unité en Sciences Biologiques et Biotechnologiques, CNRS UMR6286, Nantes Université

Co-dir. de thèse : Lisa OLIVER Chercheuse CHU, HDR, CRCI2NA, INSERM UMR_S 1307 – CNRS UMR6075, Nantes Université

Invité(s)

Ronan LE BOT

Dr. en pharmacie, Directeur Atlantic Bone Screen

Ce travail a été réalisé avec le soutien financier de

Atlantic Bone Screen

dans le cadre d'une thèse CIFRE

Au sein des laboratoires

Unité en Sciences Biologiques et Biotechnologies

UMR CNRS 6286

Equipe 3 : Mécanisme de régulation de la réparation de l'ADN

Et

Laboratoire d'hétérogénéité Tumorale et Médecine de Précision

Institut de Cancérologie de l'Ouest



REMERCIEMENTS

Bien qu'un unique nom apparaisse au-dessus du titre de ce document, il me paraît important de souligner que cette thèse n'a pu aboutir que grâce à l'intervention d'une multitude de personnes.

Tout d'abord, merci aux **Pr. Bernard Hoffman** et **Fabrice Fleury** de m'avoir accueillie au sein du laboratoire US2B et de l'équipe 3 « Mécanisme et régulation de la réparation de l'ADN ».

Ensuite, je souhaite remercier l'ensemble des membres de mon jury d'avoir accepté de se déplacer depuis les quatre coins de la France pour assister à la soutenance de ce travail. Merci aux **Dr. Annie Schmid-Alliana** et **Laura Broutier** d'avoir accepté de relire cette thèse et d'en être les rapporteuses. Leurs remarques avisées et bienveillantes ont permis de parvenir à une thèse dont je n'ai pas à rougir. Merci également aux examinateurs, les **Dr. Catherine Boisson-Vidal** et **Frédéric Lézot**, dont ce dernier a également fait partie de mon comité de suivi de thèse et a donc pu suivre ce projet du début à la fin.

Je remercie également la société Atlantic Bone Screen, en particulier le **Dir. Ronan Le Bot**, d'avoir acceptés de me prendre en thèse CIFRE et d'avoir financé ces trois années de recherche. Merci à **Amélie Lebatard** et **Catherine Vincent** de m'avoir accueilli et guidé au sein du pôle Histologie de l'entreprise.

Je souhaite également remercier mon directeur de thèse, le **Pr. Dominique Heymann** de m'avoir encadré depuis mon premier stage en Master. Il a été un mentor attentif, disponible et avisé. Par-dessus tout, il m'a laissé la liberté de commettre mes propres erreurs qui ont été si formatrices, tout en intervenant dès que je m'égarais trop. Je souhaite à chaque doctorant d'avoir la chance de travailler avec un directeur de thèse tel que lui. Grâce à ses enseignements, je pense être prête à continuer vers de nouvelles aventures dans le monde de la recherche. Après tout, comme il me le disait à chaque fois que je déboulais dans son bureau paniquée et pleine de doute : « Je ne suis pas inquiète ». J'espère avoir un jour l'occasion de retravailler avec lui.

Merci également au **Dr. Lisa Oliver** d'avoir co-encadré cette thèse. Nos échanges scientifiques ont toujours été riches d'apprentissage pour moi, et elle a été ma fournisseuse officielle en produits et protocoles en tout genre pour que je puisse les tester dans le

contexte de mon projet. Merci pour sa disponibilité, son écoute et ses précieux conseils que ce soit pour la réalisation d'expérience ou la correction de reviews.

Je tiens à remercier chaleureusement mes collègues de l'équipe Hétérogénéité Tumorale et Médecine de Précision. Merci au duo de choc, Denis et Javier. **Denis Cochonneau**, qui m'a formé à mon arrivée au laboratoire il y a de cela 5 ans maintenant et qui est l'homme derrière les tris cellulaires par fluorescence réalisé lors de ce projet. **Javier Munoz-Garcia**, avec qui j'ai pu discuter de sciences ou tout simplement de la vie autour d'un café dès que j'en avais besoin. Votre sens de l'humour à tous les deux n'a jamais manqué de me faire rire et ce séminaire à Pamplona restera longtemps dans les annales. **Emilie Ollivier**, qui est l'experte en Nanostring de notre laboratoire. Nos longues séances de psy réciproque dans la salle du DepArray vont terriblement me manquer (c'est pour cela qu'il faut que tu convainques Dominique d'y installer une antenne relais pour que je puisse continuer à t'y appeler). **Laurie Fradet**, qui a toujours été arrangeante lorsqu'on se retrouvait à utiliser le microscope au même moment. Merci pour ta bonne humeur, tes dessins sur les poubelles de cultures et pour nos échanges passionnés sur Harry Potter.

A l'équipe du bureau des étudiants, merci pour les supers moments partagés. Vous êtes l'une des raisons qui faisaient que j'étais heureuse de venir travailler chaque jour. Tout d'abord, merci aux doctorants. **Gaëlle Saade**, merci de m'avoir suivie dans tous mes délires, même quand je te faisais tourner des vidéos absurdes pour féliciter la soutenance d'autres doctorants. Nos discussions, qu'elles soient professionnelles ou personnelles, joyeuses ou tristes, sont des souvenirs précieux. **Antoine Babuty**, même si on ne se voyait pas tous les jours, c'était toujours un plaisir de ~~me chamoier~~ discuter avec toi. Sauf peut-être lorsque tu planifiais ma mort... **Isidora Panez**, tes chansons qui restent dans la tête vont malgré tout me manquer. Je compte sur toi pour ne pas mener une vie trop facile à Javi ! **Maxime**, même si ce fut court, c'était suffisant pour que je me rende compte que tu es quelqu'un de foncièrement gentil et drôle. Bienvenue dans l'équipe, je sais que tu y seras comme un poisson dans l'eau. Je vous souhaite à tous pleins de bonheur (et de réussite) avec vos poissons zèbres, venins de serpents, billes fluorescentes et carottes histologiques. Merci également aux masters. A **Romain**, mon voisin de bureau qui a toléré mes tendances expansionnistes et qui partageait ma passion pour les diapos bien faits. A **Marie Porte**, mon

soutien sans faille lorsque les collègues avaient décidé de venir m'embêter. Je suis ta plus grande fan. Merci pour tes corrections sur ce mémoire de thèse.

Merci également aux autres membres du labo. En particulier, merci à **Nolwenn**, qui m'a toujours accueillie dans son bureau à bras ouvert lorsque j'avais une question (même lorsque c'était la quatrième fois que je la lui posais...). Merci à **Marie-Françoise Heymann**, **Axelle Renodon-Cornière**, **Vincent Potiron**, et **Christine Bobin-Dubigeon** pour les discussions passionnantes lors des réunions d'équipe. Merci à **Mathieu Chocry**, que j'aurais aimé connaître plus tôt. Bien que cela me tue de le dire, merci à **Arulraj Nadaradjane** dit ~~Papi~~ Shankar d'avoir été mon compagnon de troubles. Avec toi, impossible pour moi de m'ennuyer. Merci d'avoir assuré mon ravitaillement régulier en gâteau en tout genre lorsque mon taux de glucose tombait trop bas en fin d'après-midi.

Un grand merci également au **service technique de l'ICO**, qui accourait tel des super-héros dès qu'il y avait un souci.

Un immense merci à mes anciens collègues doctorants et amis, qui ont toujours répondu présents lorsque je les appelais à l'aide. Merci à **Joséphine Briant**, Queen Josy, qui été là lorsque je suis arrivée en master et qui a toujours été un peu la ~~maman~~ mamie du laboratoire, même une fois partie de l'autre côté de l'océan Atlantique. Merci à **Marie Cadé.**, ma plus vieille partenaire. Nos sessions karaoké en salle de culture me manquent terriblement, ainsi que nos balades pleines de philosophie. L'obtention de ton doctorat a été un évènement doux-amer pour moi, mêlant fierté de te voir réussir et tristesse de te voir partir. Merci à **Manon Duforestel**, dite Dufofo, qui a toujours été un bonheur à côtoyer. Tu as une intelligence émotionnelle exceptionnelle, et tu étais toujours la première à savoir quand ça n'allait pas. Merci pour ton soutien indéfectible. Merci à **Aurélie Loussouarn**, la gardienne des fêtes d'Halloween, de Noël et de Pâques. Tu es l'une des personnes les plus gentille et bienveillante qu'il m'ait été donné de rencontrer et, bien que les causes soient à déplorer, je me réjouie que tu es rejoins le laboratoire en cours de thèse. Merci à **Thomas Delpirou**, dont l'humour bourré de pop-culture m'a toujours fait tant rire. Merci également pour les séances véto gratuites lorsque vous veniez toi et Aurélie vous occuper d'Albus (et pour avoir volé au secours de notre chat lorsqu'il était blessé). Merci à **Florestan Courant**, avec qui j'ai pu débattre de tout et de rien, et qui a été un monteur vidéo de génie et un véritable pizzaiolo en herbe (même si je maintiens que tes pizzas seraient des chefs-d'œuvre

s'il y avait un peu moins de fromage...). Je pourrais m'épancher sur des pages entières si je décrivais tout ce que je vous dois, mais je dirais simplement qu'à chaque fois que j'étais au plus bas au cours de ces trois dernières années, l'un d'entre vous était invariablement à mes côtés. Et c'est à cela que l'on reconnaît les vrais amis.

Je remercie également ma famille et ma belle-famille, qui ont toujours été très compréhensif et patients avec mes horaires de travail absurdes qui limitaient mes visites. A mon **frère**. Maintenant que je suis censée être une adulte respectable, je dois t'avouer que j'ai menti : tu n'es pas adopté. A mes grand-mères, **Mamie** et **Mamico**. Vous avez toujours cru en moi et été mes plus grandes supportrices. A mes **parents**, qui ont toujours été derrière moi. C'est grâce à tes capacités de planification militaire **maman** et à ta théorie du GBS **papa** que j'en suis arrivée là.

Enfin je souhaite remercier la personne qui partage ma vie depuis plus de 5 ans maintenant. **Emilien Orgebin**, tu as été là tout au long de cette aventure, dont tu as vécu chaque instant avec moi. Je pense sincèrement que je ne serais pas parvenue à réaliser la moitié de ce que j'ai accomplie si tu n'avais pas été à mes côtés. Je sais que je n'ai pas toujours été facile à vivre en particulier lorsque je me noyais dans mes doutes et me laissais gouverner par mon manque de confiance en moi, mais ton soutien sans faille m'a permis de repartir de l'avant à chaque fois un peu plus forte. C'était un véritable défi d'être doctorant en même temps, et encore plus de décider de soutenir à un jour d'intervalle. Je sais qu'un certain nombre de gens dans notre entourage s'inquiétait de nous voir éclater en vol sous la pression. Mais nous avons remporté ce pari haut là main, et j'ai le sentiment que nous en sommes ressortis plus fort. Avec toi, je me sens désormais prête à affronter toutes les épreuves que la vie pourra nous lancer. Tu as tout mon amour et bien plus encore (en revanche, le chat reste à mon nom).

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique	OCN	Ostéocalcine
Ang1	Angiopoietin 1	ONN	Ostéonectine
Ang2	Angiopoietin 1	OPN	Ostéopontine
ARN	Acide ribonucléique	PCL	Polycaprolactone
ATP	Adenosine triphosphate	PDGF	Platelet derived cell growth factor
BAX	BCL2 associated X protein	PD-L1	Programmed Death Ligand 1
BCL-2	B-cell lymphoma 2	PDMS	Polydimethylsiloxane
BIM	Bcl-2 Interacting Mediator of cell death	PGA	Poly(glycolic acid)
BMP	Bone morphogenetic protein	PLA	Poly(lactic acid)
BSP	Bone sialoprotein	PLGA	Poly(lactic-co-glycolic acid)
CDK	Cyclin-dependant kinase	PUMA	p53 upregulated modulator of apoptosis
COL-I	Collagène de type I	RANKL	Receptor activator of nuclear factor κ -B ligand
CSA	Cellule souche adulte	RB	Retinoblastoma protein
CSC	Cellule souche cancéreuse	RCCS	Rotary cell culture system
CSE	Cellule souche embryonnaire	RE	Reticulum endoplasmique
CSH	Cellule souche hématopoïétique	RO	Récepteur aux oestrogène
CSM	Cellule souche mésenchymateuse	ROS	Reactiv oxygen species
CSPi	Cellule souche pluripotente induite	RUNX2	Runt-related transcription factor 2
CTC	Cellule tumorale circulante	SAP	Self-assembling peptide
CTD	Cellule tumorale disséminée	SASP	Senescence-associated secretory phenotype
ESMO	European Society of Medical Oncology	SA- β -Gal	Senescence-associated β -galactosidase
FAC	Fibroblaste associé au cancer	SC	Stalk cell
FAS	Fas cell surface death receptor	SCLC	Small cell lung cancer
FGF	Fibroblast growth factor	SIPS	Stress-induced prematur senescence
GAG	Glycosaminoglycane	TAM	Tumor associated macrophage
HA	Hydroxyapatite	TC	Tip cell
HD	Hanging drop	TDM	Tomodensitométrie
HIF	Hypoxia-inducible factor	TEM	Transition épithélio-mésenchymateuse
IL-6	Interleukin-6	TGF- β	Tumor growth factor beta
IRM	Imagerie en résonance magnétique	TiMPs	Tissue inhibitors
LOT	Liquid overlay technique	TME	Transition mésenchymato-épithéliale
M-CSF	Macrophage colony-stimulating factor	TNF	Tumor necrosis factor
MDSC	Myeloid-derived suppressor cell	TP53	Tumor protein P53
MEC	Matrice extracellulaire	Treg	Lymphocyte T régulateur
NK	Natural killer	TSP	Thrombospondin
NSCLC	Non-small cell lung cancer	VEGF	Vascular endothelial growth factor

SOMMAIRE

SOMMAIRE	1
LISTE DES FIGURES.....	5
LISTE DES TABLEAUX.....	8
PARTIE I - INTRODUCTION.....	9
1. LE CANCER 11	
1.1. LE CANCER DE L'ANTIQUITE A NOS JOURS	11
1.1.1. <i>A propos de l'histoire du cancer et du cancer dans l'Histoire</i>	12
1.1.1.1. Un peu d'étymologie	12
1.1.1.2. L'évolution du concept de cancer au cours des millénaires	12
1.1.2. <i>Définitions actuelles du cancer</i>	15
1.1.2.1 Les cancers partagent des caractéristiques communes	15
1.2. LE CANCER DE L'OS.....	21
1.2.1. <i>Le tissu osseux sain</i>	21
1.2.1.1. Composante cellulaire de l'os.....	22
1.2.1.2. Composante acellulaire de l'os.....	24
1.2.1.3. Modelage et remodelage osseux.....	26
1.2.2. <i>Cancer primaire de l'os : le cas de l'ostéosarcome</i>	28
1.2.2.1. Fréquence de la maladie et classification des ostéosarcomes	28
1.2.2.2. Etiologie.....	31
1.2.2.3. Diagnostic, traitement et pronostic.....	33
2. MODÈLES 3D APPLIQUÉS AUX CANCERS 37	
2.1. CULTURES CELLULAIRES 2D VS. 3D	38
2.1.2. <i>Aller plus loin dans le mimétisme de la maladie : sphéroïdes et organoïdes</i>	39
2.1.3. <i>Pourquoi et comment la culture cellulaire 3D peut combler l'écart entre les études in vitro et in vivo ?</i>	41
2.2. LES TYPES DE MODELES CELLULAIRES 3D ET LEURS APPLICATIONS EN ONCOLOGIE.....	42
2.2.1. <i>Modèles de culture 3D en milieu liquide</i>	42
2.2.1.1. La culture en submersion liquide ou <i>liquid overlay technique</i>	43
2.2.1.2. La culture en goutte pendante ou <i>hanging drop</i>	44
2.2.1.3. La culture par agitation.....	45
2.2.1.4. La lévitation magnétique	46
2.2.2. <i>Modèles de culture 3D sur support</i>	47
2.2.2.1. Supports de culture 3D d'origine naturelle	48
2.2.2.2. Supports 3D de culture cellulaire d'origine synthétique	50

SOMMAIRE

2.2.3. Modèles émergents de culture cellulaire 3D	53
2.2.3.1. Les plateformes microfluidiques	53
2.2.3.2. La bio-impression 3D	54
2.2.4. Etudier l'ostéosarcome en 3D	55
2.2.4.1. Développement, criblage et résistance aux traitements	58
2.2.4.2. Induction d'un phénotype souche et amplification de CSC	59
2.2.4.3. Progression tumorale	59
2.3. A CHAQUE APPLICATION SON MODELE 3D	60
3. LA DORMANCE CANCÉREUSE 63	
3.1. DEFINITIONS : DORMANCE DES ORGANISMES ET DORMANCE CANCEREUSE.	63
3.1.1. La dormance est un processus biologique conservé au cours de l'évolution des espèces	64
3.1.2. Le concept de dormance cancéreuse trouve son origine dans la clinique	66
3.2. DEUX TYPES DE DORMANCE : LA DORMANCE DE LA MASSE TUMORALE ET LA DORMANCE CELLULAIRE CANCEREUSE	69
3.2.1. Dormance de la masse tumorale	70
3.2.1.1. Dormance angiogénique.....	71
3.2.1.2. Dormance immunologique	74
3.2.1.3. Une forme de dormance n'en exclue pas une autre	77
3.2.2. Dormance cellulaire cancéreuse	80
3.2.2.1. Arrêt du cycle cellulaire : qui de la sénescence ou de la quiescence ?	81
3.2.2.2. Réversibilité	86
3.2.2.3. Résistance à la mort	88
3.2.2.4. Dépendance à la niche.....	90
PARTIE II - MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	95
1. LISTE DES PRODUITS COMMERCIAUX 97	
2. CULTURE CELLULAIRE 100	
2.1. LIGNEES CELLULAIRES ET MILIEU DE CULTURE	100
2.2. CULTURE 2D	100
2.2. CULTURE 3D	101
2.2.1. Culture en LOT	101
2.2.2. Culture en HD.....	101
2.2.2.1. Matrice de méthylcellulose	101
2.2.2.2. Matrice de Geltrex™	102
3. MARQUAGE CELLULAIRE ET IMAGERIE 103	
3.1. COLORATION DE CELLULES VIVANTES	103
3.1.1. Marquage de la membrane cellulaire avec un colorant fluorescent lipophile.....	103
3.1.2. Marquage de noyau des cellules vivantes	103

SOMMAIRE

3.1.3. Détection de la viabilité cellulaire par marquage au LIVE/DEAD™	104
3.2. HISTOCHEMIE	104
3.2.1. Préparation des cytoblocks.....	104
3.2.2. Coloration histochimique HE.....	105
3.2. MICROSCOPIE	105
4. TRAITEMENTS DES CELLULES 106	
4.1. siRNA ET TRANSFECTION TRANSITOIRE	106
4.2. CHIMIOThERAPIE.....	106
5. BIOLOGIE MOLÉCULAIRE 107	
5.1. EXTRACTION, QUANTIFICATION ET REVERSE TRANSCRIPTION DE L'ARN	107
5.2. qPCR	107
5.3. NANOSTRING™	108
6. BIOCHIMIE 109	
6.1. MESURE DE LA MORTALITE PAR RELARGAGE LDH.....	109
7. TESTS STATISTIQUES 110	
PARTIE III - RÉSULTATS.....	112
1. COMPARAISON DE METHODES DE CULTURE 3D EN MILIEU LIQUIDE POUR LA GENERATION DE SPHEROÏDES REPETABLES ET LE CRIBLAGE DE MOLECULES DE CHIMIOThERAPIE 113	
1.1. TOUTES LES LIGNEES CANCEREUSES NE SONT PAS CAPABLES DE FORMER SPONTANEMENT DES SPHEROÏDES EN CONDITION LOT	114
1.2. LA FORME DU SUPPORT DE CULTURE JOUE UN ROLE SUR L'HOMOGENEITE DES SPHEROÏDES GENERES	116
1.3. LA CONCENTRATION D'ENSEMENCEMENT N'A PAS D'IMPACT SUR LA REPETABILITE DES SPHEROÏDES GENERES, MAIS INFLUE LA VITESSE D'AGREGATION	120
1.4. LA METHODE DE CULTURE EN HD N'AMELIORE PAR LA REPETABILITE DES SPHEROÏDES GENERES PAR RAPPORT AU LOT EN PLAQUE A FOND ARRONDI	123
1.5. LA CULTURE EN 3D DIMINUE LA SENSIBILITE AU TRAITEMENT A LA DOXORUBICINE DES CELLULES MNNG/HOS PAR RAPPORT A LA CULTURE EN 2D	123
2. CULTURE EN 3D DE LIGNÉES CELLULAIRES D'OSTEOSARCOME POUR L'ETUDE DE LA DORMANCE CANCEREUSE 129	
2.1. LA CULTURE EN 3D FAVORISE UN RALENTISSEMENT DE LA PROLIFERATION CELLULAIRE DE PLUSIEURS LIGNEES D'OSTEOSARCOME.....	131
2.2. LES LIGNEES CELLULAIRES D'OSTEOSARCOME CULTIVEES EN 3D PRESENTENT DES PROFILS MORPHOLOGIQUES DIFFERENTS .	131
2.3. LE MICROENVIRONNEMENT TUMORAL JOUE UN ROLE DANS LA DORMANCE CANCEREUSE DES CELLULES CULTIVEES EN 3D..	133

SOMMAIRE

2.4. LES CELLULES ENCORE POSITIVES AU DiD APRES PLUS D'UN MOIS DE CULTURE PRESENTENT UNE SIGNATURE TRANSCRIPTOMIQUE DIFFERENTE DES CELLULES AYANT PERDUES LEUR MARQUAGE	135
2.5. LE TRAITEMENT DES CELLULES AVEC DES siRNA ENTRAINE UNE MODIFICATION DE LA PROLIFERATION CELLULAIRE	137
2.6. LA SOUS-EXPRESSION DES GENES DE LA SIGNATURE POURRAIT AVOIR UN EFFET SUR LA MORPHOLOGIE ET LA VIABILITE DES CELLULES CANCEREUSE.....	139
2.7. IMPACT DE LA SOUS-EXPRESSION DES GENES DE LA SIGNATURE TRANSCRIPTOMIQUE SUR LA SENSIBILITE AUX TRAITEMENTS	142
3. FIGURES SUPPLEMENTAIRES	145

PARTIE IV - DISCUSSION.....155

1. COMPARAISON DE METHODES DE CULTURE 3D EN MILIEU LIQUIDE POUR LA GENERATION DE SPHEROÏDES REPETABLES ET LE CRIBLAGE DE MOLECULES DE CHIMIOTHERAPIE	157
1.1. LA MORPHOLOGIE DES SPHEROÏDES FORMES SPONTANEMENT PAR LOT DEPEND DES LIGNEES ET POURRAIT TEMOIGNER DE LA VARIABILITE INTER-TUMORALE	157
1.2. LORSQUE CULTIVES PAR LOT EN PLAQUE A FOND ARRONDI, LES SPHEROÏDES GENERES SONT HAUTEMENT REPETABLES ET SUIVENT DEUX SCHEMAS POSSIBLES D'EVOLUTION MORPHOLOGIQUE	158
1.3. LES SPHEROÏDES ONT UNE TAILLE LIMITE	160
1.4. LES SPHEROÏDES SONT DES MODELES ADAPTES AU CRIBLAGE DE MOLECULES THERAPEUTIQUES	162
2. CULTURE EN 3D DE LIGNÉES CELLULAIRES D'OSTEOSARCOME POUR L'ETUDE DE LA DORMANCE CANCEREUSE	165
2.1. LES SPHEROÏDES SONT DES MODELES DE CULTURE PERTINENTS POUR ETUDIER LA DORMANCE TUMORALE	165
2.2. LA MEC EST UN ACTEUR CLE DE LA REGULATION DE LA DORMANCE CANCEREUSE.....	167
2.3. LES GENES SOUS-EXPRIMES DANS LES CELLULES DiD ⁺ SONT COHERENTS AVEC UNE SIGNATURE DE LA DORMANCE.....	168
2.4. LA SOUS-EXPRESSION DES GENES DE LA SIGNATURE TRANSCRIPTOMIQUE INFLUE SUR LE PROFIL DES COURBES DU CI	171
2.5. LA SOUS-EXPRESSION DES GENES DE LA SIGNATURE AGIRAIT SUR LA MORPHOLOGIE ET LA VIABILITE DES CELLULES CANCEREUSES PLUTOT QUE SUR LA PROLIFERATION CELLULAIRE	173
2.6. LA SOUS-EXPRESSION D'ETV4, RAD21 ET UBE2T DIMINUERAIT LA SENSIBILITE DES CELLULES A LA CHIMIOTHERAPIE.	174
3. CONCLUSION	177

BIBLIOGRAPHIE.....181

ANNEXES.....205

LISTE DES FIGURES

PARTIE I - INTRODUCTION

Chapitre 1. Le cancer

FIGURE I.1.1. FRISE CHRONOLOGIQUE DES PRINCIPALES AVANCEES DANS LA RECHERCHE SUR LE CANCER	14
FIGURE I.1.2. LES <i>HALLMARKS</i> DU CANCER.....	15
FIGURE I.1.3. DIFFERENCIATION OSTEOCLASTIQUE ET OSTEOBLASTIQUE	23
FIGURE I.1.4. MODELAGE OSSEUX	26
FIGURE I.1.5. REMODELAGE OSSEUX	28
FIGURE I.1.6. EPIDEMIOLOGIE DE L'OSTEOSARCOME	29
FIGURE I.1.7. STRATEGIE THERAPEUTIQUE GENERALE POUR L'OSTEOSARCOME	34

Chapitre 2. Modèles 3D appliqués aux cancers

FIGURE I.2.1. ORGANISATION SPATIALE DES CULTURES EN 2D VS. 3D.....	39
FIGURE I.2.2. SPHEROÏDES VS. ORGANOÏDES.....	40
FIGURE I.2.3. CULTURE 3D EN MILIEU LIQUIDE	43
FIGURE I.2.4. EXEMPLE DE MODELE DE CULTURE 3D EN PLATEFORME MICROFLUIDIQUE	52
FIGURE I.2.5. METHODES DE BIO-IMPRESSON 3D	55

Chapitre 3. La dormance cancéreuse

FIGURE I.3.1. DUREE DE LA DORMANCE CANCEREUSE EN FONCTION DES CANCERS	68
FIGURE I.3.2. DIFFERENTS TYPES DE DORMANCE CANCEREUSE.....	70
FIGURE I.3.3. MECANISMES DE VASCULARISATION DES TUMEURS	73
FIGURE I.3.4. ROLE DU SYSTEME IMMUNITAIRE SUR L'IMMUNOGENICITE DES TUMEURS.....	75
FIGURE I.3.5. LES TROIS ETAPES DE L'IMMUNOEDITION DU CANCER	76
FIGURE I.3.6. INTERACTION ENTRE L'ANGIOGENESE ET LA REGULATION IMMUNITAIRE DANS LE MICROENVIRONNEMENT TUMORA.....	79
FIGURE I.3.7. LES <i>HALLMARKS</i> DE LA DORMANCE CANCEREUSE.....	81
FIGURE I.3.8. LE CYCLE CELLULAIRE	82
FIGURE I.3.9. HETEROGENEITE TUMORALE	85
FIGURE I.3.10. ROLE DES NICHES DANS LE CONTROLE DE LA DORMANCE DES CELLULES TUMORALES DISSEMINÉES.....	92

PARTIE III - RÉSULTATS

Chapitre 1. Comparaison de méthodes de culture 3D en milieu liquide pour la génération de sphéroïdes répétables et le criblage de molécules de chimiothérapie

FIGURE III.1.1. CARACTERISATION MORPHOLOGIQUE DE DIFFERENTES LIGNEES CELLULAIRES CANCEREUSES CULTIVEES PAR LOT DANS DES PLAQUES DE CULTURE 96-PUITS A FOND PLAT	115
FIGURE III.1.2. COMPARAISON DE L'IMPACT DU TYPE DE PLAQUE DE CULTURE UTILISE SUR LA REPETABILITE DES SPHEROÏDES GENERES PAR LOT	118
FIGURE III.1.3. MECANISME DE FUSION DES SPHEROÏDES AU COURS DU TEMPS.....	119
FIGURE III.1.4. COMPARAISON DE L'EFFET DU VOLUME DE CULTURE SUR LA MORPHOLOGIE DES SPHEROÏDES 10 JOURS APRES ENSEMENCEMENT	121
FIGURE III.1.5. ROLE DE LA CONCENTRATION INITIALE D'ENSEMENCEMENT SUR LA VITESSE D'AGREGATION .	122
FIGURE III.1.6. IMPACT DE LA METHODE DE CULTURE SUR LA REPETABILITE DES SPHEROÏDES GENERES.....	124
FIGURE III.1.7. COMPARAISON QUALITATIVE DE LA SENSIBILITE A UN TRAITEMENT DE CHIMIOTHERAPIE DE CELLULES MNNG/HOS CULTIVEE EN 2D OU EN 3D.....	125
FIGURE III.1.8. COMPARAISON QUANTITATIVE DE LA SENSIBILITE A UN TRAITEMENT DE CHIMIOTHERAPIE DE CELLULES MNNG/HOS CULTIVEES EN 2D OU EN 3D	128

Chapitre 2. Culture en 3D de lignées cellulaires d'ostéosarcome pour l'étude de la dormance cancéreuse

FIGURE III.2.1. COMPARAISON DE LA DILUTION DU DID ENTRE LES CULTURES 2D ET 3D	130
FIGURE III.2.2. CARACTERISATION MORPHOLOGIQUE DE DIFFERENTES LIGNEES CELLULAIRES D'OSTEOSARCOMES CULTIVEES EN 3D PAR LOT	132
FIGURE III.2.3. IMPACT DU MICROENVIRONNEMENT SUR LA DORMANCE CANCEREUSE	134
FIGURE III.2.4. DETECTION D'UNE SIGNATURE TRANSCRIPTOMIQUE DE LA DORMANCE CANCEREUSE	136
FIGURE III.2.5. EVALUATION DE LA PROLIFERATION CELLULAIRE EN FONCTION DES TRAITEMENTS DE SIRNA .	138
FIGURE III.2.6. IMPACT DE LA SOUS-EXPRESSION DES GENES SUR LA PROLIFERATION, LA MORPHOLOGIE ET LA VIABILITE CELLULAIRE	140
FIGURE III.2.7. SENSIBILITE DES CELLULES A UN TRAITEMENT A LA DOXORUBICINE EN FONCTION DES GENES SOUS-EXPRIMES	142

Chapitre 3. Figures supplémentaires

FIGURE SUPPLEMENTAIRE III.3.1. EVOLUTION MORPHOLOGIQUE DES SPHEROÏDES CULTIVES PAR LOT	145
FIGURE SUPPLEMENTAIRE III.3.2. EVOLUTION MORPHOLOGIQUE DES SPHEROÏDES CULTIVES PAR HD	147

LISTE DES FIGURES

FIGURE SUPPLEMENTAIRE III.3.3. CORRELATION ENTRE LA TAILLE ET LE NOMBRE DE CELLULES CONTENUS PAR UN SPHEROÏDE	149
FIGURE SUPPLEMENTAIRE III.3.4. IMAGES DE MICROSCOPIE ILLUSTRANT LA DECROISSANCE DU DID AU COURS DU TEMPS ENTRE DES LIGNEES D'OSTEOSARCOME CULTIVEES EN 2D OU EN 3D	150
FIGURE SUPPLEMENTAIRE III.3.5. IMAGES DE MICROSCOPIE ILLUSTRANT L'EVOLUTION DE LA MORPHOLOGIE DES SPHEROÏDES AU COURS DU TEMPS	151
FIGURE SUPPLEMENTAIRE III.3.6. HISTOGRAMME REPRESENTATIF DU TRI CELLULAIRE DES CELLULES MNNG/HOS DID- VS. DID+	152
FIGURE SUPPLEMENTAIRE III.3.7. STRING REPRESENTANT LES INTERACTIONS PROTEIQUES DES GENES SELECTIONNES POUR UNE ETUDE PLUS APPROFONDIES DE LEUR IMPLICATION DANS LA DORMANCE CANCEREUSE	153
FIGURE SUPPLEMENTAIRE III.3.8. GENES REGULES PAS LES INTERFERONS	154

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU I.1.1. CLASSIFICATION DES OSTEOSARCOMES	30
TABLEAU I.2.1. LISTE DES POLYMERES NATURELS ET SYNTHETIQUES UTILISES POUR LA PRODUCTION DES SUPPORTS DE CULTURE 3D	49
TABLEAU I.2.2. TYPES DE BIO-IMPRESSON, MECANISMES, AVANTAGES ET DESAVANTAGES	56
TABLEAU I.3.1. COMPARAISON DES CARACTERISTIQUES DE LA SENESCENCE ET DE LA QUIESCENCE	82
TABLEAU II.1.1. LISTE DES PRODUITS COMMERCIAUX	97
TABLEAU II.5.1. SEQUENCES DES AMORCES	107
TABLEAU III.1.1. CLASSIFICATION DES LIGNEES CELLULAIRES EN FONCTION DE LEUR CAPACITE A FORMER SPONTANEMENT DES SPHEROÏDES ET DE LEURS CARACTERISTIQUES MORPHOLOGIQUES QUALITATIVES	116

PARTIE I

INTRODUCTION



1. LE CANCER

Le cancer englobe une multiplicité de pathologies dont l'émergence est due à des cellules qui se départissent des lois biologiques régulant l'organisme et adoptent un comportement anormal pouvant mettre en danger le ou les tissus à proximité.

1.1. Le cancer de l'Antiquité à nos jours

Responsable de près de 10 millions de morts en 2020, le cancer est la seconde cause de décès non naturels dans le monde, et la première dans les pays développés (Sung et al., 2021). Selon les estimations, le cancer pourrait même détrôner les maladies cardiovasculaires dans les décennies à venir (Bray et al., 2021) et voir le nombre de nouveaux cas diagnostiqués en 2040 augmenter de 47% par rapport à 2020 (Sung et al., 2021).

Ces chiffres peuvent grandement être expliqués par le vieillissement de la population, l'augmentation de l'exposition aux oncogènes et un diagnostic plus précoce en lien avec des technologies de détection de plus en plus performantes. De fait, le cancer est parfois désigné comme la « maladie du siècle » ou « la maladie moderne par excellence ». Ce discours donne l'idée que le cancer est une maladie humaine récente qui résulterait uniquement de l'industrialisation. En réalité, le cancer est une pathologie millénaire dont souffrait déjà nos ancêtres comme en témoigne le cas d'un ostéosarcome détecté chez une momie (Capasso, 2005). Un exemple encore plus ancien de cette maladie peut être retrouvé chez les dinosaures. En effet, un spécimen de l'espèce *Centrosaurus apertus* (herbivore à corne et à collerette de 5 mètres de long, 2 mètres de haut et pesant près de 2 tonnes) datant d'environ 75 millions d'années présente un cas d'ostéosarcome (Ekhtiari et al., 2020).

1.1.1. A propos de l'histoire du cancer et du cancer dans l'Histoire

1.1.1.1. Un peu d'étymologie

Bien que les premiers écrits médicaux décrivant ce que l'on suppose être un cancer peuvent être retrouvés dans les papyrus Edwin Smith (Breasted, 1930) et Ebers datés d'environ 1600 av. J.-C., le terme « cancer » n'est cependant utilisé pour la première fois qu'au 1^{er} siècle av. J.-C. par le polygraphe romain Aulus Cornelius Celsus dans son œuvre *De Medicina* (CELSUS, 1876). Celsus s'inspire des textes hippocratiques rédigés plus de trois siècles plus tôt, qui décrivaient des cas de protubérances tissulaires parfois cancéreuses et les nommaient *καρκίνος* (*karkinos*). « *karkinos* » et « *cancer* » se traduisent tous deux par « crabe », et la similitude entre le crustacé aux multiples pattes et la masse tumorale aux nombreux vaisseaux pourrait expliquer le choix de cette terminologie. Plus tard, Claude Galien nommera les tumeurs *ὄγκος* (*oncos*) qui veut dire « masse, gonflement » en grec, et qui se traduit par *tumor* en latin. Les mots « oncologie » et « tumeur » seront respectivement dérivés de ces termes.

1.1.1.2. L'évolution du concept de cancer au cours des millénaires

Hippocrate de Kos (460 – 377 av. J.C.) est le premier à proposer une origine naturelle plutôt que spirituelle au cancer, et aux maladies de manière plus large. Il élabore la théorie humorale, selon laquelle le corps est divisé en quatre substances appelées « humeurs » – le sang, la lymphe, la bile noire et la bile jaune. C'est le déséquilibre entre ces humeurs qui est responsable de l'apparition des maladies, des malformations et des handicaps. Il ne parvient cependant pas à faire la différence entre tumeur bénigne et tumeur maligne.

Cette doctrine sera adoptée par les successeurs d'Hippocrate, qui l'affineront et la préciseront. Ainsi, Aulus Cornelius Celse (25 av. J.C. – 50) souligne l'existence de deux types de cancers, le *cacoethes* que l'on peut réséquer et qui ne réapparaît pas, et le *carcinoma* pour lequel le traitement aggrave la santé du patient alors que le simple recours à des soins palliatifs permet généralement au malade de vivre plus longtemps. Il reconnaît cependant que seul le temps et l'expérience peut permettre de distinguer un *cacoethes* d'un *carcinomas*. Il décrit également le caractère invasif du cancer, qui « *se dissémine rapidement et pénètre jusque dans les os et dévore ainsi la chair* » (CELSUS, 1876). Claude Galien (129 – 201) précisera le rôle de la bile noire dans la genèse des cancers, celle-ci stagnant et se

solidifiant à l'endroit où la maladie doit apparaître. Il classifera en plusieurs catégories les grosseurs et son traité *De tumoribus praeter naturam* (LYTTON and RESUHR, 1978) (trad. fr. : *Des tumeurs contre nature*) est le plus ancien document dédié aux tumeurs en tout genre. Malheureusement, à l'instar de ses prédécesseurs, il ne parvient pas à faire la différence entre grosseurs inflammatoires et cancer véritable. De fait, bien qu'elle ait le mérite de se baser sur l'observation et le raisonnement, la théorie des humeurs d'Hippocrate puis de Galien limitera en réalité la compréhension de la maladie cancéreuse pendant de nombreux siècles.

S'en suit une longue période de stagnation des connaissances médicales. Celle-ci s'explique par l'hégémonie du galénisme dans l'Empire byzantin, puis en Europe occidentale durant la deuxième moitié du Moyen Âge, qui se fait en parallèle d'une interdiction pontificale de la pratique de la chirurgie par les ecclésiastiques, alors principaux détenteurs du savoir médical (Santoni-Rugiu and Sykes, 2007). C'est seulement au 16^{ème} siècle, soit plus d'un millénaire après la mort de son auteur, que le dogme galénique commence à être remis en question. Certains médecins, tels que Paracelse et André Vésale, encouragent l'apprentissage de la médecine par l'expérience et non pas uniquement par l'étude théorique des textes anciens qui font alors autorités. Pour appuyer ses propos, Vésale publie un recueil d'anatomie humaine – *De humani corporis fabrica* – de plus de 700 pages, où il met en évidence les nombreuses erreurs anatomiques faites par Galien (Joutsivuo, 1997). On tente alors d'expliquer la carcinogenèse autrement que par la bile noire, comme par une accumulation de sels minéraux, ou, une fois le système lymphatique découvert au 17^{ème} siècle par Gaspard Aselli et Jacques Pecquet, de lymphe. Force est de constater que, malgré leur volonté de révolutionner le monde médical alors encore entravé par la philosophie scolastique, ces médecins humanistes ne parviennent pas à se détacher complètement de la théorie des humeurs, dont le fond reste le même pendant encore 200 ans jusqu'à l'avènement de la théorie cellulaire. Cette période comprend cependant quelques brillantes observations qu'il est important de souligner. Ainsi, au milieu du 16^{ème} siècle, Henri-François Le Dran propose que le cancer soit une maladie localisée au début, qui peut s'étendre par la suite dans l'organisme par le biais des réseaux sanguins et lymphatiques. Dans le cas du cancer du sein, en plus de la mastectomie, il préconise le retrait des « glandes sous l'aisselle » (les ganglions lymphatiques envahis). A la même période, Giovanni Batista Morgagni publie son livre *De Sedibus, et Causis Morborum per Anatomen Indaqatis* (trad. fr. : *Recherches anatomiques*

sur le siège et les causes des maladies) qui rassemble les résultats de 700 autopsies corrélés aux données cliniques observées du vivant des patients, dont 17 cas de cancer. Il devient ainsi l'un des fondateurs de la discipline d'anatomie pathologique.

A la fin des années 1830, Theodor Schwann et Matthias Schleiden démontrent que la plus petite unité vivante est la cellule, et que tous les organismes, végétaux comme animaux, en sont composés (Schwann, 1839; Schwann and Schleyden, 1847). Johannes Müller, alors le maître de Schwann, applique les observations de son élève au domaine de la cancérologie. Il déclare que les cancers ne sont non pas de la lymphe accumulée, mais des masses cellulaires. Il est le premier à faire une comparaison histologique des tissus sains et des tissus malades, ce qui lui permet d'établir une ébauche de classification des tumeurs (Müller, 1840). Rudolf Virchow, un autre élève de Müller, va plus loin et propose que les cellules cancéreuses soient en réalité issues de cellules saines qui auraient été irritées. La notion de pathologie cellulaire est née (**Figure I.1.1**).

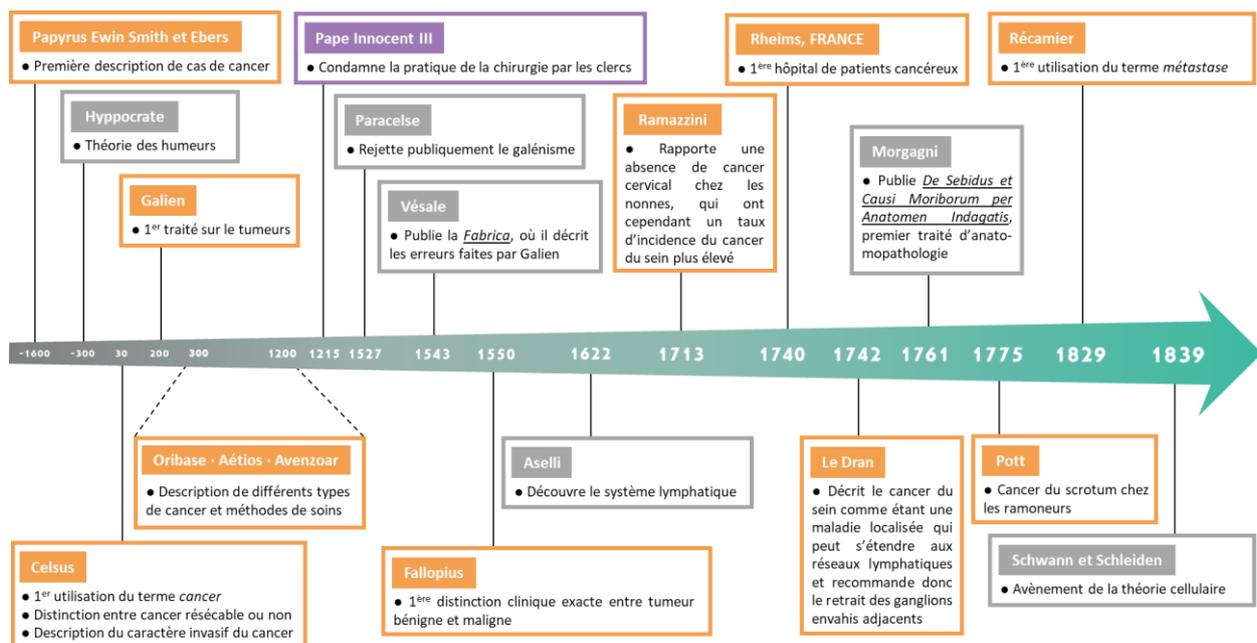


Figure I.1.1. Frise chronologique des principales avancées dans la recherche sur le cancer. De l'Égypte Antique à l'avènement de la théorie cellulaire.

Pour autant, la cause des tumeurs reste non élucidée. Des hommes de sciences avaient décrits, le siècle précédent, des cas de cancers dont l'apparition semblait être associée à un environnement particulier : le taux d'incidence du cancer du sein plus élevé chez les nonnes que chez les femmes mariées, et l'absence de cas de cancer cervical chez ces même nonnes étaient attribués à l'abstinence sexuelle ; les ramoneurs avaient plus de chance de

développer un cancer du scrotum du fait du contact répété avec la suie sur les cordes qu'ils utilisaient pour se déplacer dans les cheminées (Faguet, 2015). Mais il faudra attendre la découverte de l'ADN par Watson, Crick et Franklin au milieu du XX^{ème} siècle (Watson and Crick, 1953) et de son rôle, ainsi que l'avènement de la biologie moléculaire, pour que le cancer devienne une maladie touchant les gènes.

1.1.2. Définitions actuelles du cancer

1.1.2.1 Les cancers partagent des caractéristiques communes

Comme abordé précédemment, la pathologie maligne englobe en réalité une multiplicité de types et de sous-types de tumeurs, dont l'origine, la localisation, et l'impact délétère sur l'organisme peuvent grandement varier. Pour autant, si l'ensemble des manifestations de la maladie se retrouvent sous l'unique bannière du cancer, c'est parce qu'elles partagent des caractéristiques communes. Hanahan et Weinberg ont ainsi proposé au début des années deux-milles un certain nombre de règles régissant l'initiation et la progression tumorales : les signes distinctifs (« *hallmarks* ») du cancer (Hanahan and Weinberg, 2000). Du fait de la complexité de la maladie cancéreuse, l'oncologie est un domaine où la recherche évolue très vite. Dans ce sens, les *Hallmarks of Cancer* ont été amendées par deux fois au cours des vingt dernières années et sont désormais au nombre de quatorze (Hanahan, 2022; Hanahan and Weinberg, 2011). Ces signes distinctifs du cancer comprennent des capacités acquises ainsi que des facteurs favorisant l'acquisition de ces particularités (**Figure I.1.2**).

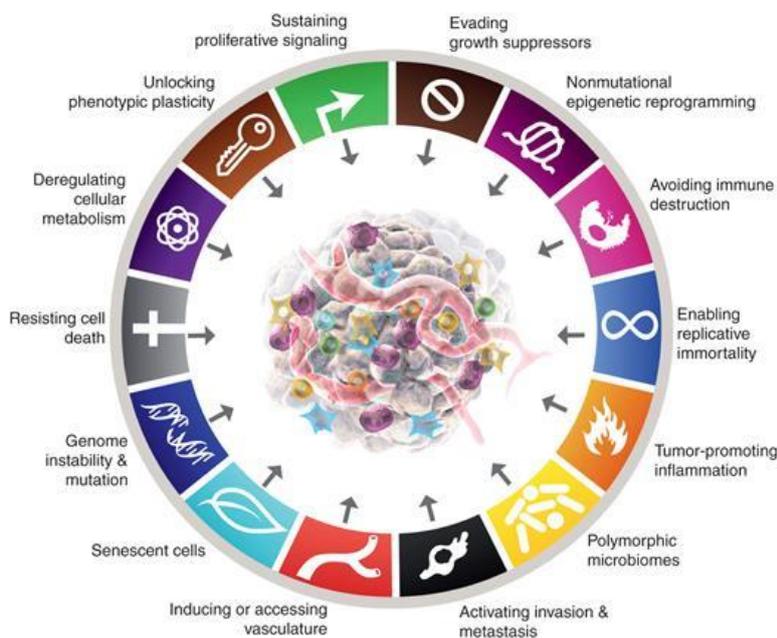


Figure I.1.2. Les *Hallmarks* du Cancer. Tirée de la revue éponyme de 2022 (Hanahan, 2022)

Parmi les capacités acquises propres au cancer, on retrouve la prolifération cellulaire incontrôlée et infinie, la potentialisation de la survie cellulaire, l'induction de l'accès à la vascularisation, l'activation de l'invasion et de la métastase, la dérégulation du métabolisme cellulaire et le déverrouillage de la plasticité cellulaire.

La prolifération cellulaire incontrôlée et infinie est peut-être le caractère le plus fondamental du cancer. Cette propriété inclut trois mécanismes distincts mais complémentaires. Le premier est l'**auto-suffisance en facteur de croissance**. Là où l'homéostasie d'un tissu sain est contrôlée étroitement par le relargage de facteurs mitogéniques dans le milieu, les cellules cancéreuses sont capables d'outrepasser cette régulation par différents moyens : elles peuvent produire une signalisation autocrine, recruter et/ou activer des cellules du microenvironnement tumoral qui répondront en sécrétant des facteurs de croissance, potentialiser la liaison d'un ligand à son récepteur en augmentant l'expression de récepteur à la surface de la membrane cellulaire ou en altérant la structure de ce récepteur pour améliorer son affinité à son ligand ainsi que la vitesse de réponse suite à l'interaction, activer constitutionnellement des composés intervenants plus en aval de la voie de signalisation rendant ainsi la stimulation par liaison du ligand au récepteur obsolète, etc. Le second mécanisme est le pendant du précédent : il s'agit de l'**insensibilité aux signaux inhibiteurs de croissance**. Les cellules cancéreuses sont ainsi capables de contourner des programmes biologiques majeurs, notamment en sous-exprimant des suppresseurs clés de la prolifération comme les protéines RB (en anglais, *retinoblastoma-associated*) et TP53. Les cellules cancéreuses sont également capables d'ignorer l'inhibition de contact censée empêcher la prolifération. Le troisième et dernier mécanisme impliqué dans cette prolifération anarchique des cellules cancéreuses est l'**immortalité répllicative**. En effet, contrairement aux cellules normales qui ne peuvent se répliquer qu'un nombre limité de fois, les cellules cancéreuses ont un potentiel de multiplication théoriquement illimité. Cette capacité viendrait de la réexpression par ces cellules de la télomérase, une enzyme capable d'agrandir les télomères (séquence de nucléotides répétés à l'extrémité des chromosomes), sans quoi la réduction de ces télomères au cours des divisions successives entraînerait la sénescence et/ou la mort cellulaire (le mécanisme de sénescence et le rôle des télomères sont décrits plus en détails dans le **Chapitre 3** de cette partie, p.81).

L'augmentation de la survie cellulaire est une autre des propriétés acquises par les cellules cancéreuses. Celle-ci passe par la **résistance à la mort cellulaire**, en particulier apoptotique.

L'apoptose est un mécanisme de mort cellulaire programmée, qui s'active notamment lorsqu'un déséquilibre de la signalisation ou des dommages à l'ADN importants sont détectés. Ces deux types de stimulus sont communément subis par les cellules cancéreuses du fait de leur capacité de prolifération cellulaire incontrôlée, et l'apoptose joue donc un rôle antitumoral. Pour survivre, les cellules cancéreuses peuvent utiliser différentes stratégies afin d'atténuer l'induction de l'apoptose : l'inactivation de TP53 qui est capable de détecter les dommages à l'ADN et de déclencher l'apoptose, la surexpression de régulateurs anti-apoptotiques (BCL-2, BCL-xL), la sous-expression de facteurs pro-apoptotiques (BAX, BIM, PUMA) ou la réduction du nombre de récepteurs activateurs de l'apoptose présents à la surface de la cellule (FAS). Les cellules cancéreuses peuvent également augmenter leur chance de survie en **évitant leur reconnaissance par le système immunitaire**. Le système immunitaire élimine non seulement les pathogènes s'attaquant à l'organisme, mais également les cellules du soi compromises dont les cellules cancéreuses font parties. Pour survivre, les cellules cancéreuses doivent donc développer des méthodes pour échapper à la surveillance du système immunitaire, soit en réduisant leur immunogénicité, soit en encourageant un microenvironnement immunosuppresseur qui rend les cellules immunitaires inefficaces.

La sixième capacité acquise des cancers est l'**induction de l'accès à la vascularisation**. Initialement appelée *induction de l'angiogenèse*, la mise en évidence de multiples autres mécanismes permettant le recrutement ou la génération de vaisseaux sanguins a entraîné une désignation plus large de cette caractéristique. Comme c'est le cas des tissus normaux, les cellules tumorales ont besoin de nutriments, d'oxygène et d'un moyen d'évacuer leurs déchets pour survivre et proliférer. Ces besoins sont satisfaits par le biais de la vascularisation. Mais contrairement aux tissus normaux, dont l'organisation vasculaire est établie depuis l'embryogenèse et dont le renouvellement n'a lieu que dans des cas particuliers comme la cicatrisation, le cycle menstruel féminin ou la croissance osseuse, les néoplasmes, comme leur nom l'indique, sont des tissus nouvellement formés. Ils vont donc devoir créer leur propre réseau vasculaire, notamment via l'angiogenèse et le switch angiogénique.

L'accès à la vascularisation peut favoriser la septième capacité des cancers, à savoir l'**activation de l'invasion et l'induction de métastases**. La nature maligne d'une tumeur est inévitablement associée à son caractère invasif. Particulièrement étudié dans le contexte des

cancers épithéliaux, le passage d'un carcinome *in situ* bénin (dont les cellules anormales sont histologiquement similaires à des cellules cancéreuses mais qui ne s'étendent pas au-delà de leur site initial de formation) vers un carcinome malin implique une augmentation de la motilité et de la capacité invasive des cellules. Concrètement, les cellules cancéreuses perdent leurs caractéristiques épithéliales au profit d'un phénotype mésenchymateux, au cours d'un processus appelé transition épithélio-mésenchymateuse (TEM). Ce phénotype mésenchymateux favorise la migration et les cellules cancéreuses vont pouvoir rejoindre les réseaux sanguin et lymphatique. C'est l'initiation du processus métastatique. Les cellules tumorales circulantes (CTC) ainsi produites vont devoir ré-inverser leur phénotype (transition mésenchymato-épithéliale ou TME) pour quitter la circulation sanguine ou lymphatique et envahir un nouveau tissu : on parle alors de cellules tumorales disséminées (CTD). Ces CTD ont le potentiel de croître et de former des foyers métastatiques cliniquement détectables. A noter qu'on a longtemps pensé que ces changements entre les phénotypes épithéliaux et mésenchymateux avaient lieu tardivement dans le déroulement de la progression tumorale, mais un nombre croissant d'études semblent indiquer que le processus métastatique pourrait se déclencher dès la lésion pré-néoplasique, parfois avant même que la tumeur primaire ne soit détectée (Hosseini et al., 2016). De fait, ces propriétés d'invasion et de métastase des cancers peuvent être acquises plus tôt que certaines autres caractéristiques, ce qui expliquerait les 0,5 à 7% de cas de cancers où le site primaire est inconnu (van de Wouw et al., 2002).

Si l'induction de l'accès à la vascularisation se fait attendre, les cellules cancéreuses peuvent également passer par d'autres voies pour produire de l'énergie, notamment en **dérégulant le métabolisme cellulaire**. En condition aérobie classique, le pyruvate métabolisé à partir du glucose est principalement dirigé vers la mitochondrie consommatrice d'oxygène qui va permettre la génération d'une trentaine de molécules d'ATP à partir d'une molécule de glucose : c'est la respiration. En condition anaérobie, le pyruvate issu de la glycolyse est métabolisé en lactate dans le cytosol, ce qui permet la production de deux molécules d'ATP pour une molécule de glucose : c'est la fermentation. De façon assez intéressante, il a été mis en évidence il y a maintenant un siècle que les cellules cancéreuses préféraient la voie métabolique de la fermentation, plutôt que celle de la respiration, et ceci même en présence d'oxygène. La fermentation étant 15 fois moins efficace que la respiration pour la production d'ATP, il paraît contre-intuitif pour les cellules cancéreuses de favoriser cette voie

métabolique. Mais il faut se souvenir que la respiration est utilisée par des cellules eucaryotes normales composant des tissus différenciés. A l'inverse, les cellules cancéreuses prolifèrent de façon intense et ont donc besoin, en plus d'énergie, de synthétiser de grandes quantités de molécules telles que des nucléotides, des lipides et des acides aminés. Or, les produits intermédiaires et finaux de la glycolyse par fermentation sont utilisés pour produire cette biomasse, ce qui peut expliquer pourquoi les cellules cancéreuses continuent à faire de la fermentation même en condition aérobie (Fan et al., 2019).

Récemment, Hanahan a étoffé la liste des caractéristiques propres au cancer de deux nouveaux traits qui impliquent le déverrouillage de la plasticité cellulaire (Hanahan, 2022). Le premier consiste en un **détournement des programmes de différenciation** cellulaire. La majorité des cellules dans un organisme adulte a atteint un stade de différenciation terminal généralement associé à un arrêt de la prolifération, hormis quelques types cellulaires comme les cellules souches (capables de générer différents types cellulaires) et les cellules progénitrices (encore phénotypiquement indifférenciées, mais déjà engagées dans une lignée cellulaire). De fait, il est probable que la cellule ayant subi une mutation carcinogénique se trouve dans cet état différencié et doit donc trouver un moyen de se remettre à proliférer. Les cellules cancéreuses peuvent ainsi inverser leur différenciation pour reprendre un phénotype similaire au progéniteur dont elles sont originaires à la base : c'est la **dédifférenciation**. Il est également possible que la transformation maligne se déroule dans une cellule progénitrice, certes déjà engagée dans une lignée cellulaire mais n'ayant pas encore terminée sa différenciation et encore capable de proliférer (Tellez-Gabriel et al., 2016). Dans ce cas-là, les cellules cancéreuses peuvent court-circuiter le processus de différenciation pour rester dans leur état de progéniteur : c'est le **blocage de la différenciation**. Enfin, certaines cellules cancéreuses déjà engagées dans une lignée sont capables de changer leur phénotype pour rejoindre un programme de différenciation complètement différent de celui de leur cellule d'origine : c'est la **transdifférenciation** (le mécanisme de TEM et TME en est un exemple). Ce détournement des programmes de différenciation peut ainsi expliquer pourquoi différents types cellulaires cancéreux peuvent être détectés au sein d'un même cancer. La seconde forme de plasticité cellulaire que peuvent adopter les cancers est la **dormance cancéreuse**. Dans sa revue, Hanahan parle de l'existence de cellules cancéreuses sénescents mais capables de résister à l'apoptose, d'induire l'angiogenèse, de stimuler l'invasion et la métastase et d'échapper au système

immunitaire (Hanahan, 2022). Ces cellules cancéreuses sénescents peuvent se remettre à proliférer à tout moment, et seraient donc responsables de la période de dormance cancéreuse observée notamment entre le traitement d'une tumeur et sa récurrence. La dormance cancéreuse n'est cependant pas uniquement induite par des cellules en sénescence, et d'autres mécanismes existent. De fait, à la manière de la caractéristique « induction de l'angiogenèse » qui fut plus tard généralisée en « induction de l'accès à la vascularisation », il est possible que cette propriété des cancers intitulée « cellules sénescents » s'étende en réalité à toutes les formes de dormance cancéreuse. Cette dormance cancéreuse est l'objet du troisième chapitre de cette introduction (cf. p.55).

Tous les cancers ne présentent pas forcément l'ensemble de ces dix caractéristiques, mais les formes les plus agressives et les plus résistantes aux thérapies (donc théoriquement les formes les plus évoluées) ont acquis une majorité de ces propriétés à un moment donné de leur progression. L'acquisition de ces caractéristiques propres au cancer est facilitée par un certain nombre d'autres propriétés, telles que l'**instabilité du génome** qui est propice à l'apparition de mutations pouvant inactiver des gènes suppresseurs de tumeurs et induire des oncogènes, ou la **reprogrammation épigénétique non mutationnelle** qui pourrait favoriser l'hétérogénéité tumorale et les phénomènes de détournement des programmes de différenciations. Au-delà de ces facteurs intrinsèques, le microenvironnement tumoral peut également encourager l'acquisition des propriétés inhérentes au cancer. Ce microenvironnement tumoral est composé de cellules, telles que les cellules immunitaires (lymphocytes macrophages, cellules dendritiques, etc.) et les cellules stromales (cellules endothéliales, fibroblastes associés au cancer, etc.). Mais il est également composé d'éléments non cellulaires, tels que la matrice extracellulaire (MEC) qui est un réseau de macromolécules (protéoglycanes, collagène, laminine, élastine, fibronectine et enzymes), d'eau, de cytokines et de facteurs de croissance (Anderson and Simon, 2020). Il a été prouvé que ce microenvironnement jouait un rôle majeur dans la carcinogenèse, la progression tumorale et la résistance aux traitements. Ainsi, une **inflammation pro-tumorale** peut fournir aux cellules cancéreuses des facteurs de croissance et de survie qui encourage la prolifération cellulaire, des facteurs pro-angiogéniques qui permettent l'induction d'une vascularisation, et peut également relarguer des dérivés réactifs de l'oxygène (en anglais, *reactiv oxygen species* ou ROS) qui sont mutagènes. Enfin, les **microbiomes polymorphiques** extra- et intra-tumoraux semblent également pouvoir jouer un rôle dans l'acquisition de

mutations génomiques et l'échappement à la destruction par le système immunitaire, en particulier dans le contexte du microbiote intestinal (Hanahan, 2022; Nejman et al., 2020).

Le fait que ces caractéristiques propres au cancer n'ont de cesse de s'étoffer au fil des décennies souligne bien la complexité associée à la multiplicité de cancers existant. Il n'est ainsi pas impossible que d'ici une dizaine d'années, ces quatorze *hallmarks* du cancer ne soient modifiées pour refléter au mieux l'évolution des connaissances acquises dans le domaine de l'oncologie.

1.2. Le cancer de l'os

1.2.1. Le tissu osseux sain

Au sein du règne animal, le tissu osseux est un organe retrouvé uniquement dans le sous-branchement des vertébrés. Il constitue une partie du squelette et est notamment caractérisé par sa rigidité. Cette dureté ne signifie pas pour autant que cet organe est inerte. En effet, le tissu osseux est remodelé tout au long de la vie d'un adulte et on estime que la majorité du squelette est renouvelé tous les dix ans (Office of the Surgeon General (US), 2004). De plus, les os servent constamment une variété de fonctions biologiques essentielles. Ils ont un rôle structurel primordial, puisqu'ils supportent l'organisme en résistant aux forces mécaniques subies par ce dernier (ex. : la gravité), ils permettent la motilité en association avec les muscles, et ils assurent une protection physique des organes plus mous et donc plus fragiles (ex. : les côtes protègent le cœur et les poumons, le crâne protège le cerveau, la colonne vertébrale protège la moelle épinière). Le tissu osseux remplit également une fonction de synthèse, puisqu'il contient la moelle osseuse qui est le siège de l'hématopoïèse (Office of the Surgeon General (US), 2004). Enfin, les os jouent un rôle dans le métabolisme : ils sont le principal réservoir d'un certain nombre de minéraux (ils contiennent 99% du calcium, 85% du phosphore et 65% du magnésium de l'organisme (Shaker and Deftos, 2000)) et ils ont une action endocrine via le relargage du FGF-23 (en anglais, *fibroblast growth factor 23*) qui contrôle la réabsorption du phosphate au niveau des reins et le relargage de l'ostéocalcine (OCN) qui régule le métabolisme du glucose (N. K. Lee et al., 2007). Ces nombreuses fonctions sont rendues possibles par les composantes cellulaire et acellulaire de l'os.

1.2.1.1. Composante cellulaire de l'os

Bien que l'os soit connu pour ses caractéristiques minérales, de nombreuses cellules essentielles à son homéostasie y résident.

Les **ostéoclastes** sont des cellules géantes multinucléées formées à partir de la fusion de cellules mononucléées issues de la différenciation de cellules souches hématopoïétiques (CSH). Cette ostéoclastogenèse est influencée par M-CSF (en anglais, *macrophage colony-stimulating factor*) et RANKL (en anglais, *receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand*) exprimés par les autres cellules de l'environnement osseux. Les ostéoclastes sont les cellules responsables de la résorption osseuse. Ils existent sous deux états fonctionnels : les phases mobile et de résorption. Durant la phase mobile, les progéniteurs ostéoclastiques migrent de la moelle osseuse vers le site à résorber et sont caractérisées par une morphologie aplatie, ainsi que par la présence d'expansions membranaires. Lorsque les ostéoclastes atteignent la zone de résorption, ils se polarisent et leur membrane s'organise en quatre domaines distincts : la bordure en brosse riche en microvillosité, la zone de scellement, la membrane basolatérale et le domaine de sécrétion. La zone de scellement assure une fixation hermétique de l'ostéoclaste à l'os et permet de délimiter la zone en cours de résorption. La bordure en brosse, encerclée par la zone de scellement, est composée de multiples microvillosités qui augmentent la surface d'échange de l'ostéoclaste avec la surface de l'os. C'est également par cette bordure en brosse que l'ostéoclaste va sécréter des cations qui vont acidifier l'espace entre l'ostéoclaste et la surface osseuse, ce qui permettra la déminéralisation de la partie organique de la matrice osseuse. Dans ce milieu acide, les ostéoclastes pourront ensuite déverser le contenu enzymatique de leur lysosome qui finiront de dégrader la fraction organique de l'os (Rousselle and Heymann, 2002). Les produits de cette dégradation seront internalisés puis éliminés via le domaine de sécrétion localisé sur le pôle basal de l'ostéoclaste (Florencio-Silva et al., 2015) (**Figure I.1.3A**).

Les **ostéoblastes** sont des cellules de forme plutôt cubique qui se trouvent à la surface de l'os. Histologiquement, ces cellules contiennent un réticulum endoplasmique rugueux et un appareil de Golgi abondants, ainsi que de nombreuses vésicules de sécrétions – tout cela étant morphologiquement caractéristique des cellules sécrétrices de protéines. De fait, bien que les ostéoblastes ne représentent que 5% de la totalité des cellules composant l'os, ils sont responsables de la synthèse de la substance ostéoïde. Composée de collagène de type I (COL-I), de protéoglycanes, de polysaccharides et d'autres protéines (OCN, ostéonectine

(ONN), sialoprotéine osseuse (en anglais, *bone sialoprotein* ou BSP), ostéopontine (OPN), etc.), cette substance pré-osseuse – la matrice ostéoïde – fait une dizaine de microns d'épaisseur et est capable de lier les sels de calcium, ce qui aboutit à la matrice calcifiée des os. Les ostéoblastes sont dérivés des cellules souches mésenchymateuses (CSM), à la suite de l'activation de facteurs de transcription tels que RUNX2 et Osterix (Nakashima et al., 2002; Schroeder et al., 2005) et de voies de signalisation impliquant des molécules telles que BMP, Wnt et FGF (Amarasekara et al., 2021). Une fois différencié, l'ostéoblaste a trois destins possibles : soit il est éliminé par apoptose, soit il s'inactive et devient une cellule bordante, soit il se différencie de façon terminale en ostéocyte (**Figure I.1.3B**).

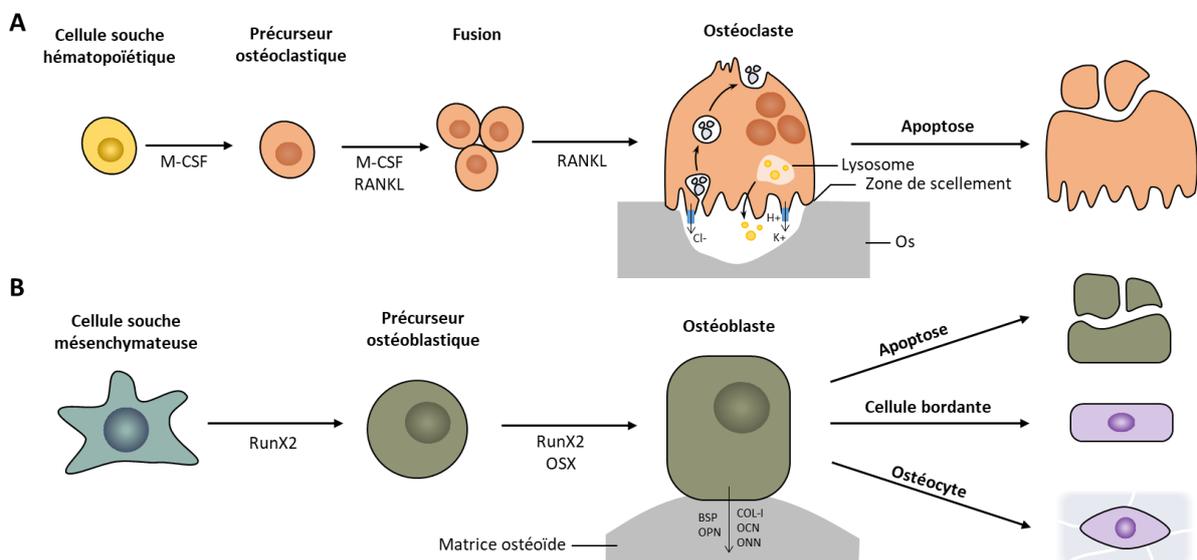


Figure I.1.3. Différenciation ostéoclastique et ostéoblastique. A) L'ostéoclastogenèse débute par l'engagement d'une cellule souche hématopoïétique dans le lignage ostéoclastique suite à la détection de M-CSF. Le précurseur ostéoclastique fusionne ensuite pour donner un ostéoclaste en présence de RANKL. L'ostéoclaste est capable de résorber la matrice osseuse sous-jacente par acidification du milieu et sécrétion d'enzymes telles que MMP-9 et la cathepsine K. Une fois sa fonction remplie, l'ostéoclaste est éliminé par apoptose. B) L'ostéoblastogenèse commence par l'augmentation de l'expression du facteur de transcription Runx2, ce qui différencie une cellule souche mésenchymateuse en précurseur ostéoblastique. Puis, l'expression d'un autre facteur de transcription, Osterix, aboutit à la différenciation en ostéoblaste. Cet ostéoblaste est capable de produire une matrice pré-osseuse, la substance ostéoïde. Lorsque la formation osseuse est finie, l'ostéoblaste meurt par apoptose, devient une cellule bordante recouvrant la surface osseuse, ou est intégré dans la matrice osseuse et se différencie de façon terminale en ostéocyte.

Un ostéoblaste ayant rempli son rôle ostéogène et n'ayant pas été éliminé par apoptose voit sa morphologie s'aplatir pour devenir une **cellule bordante** quiescente. Le rôle des cellules bordantes n'est pas aussi clairement établi que les autres cellules composant l'os, mais elles semblent pouvoir contrôler localement le remodelage osseux. Tout d'abord, elles seraient capables de se différencier pour redevenir des ostéoblastes lorsque ceux-ci sont déplétés

ou réduits du fait de l'âge (Matic et al., 2016). Elles pourraient également favoriser la résorption osseuse en activant la différenciation ostéoclastique et en prédisposant le collagène non minéralisé de la substance ostéoïde (Everts et al., 2002). Enfin, leur organisation en tapis recouvrant la surface de l'os leur permettrait de contrôler mécaniquement ce remodelage osseux : les ostéoclastes ne pourraient accéder à la matrice osseuse qu'après que les cellules bordantes aient migrées pour former une voûte au-dessus de la zone en remodelage (Hauge et al., 2001). Les cellules bordantes pourraient donc jouer un rôle plus important qu'initialement estimé dans le remodelage osseux, que ce soit au niveau de la formation ou de la résorption osseuse.

Lorsque les ostéoblastes se retrouvent emprisonnés dans la matrice osseuse calcifiée, ils se différencient en **ostéocytes**. Ces ostéocytes sont plus petits que leurs prédécesseurs ostéoblastiques, ont un ratio noyau/cytoplasme augmenté et présentent des prolongements cytoplasmiques caractéristiques d'une morphologie dendritique. Le corps des ostéocytes repose dans une cavité au sein de la matrice osseuse minéralisée appelée ostéoplaste, tandis que les prolongements cytoplasmiques cheminent à travers la matrice osseuse au sein de canaux appelés canalicules. Par le biais de leurs nombreux prolongements cytoplasmiques, les ostéocytes établissent des contacts avec les autres ostéocytes, ainsi qu'avec les ostéoblastes, les cellules bordantes et les précurseurs ostéoclastiques. Cette position centrale des ostéocytes leur octroie le rôle de chef d'orchestre du remodelage osseux, notamment par leur capacité à transduire des stimuli mécaniques en signaux chimiques. Ainsi, il a été mis en évidence que les ostéocytes se trouvant à proximité de zones ayant subies des micro-fractures entrent en apoptose ce qui agit comme un signal chimiotactique attirant les ostéoclastes et activant le remodelage (Cardoso et al., 2009). De plus, les ostéocytes sont capables d'inhiber la prolifération des ostéoblastes et d'augmenter leur apoptose, ce qui bloque la formation de nouveaux tissus osseux, notamment par le biais de la sclérostine (Li et al., 2005; van Bezooijen et al., 2007).

1.2.1.2. Composante acellulaire de l'os

En plus de sa composante cellulaire, le tissu osseux comprend une MEC. Bien que sa composition exacte diffère en fonction de l'âge, du sexe et de l'état de santé, on estime qu'elle est constituée d'une fraction minérale et d'une fraction organique.

La fraction minérale est formée principalement de dépôts de sels de phosphate et de calcium, organisés en cristaux d'hydroxyapatite (HA) de formule chimique $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$. On retrouve également en plus petite quantité du bicarbonate, du citrate, du magnésium, du potassium ainsi que des ions sodiques. Elle représente 60% de la masse osseuse totale et est responsable de la dureté de l'os. Du fait de son contenu hautement minéralisé, la fraction inorganique est le réservoir principal de l'organisme en ions calcium et phosphate entre autres.

Les 40% restant de la masse osseuse correspondent à la fraction organique. Celle-ci contient majoritairement des protéines fibrillaires, dont le COL-I est le représentant principal (90% des fibres). Ces fibres de collagènes assurent l'intégrité structurale des os en servant de support mécanique et d'échafaudage aux cellules. Bien que présentes en moindre quantité, les protéines non fibrillaires participent significativement à la fonction biologique de la matrice osseuse, notamment en contribuant au processus de minéralisation et en contrôlant la différenciation et les fonctions des cellules de l'os. Parmi les protéines non fibrillaires identifiées dans la matrice osseuse, on retrouve des protéoglycanes riches en petite leucine (ex. : biglycane, décorine, kératocane, asporine), des protéines contenant de l'acide γ -carboxyglutamique (ex. : OCN, périostine) et des glycoprotéines (ex. : ostéonectine, BSP, OPN) (Lin et al., 2020). Enfin, de nombreuses cytokines et facteurs de croissance également impliqués dans la différenciation et la fonction des cellules de l'os sont présents dans cette fraction organique, tels que le TGF- β (en anglais, *tumor growth factor β*), les BMP (en anglais, *bone morphogenetic protein*) et le TNF (en anglais, *tumor necrosis factor*).

La fraction organique est en étroite relation avec la fraction inorganique. En effet, ce sont sur les fibres de collagènes que se déposent les cristaux d'HA. Cette association permet d'assurer la résistance et la solidité de l'os par le biais du collagène, et sa rigidité par le biais des cristaux d'HA (Nair et al., 2013).

1.2.1.3. Modelage et remodelage osseux

Le squelette peut adapter sa structure de deux manières selon la cause de cette réorganisation : par modelage ou par remodelage osseux.

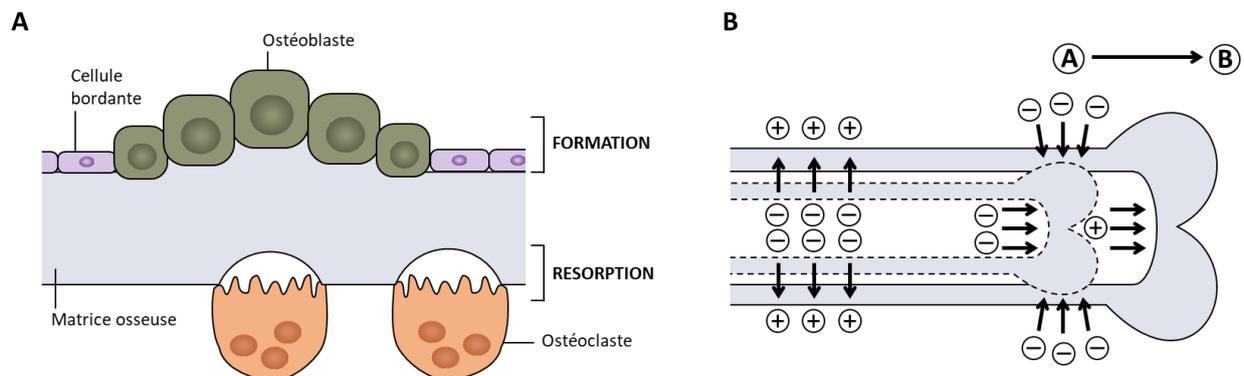


Figure 1.1.4. Modelage osseux. A] Au cours du modelage osseux, l'os est formé par les ostéoblastes sur une surface osseuse préexistante sans qu'il n'y ait eu de résorption au préalable, ou l'os est détruit par les ostéoclastes. Les mécanismes de formation et de résorption osseuses se déroulent sur des surfaces différentes et peuvent intervenir indépendamment l'un de l'autre, ou de manière coordonnée. B] Lors de la croissance du squelette, le modelage osseux permet aux os longs de garder une morphologie correcte. L'action coordonnée mais séparée spatialement de la formation (+) et de la résorption (-) permet à l'os de croître de A vers B. La cavité centrale contenant la moelle osseuse est agrandie par résorption tandis que la formation sur la face externe de l'os assure le maintien des capacités mécaniques de l'os ce qui permet son élargissement. A l'extrémité, des mécanismes similaires ont lieu pour permettre l'allongement de l'os.

Le modelage osseux est un processus au cours duquel la résorption et la formation osseuses se déroulent indépendamment l'une de l'autre et sur des sites différents (cf. **Figure 1.1.4A**). Principalement observé lors de la croissance du squelette, le modelage osseux permet par exemple le maintien de la forme des os lors de leur élongation (cf. **Figure 1.1.4B**). Ce mécanisme intervient également dans une moindre mesure chez l'adulte en réponse à un changement de la charge mécanique subie par le tissu osseux.

Le remodelage osseux, quant à lui, assure le renouvellement des os en couplant la résorption et la formation osseuse (la première précède la seconde) sur un même site. Ce remodelage osseux est un cycle qui se déroule en plusieurs étapes séquentielles (Kenkre and Bassett, 2018) : l'activation, la résorption, l'inversion, la formation, la minéralisation et la quiescence (**Figure 1.1.5**).

La **phase d'activation** débute avec la détection d'un stimulus, par exemple un impact ayant endommagé l'os, par les ostéocytes profondément enfouis dans la matrice osseuse. Ces ostéocytes induisent la sortie de l'état de quiescence du tissu osseux en recrutant des précurseurs ostéoclastiques à partir de la circulation sanguine et en signalant aux cellules bordantes localisées à la surface. En réponse, les cellules bordantes se détachent de la

matrice osseuse pour former une voûte au-dessus de la zone à remodeler sous laquelle les précurseurs ostéoclastiques peuvent s'immiscer. Les précurseurs ostéoclastiques fusionnent ensuite pour devenir un ostéoclaste polynucléé.

La différenciation des précurseurs ostéoclastiques en ostéoclastes matures indique le début de la **phase de résorption**. Ces ostéoclastes s'attachent fermement à la matrice osseuse et digèrent cette dernière, d'abord en acidifiant le milieu sous-ostéoclastique ce qui permet la dissolution de la fraction minérale, puis en libérant des enzymes qui vont dégrader le collagène. Cette phase se conclue par la mort programmée des ostéoclastes.

La **phase d'inversion** sert de tampon entre la phase de résorption et la phase de formation. Bien qu'encore peu comprise, il semblerait que cette étape serve à préparer la formation de la nouvelle matrice osseuse, notamment en lissant la surface récemment résorbée grâce à des cellules de la lignée ostéoblastique (probablement des cellules bordantes et des précurseurs ostéoblastiques), ce qui va permettre une meilleure adhérence des ostéoblastes.

Après différenciation des précurseurs ostéoblastiques en ostéoblastes, la **phase de formation** peut commencer. Les ostéoblastes vont déposer la substance ostéoïde riche en collagène à la surface de la surface osseuse résorbée. Puis, les ostéoblastes vont participer au dépôt progressif de cristaux d'HA parmi les fibres de collagène : c'est la **phase de minéralisation**.

Enfin, une fois la minéralisation est complétée, les ostéoblastes entrent en apoptose, deviennent des cellules bordantes recouvrant l'os nouvellement formé ou sont enterrés au sein de la matrice osseuse. Le tissu osseux peut alors revenir à sa **phase de quiescence** initiale.

Ce processus de remodelage osseux est finement régulé afin d'assurer un maintien de l'homéostasie osseuse. L'apparition d'un déséquilibre entre la résorption et la formation osseuse témoigne d'un trouble, dont le cancer peut être la cause ou la conséquence.

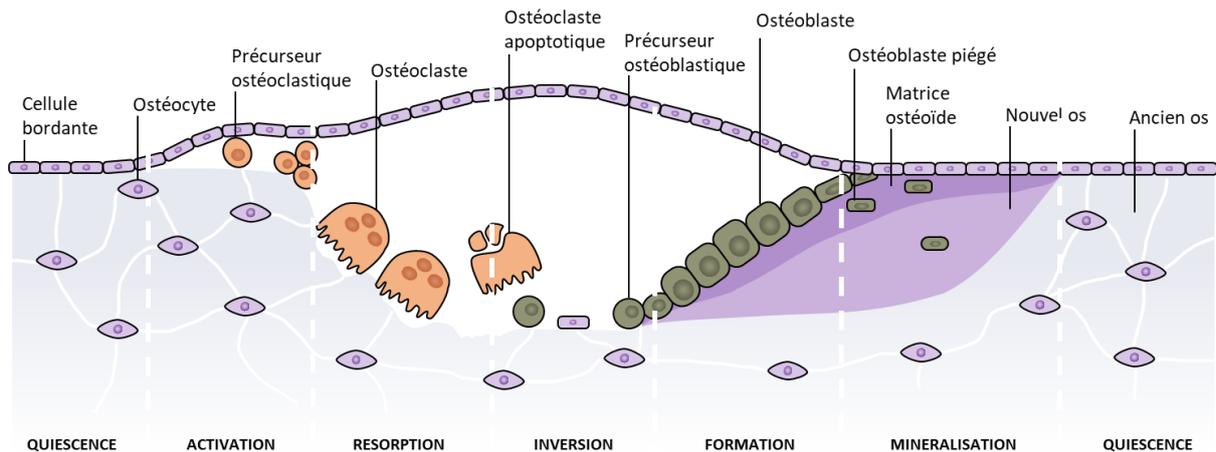


Figure I.1.5. Remodelage osseux. Au cours du remodelage osseux, la résorption et la formation osseuse ont lieu dans une même zone restreinte. Ce remodelage osseux se déroule en plusieurs phases séquentielles. L'initiation du remodelage commence par la phase d'activation, au cours de laquelle des signaux notamment fournis par les ostéocytes vont recruter des précurseurs ostéoclastiques qui vont s'introduire entre les cellules bordantes et la surface de la matrice osseuse. Puis, d'autres signaux vont induire la différenciation des précurseurs ostéoclastiques en ostéoclastes. Ces ostéoclastes vont résorber la matrice osseuse : c'est la phase de résorption. S'en suit une phase d'inversion où les ostéoclastes sont éliminés par apoptose et où des cellules telles que des cellules bordantes et des précurseurs ostéoblastiques lissent la surface osseuse résorbée. Les précurseurs ostéoblastiques se différencient ensuite en ostéoblastes matures qui vont produire la substance ostéoïde lors de la phase de formation. Cette matrice ostéoïde sera progressivement minéralisée par l'incorporation d'ions calcium et phosphore sécrétés par les ostéoblastes. Au cours de cette phase de minéralisation, des ostéoblastes vont pouvoir se retrouver piégés dans la matrice osseuse nouvellement formée ce qui induit leur différenciation en ostéocyte. Ce remodelage osseux se conclut par un retour à l'état de quiescence du tissu osseux.

1.2.2. Cancer primaire de l'os : le cas de l'ostéosarcome

1.2.2.1. Fréquence de la maladie et classification des ostéosarcomes

L'ostéosarcome d'origine osseuse est un sarcome rare caractérisé par la formation d'une matrice ostéoïde maligne. Il a une distribution bimodale : on observe un pic chez les moins de 20 ans et un autre, moins important, chez les plus de 65 ans. Avec une incidence annuelle de 0,4-0,5 cas par 100 000 enfants, cela en fait l'un des dix cancers pédiatriques les plus fréquents, et le cancer de l'os le plus commun. Il semble toucher légèrement plus les individus de sexe masculin que féminin (Ottaviani and Jaffe, 2009a).

L'ostéosarcome apparaît le plus souvent à proximité de la plaque de croissance dans les os longs des extrémités, tels que le fémur (42%), le tibia (19%) et l'humérus (10%), mais peut aussi toucher la mâchoire (8%), le pelvis (8%) et dans une moindre mesure les côtes (1,8%) (Ottaviani and Jaffe, 2009a) (**Figure I.1.6**).

Les propriétés histologiques, radiographiques et cliniques de l'ostéosarcome permettent de classer cette tumeur osseuse en deux groupes, chacun ayant ses propres sous-types : les ostéosarcomes centraux (ou intramédullaires) et les ostéosarcomes de surface (ou juxtacorticaux) (Misaghi et al., 2018). Les caractéristiques et fréquences de chaque type et sous-types sont décrits dans le **Tableau I.1.1**.

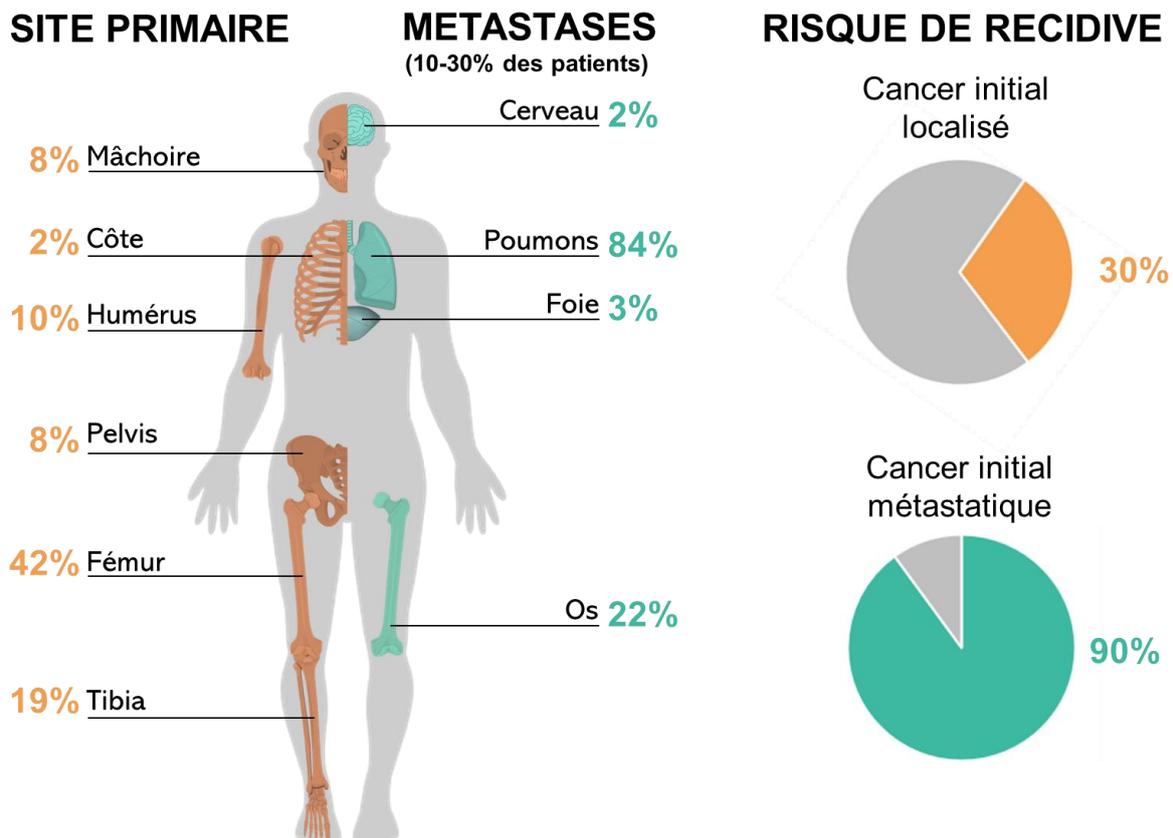


Figure I.1.6. Epidémiologie de l'ostéosarcome. Les ostéosarcomes sont plus fréquents au niveau des os longs, et métastases principalement aux poumons et à l'os. Un patient présentant des métastases synchrones à 9 chances sur 10 de récidiver même après avoir répondu aux traitements initiaux.

Au moment du diagnostic, 10 à 30% des patients présentent des métastases dites synchrones (c'est-à-dire qu'elles se développent en parallèle de la tumeur primaire), bien que les techniques de détection actuelles puissent en réalité sous-estimer ce taux. C'est tout du moins ce que suggère le nombre plus élevé de métastases observé histologiquement après résection ou lors d'autopsie de patients par rapport à ce que les techniques d'imagerie avaient détecté *a priori*. Cette hypothèse est en plus renforcée par les données sur le taux de survie des patients avant l'introduction de la chimiothérapie adjuvante : seul 20% des patients traités uniquement par chirurgie survivaient, ce qui sous-entend que les 80%

Tableau I.1.1. Classification des ostéosarcomes

Types	Sous-types	Fréquence	Caractéristiques cliniques et histologiques
Central/Intramédullaire	Conventionnel	80%	Forme la plus commune de l'ostéosarcome Subdivisé en fonction de l'aspect des cellules tumorales (ostéoblastique, chondroblastique, fibroblastique ou mixte) Haut grade Ostéolytique, ostéoblastique ou les deux
	Télangiectasique	<4%	Caractérisé par des cavités plus ou moins larges (de plusieurs centimètres de diamètre avec un aspect d'éponge) remplies de sang Haut grade Peut causer des fractures Souvent confondu avec un kyste osseux anévrismal
	Bas-grade	1-2%	Touche plutôt les individus qui sont dans leur troisième ou quatrième décennie de vie (très rare chez les enfants) Difficile à distinguer de l'ostéosarcome parostéal ou d'autres formes de cancer de l'os bénin, du fait de son caractère hautement différencié similaire à l'os mature Bas grade (mais peut se transformer en ostéosarcome conventionnel)
	Petite cellule	1-2%	Petites cellules à noyau rond et à faible quantité de cytoplasme Peut être confondu avec le sarcome d'Ewing (une autre tumeur maligne osseuse)
Surface/juxtacortical	Parostéal	4-6%	Forme la plus commune des ostéosarcomes de surface Touche principalement les jeunes adultes et les adultes d'âge moyen (pic d'incidence au cours de la trentaine) Bas grade (peut évoluer vers un sarcome de haut grade tels que d'autres variants d'ostéosarcome) Masse osseuse dense et lobée
	Périosté	2%	Touche les adolescent et les jeunes adultes (de plus de 10 ans et de moins de trente ans) Grade intermédiaire Essentiellement chondroblastique
	Haut grade	<1%	Ressemble à un ostéosarcome conventionnel hormis pour sa localisation corticale Haut grade Peut s'étendre aux tissus mous adjacents

restant présentait peut-être des macro- et micrométastases indétectables au diagnostic (Odri et al., 2022). Les principaux sites métastatiques sont le poumon (83,8%), l'os (21,9%), le foie (2,9%) et le cerveau (2,2%). Parmi les patients métastatiques au diagnostic initial, plus de 80% ne présentent qu'un seul site métastatique, alors que le reste en possède deux ou plus (Xu et al., 2022). Les métastases osseuses sont généralement considérées comme un événement subséquent à une métastase pulmonaire car la majorité des patients avec des métastases osseuses présente des foyers métastatiques au poumon. Il arrive cependant que des métastases osseuses apparaissent alors qu'aucune tumeur secondaire non-squelettique n'ait été détectée. Dans ce cas, on parle de *skip* métastases. Il s'agit de métastases osseuses se développant sur le même os ou sur l'os opposé à l'articulation et qui sont séparées de la tumeur primaire par du tissu sain. Ces *skip* métastases peuvent concerner 10% des patients. Occasionnellement, l'ostéosarcome peut toucher simultanément plusieurs sites osseux sans qu'il n'y ait d'atteintes viscérales. Ces ostéosarcomes multifocaux concernent moins de 3% des cas d'ostéosarcome et leur origine est encore débattue (s'agit-il d'une tumeur primaire ayant métastasée ou l'apparition d'ostéosarcomes indépendants dans différents sites ?) (Odri et al., 2022).

Les ostéosarcomes n'ayant pas répondu à un traitement ou ayant ressurgi après une réponse initiale au traitement sont considérés comme réfractaires et récidivants respectivement. 30% des patients avec une maladie initiale localisée récidivent, contre 90% pour ceux qui présentaient déjà une ou plusieurs métastases avant le début du traitement. Les récurrences locales (au niveau du site primaire de résection) comptent pour 5-10% des récurrences. Les autres sont des métastases métachrones, encore une fois principalement retrouvées au niveau des poumons (60-80%) (Odri et al., 2022).

1.2.2.2. Etiologie

L'étiologie de l'ostéosarcome est encore obscure, non seulement par ce que cette maladie touche principalement une population jeune chez qui le dépistage n'a généralement pas raison d'être, mais surtout parce que la soudaineté de l'apparition de ce cancer a entravé la désignation catégorique d'une cellule d'origine. Bien que des preuves désignent les précurseurs ostéoblastiques ou les CSM comme étant les progéniteurs de l'ostéosarcome, l'hétérogénéité des ostéosarcomes (ostéoblastique, chondroblastique, fibroblastique) font des CSM les principales suspectes (Mohseny and Hogendoorn, 2011; Xiao et al., 2013). Dans

ce sens, la surexpression de pro-oncogènes tels que *c-myc* dans des CSM de souris a entraîné l'apparition d'une tumeur fortement disséminée dont les cellules produisent une substance ostéoïde caractéristique des ostéosarcomes (Cleton-Jansen, 2022). De manière plus spontanée, des CSM de souris longuement cultivées *in vitro* ont subi une transformation en sarcome, dont les cellules réinjectées en modèle murin sécrétaient de la substance ostéoïde. Chez l'humain, de rares cas d'ostéosarcome ont été décrits après que des patients aient reçu une transplantation de MSC. Pour l'un de ces patients, on sait avec certitude que l'ostéosarcome provient bien des MSC transplantées car les cellules cancéreuses présentaient une mutation génétique rare présente uniquement chez le donneur (Cleton-Jansen, 2022).

Le fait que l'ostéosarcome soit une maladie avec des anomalies génétiques complexes et multiples entrave également la mise en évidence des mutations *drivers* impliquées dans l'initiation et l'évolution du cancer (Engert et al., 2017; Smida et al., 2017). La grande instabilité chromosomique retrouvée chez les ostéosarcomes pourrait résulter du mécanisme de chromothripsis, impliqué dans les cancers et les maladies congénitales. Ce phénomène de chromothripsis (du grec *chromo* pour chromosome, et *thripsis* pour briser en éclat) consiste en un réarrangement massif des chromosomes en un seul évènement, ce qui expliquerait le caractère catastrophique de l'apparition de l'ostéosarcome plutôt que la transformation progressive par mutations successives observée dans d'autres cancers (Fei et al., 2022).

Malgré l'absence d'une unique mutation *driver*, plusieurs gènes ont été décrits comme fréquemment mutés dans l'ostéosarcome. C'est le cas notamment de *RUNX2*, *TP53*, *C-MYC*, *RB* et des hélicases *RECQ* (Marinoff et al., 2023). De fait, la préexistence d'une maladie génétique héréditaire où l'un de ces membres est muté prédispose un individu au développement de l'ostéosarcome, comme c'est le cas pour le syndrome de Li-Fraumeni (*TP53* muté), le rétinoblastome (*RB* muté) ou encore le syndrome de Rothmund-Thomson (*RECQ* muté) (Fei et al., 2022; Rocca et al., 2022).

Enfin, des facteurs environnementaux semblent également affecter le risque de développer un ostéosarcome, en particulier dans le cas des ostéosarcomes dit secondaires (c'est-à-dire que le sarcome se développe dans un os anormal) chez les patients plus âgés et correspond au second pic d'incidence de l'ostéosarcome. Ces facteurs de risques incluent notamment les patients atteints de la maladie de Paget, ceux ayant été soumis à des radiations, des

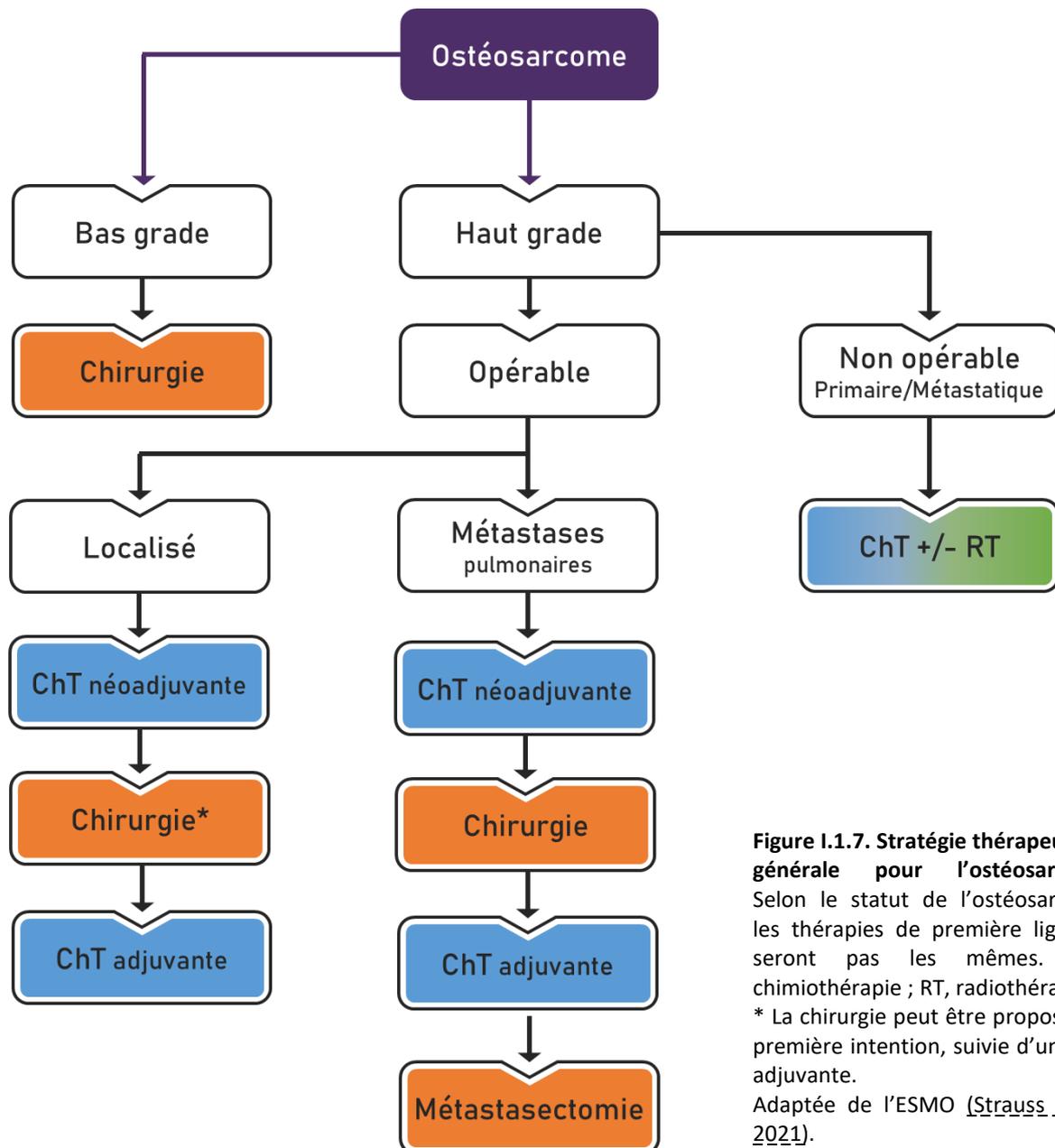
agents alkylants, ou ayant subis un traumatisme osseux (fracture, infection) antérieur (Ottaviani and Jaffe, 2009b).

1.2.2.3. Diagnostic, traitement et pronostic

Le plus souvent, les patients se présentent pour des douleurs osseuses persistantes ou transitoires, qui augmentent dans le temps et sont présentes même au repos. Dans certains cas, la taille importante de la tumeur peut causer un gonflement autour de la zone atteinte. La douleur et le gonflement peuvent entraîner un boitillement. Plus rarement (en particulier dans le contexte d'un ostéosarcome télangiectasique), la tumeur maligne peut être détectée à la suite d'une fracture soudaine et spontanée résultant de la fragilisation du tissu osseux par l'expansion du cancer.

Le diagnostic repose sur deux types d'examens : une série d'imagerie médicale et l'analyse d'une biopsie. La première investigation radiologique passe par une radiographie à rayon X classique de la zone douloureuse. Si la radiographie ne permet pas de réfuter sans équivoque le caractère malin de la lésion, une imagerie en trois-dimensions par imagerie par résonance magnétique (IRM) ou par tomодensitométrie (TDM) est réalisée. La confirmation du diagnostic nécessite obligatoirement un examen histologique à partir d'une biopsie de la lésion suspecte (échantillon obtenu par cytoponction, curetage ou par excision). Une fois la présence de l'ostéosarcome confirmée, la recherche de métastases est réalisée sur le corps entier par IRM ou de façon plus localisée par TDM de la poitrine et scintigraphie osseuse (Strauss et al., 2021).

Le choix des traitements curatifs de l'ostéosarcome dépend du grade et du statut métastatique ou non de ce dernier. Les stratégies thérapeutiques recommandées par la Société européenne d'oncologie médicale (ESMO) sont présentées dans la **Figure 1.1.7** (Strauss et al., 2021). Conventionnellement, le traitement de l'ostéosarcome implique une combinaison de chirurgie et de chimiothérapies pré- (néoadjuvantes) et post-opératives (adjuvantes). Pour les ostéosarcomes de bas grade, la résection à elle seule suffit généralement. Dans le cas des tumeurs non résécables du fait de leur taille ou de leur localisation, l'utilisation de la radiothérapie peut être envisagée.



La chirurgie a pour but le retrait complet de la tumeur. Si c'est possible, une chirurgie conservatrice est à préférer, même si cela pose un certain nombre de défis chez les patients encore en croissance. En effet, la chirurgie conservatrice implique la reconstruction de la zone réséquée. Dans 60% des cas, cette zone se trouve au niveau de la jambe et des problématiques d'inégalité de longueur entre le membre atteint et celui sain peuvent survenir. En général, une reconstruction par allogreffe est réalisée, sauf si la résection implique le joint. Dans ce cas-là, une prothèse extensive ou une rotationplastie sont considérées. Si une chirurgie curative est possible mais que la tumeur a envahi les tissus

mous et neurovasculaires environnants, l'amputation est indiquée. Enfin, certaines métastases peuvent également être retirées par chirurgie (Mavrogenis et al., 2022).

Introduite pour la première fois au début des années 70 pour ce type de cancer, la chimiothérapie est depuis la pierre angulaire des traitements actuels des ostéosarcomes de haut grade. Actuellement, les molécules de chimiothérapies néoadjuvantes et adjuvantes utilisées dans la grande majorité des schémas thérapeutiques sont au nombre de quatre : la doxorubicine, la cisplatine, le méthotrexate à forte dose et l'ifosfamide. La plupart des associations chimiothérapeutiques administrées comprennent deux ou trois de ces molécules (Mavrogenis et al., 2022). Dans le cas de l'ostéosarcome récidivant (local ou métastatique) opérable, bien qu'il n'y ait pas de traitement standard, il n'est pas rare d'utiliser une chimiothérapie de deuxième ligne impliquant les mêmes molécules que précédemment si le patient avait répondu au traitement initial. Dans le cas des ostéosarcomes réfractaires, il faut considérer une inclusion dans un essai thérapeutique.

Historiquement utilisée chez les patients refusant l'amputation, la radiothérapie est désormais utilisée principalement lorsque la chirurgie ou la résection complète de la tumeur ne sont pas possibles, comme les ostéosarcomes du pelvis, de la colonne vertébrale ou de la tête et du cou. La radiothérapie peut alors permettre un meilleur contrôle de la maladie, bien que son efficacité par rapport à la résection n'ait pu être clairement mise en évidence à ce jour (Ollivier et al., 2022).

La survie globale à 5 ans est de 71%, mais elle chute à 30-45% pour les patients présentant des métastases synchrones (Smeland et al., 2019). Bien que ces chiffres restent somme toute élevés par rapport à d'autres types de cancer, le fait que ces taux n'aient pas évolué depuis près de 40 ans témoigne d'un besoin drastique de nouvelles avancées thérapeutiques. Dans ce sens, un certain nombre d'essais cliniques étudient l'intérêt d'agents anti-angiogéniques tels que le regorafenib, le cabozantinib ou le bevasizumab (Blay et al., 2022). Le nombre de candidats médicaments restent cependant faible, et le développement de nouvelles thérapies est donc primordial, que ce soit pour l'ostéosarcome ou pour d'autres cancers. Malheureusement, le processus de développement d'un nouveau médicament est long et coûteux, et beaucoup de candidats échouent entre les phases expérimentales pré-cliniques et cliniques. Pourtant, une partie de ces échecs pourraient être prévenus par l'utilisation de modèles pré-cliniques plus pertinents, tels que les modèles de culture en trois-dimensions.

2. MODÈLES 3D APPLIQUÉS AUX CANCERS

L'étude des mécanismes impliqués dans l'initiation, la progression et la résistance aux traitements des cancers passe par l'utilisation de divers modèles *in vivo* et *in vitro*. Les modèles *in vivo* (ex. : rongeurs, chiens, singes, etc.) se basent sur l'apparition de cancers spontanés, après des manipulations génétiques ou après une exposition à des carcinogènes. Une autre possibilité est l'induction de cancers par injection des animaux avec des cellules cancéreuses. L'expérimentation *in vivo* permet d'étudier le cancer dans un microenvironnement complexe similaire mais non identique à celui observé chez les patients. Cependant, l'utilisation de ces modèles a également ses limites : la diversité génétique et la spécificité immunitaire des espèces entraînent des disparités dans les résultats obtenus en recherche pré-clinique sur les animaux et en recherche clinique sur les humains, le cadre éthique stricte complexifie l'implémentation des expériences, et un personnel qualifié et des infrastructures dédiées sont requis ce qui entraîne un coût important. Les modèles *in vitro* impliquent la culture de cellules dérivées d'organismes multicellulaires dans des contenants en plastique ou en verre. Les cultures *in vitro* ont l'avantage d'autoriser un contrôle élevé des paramètres d'expérimentation, ce qui permet des expérimentations hautement répétables, un coût généralement faible, et un large éventail d'applications. La méthode de culture *in vitro* la plus utilisée est en deux-dimensions (2D), c'est-à-dire que les cellules se développent en monocouche adhérente. L'inconvénient est que les cultures 2D restent des modèles par trop simplifiés qui ne miment pas l'organisation histologique d'une masse tumorale *in vivo*. Afin de dépasser ces limites, une variété de modèles tri-dimensionnels (3D) ont été développés. Ils permettent de modéliser les interactions cellule-cellule et cellules-microenvironnement en y intégrant des paramètres physicochimiques plus physiologiques (ex. : gradient d'oxygène, de dioxyde de carbone, de nutriments, mise en place de barrières tissulaires) et une organisation spatiale plus biologique. De fait, ces modèles *in vitro* 3D pourraient permettre de combler le vide entre les modèles *in vivo* et *in vitro* 2D.

Cette partie a pour but de décrire les principaux modèles de cultures 3D actuellement disponibles pour étudier le développement du cancer et le criblage de candidats médicaments. Ces modèles sont présentés en regard de leurs valeurs ajoutées et de leurs

limitations propres. Une attention particulière quant à l'utilisation des modèles de culture cellulaire 3D pour étudier l'ostéosarcome a été portée. A noter que cette partie a été rédigée à partir de deux revues (Jubelin et al., 2022b; Munoz-Garcia et al., 2021) insérées à la fin du manuscrit (**ANNEXE 1 et 2**).

2.1. Cultures cellulaires 2D vs. 3D

Les cellules cancéreuses cultivées en 2D ne présentent pas les mêmes profils morphologiques, phénotypiques, de MEC et d'expression de gènes et de protéines que celles cultivées en 3D.

Après que les premières cultures de tissus aient été développées par Harrison au début du 20^e siècle (Harrison, 1910), la culture de cellules de mammifères se développa rapidement. La culture cellulaire en 2D produit des résultats reproductibles, est facile à mettre en œuvre, peu coûteuse, et facile à analyser. Ces qualités en ont fait le modèle le plus utilisé pour étudier la biologie et le cancer en particulier. S'il faut reconnaître la contribution importante des modèles 2D dans l'amélioration des connaissances sur le cancer, ils restent cependant des modèles simplistes qui ne peuvent représenter la biologie réelle des tumeurs et de leur microenvironnement.

Toutes les limites associées aux cultures 2D résultent du fait que les cellules croissent en monocouche adhérente sur une surface plastique, contrairement à l'organisation 3D observée *in vivo* (**Figure I.2.1**). De fait, la morphologie est le principal facteur de différence entre les deux modes de culture. En 2D, les cellules adhérentes s'étirent sur la surface du support de culture et prennent une morphologie aplatie. Ces cellules ont la capacité de traduire les forces mécaniques qu'elles subissent en signaux biochimiques via la mécanotransduction (Ingber, 2006). Ainsi, les cellules peuvent détecter la rigidité de leur support d'attache (Discher et al., 2005), ce qui entraîne une réorganisation du cytosquelette (Solon et al., 2007), une modification de la prolifération, la mort cellulaire (Nemir and West, 2010), ou encore l'induction d'un phénotype de dédifférenciation (Parreno et al., 2017).

De plus, l'organisation spatiale de la monocouche limite grandement les interactions cellule-cellule et empêche la formation d'un gradient de transport. Les cellules cultivées en 2D disposent d'un accès équitable et sans obstacle aux nutriments présents dans le milieu de culture. Par conséquent, la réponse aux signaux moléculaires tels que la chimiothérapie est

très différente de la situation *in vivo*. Ce gradient de signalisation est primordial dans l'initiation de nombreux processus physiologiques et pathologiques (ex. : prolifération, angiogenèse). De même, la composition spatiale et moléculaire de la MEC produite par les cellules cancéreuses est fortement affectée par la méthode de culture (Jakubikova et al., 2016). Or, cette MEC joue un rôle prépondérant dans la cancérogenèse, la progression tumorale et la migration cellulaire, par le biais de contacts directs ou de la fixation de facteurs de croissance à leur récepteur présents à la surface des cellules (Senthebane et al., 2018).

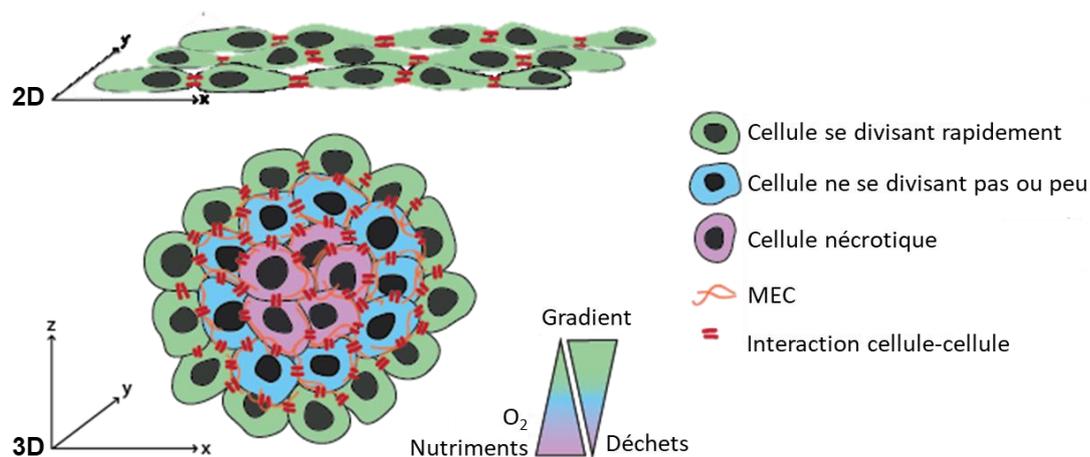


Figure 1.2.1. Organisation spatiale des cultures en 2D vs. 3D. Les cultures en monocouche adhérente (2D) reçoivent la même quantité de molécules provenant du milieu et ne font des liaisons avec les cellules adjacentes que sur un unique plan. Les cellules dans les sphéroïdes s'organisent en couches superposées (cellules nécrotiques au cœur, cellules ne se divisant pas ou peu dans la couche intermédiaire, cellules proliférant rapidement en périphérie) du fait du gradient de diffusion inhérent à leur structure.

2.1.2. Aller plus loin dans le mimétisme de la maladie : sphéroïdes et organoïdes

Parmi les formes que peuvent prendre les cellules cultivées en 3D, on en distingue deux principales : les organoïdes et les sphéroïdes.

Les organoïdes sont un modèle de culture 3D très intéressant pour reproduire la complexité des tissus. Les organoïdes sont des cultures organotypiques autoorganisées qui sont issues de cellules souches embryonnaires (CSE), de cellules souches pluripotentes induites (CSPi) ou de cellules souches adultes (CSA) provenant de tissus spécifiques. Les organoïdes dérivés de CSE ou de SCPi permettent de reproduire la structure complexe des organes adultes. Ils peuvent contenir des composés cellulaires mésenchymateux, épithéliaux et même endothéliaux (Azar et al., 2021). Malheureusement, ces organoïdes ont également tendance

à garder des propriétés foétales et à contenir des cellules étrangères au tissu mimé (Wu et al., 2018). Les organoïdes dérivés de CSA ne sont pas aussi complexes que ceux produits à partir des CSE ou des SCPi et ils ne peuvent reproduire que des tissus adultes gardant physiologiquement des propriétés régénératrices. Pour autant, ces organoïdes dérivés de CSA ont l'avantage de mimer les tissus adultes à la fois physiologiques et pathologiques (ex. : tumeurs), là où les organoïdes dérivés de CSE et de CSPi sont plus utiles pour étudier l'organogenèse et les maladies génétiques. L'induction de la formation des sphéroïdes se fait de deux manières : soit en culture submergée (les cellules sont cultivées au sein d'une matrice, elle-même recouverte de milieu), soit en culture air-liquide (les cellules sont cultivées au sein d'une matrice dont la face supérieure est en contact direct avec l'air alors que la face inférieure repose sur une membrane poreuse permettant la diffusion des nutriments à partir d'une chambre inférieure contenant du milieu de culture) (Figure I.2.2). La culture air-liquide a l'avantage d'offrir une meilleure oxygénation des organoïdes que la culture submergée. Elle permet donc de cultiver des fragments de tissus entiers qui peuvent contenir des cellules épithéliales et stromales (Ootani et al., 2009). Ces cellules stromales peuvent ainsi être suffisantes au maintien et à la survie des organoïdes, sans que des facteurs de croissance ou d'autres molécules n'aient besoin d'être ajoutés au milieu de culture.

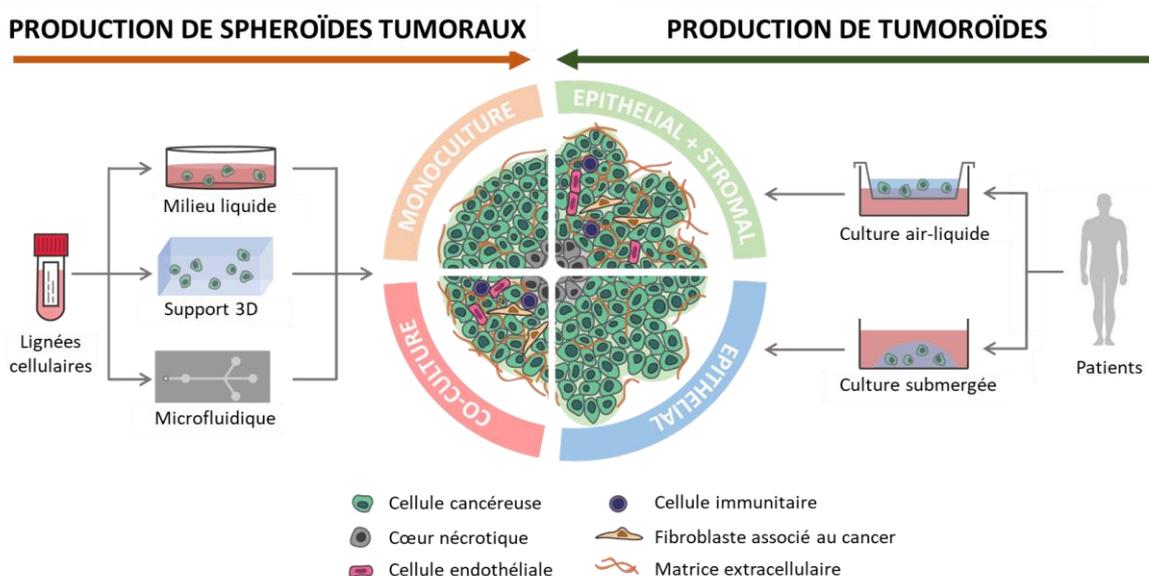


Figure I.2.2. Sphéroïdes vs. Organoïdes. Les sphéroïdes sont généralement issus de lignées cellulaires et produits avec des méthodes de culture 3D en milieu liquide, sur support 3D ou par microfluidique. À l'inverse, les organoïdes proviennent de patients et sont produits en culture air-liquide ou submergée. Ces modèles de culture 3D diffèrent par leur composition.

Les sphéroïdes sont principalement générés à partir de lignées cellulaires capables de s'auto-agréger en suspension ou au sein d'une matrice. Conçus par des méthodes de culture en milieu liquide, sur support de culture (*scaffold*), au sein de plateforme microfluidique ou par bio-impression (**Figure I.2.2**), ils peuvent être très simples à produire et à manipuler, et ils sont particulièrement puissants pour l'étude des micrométastases et des tumeurs avasculaires (Al-Ramadan et al., 2018; Stöhr et al., 2020). Il est possible d'améliorer leur pertinence en intégrant des cellules du microenvironnement tumoral (ex. : fibroblastes associés au cancer (FAC), cellules immunitaires, cellules vasculaires, etc.) dans le sphéroïde (Jaganathan et al., 2014; Noel et al., 2017). De plus, contrairement aux organoïdes, ils sont adaptés au screening à haut débit. Pour toutes ces raisons, les sphéroïdes sont le modèle 3D le plus utilisé dans la recherche oncologique depuis leur première utilisation en 1970 par Inch et al. (Inch et al., 1970).

2.1.3. Pourquoi et comment la culture cellulaire 3D peut combler l'écart entre les études *in vitro* et *in vivo* ?

Une masse tumorale est caractérisée par la coexistence d'une population hétérogène de cellules cancéreuses en relation étroite avec la MEC et le reste du microenvironnement tumoral. Dans ce contexte, les sphéroïdes et les organoïdes en tant que culture 3D sont un outil biologique permettant de répliquer l'hétérogénéité présente dans les tumeurs – au contraire de l'homogénéité observée avec les cultures 2D. Puisque le gradient de transport de l'oxygène, des nutriments et ces déchets cellulaires est généralement limité à 150-200 μm , les sphéroïdes et organoïdes ayant un diamètre supérieur à 500 μm présentent une structure stratifiée avec une population proliférante située en périphérie et un cœur composé de cellules non-proliférantes et nécrotiques (Curcio et al., 2007). Cette organisation sphérique, très similaire à ce qui est observable *in vivo* au niveau des tumeurs avasculaires, joue un rôle dans la sensibilité aux traitements. De plus, les cultures 3D reproduisent au moins partiellement le microenvironnement tumoral en restaurant les interactions cellules-cellules et cellules-MEC (Lovitt et al., 2018; Nakamura et al., 2003). Enfin, plusieurs études montrent que les cultures 3D, et en particulier les organoïdes, sont fidèles à la tumeur d'origine, que ce soit au niveau de leur expression génique et protéique, ou de leur réponse aux traitements (Broutier et al., 2017; Ganesh et al., 2019; Naruse et al., 2021; Pasch et al., 2019; Weeber et al., 2015).

Pour toutes ces raisons, les cultures 3D contribuent grandement à améliorer la compréhension de divers aspects biologiques du cancer, tels que la progression tumorale (Palikuqi et al., 2020; Roulis et al., 2020; Wisdom et al., 2018), le microenvironnement tumoral, l'expression génique et protéique (Bingel et al., 2017; Zschenker et al., 2012), les voies de signalisation pro-oncogéniques (Elia et al., 2017; Thippabhotla et al., 2019), et la résistance aux traitements (Imamura et al., 2015; Ong et al., 2010; Rohwer and Cramer, 2011). Les cultures 3D semblent également être une plateforme prometteuse pour le développement et le criblage de molécules thérapeutiques, dont les immunothérapies (Dijkstra et al., 2018; Ganesh et al., 2019; Jacob et al., 2020).

2.2. Les types de modèles cellulaires 3D et leurs applications en oncologie

2.2.1. Modèles de culture 3D en milieu liquide

La principale caractéristique des systèmes de culture 3D en milieu liquide est que l'adhérence des cellules à un substrat est restreinte par le recouvrement du récipient de culture avec un produit anti-adhérence, l'utilisation de la gravité, ou par la création de mouvements de fluide empêchant les cellules de se déposer au fond du récipient de culture. Dans ces conditions, l'interaction cellule-cellule est privilégiée, et les cellules peuvent théoriquement s'agréger. De fait, les modèles de culture 3D en milieu liquide sont principalement utilisés pour générer des sphéroïdes, dont la morphologie reproduit les gradients physicochimiques observés dans les tumeurs solides. De plus, à la manière des cellules souches saines, les cellules souches cancéreuses (CSC) peuvent être identifiées et enrichies en utilisant l'essai de formation de sphères, qui implique des méthodes de culture 3D en milieu liquide (Ma et al., 2019). Les modèles de culture 3D en milieu liquide sont pour la majorité faciles d'utilisation, peu chers et facilement implémentables pour du criblage haut débit. De plus, les sphéroïdes générés dans un environnement liquide sont exposés à des conditions similaires (le milieu de culture a une densité d'environ 1 g/cm^3 et une viscosité de $0.7\text{-}1 \text{ mPa}\cdot\text{s}$) que le compartiment sanguin (une densité de $1,0\text{-}1,1 \text{ g/cm}^3$ et une viscosité de $3,5\text{-}5,5 \text{ mPa}\cdot\text{s}$) (Fröhlich et al., 2013; Kenner, 1989; Nader et al., 2019; Poon, 2020).

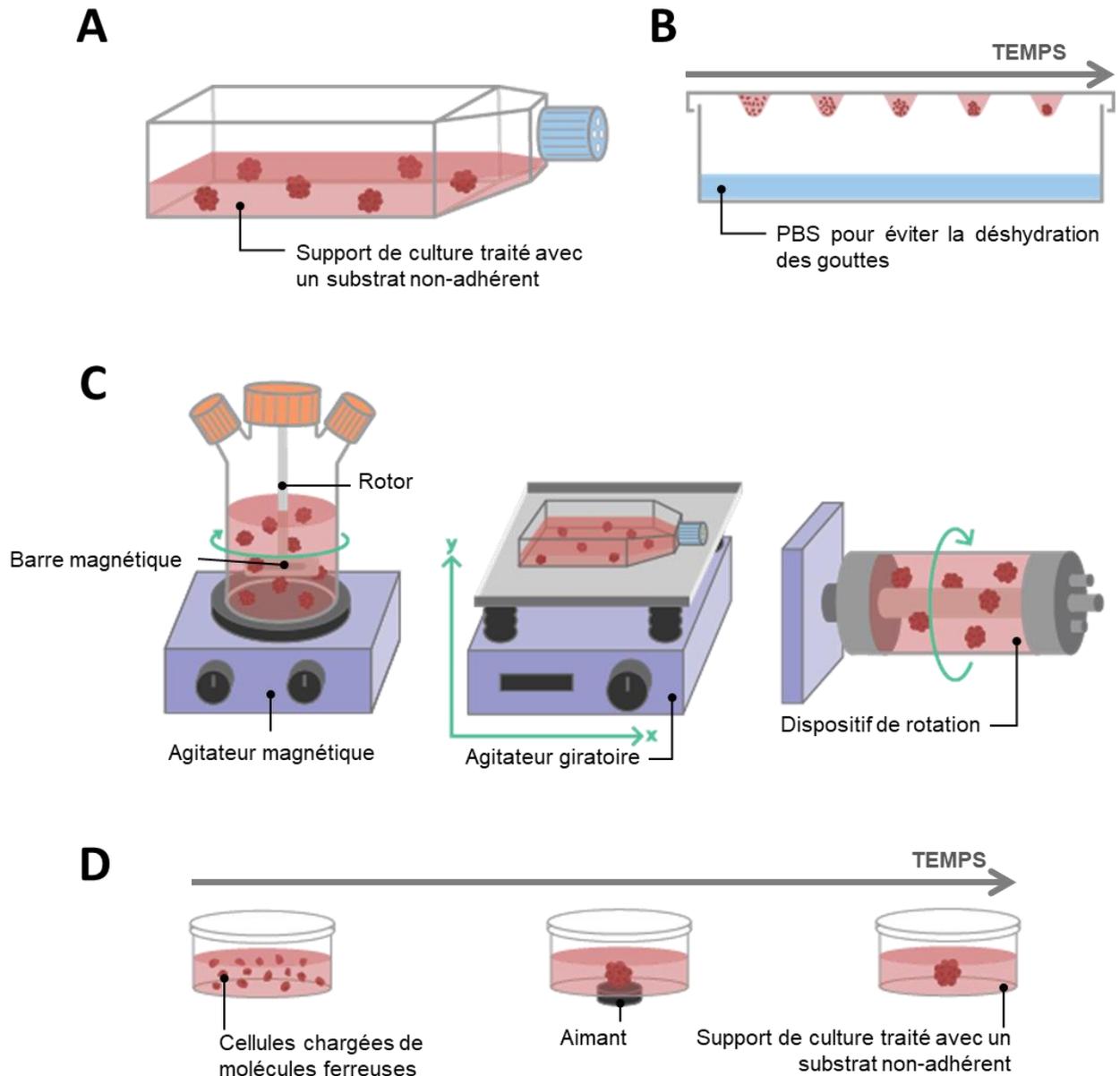


Figure 1.2.3. Culture 3D en milieu liquide. (A) Liquid Overlay Technique. (B) Hanging Drop. (C) Culture par agitation. (D) Lévitación magnétique.

2.2.1.1. La culture en submersion liquide ou *liquid overlay technique*

La culture en submersion liquide ou *liquid overlay technique* (LOT) en anglais est la méthode la plus simple pour produire des sphéroïdes. Les cellules sontensemencées sur une surface non adhérente, ce qui encourage l'adhérence cellule-cellule, amenant à la formation spontanée de sphéroïdes (**Figure 1.2.3A**). Pour créer ces conditions de non-adhérence, le récipient de culture est recouvert avec des produits tels que de l'agarose ou du polyhydroxyméthyle méthacrylate (Carlsson and Yuhas, 1984; Friedrich et al., 2009; Ivascu and Kubbies, 2006; Xiang et al., 2011).

La culture en LOT ne nécessite aucun équipement spécialisé et est facilement implémentable. Pour autant, toutes les cellules ne sont pas capables de former spontanément des sphéroïdes lorsque cultivées en conditions non-adhérentes (Froehlich et al., 2016). Des ajustements peuvent donc être nécessaires afin de promouvoir la formation des sphéroïdes, notamment en ajoutant des éléments de la MEC au milieu de culture (Dubois et al., 2017), en enduisant le récipient de culture avec des matériaux bioactifs (ex. : acide hyaluronique, laminine, poly-D-lysine) (Carvalho et al., 2017; Kano et al., 2003; G. Y. Lee et al., 2007) ou en utilisant des milieux de culture complétés avec des facteurs de croissance et des cytokines (Fleurence et al., 2016; Frøen et al., 2011; Maliszewska-Olejniczak et al., 2018).

La principale limite de la culture en LOT est la variabilité en termes de taille et de morphologie des sphéroïdes générés. Une modulation de la concentration d'ensemencement ou l'utilisation de plaques à fond arrondi ou microstructurées peut être nécessaire afin d'obtenir des sphéroïdes homogènes.

2.2.1.2. La culture en goutte pendante ou *hanging drop*

La culture en goutte pendante ou *hanging drop* (HD) en anglais se base sur la gravité pour former les sphéroïdes et fut utilisée en particulier pour la différenciation de CSE en corps embryonnaires (Wang and Yang, 2008). Une suspension cellulaire dans un volume inférieur à 30 μL est déposée sur la surface d'une boîte de pétri non-traitée pour la culture (généralement le couvercle), qui est ensuite inversée. La goutte ne se répandra pas sur la surface du fait de la gravité et de la tension superficielle, ce qui permet la formation d'un sphéroïde dans le bas de la goutte (**Figure I.2.3B**). Il est possible d'améliorer la formation des sphéroïdes en ajoutant des additifs comme de la méthylcellulose ou du collagène (Leung et al., 2015).

La culture en HD a notamment l'avantage d'être facilement implémentable puisqu'elle ne requiert pas de matériel de culture coûteux. Elle promeut également les contacts cellules-cellules même lorsque le nombre de cellules est faible. Utilisée dès 1910 par R. Harrison pour la culture de cellules neuronales (Harrison, 1910), cette méthode de culture 3D a été depuis largement utilisée dans le contexte de l'oncologie et est par conséquent bien documentée pour de multiples types de cancer, dont le cancer du sein (Froehlich et al., 2016; Raghavan et al., 2016a), de la prostate (Eder and Eder, 2017) ou encore des ovaires

(Létourneau et al., 2012). Dans le contexte du cancer des ovaires, les cultures en milieu liquide sont particulièrement pertinentes, puisque les cellules cancéreuses ovariennes métastases régulièrement en agrégats multicellulaires au sein d'ascite présent dans la cavité abdominale. En utilisant la culture en HD pour générer des sphéroïdes de cancer des ovaires, Al Habyan et al. ont montré que les cellules pouvaient se détacher spontanément de la tumeur primaire de façon groupée, et que ces agrégats étaient moins sensibles à l'apoptose. Des résultats similaires ont pu être obtenus *in vivo* (Al Habyan et al., 2018).

En parallèle, la technique a également évolué et des plateformes de HD ont été développées pour permettre la culture de sphéroïdes à haut débit (Tung et al., 2011). Pour autant, cette méthode a certains inconvénients. Bien que la culture en HD permette un meilleur contrôle de la formation des sphéroïdes que les autres méthodes du fait du faible volume de culture, il peut être difficile de changer le milieu ou d'ajouter des traitements sur des temps de culture long. De fait, les sphéroïdes générés en culture HD sont souvent transférés dans des récipients de culture plus facilement manipulables, tel que des plaques de culture à puits multiples.

2.2.1.3. La culture par agitation

Une autre méthode de production de sphéroïdes consiste à cultiver les cellules dans un environnement liquide en agitation constante, ce qui empêche l'adhérence des cellules aux parois du récipient de culture et augmente le nombre de collision entre les cellules. Dans ces conditions, les cellules ont tendance à s'agréger spontanément en sphéroïde. Afin de créer ce mouvement, soit le liquide est constamment mélangé, soit le récipient de culture est agité.

Les fioles rotatives (en anglais, *spinner flask*) sont des flacons de culture à trois encolures qui peuvent contenir un volume de plusieurs centaines de millilitres. Les échanges gazeux sont rendus possibles par le biais des deux bras avec des bouchons à filtre. Le mouvement de fluide est produit par un rotor relié à une barre magnétique (**Figure 1.2.3C gauche**). Le principal problème avec les fioles rotatives est la fortes contrainte de cisaillement induite par les mouvements de fluide, ce qui peut limiter la croissance de certains types cellulaires.

L'agitation du récipient de culture permet également de produire du mouvement de liquide. La façon la plus simple de faire est d'utiliser un agitateur orbital qui assurera une agitation giratoire (**Figure 1.2.3C centre**). De la même manière qu'avec les fioles rotatives, les

mouvements de fluide induisent une contrainte de cisaillement. Dans certains cas cependant, cette contrainte peut être représentative d'un phénomène biologique. Ainsi, le mouvement giratoire produit par l'agitateur orbital peut permettre de mimer les contraintes de cisaillement que subissent des sphéroïdes ovariens lors du processus de métastase transcoelomique (Masiello et al., 2018).

Le RCCS (en anglais, *rotary cell culture system*) a été conçu dans les années 90 par la NASA pour étudier le comportement des cellules dans un environnement en microgravité. Le bioréacteur rotatif est constitué d'un récipient cylindrique qui tourne doucement autour d'un axe horizontal, ce qui soumet les cellules qu'il contient à une chute libre continue. Dans ces conditions, les cellules sont maintenues en suspension et peuvent s'agréger en sphéroïdes (**Figure I.2.3C droite**). Contrairement aux deux méthodes précédentes, le RCCS a l'avantage de ne produire que très peu de force de cisaillement. Bien qu'utilisé pour décrire la croissance de diverses tumeurs humaines (ex. : gliome, prostate, urinaire, vessie, sein, métastase au cerveau) (Ingram et al., 1997), ce modèle de microgravité doit être employé avec précaution car les propriétés physiques induites par celui-ci sont rarement transposables chez l'humain.

Le principal avantage des méthodes de culture par agitation est qu'elles permettent de produire un très large nombre de sphéroïdes de grandes tailles (Zanoni et al., 2016), du fait des mouvements de fluide qui participent à l'oxygénation, à la distribution de nutriments et à l'élimination des déchets. Ces modèles présentent aussi la limite de produire des sphéroïdes de tailles et de morphologies très différentes. De plus, il est impossible de suivre en temps-réel la formation des sphères à cause du mouvement constant.

2.2.1.4. La lévitation magnétique

La méthode de culture 3D impliquant l'utilisation de la lévitation magnétiques a été développée en 2010 (Souza et al., 2010) et se base sur l'action de nanoparticules magnétiques biocompatibles pour assembler les cellules en sphéroïdes. Les cellules sont incubées avec les nanoparticules ferreuses qu'elles vont assimiler. Une courte exposition à un champ magnétique par le biais d'un aimant promeut l'agrégation des cellules et la formation de sphéroïdes, ce qui favorise les interaction cellules-cellules et la synthèse de MEC (**Figure I.2.3D**). Ceci est généralement réalisé dans des plaques de culture à puits multiples, ce qui permet la synthèse d'un sphéroïde par puits.

Cette technique a l'avantage de faciliter une agrégation cellulaire rapide et douce qui ne nécessite pas de substrat additionnel, de milieu spécialisé ou d'équipement particulier en dehors des aimants et des nanoparticules ferreuses. De plus, la lévitation magnétique est théoriquement adaptée à tout type de cellule. Des cocultures peuvent être réalisées en agrégeant de multiples types cellulaires en sphéroïde (Jaganathan et al., 2014; Noel et al., 2017). Il est même possible de contrôler jusqu'à un certain point l'organisation des cellules à l'intérieure des sphéroïdes en ajoutant chaque type cellulaire à différents temps lors de l'assemblage magnétique. Ainsi, le premier type cellulaire subira l'action magnétique de l'aimant et s'agrègera. Puis, le second type cellulaire est ajouté, et les cellules s'agrègent autour de la couche de cellules précédente et ainsi de suite, ce qui crée un sphéroïde à plusieurs strates (Jaganathan et al., 2014; Noel et al., 2017). Chaque sphéroïde étant cultivé dans un puits unique et subissant le même champ magnétique que les autres sphéroïdes assure une expérience hautement reproductible. Enfin, cette méthode de culture 3D est adaptée au criblage à haut débit. Pour autant, la lévitation magnétique a certains désavantages. Bien qu'il ait été mis en évidence que les nanoparticules magnétiques n'ont pas un impact direct sur le comportement cellulaire (Guo et al., 2014; Souza et al., 2010), un champ magnétique de plus de 30 mT affecte l'angiogenèse (Wang et al., 2009), la croissance des sphéroïdes tumoraux (Zablotskii et al., 2016) et la migration cellulaire (Hashimoto et al., 2007). De plus, les nanoparticules magnétiques colorent les cellules en marron du fait des oxydes de fer qu'elles contiennent. Ceci peut gêner les essais impliquant des réactifs colorimétriques qui forment des produits marrons tel que le 3,3'-Diaminobensidine ou l'o-phenylenediamine.

2.2.2. Modèles de culture 3D sur support (en anglais, *scaffold*)

Les modèles de culture 3D sur support agissent comme un substrat sur lequel les cellules peuvent s'accrocher et croître, et reproduisent donc partiellement la MEC. La porosité, la solubilité, la souplesse et la composition du support impactent la réponse cellulaire (Rao et al., 2013). Par conséquent, le choix du biomatériau utilisé dépendra de l'origine et du niveau d'avancement du cancer, des cellules présentes dans le microenvironnement tumoral et des recherches à réaliser. En effet, des compositions différentes de la MEC ont pu être observées à différents stades du cancer (Li et al., 2020) mais également entre les tissus sains, les tumeurs primaires et les tissus métastatiques (Naba et al., 2014).

Afin de répondre à la multiplicité des MEC observées *in vivo*, divers supports d'origine naturelle ou synthétique ont été développés (**Tableau I.2.1**).

2.2.2.1. Supports de culture 3D d'origine naturelle

Les supports naturels incluent des biomatériaux composés de protéines, de polysaccharides ou encore d'une MEC décellularisée.

Le collagène et ses dérivés (gélatine et gélatine méthacryloyle) permettent la production de supports composés de protéines. Le collagène est la principale protéine fibrillaire de la MEC dans les tissus conjonctifs et représente un tiers de la totalité des protéines de l'organisme (Shoulders and Raines, 2009). Les supports à base de collagène ont été utilisés pour la culture 3D de différents cancers tels que des cancers du sein (Szot et al., 2011), des ovaires (Zheng et al., 2015), du pancréas (Dangi-Garimella et al., 2013), de la tête du cou (Ayuso et al., 2019) ou encore du foie (Yip and Cho, 2013). Le Matrigel™ est un mélange de protéines de la membrane basale, de facteurs de croissance et de cytokines qui est sécrété par les cellules sarcomateuses des souris Engelberth-Holm-Swarm. Les principales protéines qui le compose sont la laminine, le collagène de type IV, le sulfate d'héparane et l'entactine (Kleinman and Martin, 2005). Du fait de son origine maligne, le Matrigel™ a été largement utilisé pour étudier l'invasion cellulaire et les métastases, les CSC (Benton et al., 2014), l'interaction des différents composants cellulaire du microenvironnement tumoral avec les cellules cancéreuses (Zhang et al., 2020) ainsi que le rôle de la MEC sur la résistance aux traitements (Lovitt et al., 2018). Enfin, le Matrigel™ est la matrice la plus utilisée pour soutenir la croissance d'organoïdes (Boj et al., 2015; Jiang et al., 2020; Seppälä et al., 2020). Les polymères naturels peuvent également se composer de polysaccharides. Les glycosaminoglycanes (GAG) sont des polysaccharides linéaires capables de s'attacher de façon covalente aux protéines de la MEC ou à d'autres GAG, et ils jouent un rôle essentiel dans la stabilisation de la MEC. Leur structure (longueur de chaîne et motif de sulfatation) diverge entre les tissus sains et pathologiques, mais également entre les tumeurs primaires et les métastases (Weyers et al., 2012). Les supports à base d'acide hyaluronique font partie des matrices les plus utilisées en recherche oncologique. Elles ont été utilisées pour l'établissement de modèles 3D (Campbell et al., 2011; Xiao et al., 2018; Xu et al., 2012), pour l'étude du comportement cellulaire en réponse à des modifications de l'environnement (Gurski et al., 2012; H.-Y. Liu et al., 2018; Shen et al., 2014) ou pour du criblage

Tableau I.2.1. Liste des polymères naturels et synthétiques utilisés pour la production des supports de culture 3D

	Type de polymère	Sous-type de polymère	Avantages (+)/désavantages (-)
Support de culture 3D naturel	Protéique	Collagène Elastine Fibronectine Fibrine Gélatine Fibroïne de soie	<ul style="list-style-type: none"> + Biocompatibilité + Bio-activité inhérente - Structure complexe - Difficulté à contrôler la rigidité, la dégradabilité et la bio-activité - Variabilité inter-lot - Approches techniques assez coûteuses
	Polysaccharide	Glycosaminoglycane (acide hyaluronique, sulfate de chondroïtine) Alginate Chitosan	
	MEC décellularisée		
Support de culture 3D synthétique	PEG pHEMA	RADA16-I (Puramatrix®) Fmoc (Biogelx®) H9e FEFK MAX1	<ul style="list-style-type: none"> + Structure bien définie + Très reproductible + Possibilité de moduler les propriétés biochimiques et biophysiques - Pas de bio-activité inhérente - Nécessite une fonctionnalisation pour permettre l'adhérence cellulaire - Plus faible biocompatibilité que les supports de culture 3D naturels.
	PVA SAP		
	Polyester aliphatique	PCL PGA PLA PLGA	

MEC : Matrice extracellulaire ; PEG: poly(éthylène) glycol; pHEMA: poly(2-hydroxyéthyl méthacrylate); PVA: poly(vinyl alcool); SAP: Self-Assembling peptides; PCL: polycaprolactone; PGA: poly(glycolic acid); PLA: poly(lactic acid); PLGA: poly(lactic-co-glycolic acid).

haut débit (Gurski et al., 2009; Tang et al., 2017). L'alginate et le chitosane sont également des polysaccharides qui sont retrouvés respectivement dans la membrane cellulaire des algues marrons et l'exosquelette des arthropodes. Plusieurs de ces biomatériaux peuvent également être associés ensembles pour former des composites (C. Liu et al., 2018; Rao et al., 2013).

Malgré cela, il peut s'avérer compliqué de reproduire le microenvironnement retrouvé *in vivo* à partir de plusieurs polymères au sein d'un unique support de culture. Les tissus décellularisés sont une bonne alternative pour produire des MEC similaires au tissu initial. Lors de ce processus, toutes les cellules sont retirées du tissu et seule la MEC et son organisation sont maintenues. La décellularisation est réalisée par des méthodes physiques (ex. : température, électroporation, pression hydrostatique), chimiques (ex. : tensioactifs ioniques et non ioniques, acides et bases) et enzymatiques (ex. : trypsine, nucléase, dispase) (Gilpin and Yang, 2017). Ces tissus décellularisés ont permis de mettre en évidence le rôle de la MEC dans la polarisation des macrophages ou encore dans la résistance aux traitements (Hoshiba and Tanaka, 2016; Pinto et al., 2017).

Comme tous ces supports viennent de sources naturelles, les variations inter-lots posent problèmes. De plus, certains polymères peuvent être difficiles à extraire en grande quantité (ex. : collagène). Enfin, leur structure est complexe, pas toujours bien définie et peut amener à des propriétés non reproductibles entre différents lots de matrice. De fait, les scientifiques ont développé des supports synthétiques afin de réduire le coût de production et de limiter les variabilités inter-matrices.

2.2.2.2. Supports 3D de culture cellulaire d'origine synthétique

A l'inverse des biopolymères d'origine naturelle, la composition chimique des supports synthétiques est complètement contrôlée. Il est possible d'affiner leur propriétés biochimiques et mécaniques (ex. : rigidité, biodégradabilité, bio-activité) et ces supports sont hautement reproductibles.

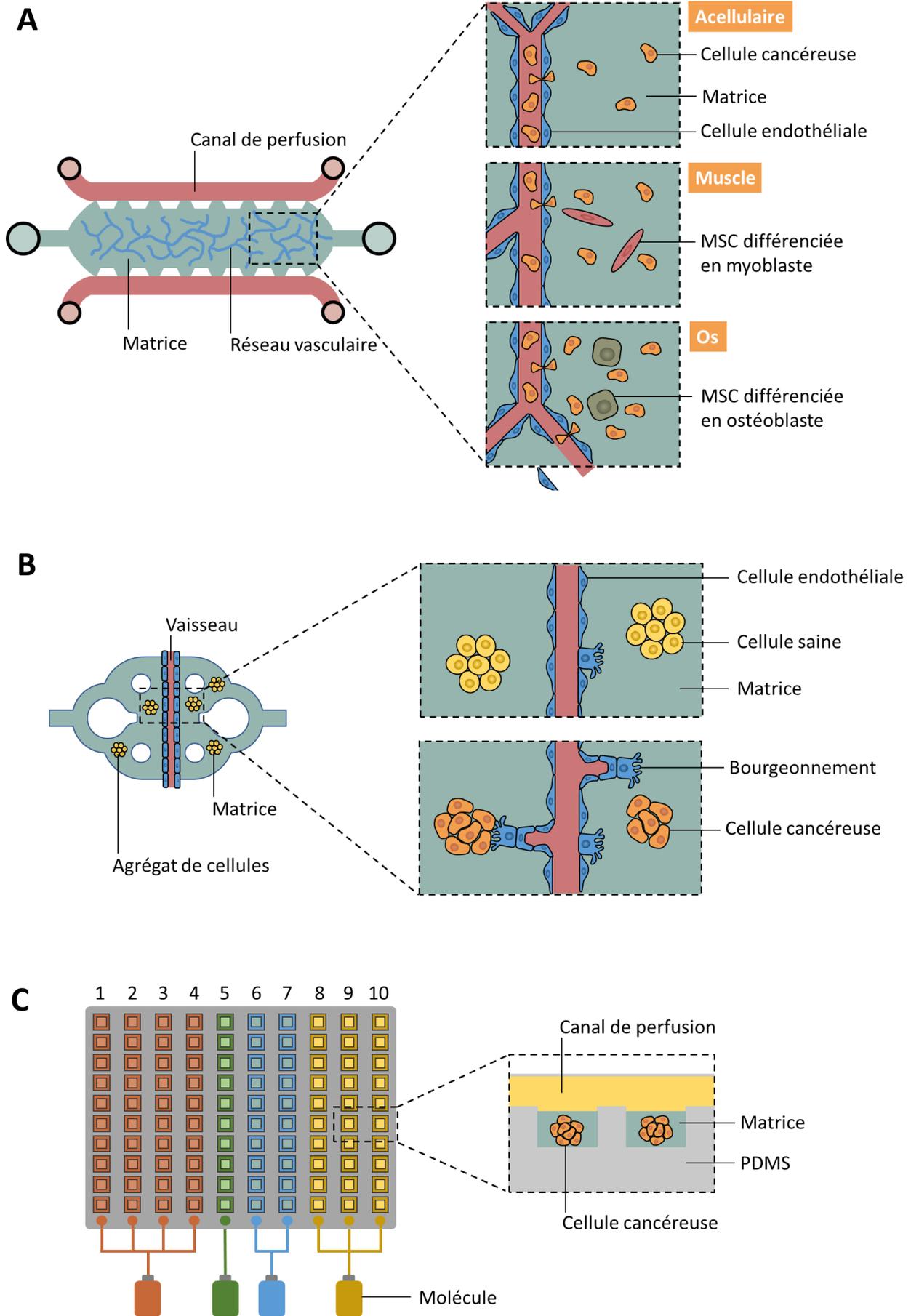
Le polyéthylène glycol (PEG) est un polymère synthétique qui enfle pour former un hydrogel en quelques minutes lorsque exposé à une solution aqueuse. L'incorporation de fonctionnalités biologiques et biochimiques dans le squelette du PEG permet d'en étudier directement l'impact sur les cellules cancéreuses (Zhu, 2010), notamment au niveau de la

morphologie et de leur expression génique et protéique (Sieh et al., 2012) ainsi qu’au niveau de la capacité de prolifération (Pradhan and Slater, 2019) de ces cellules.

Les polyesters aliphatiques tels que le polycaprolactone (PCL), l’acide polyglycolique (PGA), l’acide polylactique (PLA) ou l’acide polylactique-coglycolique (PLGA) sont d’autres matériaux synthétiques communément utilisés pour former des supports de culture 3D. Comme c’était le cas pour le PEG, les polyesters ont une biocompatibilité et une capacité d’ajustement élevées. Ces polyesters diffèrent par leur hydrophobie, ce qui influe sur leur dégradabilité : plus le polymère est hydrophobe, moins il sera dégradé. Ces polyesters peuvent donc être classés du plus lent au plus rapide à être dégradé : PCL<PLA<PLGA<PGA (Göpferich, 1996). Bien que n’étant pas composé de molécules biologiques, la culture de cellules du microenvironnement tumoral au sein de ces supports synthétiques peut permettre le dépôt de MEC par les cellules sécrétrices (Nayak et al., 2019).

Les peptides auto-assemblables (SAP) sont des petites molécules qui s’organisent spontanément en structures supramoléculaires nanofibrillaires lorsque soumises à un changement de pH, de température ou à un traitement enzymatique (Lee et al., 2019; Zhang, 2003). Les SAP ont été utilisés comme transporteurs de molécules pour l’administration de traitements (Ashworth et al., 2020; Liu et al., 2011). Ils sont hautement biocompatibles, facilement ajustable et offre un réseau fibreux organisé similaire à la MEC (Mi et al., 2009; Worthington et al., 2015). De plus, leur faible longueur (<20 acides aminés) rend leur synthèse rapide, facile et peu coûteuse. Parmi la variété de SAP existant, RADA16 est celui le plus communément utilisé et est disponible dans le commerce sous le nom PuraMatrix®. Des cancers comme l’adénocarcinome ductulaire du pancréas (Betriu and Semino, 2018), le carcinome mammaire (Zhang et al., 2020), le carcinome hépatocellulaire (Xu et al., 2012) et la leucémie (Song et al., 2015) ont été cultivés dans un support à base de RADA16.

Enfin, ces polymères synthétiques peuvent être hybridés avec des polymères naturels pour améliorer leur biocompatibilité (Beck et al., 2013; Liang et al., 2011; Tsao et al., 2014).



2.2.3. Modèles émergents de culture cellulaire 3D

2.2.3.1. Les plateformes microfluidiques

Les plateformes microfluidiques se basent sur la manipulation de fluides dans des petits volumes et espaces (de l'ordre du micro) au sein d'un réseau de canaux. Cette dimension réduite induit un écoulement reproductible et laminaire qui facilite la formation de sphéroïdes homogènes (Wu et al., 2008). Dans le domaine de l'oncologie, ces plateformes microfluidiques ont été utilisées pour séparer et isoler les cellules cancéreuses telles que les CTC à partir du sang (Tellez-Gabriel et al., 2018). Leur utilisation a été par la suite étendue à la culture cellulaire en 2D et en 3D. Les plateformes microfluidiques peuvent prendre des formes différentes, incorporer des supports de culture diverses et être produites à partir de matériaux variés. Ce grand panel de plateformes répond aux besoins de mimer au mieux les différents microenvironnements tumoraux et mécanismes cancéreux. Ainsi, des modèles de culture 3D en plateforme microfluidique ont été notamment développés pour étudier la migration cellulaire dans le processus métastatique (Jeon et al., 2015), l'angiogenèse cancéreuse (Miller et al., 2018) ou encore pour le criblage haut débit (Schuster et al., 2020), dont des exemples sont présentés dans la **Figure I.2.4**.

◀ **Figure I.2.4. Exemple de modèle de culture 3D en plateforme microfluidique.** Les plateformes microfluidiques peuvent prendre différentes formes afin de mimer la grande variété de cancer et les multiples mécanismes qui les régissent. A] Cette plateforme microfluidique permet d'étudier la migration et l'extravasation des cellules cancéreuses et le rôle joué par le microenvironnement tumoral. Une plateforme microfluidique contenant une chambre centrale est remplie d'une matrice gélifiée contenant des cellules endothéliales capables de s'organiser en réseaux vasculaires perfusables grâce au milieu apporté par les deux canaux latéraux. La chambre centrale vascularisée peut également contenir d'autres types cellulaires afin de mimer des microenvironnements différents (des CSM engagées dans la lignée myoblastique ou ostéoblastique pour mimer le tissu musculaire ou osseux respectivement). Des cellules cancéreuses ayant un tropisme pour l'os vont donc plus s'extravaser vers le tissu mimant l'os que les autres types d'environnement. B] Cette autre plateforme permet de mimer le rôle des cellules cancéreuses dans l'induction de l'angiogenèse. Des agrégats de cellule peuvent être enrobés dans une matrice au sein d'un système de micro-canaux synthétiques. La présence d'une tige traversant de part en part ce système pendant la polymérisation du gel permet de créer un pseudo canal lors de son retrait. Des cellules endothéliales peuvent alors être perfusées dans ce canal. L'arrêt temporaire du flux leur permet d'adhérer et d'ainsi créer un vaisseau perfusable. Grâce à ce modèle, une augmentation des bourgeonnements angiogéniques à partir du vaisseau central peut être observée lorsque la matrice contient des cellules cancéreuses. C] Les plateformes microfluidiques sont également une vraie plus-value dans le contexte de l'automatisation du criblage de molécules. Cette plateforme microfluidique permet ainsi d'étudier l'impact de différents traitements sur 200 échantillons (seuls 100 représentés sur le schéma) divisés en 20 unités contenant 10 puits chacune. Chaque puit peut ainsi accueillir 1 sphéroïde, et chaque unité un type de traitement. La présence de valve dont l'ouverture et la fermeture peuvent être contrôlées par ordinateur permet une automatisation du processus.

Le PDMS est le matériau le plus utilisé pour la biofabrication des plateformes de microfluidiques du fait de sa biocompatibilité, de sa facilité à être modelé et de sa transparence qui facilite la microscopie. De plus, ce composé est perméable aux gaz ce qui assure une oxygénation suffisante des fluides et des cellules cultivées à l'intérieure de la plateforme de microfluidique. Le PDMS a cependant le désavantage d'être perméable à l'évaporation de l'eau ce qui peut aboutir au dessèchement des échantillons. La porosité du matériau est également responsable de l'absorption d'un grand nombre de cytokines et de molécule de signalisation ce qui peut entraîner des résultats biaisés (Berthier et al., 2012). Afin de dépasser ces limites, d'autres matériaux ont été utilisés pour la fabrication des plateformes microfluidiques tels que du polystyrène (Ko et al., 2019).

Les plateformes microfluidiques vont plus loin dans l'imitation des tumeurs que les modèles 3D présentés précédemment, mais elles nécessitent des collaborations interdisciplinaires (physique, biochimie, ingénierie, biologie) et des matériaux et équipements coûteux.

2.2.3.2. La bio-impression 3D

La bio-impression 3D est une approche innovante basée sur un processus de fabrication additif automatique qui offre le potentiel d'assembler des structures similaires aux tissus en contrôlant le positionnement des cellules, tissus et biomatériaux. De fait, la bio-impression 3D permet la formation d'architectures et de propriétés complexes participant à la fonction du tissu et pourrait donc être un tremplin pour une forme avancée de médecine personnalisée. Les travaux de Heinrich et al. illustrent parfaitement ces propos : la construction d'un « mini-cerveau » contenant différents types cellulaires leur a permis d'étudier spécifiquement l'interaction des cellules entre elles et l'impact de molécules de chimiothérapie sur cette même interaction (Heinrich et al., 2019). Les biomatériaux à base d'hydrogel utilisés pour la bio-impression sont appelés bio-encre. Ces bio-encre doivent posséder des propriétés viscoélastiques adaptées à un dépôt feuillelet après feuillelet, afin de garantir une impression fidèle des constructions 3D. En fonction du biomatériau présent dans la bio-encre, les structures 3D bio-imprimées peuvent être solidifiées par action physique (température ou lumière), enzymatique ou chimique (pH ou ions) (Kim et al., 2018; Petta et al., 2018; Rutz et al., 2015). Les bio-imprimantes se différencient par leurs modalités d'impression et peuvent donc être classées en quatre catégories : la bio-impression à jet d'encre, la bio-impression par micro-extrusion, la bio-impression assistée par laser et la bio-

impression par stéréolithographie. Ces modalités de bio-impression (**Figure I.2.5**) utilisent des stratégies différentes avec leurs avantages et inconvénients (**Tableau I.2.2**).

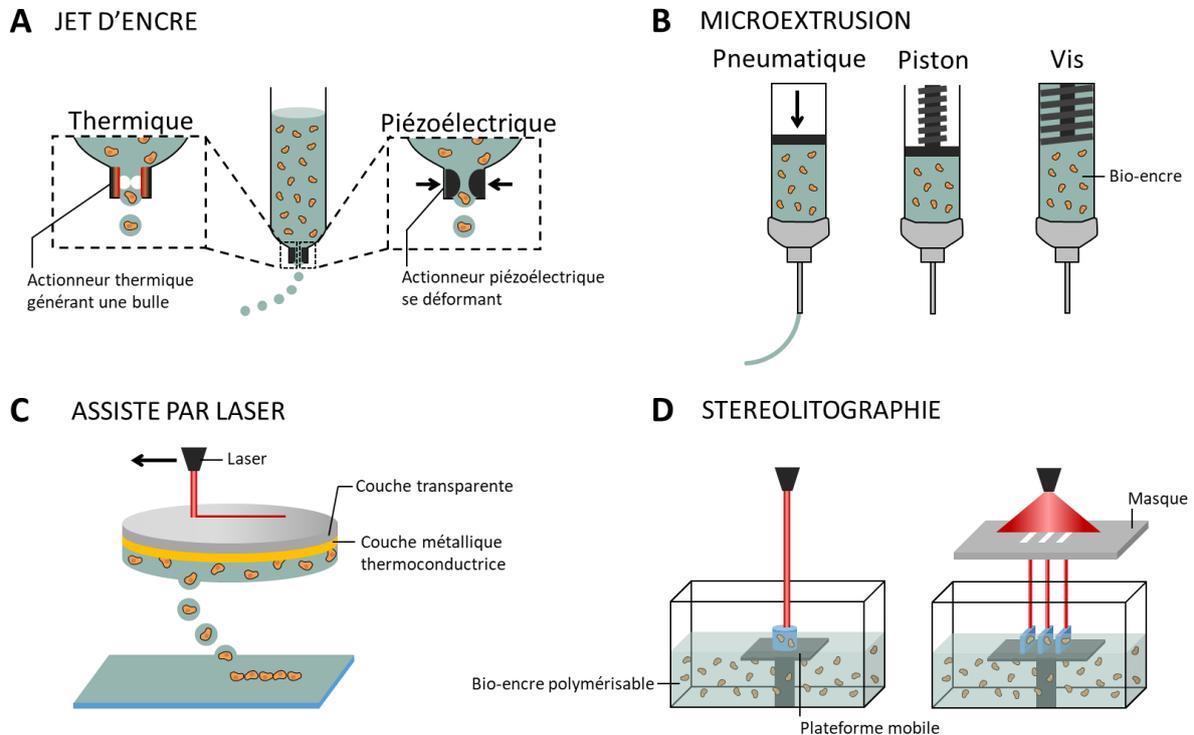


Figure I.2.5. Méthodes de bio-impression 3D. Il existe quatre formes de bio-impression 3D, qui diffèrent par leur modalité. (A) L'impression à jet d'encre utilise la température ou un courant électrique pour éjecter au goutte à goutte la bio-encre chargée en cellule. (B) La microextrusion utilise la force physique pour extraire la bio-encre en continu. (C) Le bio-impression assistée par laser utilise un ruban dit d'impression composé d'une couche transparente laissant passer la lumière d'un laser, d'une couche métallique emmagasinant l'énergie du laser sous forme de chaleur et d'une couche de bio-encre contenant les cellules. La bio-encre est imprimé goutte par goutte et suit le tracé du laser. (D) La stéréolithographie utilise également un laser pour polymériser une bio-encre contenue au sein d'une cuve.

2.2.4. Etudier l'ostéosarcome en 3D

La complexité de la structure osseuse et du microenvironnement tumoral implique que les cultures 2D ont une organisation très différente des tissus tumoraux naturels, et ne sont donc pas toujours adaptées à l'étude de certains aspects de l'ostéosarcome. De fait, à l'image de ce que y est observé pour d'autres cancers moins rares, le nombre d'étude utilisant des modèles 3D pour investiguer cette tumeur osseuse primaire augmente chaque année.

Tableau I.2.2. Types de bio-impression, mécanismes, avantages et désavantages

Type	Sous-type	Avantages (+)/Désavantages (-)
Bio-impression à jet d'encre	<p>CIJ : se base sur le phénomène d'instabilité du Plateau-Rayleigh pour surpasser la force de tension de la bio-encre à l'extrémité de l'aiguille d'impression ce qui permet une impression au goutte à goutte.</p>	<ul style="list-style-type: none"> + Grande vitesse + Faible coût + Haute viabilité cellulaire
	<p>DOD : se base sur la génération de gouttes par un stimulus thermique ou piézoélectrique pour éjecter sur demande la bio-encre goutte à goutte. Dans le cas du stimulus thermique, un activateur localisé au sein du bec de la seringue va chauffer très rapidement, générant une bulle d'air comprimé qui, en explosant, va fournir la force nécessaire à l'éjection de la goutte. Dans le cas du stimulus piézoélectrique, c'est un matériau se déformant avec un courant électrique qui va permettre cela.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Nécessite un équipement spécifique - Densité faible de cellules bio-imprimables - Bio-encre à viscosité faible uniquement - Risque de bouchage - Choc thermique possible dans le cas de la DOD - Faible intégrité mécanique de la construction
Bio-impression par extrusion	<p>Pneumatique : utilise la pression de l'air pour extraire la bio-encre</p>	<ul style="list-style-type: none"> + Simplicité du système + Intégrité structural bonne + Forte densité de cellules imprimable + Possibilité d'utiliser des bio-encre à viscosité élevée
	<p>Mécanique : utilise un piston ou une vis pour extraire la bio-encre</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Plus faible résolution que les bio-imprimantes à jet d'encre ou assistées par laser (100 μm) - Haut taux de cisaillement peut impacter la viabilité cellulaire - Risque de bouchage - Vitesse d'impression faible - Nécessite des bio-encre avec des propriétés de rhéofluidications.

Bio-impression assistée par laser	<p>Cellules incluses dans la bio-encre : consiste en une lame donneuse faite d'une couche transparente, d'une couche absorbant l'énergie et d'une couche de bio-encre emprisonnant les cellules. Un laser traverse la couche transparente, son énergie est absorbée par un feuillet en métal ou en biopolymère, ce qui crée une bulle d'évaporation localisée. La haute pression gazeuse propulse une goutte de la bio-encre sur le substrat.</p>	<ul style="list-style-type: none"> + Haute viabilité cellulaire + Haute résolution (5 µm) + Bonne vitesse d'impression + Pas de problème de bouchage + Densité de cellule imprimable plus élevée qu'avec la bio-impression à jet d'encre - Bio-encre à viscosité faible obligatoire - L'exposition au laser peut causer des dommages photo-toxiques - Les nanoparticules dans le feuillet métallique peuvent être toxiques - Coûteux - Lame donneuse compliquée à produire
Bio-impression par stéréolithographie	<p>Impression par laser directe : un laser trace une ligne à la surface du photopolymère pour permettre sa polymérisation.</p> <p>Projection sur masque : utilise un masque physique ou digital pour filtrer la lumière et polymériser une couche entière de photopolymère en un seul passage.</p>	<ul style="list-style-type: none"> + Résolution la plus élevée parmi toutes les modalités de bio-impression + Faible coût + Forte densité de cellules imprimable + Pas de risque de bouchage + Bonne vitesse d'impression avec les masques + Viscosité élevée des bio-encre possible - La phototoxicité liée aux UV et infrarouges peut entraîner une faible viabilité cellulaire - Peu de bio-encres compatibles avec la bio-impression par stéréolithographie

CIJ: Continuous Inkjet; DOD: Drop-On-Demand.

2.2.4.1. Développement, criblage et résistance aux traitements

Les cultures 3D en milieu liquide – en particulier la culture en LOT ou HD – sont simples à implémenter et font donc partie des méthodes les plus utilisées en culture 3D. Dans le contexte de l'ostéosarcome, la culture 3D en milieu liquide a été particulièrement utilisée pour étudier la résistance aux traitements de chimiothérapies. En utilisant la méthode du HD, Rimann et al. ont démontré il y a près de dix ans maintenant que des sphéroïdes générés à partir des lignées cellulaires SAOS-2 et HOS présentaient une sensibilité réduite à des traitements de chimiothérapie tels que la doxorubicine, la cisplatine, le taxol et la taurolidine par rapport aux cellules cultivées en 2D. Lorsqu'ils ont étudié la réponse de cellules primaires d'ostéosarcome à un traitement à la doxorubicine, ils ont de nouveau observé une diminution de la sensibilité des cellules d'ostéosarcome ostéoblastique lorsque cultivées en 3D plutôt qu'en 2D. Plus intéressant encore, ils ont constaté que pour les cellules d'ostéosarcome chondroblastique, la doxorubicine n'avait pas d'effet en 2D, mais fonctionnait en 3D (Rimann et al., 2014). Ceci illustre parfaitement le potentiel de la culture 3D comme modèle de criblage de molécules thérapeutiques. Les sphéroïdes générés en milieu liquide peuvent également aider à détecter de nouvelles cibles thérapeutiques ou de nouveaux moyens d'administration des traitements (Kiss et al., 2020; Lenna et al., 2020).

Ces approches en milieu liquide sont cependant loin de reproduire le microenvironnement tumoral, qui joue un rôle crucial dans la résistance aux traitements (Netti et al., 2000). L'utilisation de supports de culture en particulier d'origine naturelle est une stratégie pour essayer de mimer ce microenvironnement tumoral. De façon similaire à ce qui a été présenté en milieu liquide, une amélioration de la résistance aux traitements a pu être observée lorsque les cellules d'ostéosarcome étaient cultivées dans des matrices 3D par rapport aux modèles de culture en 2D (Fallica et al., 2012; Tan et al., 2011). Cette différence de sensibilité pourrait être expliquée par une augmentation de l'expression du transporteur à cassette liant l'ATP B1 lorsque les cellules étaient cultivées en 3D – cette protéine transmembranaire étant impliquée dans l'efflux des molécules de chimiothérapies (Belisario et al., 2020).

L'os est un environnement aux propriétés physiques très particulières et la rigidité du support de culture semble avoir ainsi un impact sur le comportement des cellules d'ostéosarcome. Ainsi, une augmentation de la rigidité du support de culture améliore le taux de prolifération des cellules SAOS-2 (Jiang et al., 2019b). De la même manière, une

étude où des cellules MG-63 étaient cultivées au sein de quatre supports 3D différents (COL-I, Matrigel™, alginate et agarose) a mis en évidence une corrélation entre l'élasticité de la matrice et la viabilité cellulaire. Lorsque mises en culture 2D, les cellules d'ostéosarcomes se comportaient de façon similaire à des cellules ostéoblastiques saines et préféraient les matrices naturelles à base de COL-I ou de Matrigel™. En culture 3D, la viabilité des cellules d'ostéosarcome était cette fois-ci dépendante de l'élasticité de la matrice : les cellules proliféraient mieux dans les supports les plus rigides (dans l'ordre : COL-I > agarose > Matrigel™ > alginate). *In vivo*, ce rôle de l'élasticité de la matrice était également corrélé avec le volume des tumeurs et le taux d'angiogenèse : plus la matrice était rigide, plus la masse tumorale et le taux d'angiogenèse étaient importants (Jiang et al., 2019a).

2.2.4.2. Induction d'un phénotype souche et amplification de CSC

Les ostéosarcomes, comme d'autres types de cancers, sont composés d'une population cellulaire hétérogène qui comprend des CSC. Ces CSC combinent des propriétés souches et cancéreuses, et sont soupçonnées d'être en partie responsables de la résistance aux traitements et de la récurrence. Il s'avère que la culture en 3D en milieu liquide ou sur support semble favoriser la sélection et l'amplification de ces CSC, qui expriment plus fortement des marqueurs souches tels que CD133, OCT-4, NANOG ou encore SOX-2 (Bassi et al., 2020; Ozturk et al., 2020). De fait, la culture 3D pourrait permettre d'étudier de façon plus efficace et pertinente les CSC, et ainsi de développer des traitements capables d'éradiquer ces cellules résistantes.

2.2.4.3. Progression tumorale

Les modèles 3D peuvent également permettre d'étudier de façon plus réaliste différents mécanismes impliqués dans la progression tumorale. Par exemple, Sarkar et al. ont développé une puce microfluidique permettant la formation et la culture d'un grand nombre de sphéroïdes. Grâce à ce modèle, ils ont pu mesurer la quantité de VEGF-A sécrété par les cellules d'ostéosarcome (MG-63) en réponse à des pressions environnementales comme une carence en nutriment ou une induction chimique de l'hypoxie. Ils ont ainsi constaté un profil de sécrétion du VEGF-A différent selon la méthode de culture : les cellules en monocouche adhérente voient leur sécrétion de VEGF-A diminuer lorsque les cellules subissent de plus fortes pressions environnementales, alors que les sphéroïdes augmentent leur sécrétion de

VEGF-A (Sarkar et al., 2020). L'implication du VEGF dans la formation de nouveaux vaisseaux ayant été mise en évidence dans les tumeurs solides, l'utilisation des modèles 3D pourrait donc être pertinente pour étudier l'angiogenèse.

Dans la plupart des cas, la progression tumorale passe également par l'invasion et le processus métastatique. Grâce à la culture 3D, le rôle de l'acidification du milieu dans l'invasion et la migration des cellules cancéreuses a pu être validé. Pour ce faire, une plateforme microfluidique permettant la culture de sphéroïdes d'ostéosarcome dans des chambres présentant une couche de Matrigel™ sur leur face basale a été utilisée. Les chercheurs ont ainsi pu constater que lorsque le milieu était acidifié, les cellules s'échappaient du sphéroïde pour envahir rapidement et de façon importante le gel sous-jacent. L'IL-6 a été tenu responsable de cette réponse des cellules à l'acidose (Avnet et al., 2021). Plus récemment, Pellegrini et al. ont développé un modèle bio-imprimé pour également étudier les capacités invasives de l'ostéosarcome. L'utilisation d'une bio-encre à base de collagène a permis l'impression de cellules d'ostéosarcome U2OS résistantes ou non à la cisplatine au sein d'une structure dont les propriétés physiques et biochimiques étaient proches de celles observées dans les tumeurs *in vivo*. Grâce à ce modèle de bio-impression, des différences dans les capacités d'invasion des deux lignées cellulaires ont pu être mises en évidence : les cellules exprimaient plus de protéinases capables de dégrader la MEC en 3D qu'en 2D. En particulier, la lignée résistante récupérait un caractère plus agressif lorsque cultivée en 3D (Pellegrini et al., 2022). De nouveau, les modèles 3D s'avèrent donc plus efficace que leur équivalent 2D pour étudier les capacités invasives des cellules cancéreuses.

2.3. A chaque application son modèle 3D

Aussi prometteurs que soient ces modèles 3D pour étudier le cancer, de nombreux défis accompagnent leur utilisation. Premièrement, le choix de la méthode de culture dépend entièrement de la question scientifique soulevée et, par conséquent, chaque mode de culture répond à des besoins différents. Les sphéroïdes générés avec les méthodes de culture en milieu liquide sont le moyen le plus direct de faire du criblage haut débit et permettent des études fonctionnelles sur les cellules cancéreuses telles que des essais de

viabilité ou de différenciation. Pour autant, ces approches peuvent ne pas prendre en compte le rôle chimique et physique du microenvironnement tumoral vis-à-vis de la résistance aux traitements. En effet, dans le cas de l'ostéosarcome, l'utilisation d'un support de culture minéralisé reproduit la niche « naturelle » des CSCs et est bien mieux adapté que les matrices moins rigides (Bassi et al., 2020). De façon similaire, l'utilisation d'un modèle stationnaire avec ou sans support de culture peut être inadapté pour l'étude des mécanismes impliquant des mouvements de fluides tels que le processus métastatique, pour qui les plateformes microfluidiques seraient plus pertinentes. L'utilisation de modèles 3D encore plus complexes comme les organoïdes ou la bio-impression 3D devrait mieux représenter les maladies de chaque patient et permettre l'avènement d'une médecine personnalisée efficace. Mais ces modèles ne sont pas forcément adaptés au screening haut débit, et plus la complexité structurelle augmente, plus l'analyse devient compliquée.

De fait, le choix du modèle 3D le plus adapté doit également dépendre du processus analytique à réaliser. En effet, les méthodes actuelles d'analyse ont été majoritairement développées pour la culture 2D traditionnelle. Elles ne sont pas toujours adaptables à la culture 3D et nécessitent d'importantes étapes de validation (Riss and Trask, 2021). Par exemple, imager les échantillons 3D sera un défi pour les raisons suivantes : (1) les propriétés physiques de la lumière entraîne une diffusion des ondes dans les spécimens épais, qui ne peut pas être toujours résolue par sectionnement optique ou par transparençation ; (2) les sondes fluorescentes dirigées contre des molécules ou des organelles particuliers peuvent se diffuser de façon non homogène dans les sphéroïdes, avec une saturation en périphérie (Thurber and Wittrup, 2008) ; (3) de façon similaire, une diffusion faible des sondes jusqu'au cœur des sphéroïdes larges peut s'avérer problématique (Tchoryk et al., 2019). De nombreuses mises au point préliminaires sont nécessaires, puisque la taille, la charge ou l'affinité de la sonde à son ligand peuvent altérer les résultats et entraîner une caractérisation biaisée des sphéroïdes (Smyrek and Stelzer, 2017). Les modèles de culture 3D ont une MEC plus développée qui peut agir comme une barrière ou un piège pour les composés chimiques, ce qui est un inconvénient lorsque l'on souhaite lysé les spécimen 3D ou procéder à des essais métaboliques (Riss and Trask, 2021).

Ces problématiques ne doivent pas pour autant être vues comme des obstacles. Comme cela a été le cas pour la culture 2D, une augmentation de l'utilisation des modèles 3D conduira naturellement au développement de nouvelles méthodes d'analyses. De plus, certains

mécanismes du processus cancéreux peuvent être plus efficacement observé lorsque les cellules sont cultivées en 3D, comme il semblerait que ce soit le cas de la dormance cancéreuse.

3. LA DORMANCE CANCÉREUSE

Les tumeurs malignes doivent être considérées comme des entités dynamiques dont les cellules cancéreuses évoluent d'un point de vue (épi)génétique, morphologique et phénotypique au cours du temps et dans l'espace. Les nombreux sous-types histologiques observés pour une pathologie cancéreuse donnée reflètent l'hétérogénéité inter-tumorale. De plus, un tissu tumoral donné est lui-même caractérisé par une hétérogénéité cellulaire et moléculaire intrinsèque, appelée hétérogénéité intra-tumorale. Cette hétérogénéité intra-tumorale ne concerne pas uniquement la diversité des cellules cancéreuses, mais également l'hétérogénéité de leur microenvironnement (Junttila and de Sauvage, 2013). Le caractère évolutif de l'hétérogénéité tumorale, amplifié sous une pression de sélection (ex. : pression thérapeutique), permet aux cellules cancéreuses de s'adapter à leur environnement et est en grande partie responsable de l'apparition de la résistance aux drogues.

Parmi ces mécanismes d'adaptation, la dormance cancéreuse est potentiellement responsable de la maladie récurrente et de la résistance aux traitements (Vallette et al., 2019).

3.1. Définitions : dormance des organismes et dormance cancéreuse.

La dormance est un processus biologique utilisé par de nombreux organismes lorsque les conditions de vie deviennent hostiles. La multiplicité des espèces l'utilisant prouve l'efficacité de ce mécanisme de survie.

Le cancer, à la manière d'un organisme, doit faire face à des pressions environnementales diverses (ex. : manque de nutriments et d'oxygène, attaque du système immunitaire, chimiothérapie, radiothérapie, etc.) et la dormance est l'un des mécanismes qu'il a adopté pour survivre. La dormance cancéreuse est généralement associée à la maladie résiduelle minime et à la récurrence en particulier métastatique, mais elle concerne également le temps de latence avant l'apparition de la maladie primaire. De fait, elle doit être considérée comme une étape à part entière du processus tumoral.

3.1.1. La dormance est un processus biologique conservé au cours de l'évolution des espèces

Tous les êtres vivants doivent évoluer en fonction de leur environnement. Dans un contexte de sélection naturelle, la capacité d'adaptation d'un organisme aux changements environnementaux est la clé de sa survie, en particulier lorsque les conditions de vie deviennent difficiles (ex.: climat hostile, raréfaction de la nourriture, etc.). Parmi les méthodes d'adaptation connues, la dormance est un processus biologique grandement conservé dans l'évolution puisque des exemples peuvent être retrouvés dans tous les règnes du vivant. Ceci témoigne de l'efficacité de ce mécanisme pour permettre la survie d'un organisme dans un environnement qui lui est défavorable. Cette dormance passe généralement par une réduction de l'activité métabolique (hypométabolisme) qui aboutit à l'entrée de l'organisme dans un état inactif réversible (arrêt temporaire de la croissance, du développement et/ou de l'activité physique). La variété des formes de dormance, de leur durée, de leur cause, et des espèces concernées rend difficile une classification claire et de nombreux termes peuvent ainsi désigner cette dormance (ex. : torpeur, hibernation, estivation, diapause, brumation, etc.). La dormance est essentiellement liée aux conditions environnementales. Elle peut être soit prédictive (c'est-à-dire qu'elle est déclenchée avant l'apparition des conditions défavorables), soit conséquentielle (c'est-à-dire qu'elle survient suite et en réponse à l'apparition des conditions défavorables).

Ainsi, des nombreux cas de dormance peuvent être décrits chez les micro-organismes unicellulaires. En effet, dans les écosystèmes naturels, le pourcentage de micro-organismes en dormance va de 15% dans la panse des ruminants à près de 60% dans les sols (Lennon and Jones, 2011). L'un des états de dormance les plus profonds et les plus résistants aux atteintes extérieures sont les endospores produites par certaines bactéries. Ces endospores ont une structure et un contenu cellulaire très particuliers : le protoplasme (nom donné au cytoplasme des bactéries) est déshydraté et minéralisé, et l'organisation de l'ADN est modifiée par des protéines. Ces caractéristiques rendent les endospores particulièrement résistantes à la chaleur, aux produits chimiques nocifs, à la dessiccation et à l'irradiation par les UV. Les endospores peuvent rester dans cet état d'arrêt métabolique pendant des siècles avant de germer pour se remettre à proliférer naturellement (Flores and Popham, 2020). L'espace est peut-être l'environnement hostile par excellence, avec sa température de

-270°C et ses radiations cosmiques non dispersées du fait de la faible densité moléculaire. Or, des endospores de bacilles exposées à l'espace pendant plusieurs années ont été capable de survivre (Horneck, 1993).

Les tardigrades sont l'un des autres rares être vivants capables de survivre à un séjour dans l'espace (Jönsson et al., 2008). Ces organismes multicellulaires sont des animaux microscopiques aquatiques mais colonisant aussi des environnements terrestres beaucoup moins adaptés à leurs fonctions biologiques. Les tardigrades ont donc dû s'adapter pour survivre, notablement en entrant en dormance par cryptobiose ou par diapause. Lorsque le tardigrade entre en cryptobiose – une forme de quiescence extrême – en réponse à un stress environnemental (ex. : stress anoxique, stress hydrique, stress thermique, etc.), son métabolisme s'arrête complètement. En contrepartie, les tardigrades deviennent résistants à la dessiccation et/ou aux très faibles températures (Guidetti et al., 2011). La diapause est une autre forme de dormance plus endogène, c'est-à-dire que la cause directe n'est pas forcément les conditions environnementales mais qu'elle est génétiquement déterminée. En effet, la diapause est déclenchée avant l'apparition des conditions hostiles, et elle n'est pas levée uniquement par la disparition de celles-ci. Bien que chez le tardigrade cette diapause puisse avoir lieu à n'importe quelle phase de vie de l'animal, dans le cas des insectes chez qui elle est particulièrement répandue, elle a plutôt lieu à des stades précis du développement (embryonnaire, larvaire, adulte) (Lee, 2009).

L'une des formes de dormance des organismes les plus connus est certainement la dormance hivernale des plantes caduques, qui perdent leurs feuilles lorsque la température et la luminosité diminuent afin d'économiser de l'énergie. L'hibernation (aussi appelée torpeur) observée chez certains mammifères est un autre type de dormance notoire faisant intervenir l'endothermie. Parmi les mammifères hibernant, le spermophile arctique est peut-être l'exemple le plus impressionnant : pendant près de 9 mois, cet écureuil terrestre va voir sa température corporelle diminuer de 37°C à -2°C (Barnes, 1989).

Bien que les mécanismes impliqués dans la dormance des organismes et la dormance cancéreuse soient différents, le principe reste le même : s'adapter à des conditions de vie hostiles. Ainsi, à la manière d'un pathogène infectant un hôte, le cancer pourrait être considéré jusqu'à un certain point comme un organisme à part entière s'efforçant de survivre à son environnement (Manjili, 2017; Miller et al., 2021).

3.1.2. Le concept de dormance cancéreuse trouve son origine dans la clinique

Si le phénomène de récurrence avait déjà été décrit 2 millénaires plus tôt par Celse, la notion de dormance cancéreuse n'apparaît qu'après l'avènement de la théorie cellulaire et l'amélioration de la chirurgie et des méthodes histologiques. Rupert Willis, un pathologiste australien, utilise pour la première fois en 1934 le terme de dormance pour décrire et expliquer la période de latence qu'il observe entre le traitement de la maladie primaire et l'apparition de métastases tardives :

*« Quand des tumeurs métastatiques très tardives apparaissent chez des patients qui n'ont pas de récurrence locale de la grosseur primaire extirpée, il est clair que les croissances secondaires ont dû faire suite à des embolies tumorales disséminées à partir de la grosseur tumorale avant son retrait. Les cellules néoplasiques ont dû se trouver **dormantes** dans les tissus dans lesquelles elles s'arrêtèrent, et leur reprise de prolifération doit être attribuée à quelques altérations dans la nature de ces tissus ou à la levée des restrictions de croissance exercées par ceux-ci sur les cellules tumorales. »*

(Trad. de l'anglais à partir de (Summers et al., 2020)).

Vingt ans plus tard, Geoffrey Hadfield, également pathologiste, ajoutera que :

*« Lorsque l'intervalle est prolongé de six ans ou plus il paraît impossible d'échapper à la conclusion que les cellules à la croissance dormante sont dans un **état temporaire d'arrêt mitotique** [...]. »*

(Trad. de l'anglais à partir de (Hadfield, 1954)).

Ces deux pathologistes sont arrivés à la même conclusion à la suite d'un constat simple : si les cellules cancéreuses proliféraient de façon continue après un traitement ayant éliminé les masses tumorales détectables cliniquement, le temps de réapparition de la maladie devrait être beaucoup plus court que celui observé en clinique, que ce soit localement ou sur les sites métastatiques (Demicheli, 2001). Or, de nombreux cas montrent que la récurrence de la maladie peut avoir lieu des décennies après une phase de rémission complète. Ainsi, on peut trouver des exemples de cas extrêmes où la récurrence a lieu plus de vingt ans après le retrait de la tumeur primaire. C'est le cas d'un homme de 51 ans présentant une métastase pulmonaire d'un ostéosarcome diagnostiqué et traité lorsqu'il en avait 13

(Kaneuchi et al., 2020) ou d'une femme de 61 ans chez qui une métastase a été détectée 25 ans après l'excision d'un mélanome primaire (Pescarini et al., 2020). Des cas de récurrences tardives (au moins 5 ans après le premier diagnostic) ont été décrits pour des cancers mammaires, pulmonaires, colorectales, prostatiques, gastriques, hépatiques, leucémiques, pour ne citer qu'eux (Sonoda et al., 2019; Maeda et al., 2010; Szczepek et al., 1994; Nagano et al., 2021; Al Hillan et al., 2020; Bouvier et al., 2015; Han et al., 2021; Aizawa et al., 2020; Ogasawara et al., 2020; Zhang et al., 2017; Fridlyand et al., 2020). Même des cancers qui récidivent le plus souvent précocement et dont le taux de survie à 5 ans est inférieur à 10%, tel que le glioblastome (Birzu et al., 2020), peuvent présenter des cas exceptionnels de récurrence tardive (Bähr et al., 2009). Le phénomène de récurrence tardive concerne donc bien tous les cancers, bien qu'à des fréquences différentes (**Figure I.3.1**).

Le sous-type de cancer semble également jouer un rôle dans la durée de la dormance cancéreuse. L'analyse d'une cohorte de plus de 4000 patientes atteintes du cancer du sein montre que le risque de récurrence est le plus élevé dans les 5 premières années (moy. = 10 %), diminue de façon continue entre 5 et 10 ans (moy. = 4,5%), et se stabilise aux alentours de 1,5% ($\pm 0,7$) à partir de 10 ans après le premier diagnostic. Le risque de récurrence précoce (c-à-d. dans les 5 ans) est significativement plus élevé pour les patientes atteintes d'un cancer du sein n'exprimant pas les récepteurs aux œstrogènes (RO-négatives) par rapport aux patientes ayant un cancer du sein exprimant les récepteurs aux œstrogènes (RO-positives). À l'inverse, le risque de récurrence tardive (c-à-d. au-delà de 5 ans) devient plus élevé chez les patientes RO-positives par rapport aux patientes RO-négatives. De plus, pour les cancers RO-positifs, plus le nombre de ganglions envahis augmente, plus le risque de récurrence est élevé, en particulier jusqu'à 15 ans après le premier diagnostic (Colleoni et al., 2016). D'autres études plus récentes sur des cohortes beaucoup plus large (>20 000 patientes) confirment ces résultats, bien qu'à des taux légèrement différents (Pan et al., 2017; Pedersen et al., 2022).

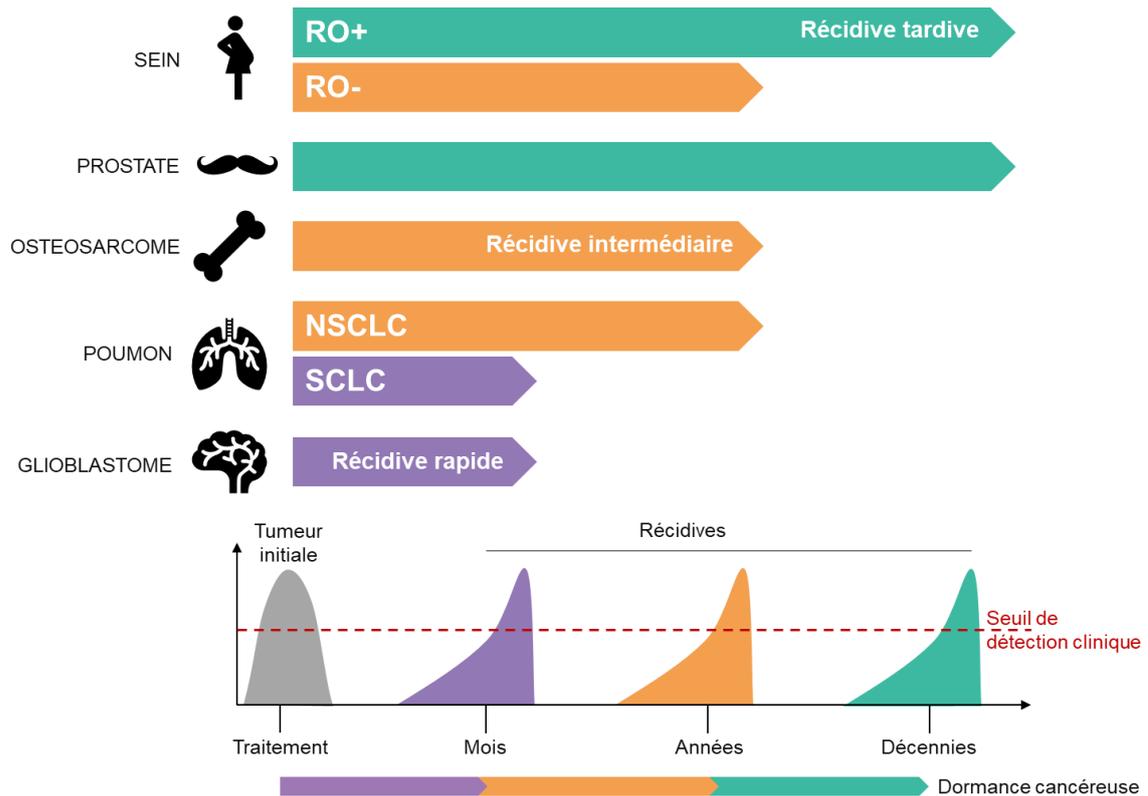


Figure 1.3.1. Durée de la dormance cancéreuse en fonction des cancers. Dans le cas de la maladie récidivante, la dormance cancéreuse correspond à la période de latence entre la disparition clinique de la tumeur primaire suite à un traitement (résection, chimiothérapie et/ou radiothérapie) et sa récurrence des mois jusqu'à des décennies plus tard. Théoriquement, tous les types de cancers peuvent passer par une étape de dormance, bien qu'à des fréquences et pour des durées différentes. Ainsi, le glioblastome présente des récurrences dont la plupart ont lieu quelques mois après la détection initiale du cancer et son traitement, alors que la durée de la dormance de l'ostéosarcome et du cancer de la prostate sont plutôt de l'ordre des années et de la décennie respectivement. De plus, différentes durées de dormance peuvent être observées entre les sous-types d'un même cancer. C'est le cas notamment des cancers du sein RO+ qui peuvent récidiver plus de 10 après la disparition clinique de la tumeur initiale, tandis que les cancer RO- récidive en général plus rapidement. La rapidité de la récurrence peut ainsi être associée à l'agressivité du cancer et à l'efficacité des thérapies utilisées pour lutter contre ce dernier. Abréviations. RO+ : récepteur œstrogène positif ; RO- : récepteur œstrogène négatif ; NSCLC : en anglais, *non-small cell lung cancer* ; SCLC : en anglais, *small cell lung cancer*. Adaptée de (Gomis and Gawrzak, 2017)

L'utilisation d'outils mathématiques tels que de la modélisation numérique a également permis une validation de profils de dormance cancéreuse en fonction des caractéristiques du cancer. Giannakeas et Narod sont parvenus à répartir plus de 120 000 patientes au sein de 10 catégories dont le taux de mortalité croît à chaque décile. Ils ont basé leur classification sur des facteurs clinicopathologiques tels que l'année du diagnostic, l'âge, l'ethnie, la taille, le stade et le grade de la tumeur mammaire, le taux de ganglions envahis, le statut RO, etc. Ils ont ensuite généré un modèle mathématique simple de dormance où tous les cancers du sein suivent la même courbe de croissance une fois sortie de leur état de dormance, et où un taux de réactivation tumorale est associé à chaque décile. Ils ont alors constaté que les

courbes de mortalité en fonction du temps générées à partir des valeurs observées ou modélisées se superposaient, et cela pour tous les déciles. Au vu de ces résultats, les auteurs proposent ainsi que les différences de durée observées avant la réapparition de la maladie primaire sont le résultat de durées différentes de dormance (Giannakeas and Narod, 2019).

Une preuve supplémentaire de l'existence d'une dormance cancéreuse est que des CTC peuvent encore être détectées dans le sang de patientes pourtant en rémission clinique depuis des dizaines d'années (Meng et al., 2004).

A noter que cette notion de dormance cancéreuse ne concerne pas uniquement la maladie métastatique et la récurrence locale, mais également la tumeur primaire initiale elle-même. En effet, des autopsies réalisées sur des individus décédés des suites d'un traumatisme (ex. : accident de voiture, etc.) ont permis de mettre en évidence la présence de tumeurs malignes alors que ces individus n'avaient jamais été diagnostiqué de leur vivant. Ainsi, 39% des femmes autopsiées d'une quarantaine d'années présentent un cancer du sein (Nielsen et al., 1987), alors que le taux de diagnostic est de 1,55% pour cette même tranche d'âge (Howlader et al., 2021). De façon similaire, la présence de carcinomes prostatiques a été détectée chez 34% des hommes examinés en *post mortem* (Sakr et al., 1993), alors que le taux d'incidence de cette maladie n'est que de 0,03% pour les moins de 50 ans (Perdana et al., 2016). Ces résultats semblent donc indiquer qu'une dormance cancéreuse précéderait l'apparition clinique du cancer primaire, et que de nombreux individus pourtant asymptomatiques toute leur vie soient en réalité atteints d'un cancer en état de dormance.

3.2. Deux types de dormance : la dormance de la masse tumorale et la dormance cellulaire cancéreuse

L'observation clinique de récurrences tardives et de la présence de néoplasmes dans des individus asymptomatiques ont donc permis de mettre en évidence un état de dormance cancéreuse. Dans le cas de la maladie récurrente, la période entre le diagnostic et la récurrence, c'est-à-dire la durée de la dormance cancéreuse, est corrélé à un certain nombre de facteurs de risques qui dépendent du cancer concerné. Pour autant, ces facteurs de risques n'expliquent pas le mécanisme sous-jacent de la dormance cancéreuse. Deux modèles bien distincts ont donc été proposés pour décrire le phénomène de dormance cancéreuse : la dormance de la masse tumorale et la dormance cellulaire cancéreuse (**Figure I.3.2**).

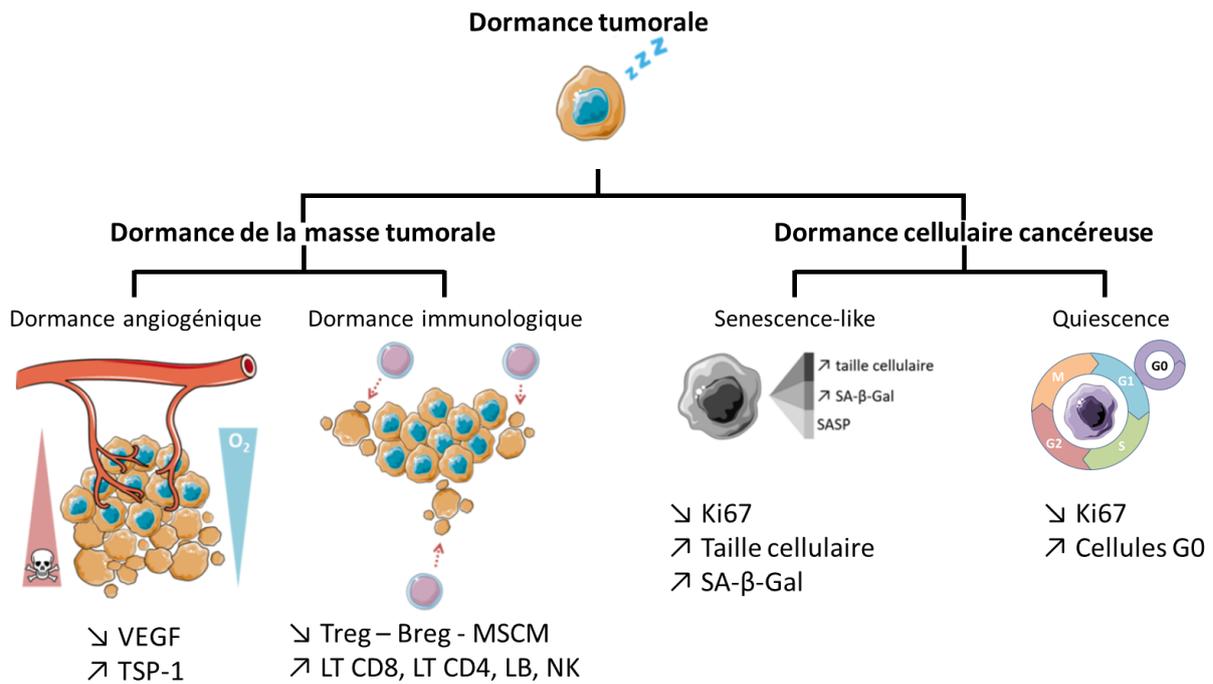


Figure I.3.2. Différents types de dormance cancéreuse. La dormance cancéreuse correspond à la période durant laquelle une masse tumorale n'est pas détectable cliniquement. Cette période de latence peut exister avant l'apparition de la tumeur primaire, ou entre le traitement d'une tumeur et la récurrence locale ou métastatique de la maladie. Cette dormance cancéreuse peut résulter de différents mécanismes. Le premier est la dormance de la masse tumorale, où l'équilibre entre la prolifération et la mort cellulaire aboutit à une masse tumorale qui ne change pas de taille. La mort cellulaire peut être le résultat d'un manque d'oxygène dans le cas de la dormance angiogénique, ou par l'action cytotoxique des cellules immunitaires dans le cas de la dormance immunologique. La dormance cellulaire cancéreuse, quant à elle, consiste en l'arrêt de la prolifération des cellules cancéreuses, soit par des mécanismes tels que la sénescence et/ou la quiescence. À noter que ces mécanismes peuvent probablement coexister, et que la dormance de la masse tumorale n'exclut pas l'existence de cellule cancéreuse en arrêt du cycle cellulaire au sein de la tumeur.

3.2.1. Dormance de la masse tumorale

La dormance de la masse tumorale est un mécanisme qui implique une homéostasie entre la mort et la prolifération des cellules cancéreuses, aboutissant à une stagnation de la taille de la tumeur maligne. Dans le contexte de la dormance cancéreuse, cette dormance de la masse tumorale ne peut concerner que des tumeurs d'une taille inférieure au seuil de détection clinique. De fait, la dormance de la masse tumorale dans le contexte de la récurrence est principalement associée aux micrométastases, dont la taille ne dépasse pas les 2 mm (Hermanek et al., 1999).

Un tel modèle permettrait d'expliquer pourquoi des CTC peuvent être détectées des décennies après le retrait de la tumeur primaire et des ganglions envahis. Cela sous-entend la présence d'un groupe de cellules capable de proliférer pour maintenir une libération régulière de CTC dans le flux sanguin, mais dont la croissance ne dépasse pas le seuil de

détection clinique. Ceci est d'autant plus vrai que la demi-vie de ces CTC dans la circulation sanguine s'estime en minute (Hamza et al., 2021; Meng et al., 2004). L'étude histologique de tumeurs récupérées sur des souris xénotransplantées montre que le taux de prolifération est le même entre les cellules d'une tumeur croissante et celles d'une tumeur dormante. Par contre, le niveau d'apoptose des tumeurs dormantes est près de 4 fois plus élevé que dans les tumeurs à croissance exponentielle (Holmgren et al., 1995), ce qui pourrait expliquer pourquoi les tumeurs dormantes n'augmentent pas de taille au cours du temps.

Dans le modèle de dormance de la masse tumorale, la mort des cellules cancéreuses résulte soit d'un manque en nutriments et d'oxygène du fait du maintien de l'état d'angiostase (on parle de dormance angiogénique), soit de l'immunosurveillance (on parle de dormance immunologique), mais plus probablement des deux.

3.2.1.1. Dormance angiogénique

Au cours de la dormance angiogénique, les cellules cancéreuses en prolifération sont incapables de recruter de nouveaux vaisseaux sanguins. La diffusion des nutriments et de l'oxygène dans les tissus non vascularisés a une portée maximale de 150 à 200 μM , mais cette distance peut varier en fonction de la densité et de l'activité métabolique du tissu. Au-delà, le taux de nutriments et d'oxygène perçu par le tissu diminue, puisqu'en plus d'être une barrière physique entravant le passage des molécules, les cellules du tissu vont aussi être consommatrices de ces molécules, réduisant la quantité disponible pour les cellules situées plus en profondeur. McMurtrey a ainsi estimé par modélisation mathématique que pour une neurosphère de 700 μm de rayon, le cœur reçoit moins de 5% de la concentration en nutriment et en oxygène présents à l'extérieure du tissu. Cela aurait pour conséquence un arrêt de la croissance des neurosphères lorsqu'elles atteignent un diamètre d'1,8 mm (McMurtrey, 2016).

Au vu de la quantité en nutriment et en oxygène requise par les cellules cancéreuses en prolifération, il est logique d'observer un arrêt de la croissance des masses tumorales avasculaires lorsque celles-ci atteignent un diamètre trop important pour permettre une diffusion suffisante à toutes les cellules. En effet, la prolifération en périphérie sera compensée par la nécrose au cœur de la masse tumorale du fait de la privation en nutriments et en oxygène, et la masse sera dormante tant qu'elle restera avasculaire

(Holmgren et al., 1995). De fait, la sortie de la dormance nécessitera l'initiation de la vascularisation tumorale, dont le mécanisme le plus connu est l'angiogénèse.

L'angiogénèse est un processus au cours duquel de nouveaux vaisseaux sont synthétisés par bourgeonnement à partir de vaisseaux préexistants. Elle est déclenchée par un switch angiogénique qui implique un déséquilibre en faveur de facteurs pro-angiogéniques (ex. : VEGF, FGF-2, PDGF, Ang1, TNF, IL-6, etc.) qui surpassent les facteurs anti-angiogéniques (ex. : TIMPs, TSP, angiostatine, endostatine, Ang 2, etc.) (Herbert and Stainier, 2011; Kopec and Abramczyk, 2022; Marech et al., 2016).

Les causes de ce switch angiogénique sont multiples mais impliquent le microenvironnement tumoral cellulaire et moléculaire et les cellules tumorales elles-mêmes. Indraccolo et al. ont injecté des cellules leucémiques (MOLT-3) seules ou avec des cellules de sarcome de Kaposi irradiées (KS-IMM) pour éviter que leur prolifération ne dépasse celle des MOLT-3. Les MOLT-3 sont des cellules faiblement tumorigéniques et qui n'expriment que peu ou pas de facteurs pro-angiogéniques. Au contraire, les KS-IMM sont des cellules fortement angiogéniques. Lorsque les MOLT-3 étaient injectées seules, elles formaient dans 20% des cas une masse tumorale blanche de petite taille qui n'évoluait pas. Lorsque co-injectées avec les KS-IMM, les MOLT-3 produisaient dans 100% des cas des masses tumorales rougeâtres à croissance progressive (Indraccolo et al., 2006). Pour autant, une tumeur non angiogénique peut acquérir une activité angiogénique d'elle-même, sous-entendant le rôle direct des cellules tumorales. C'est ce qu'ont mis en évidence Naumov et al. dans une étude où ils ont inoculé des souris immunodéficientes avec des lignées cellulaires cancéreuses d'adénocarcinome mammaire (MDA-MB-436), d'ostéosarcome (KHOS-24OS) ou de glioblastome (T98G), qui sont toutes non-angiogéniques. Ils ont constaté que si les souris inoculées étaient gardées en vie suffisamment longtemps (jusqu'à près de 8 mois), elles pouvaient développer des masses tumorales dont le taux de croissance était similaire à celui de tumeurs angiogéniques. La comparaison de l'expression de facteurs angiogéniques a montré que les facteurs pro-angiogéniques FGF-2 et le VEGF étaient surexprimés dans les tumeurs angiogéniques. A l'inverse, les tumeurs non-angiogéniques surexprimaient plutôt le facteur anti-angiogénique TSP (Naumov et al., 2006).

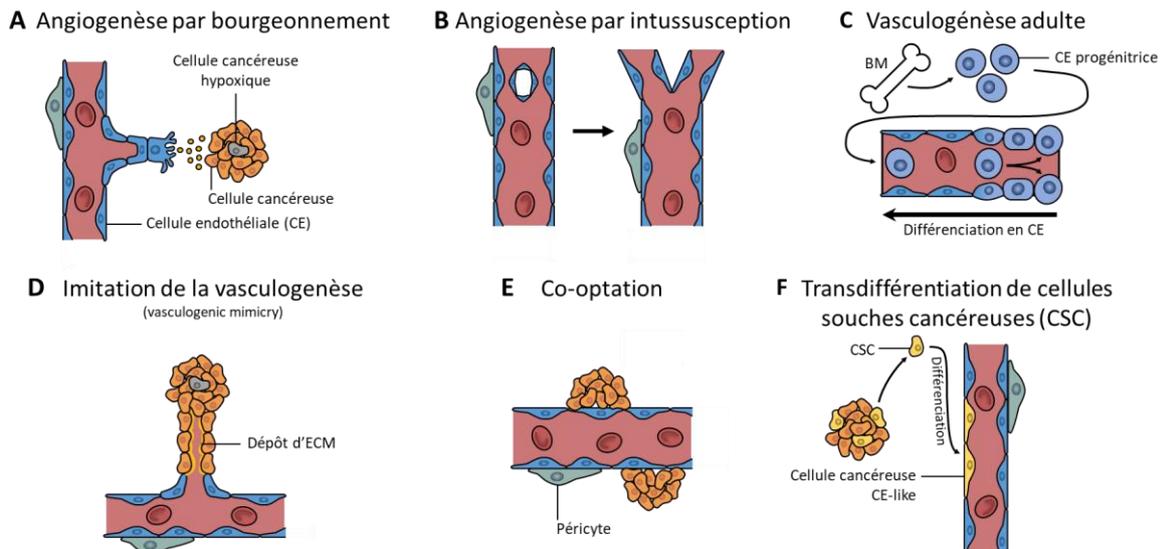


Figure 1.3.3. Mécanismes de vascularisation des tumeurs. La formation de nouveaux vaisseaux passe par des mécanismes physiologiques détournés par la tumeur (A, B et C) ou des processus propres à la pathologie (D, E et F) qui ne sont pas mutuellement exclusifs. (A) **Angiogenèse par bourgeonnement.** La formation du nouveau vaisseau passe par le bourgeonnement de la Tip Cell (TC), suivie des Stalk Cells (SCs) qui permettent l'élongation. (B). **Angiogenèse par intussusception.** Consiste à augmenter la ramification vasculaire en séparant un vaisseau pré-existant en deux. (C) **Vasculogénèse adulte.** Recrutement de progéniteurs endothéliaux circulant dans le sang à partir de la moelle osseuse, qui vont se différencier en cellules endothéliales (CE) *in situ*. (C) **Imitation vasculaire.** Les cellules cancéreuses forment des structures similaires à des capillaires et déposent à leur surface une matrice extracellulaire dense. (E). **Ralliement à des vaisseaux sanguins (co-optation).** Les cellules tumorales se développent le long des vaisseaux sanguins pré-existants. (F) **Transdifférenciation des cellules souches cancéreuses (CSC).** Des CSC présentent dans la masse tumorale se différencient en pseudo-CE et bordent les nouveaux vaisseaux.

Du fait du rôle évident du switch angiogénique dans la carcinogénèse et dans la réactivation de la prolifération cellulaire, l'angiogénèse est considérée comme un processus essentiel à la progression tumorale (c'est l'une des *hallmarks* du cancer) et plus d'une dizaine de thérapies basées sur une inhibition de cette angiogénèse ont obtenu une autorisation de mise sur le marché (De Falco, 2014). L'idée générale que l'angiogénèse est universelle à tous les cancers a cependant laissé dans l'ombre un certain nombre d'autres mécanismes permettant la vascularisation, ce qui pourrait expliquer l'échec de certaines des thérapies anti-angiogéniques. Ceci n'étant cependant pas le sujet de cette thèse, je n'entrerai pas plus dans le détail que ce qui est présenté dans la **Figure 1.3.3**, mais invite le lecteur intéressé à lire les nombreuses revues scientifiques décrivant les mécanismes alternatifs à l'angiogénèse que sont l'angiogénèse par intussusception (De Spiegelaere et al., 2012; Saravanan et al., 2020), la vasculogénèse (Drake, 2003), l'imitation vasculaire (Luo et al., 2020; X. Zhang et al., 2019), la transdifférenciation de CSC (Ping and Bian, 2011) et le ralliement à des vaisseaux sanguins

préexistants (*co-option*) (Kuczynski et al., 2019) et leur rôle dans le processus tumoral (Lugano et al., 2020).

3.2.1.2. Dormance immunologique

Comme pour l'angiogenèse, le système immunitaire joue un rôle prépondérant dans la progression tumorale et a donc également rejoint la liste des *hallmarks* du cancer. De nombreuses recherches menées chez la souris et l'humain ont mis en évidence que les systèmes immunitaires inné et adaptatif sont nécessaires pour empêcher la formation de cancers. En effet, les individus atteints d'immunodéficience primaire, dont le système immunitaire est déficient ou complètement absent du fait d'une maladie génétique, ont un risque relatif de développer un cancer (en particulier des lymphomes) 1,5 fois plus élevé que la population général (Mayor et al., 2018). De plus, certains receveurs d'organe ont développé des cancers à la suite d'une transplantation provenant de donneurs en rémission clinique ou de donneurs sans passif cancéreux (Kauffman et al., 2000). Ceci suggère que les cancers présents mais indétectés dans les transplants étaient sous le contrôle du système immunitaire du donneur, et que le transfert vers un hôte immunodéprimé a favorisé la croissance tumorale.

Pour autant, la majorité des cancers se développent dans des hôtes immunocompétents. Le système immunitaire ne parvient donc pas toujours à endiguer le cancer, et le processus au cours duquel le système immunitaire prend tour à tour le rôle de suppresseur et promoteur de tumeurs est appelé immunoédition (O'Donnell et al., 2019; Schreiber et al., 2011).

Brièvement, ce processus d'immunoédition suppose que le système immunitaire est capable d'éliminer les clones tumoraux les plus immunogènes, et exerce donc une pression de sélection qui pourra aboutir sur le long terme à l'émergence de clones immunosuppresseurs capables de lui échapper. Une étude réalisée en 2001 en est la parfaite preuve : les tumeurs formées dans des souris immunodéficientes étaient plus immunogènes que celles formées dans des souris immunocompétentes lorsque réinjectées dans de nouveaux hôtes immunocompétents (Shankaran et al., 2001) (**Figure I.3.4**).

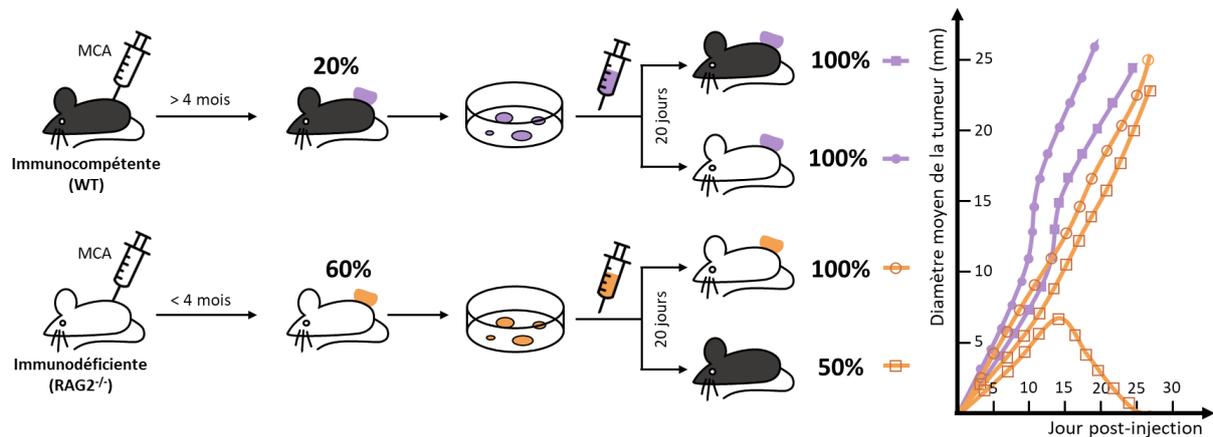


Figure I.3.4. Rôle du système immunitaire sur l'immunogénicité des tumeurs. Des souris 129/SVEV WT (immunocompétentes) et 129/SVEV RAG2^{-/-} (immunodéficience adaptative) ont été injectées en sous-cutané avec le carcinogène méthylcholanthrène (MCA). En plus de développer des tumeurs plus tôt que les WT, les souris RAG2^{-/-} avaient plus de risque de former des tumeurs (60%, contre 20% d'incidence pour les WT). Afin d'évaluer le rôle du système immunitaire adaptatif sur l'immunogénicité des tumeurs, les sarcomes générés dans un environnement immunocompétent ou immunodéficient ont été réinjectés dans de nouveaux hôtes WT ou RAG2^{-/-}. Les sarcomes issus d'une induction dans des souris WT sont parvenus à croître dans 100% des nouvelles souris, qu'elles soient WT ou RAG2^{-/-}. Les sarcomes produits dans les souris RAG2^{-/-} sont parvenus à croître dans 100% des nouveaux hôtes RAG2^{-/-}. Cependant, seule la moitié des souris injectées avec des cellules de sarcome issu d'une souris RAG2^{-/-} a développé une masse tumorale de taille croissante dans le temps. L'autre moitié a vu la taille des tumeurs régresser après une courte période de croissance. Les sarcomes générés dans les souris immunocompétentes ont en fait subi une pression de sélection du système immunitaire, rendant les tumeurs immuno-résistantes, si bien que même lorsque réinjectées dans un nouvel hôte, les tumeurs ont pu grossir de manière continue. A l'inverse, les sarcomes générés dans les souris immunodéficientes n'ont jamais été exposées à un système immunitaire. Lorsque ces cellules cancéreuses ont été cette fois-ci transférées dans un hôte immunocompétent, le système immunitaire de la souris a été capable de détruire la tumeur rapidement. Ces résultats soulignent le rôle du système immunitaire, et en particulier le système adaptatif, dans l'immunogénicité de la tumeur via immunosélection des cellules capables de lui survivre.

L'année suivante, Dunn et al. proposent un système d'immunoédition qui implique trois phases séquentielles : l'élimination, l'équilibre, et l'échappement tumoral (Dunn et al., 2002). Durant la phase d'élimination, aussi nommée immunosurveillance, le système immunitaire (inné et adaptatif) est capable de repérer les cellules cancéreuses et de les détruire. Si parmi les multiples clones tumoraux l'un d'entre eux est capable de survivre à cette immunosurveillance, on passe alors à la phase d'équilibre. Comme indiqué par son nom, cette étape consiste en un contrôle par le système immunitaire de la croissance tumorale, en ralentissant la prolifération et en continuant à éliminer les cellules reconnues. Il s'agit potentiellement de l'étape la plus longue, et elle correspondrait à la dormance cancéreuse immunologique. Lors de cette étape, la pression constante du système immunitaire encourage les cellules cancéreuses instables génétiquement à modifier continuellement leur (épi)génom, leur transcriptome et leur protéome (ex. : réduction des

antigènes présentés à la surface, sécrétion de cytokines immunosuppressives, etc.) afin de survivre (Teng et al., 2008). Si cette immunoédition est un succès, les tumeurs entrent dans la phase d'échappement, au cours de laquelle la croissance n'est plus restreinte et le cancer devient détectable cliniquement. Comme pour l'angiogenèse, ce processus d'immunoédition est autant valable pour la genèse de la maladie primaire, que la récurrence locale ou métastatique (**Figure I.3.5**).

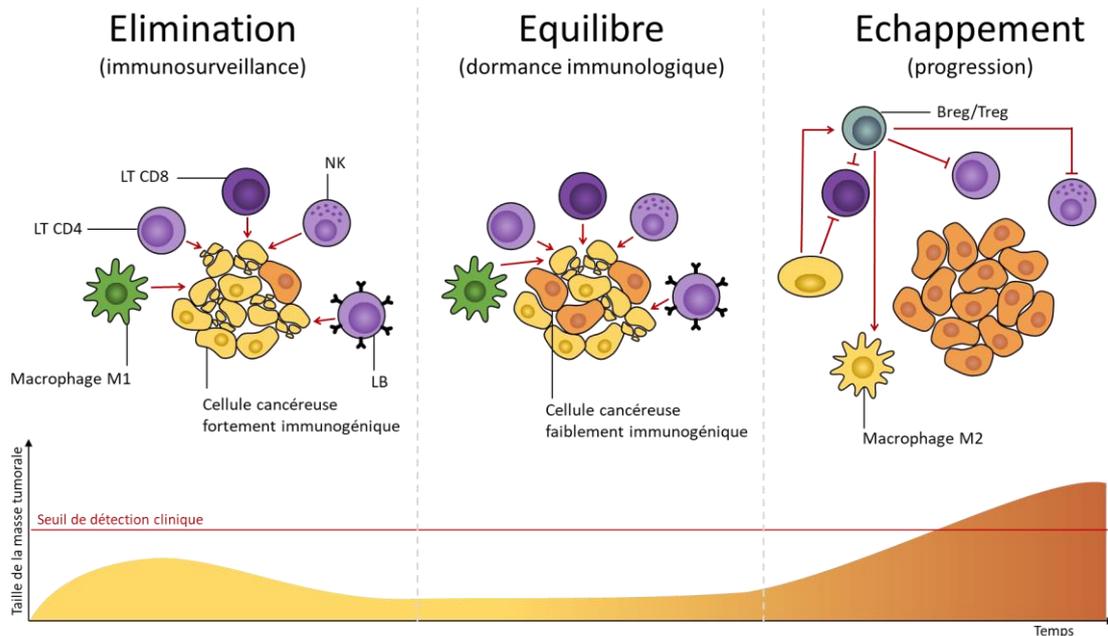


Figure I.3.5. Les trois étapes de l'immunoédition du cancer. L'immunoédition du cancer se déroule en 3 étapes séquentielles : l'élimination, l'équilibre et l'échappement. Lors de l'élimination, les cellules du système immunitaire inné et adaptatif reconnaissent les cellules tumorales et les éliminent. Si cette immunosurveillance n'aboutit pas à l'élimination de toutes les cellules tumorales, les variants survivants, peu immunogéniques, permettent le maintien de cellules tumorales dont la prolifération compense la mort des clones plus immunogéniques. Cette phase d'équilibre correspondrait au phénomène de dormance immunologique et pourrait s'étendre sur plusieurs années. Au cours de cette dormance, les cellules tumorales peuvent continuer d'accumuler des mutations (épi)généétiques et de subir une pression de sélection par le système immunitaire, qui participent à l'apparition d'un microenvironnement immunosuppresseur. Le système immunitaire n'est alors plus capable d'empêcher la croissance de la masse tumorale : c'est l'échappement tumoral.

Contrairement à la dormance angiogénique où le taux de prolifération de la tumeur en dormance est sensiblement similaire à celui d'une tumeur en croissance, la dormance immunologique impliquerait plutôt une réduction du nombre de cellules cancéreuses proliférantes et une augmentation du taux d'apoptose par action du système immunitaire (Koebel et al., 2007; Payne et al., 2016). Les résultats de Koebel et al. vont dans ce sens : certaines souris immunocompétentes injectées avec une faible dose d'oncogène ont développé des petites masses stables au niveau du site d'injection. Ces masses stables proliféraient moitié moins vite par rapport aux tumeurs en croissance, et leur taux

d'apoptose était 1,7 fois plus important. De plus, le traitement hebdomadaire des souris ayant développé ces masses stables avec des anticorps anti-CD4/-CD8 et/ou anti-IFN- γ (il s'agit de molécules essentielles au système immunitaire adaptatif) a entraîné la reprise de la prolifération dans 60% des cas (Koebel et al., 2007). Il semblerait que ce soient bien ces cellules indolentes (qui prolifèrent lentement), et non pas les cellules en arrêt du cycle cellulaire, qui soient responsable de cette immunoédition. En effet, seules les premières ont surexprimé l'inhibiteur des cellules immunitaires PD-L1 (en anglais, *Programmed Death Ligand 1*) en réponse à une exposition à de l'IFN- γ sécrété par les lymphocytes T activés. Or, l'IFN- γ est connu pour promouvoir l'expression de ce ligand sur les cellules tumorales (Payne et al., 2016).

De façon générale, les acteurs cellulaires principaux dans la dormance immunologique sont les cellules de l'immunité adaptative (T et B), alors que les cellules *natural killers* (NK) ne semblent pas jouer un rôle prépondérant (Payne et al., 2016). Une augmentation de l'infiltration de lymphocytes T cytotoxiques (CD8⁺) et *helpers* (CD4⁺ Th1), de lymphocytes B, ainsi que de cellules dendritiques dans des tissus identifiés comme étant en dormance immunologique a d'ailleurs pu être mise en évidence (Wiecek et al., 2021).

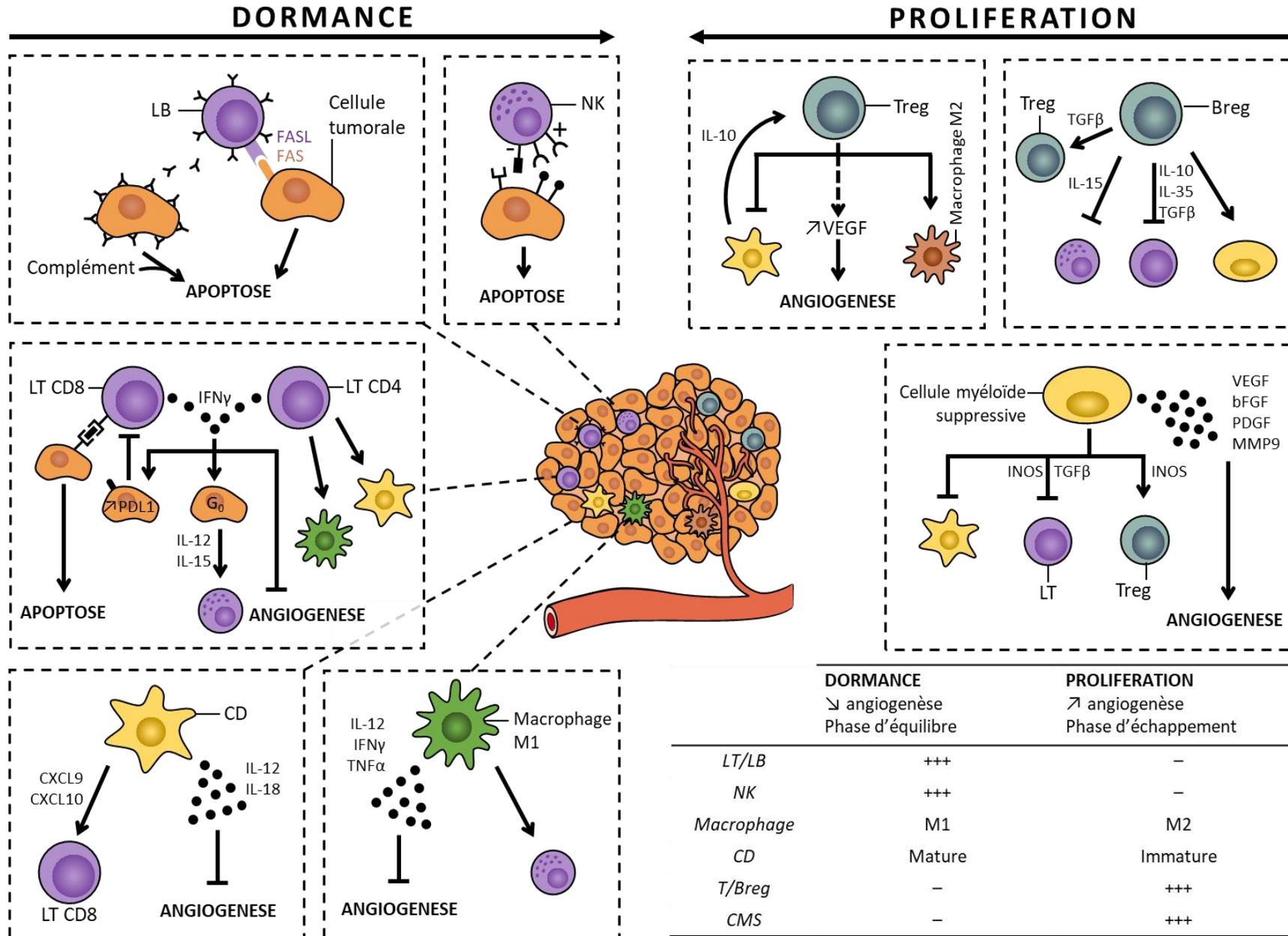
3.2.1.3. Une forme de dormance n'en exclue pas une autre

Afin de clarifier l'explication, les dormances angiogénique et immunologique ont été précédemment décrites comme deux mécanismes distincts. Pour autant, ces deux modèles de dormance de la masse tumorale ne sont pas forcément mutuellement exclusifs. Dans ce sens, l'analyse d'un profil de dormance angiogénique et/ou immunologique réalisée sur plus de 9 500 tumeurs primaires non traitées correspondant à 31 types de cancer différents a permis de mettre en évidence que 16,5% des tumeurs (tous cancers confondus) présentaient une signature de dormance de la masse tumorale, parmi lesquelles 7% exprimaient simultanément des marqueurs de la dormance angiogénique et immunologique. Cette « co-dormance » était même la forme majoritaire de dormance de la masse tumorale dans le cas des sarcomes, des adénocarcinomes ovariens et de l'estomac, des carcinomes de la vessie, etc. (Wiecek et al., 2021).

L'interaction de ces deux formes de dormance se comprend facilement lorsqu'on se place dans le contexte du microenvironnement tumoral. Un environnement trop hypoxique entraîne l'activation de la voie de signalisation du HIF, qui aboutit à une augmentation de

l'expression du VEGF. L'exposition longue à un haut taux de VEGF a un impact à la fois sur la vascularisation et sur l'immunosurveillance. Tout d'abord, le rôle pro-angiogénique du VEGF permet la génération de nouveaux vaisseaux sanguins peu organisés et perméables. Ensuite, le VEGF réduit l'expression des molécules d'adhérence présentes à la surface des cellules endothéliales nécessaires à la diapédèse des lymphocytes et limite donc l'infiltration de la tumeur par les cellules immunitaires effectrices. Enfin, le VEGF a une action immunosuppressive locale et systémique : il inhibe directement la circulation, la prolifération et la fonction des lymphocytes T cytotoxiques et empêche la maturation des cellules dendritiques présentatrices d'antigène qui sont tous deux déjà présents dans le microenvironnement tumoral ; il promeut également le recrutement de cellules immunitaires immunosuppressives tels que les macrophages associés à la tumeur M2 (TAM-M2), les cellules myéloïdes suppressives (MDSC) et les lymphocytes T régulateurs (Treg) (Kim et al., 2022). Dans le cadre de la dormance angiogénique et immunologique, une masse tumorale dont la croissance serait limitée à la fois par un manque d'oxygène et une activité immunorégulatrice pourrait ainsi, si l'hypoxie devient trop forte ou dure trop longtemps, déclencher le *switch* angiogénique. Cette angiogenèse favoriserait la transition de l'étape d'équilibre vers l'étape d'échappement (système d'immunoédition) par induction d'un microenvironnement tumoral immunosuppresseur. Cela aboutirait donc à une reprise de la croissance tumorale (**Figure I.3.6**).

► **Figure I.3.6. Interaction entre l'angiogenèse et la régulation immunitaire dans le microenvironnement tumoral.** La dormance de la masse tumorale peut résulter à la fois de mécanismes immunosuppresseurs et anti-angiogéniques. Le microenvironnement d'une masse tumorale en dormance contient plus de lymphocytes T (LT), lymphocytes B (LB) et natural killers (NK) que de lymphocytes T régulateurs (Treg), lymphocytes B régulateurs (Breg) ou de cellules suppressives dérivées des myéloïdes (MDSC). De plus, le phénotype M1 des macrophages est plus représenté que le phénotype M2. Tout ceci conduit à un environnement suppresseur de tumeur, où la prolifération des cellules tumorales est contrebalancée par l'action des cellules immunitaires : c'est l'étape d'équilibre du mécanisme d'immunoédition. La sortie de la dormance de la masse tumorale résulte d'un changement dans le microenvironnement tumoral, qui se traduit par une diminution des LT et LB infiltrants, des cellules NK, et une augmentation des cellules Breg, Treg, MDSC, ainsi qu'une polarisation des macrophages vers le sous-type M2.



Enfin, il est important d'indiquer que la présence d'une dormance angiogénique et/ou immunologique n'empêche pas la présence de cellules en phase G0 du cycle cellulaire, ce qui signifie que la dormance de la masse tumorale peut potentiellement coexister avec une dormance cellulaire cancéreuse (Braumüller et al., 2013). Certains ont même émis l'hypothèse que cette dormance cancéreuse cellulaire précéderait en fait la dormance de la masse tumorale.

3.2.2. Dormance cellulaire cancéreuse

À l'inverse de la dormance de la masse tumorale, la dormance cellulaire cancéreuse implique un arrêt du cycle cellulaire et une réduction de la mortalité. Les microtumeurs restent ainsi cliniquement indétectables car les cellules cancéreuses ne prolifèrent plus. C'est ce modèle de dormance qui a été proposé en premier pour justifier les récives tardives par Willis, puis par Hadfield. Ce dernier définit en effet de façon claire et concise ce qu'il entend par cellules cancéreuse dormante :

*« J'ai utilisé le mot « dormante » pour décrire les cellules malignes qui, bien que restant vivantes dans les tissus pour des périodes relativement longues, ne présentent **aucune preuve de multiplication** durant ce laps de temps, et pourtant gardent toute leur ancienne et vigoureuse capacité à se multiplier. »*

(Trad. de l'anglais à partir de (Hadfield, 1954)).

Dans cette citation, Hadfield souligne un autre point important associé à cette dormance : la notion de réversibilité. En effet, les cellules cancéreuses dont le cycle cellulaire est arrêté ont le potentiel de se remettre à proliférer à n'importe quel moment, selon les signaux internes et externes qu'elles reçoivent.

Comme pour les autres formes de dormance, la dormance cellulaire cancéreuse peut concerner la maladie primaire ou métastatique. Plusieurs théories co-existent concernant l'état dans lequel se trouve ces cellules cancéreuses en dormance : 1) on les retrouve isolées dans les tissus en tant que cellules uniques ; 2) elles composent une microtumeur complète ; 3) elles sont localisées au sein d'une tumeur proliférante. Dans tous les cas, la dormance cellulaire cancéreuse implique l'existence d'une niche avec laquelle les cellules cancéreuses dormantes interagissent et qui participent à l'entrée, au maintien et à la sortie de cette dormance.

La dormance cellulaire cancéreuse peut donc se résumer en quatre caractéristiques principales (*hallmarks*) : l'arrêt du cycle cellulaire, la réversibilité, la résistance à la mort (induite par la thérapie et/ou par le système immunitaire), et la dépendance à la niche (**Figure I.3.7**).

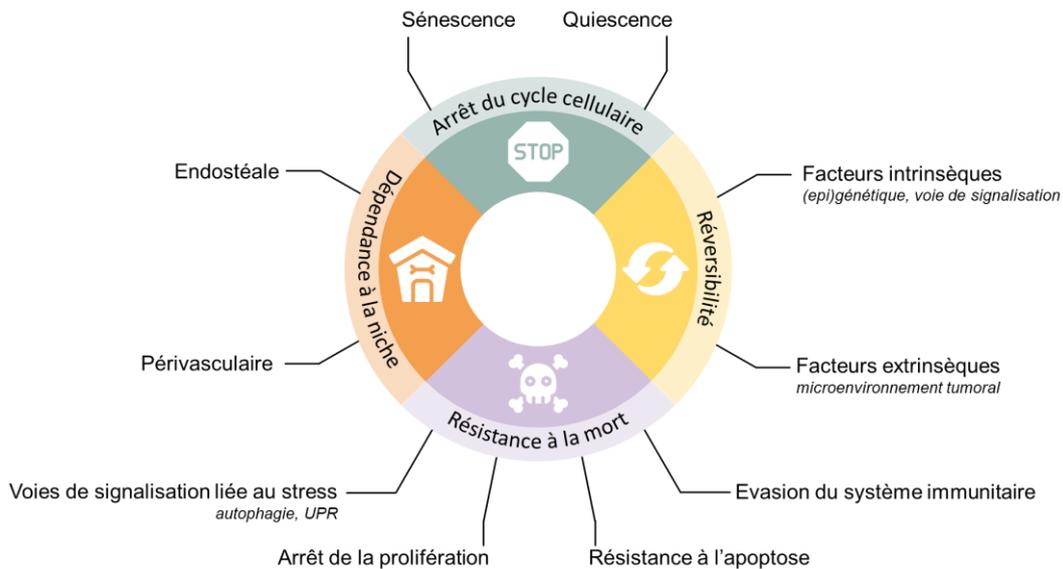


Figure I.3.7. Les *hallmarks* de la dormance cancéreuse.

3.2.2.1. Arrêt du cycle cellulaire : qui de la sénescence ou de la quiescence ?

La première et principale caractéristique de la dormance cellulaire est l'arrêt du cycle cellulaire. Le cycle cellulaire eucaryote consiste en une séquence de signaux parfaitement coordonnés et répartis en quatre phases qui aboutit à la division cellulaire. La première phase permet à la cellule de synthétiser l'ARN messager et les protéines nécessaires aux étapes suivantes (phase Gap 1 ou G_1) ; la deuxième phase consiste en la réplication de l'ADN (phase de synthèse ou S) ; la troisième phase est une étape d'intense croissance cellulaire et de synthèse de protéines (phase Gap 2 ou G_2) ; la quatrième et dernière phase est l'étape où la division cellulaire se déroule (phase de Mitose ou M). Le passage d'une phase à une autre est unidirectionnel et se base sur une régulation fine par des cyclines et des kinases dépendantes des cyclines (CDKs). En réponse à des signaux particuliers, comme une réduction des télomères ou des dommages à l'ADN irréparables, les points de contrôle (*checkpoints*) présents à l'interface de chaque phase peuvent empêcher la progression de la cellule dans le cycle cellulaire, ce qui aboutit à un arrêt de la prolifération (**Figure I.3.8**).

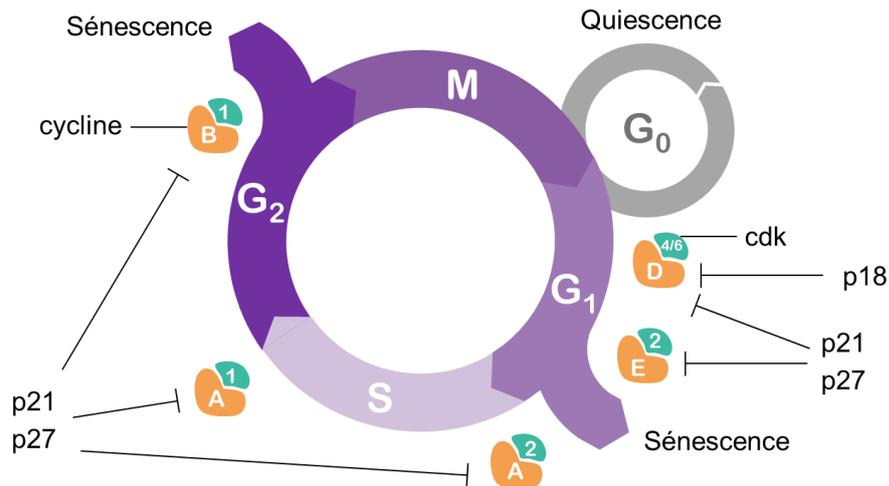


Figure I.3.8. Le cycle cellulaire. Le cycle cellulaire est divisé en deux étapes principales : l'interphase qui comprend les phases G₁, S et G₂, et la phase de mitose M. Chaque étape du cycle cellulaire est régulée finement par l'interaction de cyclines avec des kinases dépendantes des cytokines (CDK). L'entrée dans la phase G₁ est rendue possible par l'interaction des cyclines D avec les CDK4/6, tandis que la sortie de cette phase vers la phase S fait intervenir la cycline E et la CDK2. La progression dans le cycle cellulaire nécessite ensuite un remplacement progressif de la cycline E par la cycline A en gardant le même partenaire CDK2. Une fois la phase G₂ atteinte, la CDK2 est remplacée par la CDK1 comme partenaire de la cycline A. Le passage de la phase G₂ à la phase M se traduit par une réduction de la cycline A au profit de la cycline B. Ceci permet le passage de la phase G₂ à la phase M. À la fin de la mitose, la cellule a la possibilité de re-renter dans le cycle cellulaire, ou d'entrer dans un état de repos appelé phase G₀. À tout moment du cycle cellulaire, si les prérequis pour passer les points de contrôles ne sont pas remplis, la division cellulaire peut être stoppée. Les cellules entrent alors en arrêt cellulaire, qui se traduit biologiquement par l'expression d'un phénotype sénescence ou quiescent.

L'arrêt du cycle cellulaire est un phénomène requis pour le maintien de l'homéostasie des tissus. La sénescence et la quiescence sont deux des principaux mécanismes assurant un contrôle de la prolifération cellulaire. Bien que différents, ces mécanismes partagent un certain nombre de caractéristiques communes (**Tableau I.3.1**).

Tableau I.3.1. Comparaison des caractéristiques de la sénescence et de la quiescence

	Quiescence	Sénescence
Driver	<i>In vitro</i> : privation en sérum, inhibition de contact, perte d'adhésion <i>In vivo</i> : facteurs de niche, manque de facteurs mitogéniques, perte des contacts cellule/cellules ou cellule/MEC	Réduction des télomères, stress lié à la réplication, Agents de dommages à l'ADN aboutissant à une réponse au dommage à l'ADN permanentes (DDR).
Marqueurs clés	↑p27, p21; cyclines S, cyclines G ₂ /M	Elargissement, aplatissement, morphologie granuleuse ; B-gal ⁺ ; ↑p16, p21 ; SAHF ; SASP
Phase du cycle	G ₀	G ₁ , G ₂ ?
Régulateurs moléculaires	CDKis, Rb/E2F switch	Composés de la DDR, CDKis, Rb/E2F switch
Réversibilité	Oui	Possiblement
Résistance à la mort	Résistance aux agents qui ciblent les cellules en prolifération ; échappe au système immunitaire	Résistance aux agents qui ciblent les cellules en prolifération ; surexpression des facteurs anti-apoptotiques

La sénescence dite répliquative a été découverte dans les années 60 lorsque Hayflick s'est rendu compte que des fibroblastes humains cultivés *in vitro* ne pouvaient se multiplier qu'un nombre limité de fois (Hayflick and Moorhead, 1961). Quelques années plus tard, la mise en évidence de la réduction progressive de télomères (une région située à l'extrémité des chromosomes contenant des séquences répétées et permettant le maintien de l'intégrité de l'information génétique) à chaque division cellulaire et l'augmentation des dommages à l'ADN induits lorsque ces télomères sont trop réduits expliquèrent cet arrêt de prolifération observée *in vitro* (Olovnikov, 1996). A l'origine, la sénescence est de fait associée au vieillissement et est considérée comme stable et irrémédiable. D'autres mécanismes de sénescence n'impliquant pas forcément la réduction des télomères ont depuis été décrits, en particulier concernant le cancer. C'est le cas de la sénescence prématurée induite par le stress (SIPS) qui résulte de l'expression aberrante de certains oncogènes ou de celle induite par la cytotoxicité liée à la chimiothérapie (Chandek and Mooi, 2010; Zhao et al., 2004). La sénescence est associée à une hypertrophie cellulaire, une morphologie irrégulière, l'apparition de vacuoles, une augmentation de l'expression des inhibiteurs du cycle cellulaires p16^{Ink4a} et p21^{Cip1}, une activité lysosomale β -galactosidase associée à la sénescence (SA- β -Gal), ainsi que l'acquisition d'un sécrétome associé à la sénescence (SASP). De plus, les cellules en sénescence se trouvent généralement arrêtées en phase G1 ou G2 du cycle (Mao et al., 2012). *A priori*, l'induction de la sénescence pour lutter contre la prolifération incontrôlée des cellules cancéreuses est une thérapie antitumorale prometteuse (Ewald et al., 2010). Mais contre toute attente, un certain nombre d'études décrit un effet pro-tumoral des cellules sénescents. Les composés du SASP sécrétés par les cellule sénescents (cancéreuses ou du microenvironnement) semblent ainsi encourager la prolifération et la motilité invasive des cellules cancéreuse (Coppé et al., 2010).

La quiescence est une autre forme d'arrêt du cycle cellulaire. Elle implique l'entrée dans un état de repos réversible : la phase G₀. Dans cet état, les cellules expriment plus fortement un certain nombre d'inhibiteurs des CDKs tels que p27, p21^{Cip1} et p16^{Ink4a}. Physiologiquement, des cellules telles que les lymphocytes, les hépatocytes ou encore les cellules souches résidentes dans les tissus (ex. : cellules satellites dans les muscles) sont maintenues en quiescence. À tout moment, elles sont capables de sortir de cet état et de se remettre à proliférer en réponse à divers stimuli dépendants du type de cellule et de la niche dans laquelle elles se trouvent. Ainsi, les lymphocytes T restent dans un état de quiescence

jusqu'à ce qu'ils reconnaissent un antigène par leur récepteur T et les cellules satellites ne sortent de leur quiescence que pour régénérer les tissus musculaires endommagés. Par analogie aux cellules souches résidentes des tissus, les CSC (**Box 3.1**) ont été associées (et souvent confondues) avec les cellules cancéreuses quiescentes. Ces deux types de population jouent un rôle dans la maintenance de la maladie résiduelle et la récurrence (Meng et al., 2004) et résistent mieux aux traitements et à la destruction par le système immunitaire (Bruschini et al., 2020). Malgré ces points communs, il reste encore à déterminer si seules les CSC sont capables d'entrer en dormance cellulaire, si la quiescence peut toucher différentes populations de cellules cancéreuses dont les CSC font parties, ou si la quiescence induit un phénotype souche.

BOX 3.1. Le concept de CSCs

Les tumeurs sont composées d'une population hétérogène de cellules cancéreuses. Cette observation, incohérente avec l'idée qu'on se fait de l'origine monoclonale du cancer, a d'abord été justifiée par l'accumulation progressive de mutations somatiques dans des cellules différentes, ce qui aboutit à la coexistence de sous-clones multiples. Une autre explication à cette hétérogénéité serait que les tumeurs soient en réalité des tissus complexes au sein desquels les cellules cancéreuses se différencient. À la manière des tissus normaux, le cancer serait organisé de façon hiérarchique en sous-populations de cellules tumorales avec à leur tête les CSC (**Figure 1.3.9**). Toujours selon cette théorie, seules les CSC peuvent initier et maintenir une tumeur, alors que le reste des cellules tumorales ne comprend que des cellules avec un potentiel de réplication et de tumorigenèse limité. Ces CSC partagent des caractéristiques communes avec les cellules souches classiques, et notamment leur capacité d'autorenouvellement et de résistance augmentée à l'apoptose – caractéristiques rappelant les capacités distinctives des cellules cancéreuses. Elles expriment également des marqueurs souches (ex. : CD133, NANOG, OCT4, SOX2, etc.) et prolifèrent lentement. Les CSC ne représentent qu'un sous-ensemble de la population cellulaire cancéreuse, mais sont capables de recréer totalement l'hétérogénéité phénotypique de la tumeur initiale après avoir été isolées.

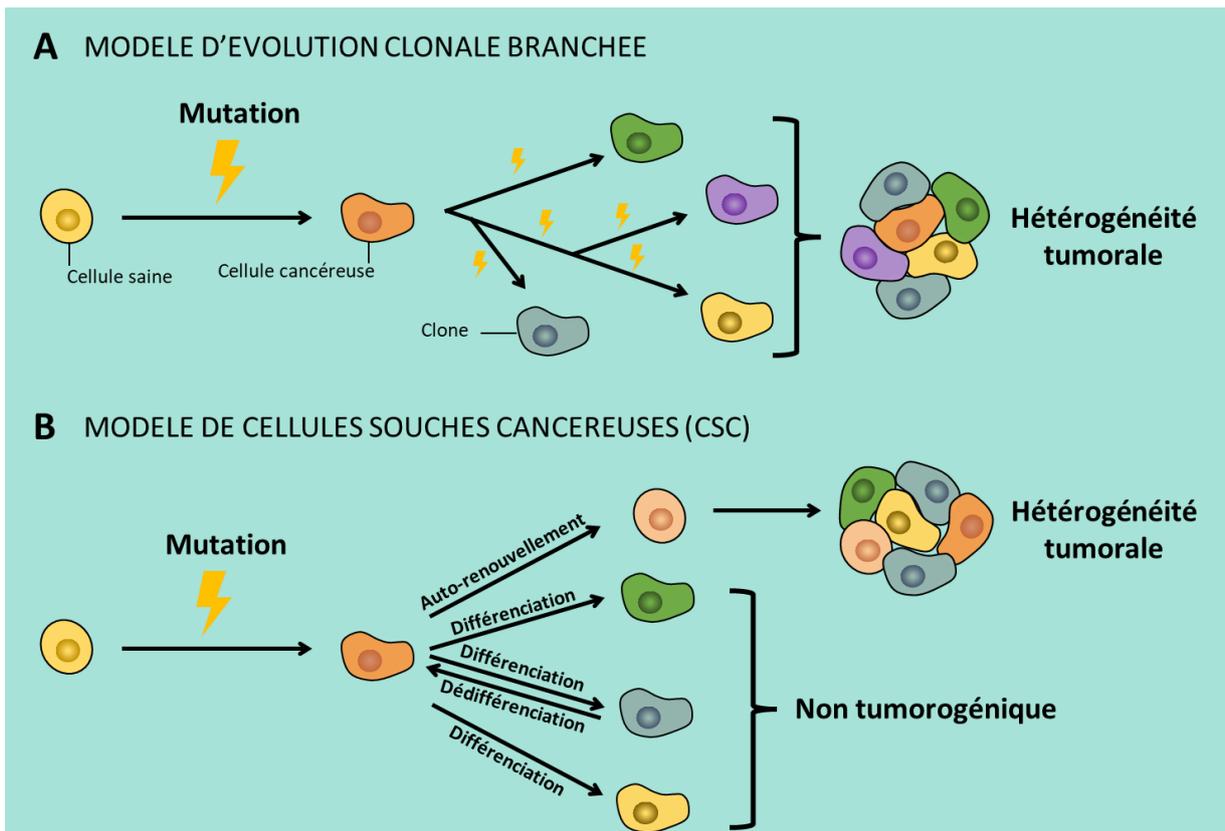


Figure 1.3.9. Hétérogénéité tumorale. L'hétérogénéité tumorale s'explique par différents modèles qui ne sont pas mutuellement exclusifs. (A) Selon le modèle d'évolution clonale branchée, des cellules tumorales issues d'un même ancêtre clonal vont pouvoir évoluer en parallèle et subir des mutations indépendantes les unes des autres ce qui aboutit à la présence de plusieurs sous-clones dans la masse tumorale. (B) Selon le modèle de cellules souches cancéreuses (CSC), une cellule saine (différenciée ou souche) va subir une série de mutations somatiques qui vont la transformer en CSC. Cette CSC sera capable de se différencier en sous-clone cancéreux n'ayant pas de propriétés tumorigénique ou d'auto-renouvellement. La masse tumorale sera donc composée de quelques CSC accompagnées de leurs sous-clones différenciés. De plus, certaines cellules cancéreuses sont plastiques : elles sont capables de passer d'un état souche à non-souche et inversement.

Encore aujourd'hui l'hypothèse des CSC reste controversée (Jordan, 2009). Tout d'abord, si les CSC sont bien les responsables du maintien de la masse tumorale, tous les cancers devraient en contenir. Or, bien que leur présence ait été établie dans de nombreux types de cancers (ex. : leucémie, cerveau, colon, prostate, poumon, pancréas, ovaire, mélanome, ostéosarcome (Clevers, 2011; Jubelin et al., 2022a; Lapidot et al., 1994; Visvader and Lindeman, 2008)), d'autres études n'ont pu en observer. Pour autant, l'hypothèse des CSC peut toujours être valable si on prend en compte divers aspects. Tout d'abord, l'absence de marqueurs universels des CSC empêche de garantir la véracité des résultats négatifs, car celles-ci pourraient exprimer une signature différente de celles connues pour d'autres cancer. Ensuite, des observations ont mis en évidence le caractère plastique des CSC (Chaffer et al., 2011) : elles peuvent passer d'un état souche à un état non-souche et ceci de façon

réversible. Ainsi, il est possible qu'à un temps donné, les CSC ne soient pas détectables au sein de la masse tumorale car elles se trouveront dans un état considéré comme non-souche. Enfin, la comparaison avec les cellules souches normales a certainement créé une certaine confusion. En lien avec ce qui a été dit précédemment, les CSC doivent être définies fonctionnellement (c'est-à-dire vis-à-vis de leur capacité tumorigénique et de différenciation) plutôt qu'en fonction de leur phénotype et de leur fréquence dans les tissus.

Le caractère réversible de la quiescence encourage l'hypothèse selon laquelle c'est ce mécanisme qui est responsable de la dormance cellulaire cancéreuse, et non pas la sénescence. Cependant, des marqueurs spécifiques de la sénescence ont été mis en évidence dans les cellules cancéreuses en dormance (Ewald et al., 2010). Il est donc plus probable que les cellules cancéreuses dormantes, comme c'est le cas pour d'autres étapes de la progression tumorale, détournent et modifient les mécanismes biologiques naturels au service de la survie de la tumeur. Dans ce sens, l'aspect irréversible jusqu'alors associé à la sénescence a été remis en cause à plusieurs reprises (Roberson et al., 2005; Saleh et al., 2019). De plus, la quiescence et la sénescence partagent des marqueurs tels que p21^{Cip1}, p16^{Ink4a} et p57. La superposition de ces deux mécanismes au niveau de leur signature moléculaire et de leur phénotype sous-entend que la quiescence et la sénescence pourraient être liées plus étroitement qu'envisagé. Pour aller encore plus loin, la longueur de l'arrêt cellulaire semble avoir un impact sur la profondeur de cette dormance. En effet, des cellules en quiescence depuis longtemps requièrent des stimulations plus intenses et mettent plus de temps à ré-entrer dans le cycle cellulaire que des cellules dont l'entrée en quiescence est plus récente (Kwon et al., 2017). Cette difficulté à inverser cet état d'arrêt cellulaire rapproche la quiescence profonde de la sénescence (Fujimaki and Yao, 2020). De fait, il se pourrait que ces différents mécanismes (quiescence superficielle, quiescence profonde et sénescence) correspondent en réalité à différents états plus ou moins intenses de dormance cellulaire.

3.2.2.2. Réversibilité

Par définition, la dormance est un état transitoire, puisque toute cellule cancéreuse en dormance peut potentiellement se réveiller. L'entrée et sortie de la dormance dépendent de

facteurs intrinsèques et extrinsèques complexes et méconnus, qui varient à la fois selon le type de cancer et selon la niche dans laquelle se trouve ces cellules en dormance.

Parmi les mécanismes intracellulaires décrits à ce jour, de nombreuses modifications génétiques et épigénétiques ont été corrélées au maintien d'un phénotype de dormance. Par exemple, FBXW7 inhibe la progression du cycle cellulaire en ubiquitinant la cycline E et c-Myc, ce qui aboutit à leur dégradation par le protéasome. *In vivo*, une ablation de ce gène a entraîné une interruption de la quiescence de cellules cancéreuses du sein (Shimizu et al., 2019). La surexpression de FBXW7 dans la lignée d'adénocarcinome pulmonaire A549 a abouti à l'inhibition de la croissance tumorale dans un modèle de xénogreffes. Cette surexpression était associée à une augmentation du nombre de cellules en phase G₀ du cycle cellulaire (W. Zhang et al., 2019). D'un point de vue épigénétique, les processus impliqués dans la dormance cancéreuse agissent à un niveau transcriptionnel, post-transcriptionnel, traductionnel et post-traductionnel. La méthylation de H3 orchestrée par le récepteur NR2F1 (surexprimé dans les cellules en dormance) entraîne une diminution de l'expression de gènes pro-prolifératifs (Sosa et al., 2015). Similairement, la méthylation de l'histone H4 par la méthyltransférase SMYD5 permet le maintien de la dormance de cellules cancéreuses du sein ayant métastasées aux poumons (Gao et al., 2014). La dormance cancéreuse peut également être régulée par une modification des voies de signalisation, en particulier celles impliquées dans la réponse au stress et la survie. Ainsi, plusieurs études ont mis en évidence l'existence d'un ratio p38 MAPK^{high}/ERK^{low} dans les cellules cancéreuses en dormance, en particulier dans le cas du cancer de la tête et du cou, et du fibrosarcome (Aguirre-Ghiso et al., 2004, 2003). La protéine p38 MAPK activée permet l'induction de facteurs régulant la dormance, tel que BHLHB3, NR2F1 ou des inhibiteurs des CDK (ex. : p27, p21), ce qui aboutit à un arrêt réversible du cycle cellulaire (Adam et al., 2009). L'inversion de ce ratio aboutit à la sortie de la dormance cellulaire cancéreuse.

En plus des facteurs intrinsèques, la dormance cancéreuse peut également être régulée par l'action du microenvironnement tumoral. Cet aspect est essentiel dans le contexte de la dormance métastatique et de colonisation de la niche tumorale souvent hostile au développement. La MEC est un composant acellulaire du microenvironnement tumoral. Une surexpression de la protéine transmembranaire COL17A1 (composante des hémidesmosomes et donc impliquée dans l'adhésion à la membrane basale) est associée à un phénotype dormant dans des organoïdes de cancer colorectal humain (Ohta et al., 2022).

Parmi les facteurs solubles qui peuvent être retrouvés dans la MEC, la protéine BMP-7 et le facteur de croissance TGF- β 2 induisent la quiescence dans de multiples cancers. En plus de la MEC, le microenvironnement tumoral comprend des composés cellulaires, dont certains jouent un rôle dans le maintien de la dormance. Ainsi, Bartosh et al. ont mis en évidence l'induction d'un phénotype dormant (diminution de la tumorigénicité, signature moléculaire du SASP) lors de la cannibalisation de CSM par des cellules de carcinome mammaire cultivées en 3D (Bartosh et al., 2016).

De façon générale, ces mécanismes sont réversibles, et impliquent généralement une modification du microenvironnement tumoral. Les mécanismes qui contrôlent la sortie de la dormance cancéreuse peuvent varier selon la niche qu'occupe les cellules. Ainsi, une activation de l'angiogenèse (Ghajar et al., 2013; Qin et al., 2016), une inflammation chronique (Albregues et al., 2018; Tivari et al., 2018), ou une résorption osseuse par l'action des ostéoclastes (Lawson et al., 2015) peuvent tout à fait permettre la réactivation des cellules cancéreuses, la reprise de la prolifération et la (ré)apparition clinique de la maladie. Ces aspects sont discutés plus en profondeur dans la partie **3.2.2.4. Dépendance à la niche.**

3.2.2.3. Résistance à la mort

La notion de maladie récidivante sous-entend que des cellules cancéreuses sont parvenues à résister aux traitements. Dans le cas où cette réapparition de la maladie se fait tardivement, il est probable que ce soient les cellules cancéreuses dormantes qui aient permis cette survie, comme le montre des études *in vivo* (Naumov et al., 2003). La présence de ces cellules cancéreuses dormantes peut avoir deux origines : soit les cellules dormantes préexistent dans la tumeur et la thérapie favorise leur sélection, soit la thérapie induit la transition de cellules cancéreuses proliférantes en cellules cancéreuses dormantes. Cette dernière hypothèse suggère que la dormance puisse être une stratégie d'adaptation des cancers aux stress environnementaux (Dhimolea et al., 2021). La nature des mécanismes favorisant cette résistance aux pressions environnementales et à la mort reste à ce jour mal définie.

L'arrêt du cycle cellulaire est le mécanisme de résistance le plus évident. En effet, de nombreux agents de chimiothérapie largement utilisés en clinique ciblent les cellules en prolifération. C'est le cas des agents alkylants (ex. : cisplatine, temozolomide), des

antimétabolites (ex. : 5-fluorouracil, methotrexate), des anthracyclines (ex. : doxorubicine), ou des inhibiteurs mitotiques (ex. : docetaxel, paclitaxel). *In vitro*, l'induction de l'expression de p21^{Waf1} et p27^{Kip1} impliquée dans la sénescence et la quiescence dans des cellules de lignée d'adénocarcinome a entraîné une diminution de la sensibilité au 5-Fluorouracil, au cisplatine et à la doxorubicine (Schmidt et al., 2001). *In vivo*, le taux de CTD de carcinome mammaire après injection en modèle murin n'a pu être réduit par un traitement à la doxorubicine, entraînant l'apparition de métastases tardives malgré la thérapie (Naumov et al., 2003).

Les cellules cancéreuses en dormance peuvent également activer des voies de signalisation associées au stress. C'est le cas notamment de la voie p38 MAPK. Cette protéine est capable d'induire la réponse aux protéines dépliées (en anglais, *unfolded protein response* ou UPR) en réponse au stress du réticulum endoplasmique (RE). Cette forme de stress résulte d'une accumulation de protéines mal conformées ou mal repliées dans le RE et l'UPR permet de restaurer la fonction normale de la cellule en dégradant les protéines mal conformées et en facilitant le repliement via des protéines chaperonnes (Avril et al., 2017; Hsu et al., 2019). L'UPR peut faciliter la survie face à un stress (ex. : chimiothérapie) notamment en augmentant l'expression à la membrane de pompes à efflux (Salaroglio et al., 2017) ou en favorisant l'induction d'autres mécanismes de résistance comme l'autophagie (Rouschop et al., 2010). L'autophagie est un mécanisme physiologique d'adaptation et de survie, dont l'activation dépend de la présence de conditions défavorables, tels que le manque de nutriments. En réponse à ce stress environnemental, la cellule est capable de s'auto-digérer : le lysosome permet la dégradation et le recyclage des composants intracellulaires. Ceci permet notamment l'élimination des métabolites toxiques, des organites et des protéines mal repliées ou endommagées, ou encore l'apport d'une source d'énergie suffisante au maintien des fonctions vitales. L'un des principaux objectifs de la dormance étant la survie, c'est sans surprise que les cellules dormantes cancéreuses présentent un taux d'autophagie supérieur à leurs homologues proliférantes (La Belle Flynn et al., 2019; Lu et al., 2008; Shimizu et al., 2014). L'autophagie permettrait ainsi la dégradation des mitochondries riches en ROS, qui autrement entraîneraient la mort cellulaire (Vera-Ramirez et al., 2018). De plus, l'inhibition de l'autophagie dans un modèle de culture d'ostéosarcome permet d'améliorer la réponse aux molécules de chimiothérapie (Shimizu et al., 2014).

Un ratio élevé p38 MAPK/ERK (donc induisant un phénotype dormant) semble favoriser l'expression de la protéine chaperonne BiP dans des cellules dormantes de carcinome épidermoïde humain. Après traitement avec de la doxorubicine, cette surexpression de BiP inhibe l'activation de Bax, une protéine pro-apoptotique. Ce mécanisme de résistance semble donc être induit par la chimiothérapie elle-même (Ranganathan et al., 2006).

La survie des cellules en dormance pourrait aussi être médiée par l'évasion du système immunitaire. Dans un modèle de leucémie myéloïde dormante, la surexpression de PD-L1 par ces cellules a permis d'éviter la mort induite par les LT cytotoxiques (Saudemont and Quesnel, 2004). Des cellules de carcinomes pulmonaire et mammaire à prolifération lente présentent une sous-expression d'ULBP, un ligand activateur des cellules NK, ce qui les protégeait de la destruction par l'immunité innée (Malladi et al., 2016). Enfin, la niche colonisée par les cellules cancéreuses en dormance pourrait être immuno-suppressive (Zou et al., 2004), ou cette immunosuppression pourrait être induite par les cellules cancéreuses dormantes elles-mêmes (Baldominos et al., 2022). Récemment, Baldominos et al. ont mis en évidence que des cellules dormantes de cancers triple négatifs étaient non seulement plus résistantes aux attaques cytotoxiques des cellules T, mais qu'elles étaient en plus capables, lorsqu'elle se regroupaient, de former une niche limitant l'infiltration immunitaire et contenant des fibroblastes immunosuppresseurs, des cellules T dites épuisées (qui ont perdues leur capacité effectrice et ne sont plus que faiblement ou pas du tout cytotoxiques) et des cellules dendritiques dysfonctionnelles (Baldominos et al., 2022). La niche joue donc un rôle primordial dans la résistance à la mort des cellules cancéreuses en dormance.

3.2.2.4. Dépendance à la niche

Emprunté du domaine de l'écologie, le terme « niche » a été utilisé pour la première fois dans le domaine de la biologie animale par Raymond Schofield en 1978 lorsqu'il a émis l'hypothèse qu'un environnement particulier – la niche – régule étroitement la différenciation et la prolifération des CSH (Schofield, 1978). Dans le contexte du cancer, et en particulier des CTD et de la maladie métastatique, cette niche correspond à un environnement spécialisé qui peut se trouver dans différents organes et qui, selon sa composition, permet la colonisation des cellules tumorales et leur prolifération ultérieure, ou à l'inverse le maintien de ces CTD dans un état de dormance. Dans le dernier cas, on parle de niche dormante. Bien que la nature précise de ces niches dormantes, que ce soit au

niveau de leur localisation et de leur composition, ne soit pas précisément définie à ce jour, deux types de niches ont été particulièrement étudiés : les niches périvasculaires d'organes fréquemment ciblés par les métastases (poumons, moelle osseuse/os) et la niche endostéale (**Figure I.3.10**).

De multiples études suggèrent que des mécanismes microenvironnementaux régulant la dormance endogène sont détournés par le cancer. En effet, les CTD issues de divers types de cancer empruntent des mécanismes de régulation de la prolifération normalement utilisés par les CSH. Par exemple, la signalisation par la chimiokine CXCL12 joue un rôle primordial dans la colonisation et la quiescence des CSH. La surexpression du récepteur CXCR4 qui lie CXCL12 par les cellules cancéreuses permet à ces dernières d'envahir le tissu osseux où des facteurs environnementaux permettront leur entrée en dormance (Price et al., 2016; Shiozawa et al., 2011). L'os contient plusieurs niches qui peuvent toutes être habitées par les CTD en dormance. La niche endostéale comprend des CSM, des ostéoblastes, des ostéoclastes et des macrophages. Chacun de ces types cellulaires peut jouer un rôle direct ou indirect dans l'induction et la sortie de la dormance, et le remodelage osseux semble être impliqué. Ainsi, les ostéoblastes semblent favoriser l'initiation et le maintien de la dormance (Mayo et al., 2021; Yu-Lee et al., 2018), tandis que l'activité ostéoclastique serait capable de réactiver la prolifération des CTD (Lawson et al., 2015). Différents facteurs sécrétés par ces deux types de cellules ont été décrits comme responsables du contrôle de cette dormance cancéreuse. Les cellules dormantes de myélome semblent notamment préférer coloniser l'endosteum recouvert d'ostéoblastes sécrétant du COL-1, alors que leurs alter-egos proliférantes s'installent loin de la surface osseuse (Lawson et al., 2015). Dans le cas de la leucémie, les cellules tumorales dormantes préfèrent se disséminer au niveau de zones riches en OPN, une molécule exprimée par les ostéoblastes (Boyerinas et al., 2013). D'autres protéines sécrétées par les ostéoblastes, comme le BMP7, Wnt5a, ou encore le TGF- β 2, semblent également induire la dormance de cellules du cancer de la prostate (Kobayashi et al., 2011; Ren et al., 2018; Yu-Lee et al., 2018). A l'inverse, la résorption osseuse, menée par les ostéoclastes, induirait la sortie de cet état de dormance, par le remodelage de la MEC par la MMP-9 et par le relargage de TGF- β 1 activé par les ostéoclastes (Albregues et al., 2018; Cackowski et al., 2010; Tivari et al., 2018).

Bien que la dormance cancéreuse ait été particulièrement étudiée au niveau des niches endostéales et périvasculaires osseuses, il est probable que d'autres environnements

périvasculaires puissent également accueillir les CTD et influencer sur leur dormance. C'est en tout cas ce que montre Ghajar et al. en injectant des cellules du cancer du sein dans des souris : les CTD se localisent préférentiellement dans les réseaux microvasculaires du sein, de la moelle osseuse et du cerveau. L'imitation *in vitro* des niches microvasculaires de deux de ces organes (poumon et moelle osseuse) a mis en évidence la sécrétion de TSP-1 par les cellules endothéliales, une molécule qui induit la dormance. L'action pro-dormance du TSP-1 ne s'avère être cependant efficace que dans le cas d'un réseau vasculaire stable. En effet, la néovascularisation entraîne une reprise de la prolifération des cellules cancéreuses en dormance. Cette angiogenèse bourgeonnante est associée à une augmentation de l'expression de périostine et de TGF- β 1 par la *tip cell* du nouveau vaisseau sanguin. Enfin, le traitement de cellules cancéreuses avec ces protéines a entraîné une explosion de la croissance tumorale, ce qui souligne le rôle que joue la périostine et le TGF- β 1 dans la sortie de la dormance cancéreuse (Ghajar et al., 2013).

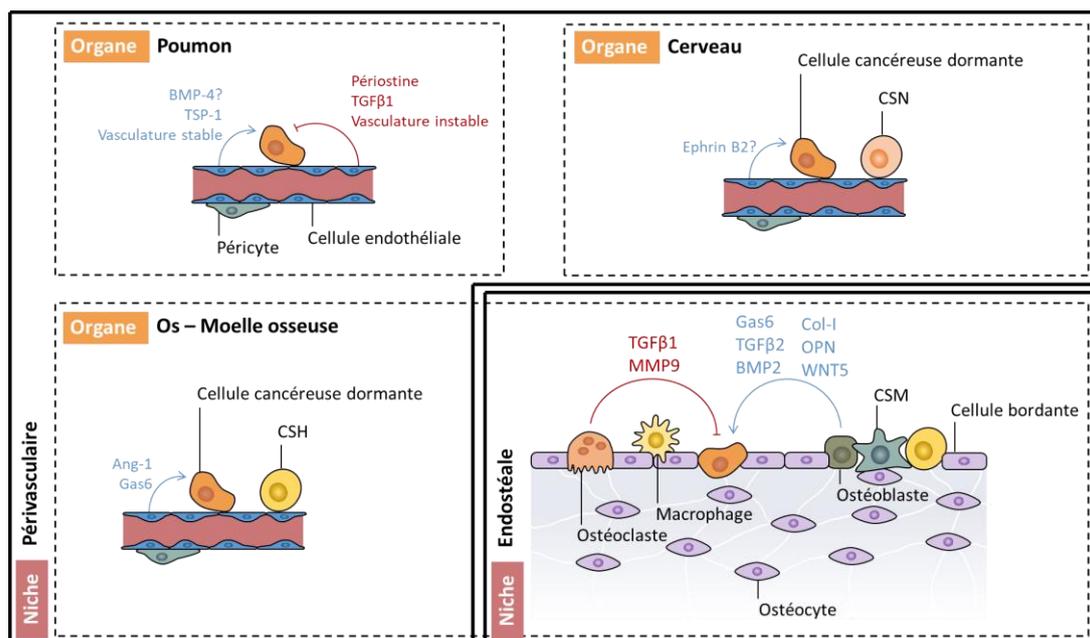


Figure I.3.10. Rôle des niches dans le contrôle de la dormance des cellules tumorales disséminées. Différentes niches dans différents organes ont été décrites dans le contexte du cancer. Le tissu osseux comprend plusieurs niches dont la niche endostéale qui joue un rôle prépondérant dans l'induction, le maintien et la sortie des cellules tumorales disséminées. En particulier, les ostéoblastes favorisent la dormance cancéreuse via la sécrétion de facteurs tels que GAS6, TGF β 2, BMP-7, collagène I, l'OPN ou encore Wnt5a. A l'inverse, la résorption osseuse par les ostéoclastes réactive la prolifération de ces cellules cancéreuses en dormance via la sécrétion de TGF β 1 et de MMP-9. Les cellules endothéliales de la niche périvasculaire osseuse maintiennent cette dormance en sécrétant de l'ANG-1 et du GAS6. Des niches périvasculaires localisées dans d'autres organes comme les poumons et le cerveau peuvent également accueillir des cellules tumorales disséminées. Au niveau pulmonaire, la déstabilisation de la structure vasculaire (qui se traduit notamment par le bourgeonnement des vaisseaux) induit la sortie de la dormance cancéreuse. Les cellules endothéliales peuvent également sécréter des facteurs pro-dormance (TSP1, et probablement BMP-4) et anti-dormance (périostine, TGF β 2). Au niveau du cerveau, il est possible que, comme elles le font pour les cellules souches neuronales, les cellules endothéliales induisent la quiescence des cellules tumorales via l'Ephrin B2.

Ainsi, il ne paraît pas aberrant d'envisager que certains des facteurs impliqués dans l'induction et la sortie de la dormance cancéreuse soient dépendants du type de tissu où se localisent les cellules cancéreuses. De fait, il est primordial de bien comprendre et distinguer les mécanismes de contrôle de la dormance spécifiques d'un tissu de ceux plus universels, et beaucoup reste encore à faire et à découvrir sur ce sujet.

Dans ce sens, l'objectif de cette thèse s'est divisé en deux parties. Dans un premier temps, la caractérisation morphologique de différentes lignées cellulaires cultivées en 3D a permis d'établir une méthode de culture adaptée à la génération de sphéroïdes répétables. Dans un second temps, cette méthode de culture a été utilisée pour étudier des processus propres au cancer, comme la résistance aux traitements et la dormance cancéreuse.

PARTIE II

MATÉRIELS ET MÉTHODES



1. LISTE DES PRODUITS COMMERCIAUX

Tableau II.1.1. Liste des produits commerciaux

NOM	ABREVIATION	REFERENCE	FOURNISSEUR
CULTURE CELLULAIRE			
143B		91112502	ECACC
A549		CCL-185	ATCC
Caco-2		86010202	Sigma-Aldrich
DU145		HTB-81	ATCC
HT29		HTB-38	ATCC
LnCaP		89110211	ECACC
MG-63		CRL-1427	ATCC
MNNG/HOS		CRL-1547	ATCC
PC3		CRL-1435	ATCC
SAOS-2		89050205	ECACC
U251		09063001	Sigma-Aldrich
U2OS		HTB-96	ATCC
Tampon PBS de Dulbecco	PBS	CSIPBS01-01	Eurobio Scientific
Dulbecco's Modified Eagle Medium	DMEM	L0106-500	Dominique Dutscher
McCoy's 5A (Modified) Medium	McCoy's 5A	P04-05500	PAN biotech
Ham's F-12K (Kaighn's) Medium	F12-K	21127-022	Gibco
Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium	RPMI	L0501-500	Dominique Dutscher
Sérum de Veau Foetal	SVF	CVFSVF00-01	Eurobio Scientific
Pyruvate de sodium 100 mM		11360070	Gibco
L-Glutamine 200 mM (100X)	L-Glutamine	25030-024	Gibco
0,05% Trypsine EDTA (1X)	Trypsine	25300-054	Gibco
Flacon de culture cellulaire 25 cm ²	T25	353109	Falcon
Flacon de culture cellulaire 75 cm ²	T75	353136	Falcon
Boîte pour culture cellulaire 100x20mm	Boîte de pétri	353003	Falcon
Plaque 6-puits adhérente		3506	Corning Costar

NOM	ABREVIATION	REFERENCE	FOURNISSEUR
CULTURE CELLULAIRE (SUITE)			
Plaque 96-puits adhérente		3599	Corning Costar
Plaque 96-puits faible-adhérence fond plat		3474	Corning Costar
Plaque 96-puits faible-adhérence fond arrondi		174926	Thermo Scientific
Plaque 384-puits faible-adhérence		4116	Corning Costar
Méthylcellulose		HSC001	R&D System
Geltrex™ LDEV-Free Reduced Growth Factor	Geltrex™	A14132-02	Gibco

NOM	ABREVIATION	REFERENCE	FOURNISSEUR
IMMUNOCYTOLOGIE			
Vybrant™ DiD Cell-labeling Solution	DiD	V22887	Invitrogen
Hoechst 33342, trihydrochloride, trihydrate	Hoechst	H3570	Invitrogen
LIVE/DEAD™ Cell Imaging Kit	LIVE/DEAD™	R37601	Invitrogen
HistoCore SPECTRA H&E Staining System	HE S1-800s	3801656 /3801656CN	Leica
Disposable Base molds 7x7x5 mm	Cytoblock	M475-1	Simport
Advanced Adhesive Slide	Lame	9618	TissueTek Sakura
Cryomatrix™		6769006	Epredia

NOM	ABREVIATION	REFERENCE	FOURNISSEUR
TRAITEMENT			
MISSION® esiRNA ETV4	siETV4	EHU069441	Merck
MISSION® esiRNA HELLS	siHELLS	EHU075091	Merck
MISSION® esiRNA ITGA6	siITGA6	EHU088861	Merck
MISSION® esiRNA MCM4	siMCM4	EHU081181	Merck
MISSION® esiRNA PRKDC	siPRKDC	EHU123791	Merck
MISSION® esiRNA RAD21	siRAD21	EHU108911	Merck
MISSION® esiRNA UBE2T	siUBE2T	EHU013731	Merck
MISSION® esiRNA KIFF11	siKIFF11	EHU019931	Merck

NOM	ABREVIATION	REFERENCE	FOURNISSEUR
TRAITEMENT (SUITE)			
MISSION® esiRNA eGFP	siEGFP	EHUEGFP	Merck
Lipofectamine™ RNAiMAX		13778075	ThermoFisher
Opti-MEM™ I		31985062	ThermoFisher
Doxorubicine Hydrochloride CRS	Doxorubicine	D2975000	Sigma Aldrich

NOM	ABREVIATION	REFERENCE	FOURNISSEUR
BIOLOGIE MOLECULAIRE			
NucleoSpin RNA Plus		700984	Macherey-Nagel
NucleoSpin RNA Plus XS		740990	Macherey-Nagel
PanCancer Human IO 360™			NanoString Technologies
Hs_GAPDH_1_SG	GAPDH	QT00079247	QIAGEN
HS_RPLPO_1_SG	RPLPO	QT00075012	QIAGEN
OneScript RT Mix with g/DNAOut		OZYA012-100	Ozyme
PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix	SYBR	A25741	Applied biosystems

NOM	ABREVIATION	REFERENCE	FOURNISSEUR
BIOCHIMIE			
LDH-Glo™ Cytotoxicity Assay		J2380	Promega

2. CULTURE CELLULAIRE

2.1. Lignées cellulaires et milieu de culture

Les lignées d'ostéosarcome MNNG/HOS, 143B, MG-63, SAOS-2, U2OS, les lignées d'adénocarcinome prostatique PC3, LnCaP, DU145, la lignée d'adénocarcinome pulmonaire A549, la lignée de glioblastome U251 et les lignées de carcinome colorectal Caco-2 et HT29 proviennent de différents fournisseurs décrits dans le **tableau II.1.1**. La lignée d'ostéosarcome SJSA-1 a été donnée gracieusement par le Pr. S. Mittnacht de l'University College of London. Toutes les lignées cellulaires ont été cultivées à 37°C, à 5% de CO₂ et dans un environnement saturé en humidité. De plus, les lignées ont été testées régulièrement pour les mycoplasmes.

En condition monocouche adhérente, les lignées MNNG/HOS, 143B et MG-63 ont été cultivées dans du milieu DMEM à 4,5 g/L de D-glucose et 0,11 g/L de pyruvate de sodium, complété par 5% de SVF et 2 mM de L-Glutamine. Les lignées DU145, U251 et Caco-2 ont été cultivées dans du milieu DMEM à 4,5 g/L de D-glucose et 0,11 g/L de pyruvate de sodium et complété avec 10% de SVF et 2 mM de L-Glutamine. Les lignées SAOS-2, U2OS et HT29 ont été cultivée dans du milieu McCoy's 5A complété avec 10% de SVF et 2 mM de L-Glutamine. La lignée SJSA-1 a été cultivée dans du milieu RPMI complété avec 10% de SVF et 2 mM de L-Glutamine. La lignée LnCaP a été cultivée dans du milieu RPMI complété avec 10% de SVF, 2 mM de L-Glutamine et 1mM de pyruvate de sodium. Les lignées A549 et PC3 ont été cultivées dans du milieu F12-K complété avec 10% de SVF et 2 mM de L-Glutamine. Les références des lignées cellulaires et des milieux de culture ainsi que leurs compléments sont disponibles dans le **tableau II.1.1**.

2.2. Culture 2D

Les lignées cellulaires étaient entretenues en monocouche adhérente dans des flacons de culture T25 ou T75. Lorsque les cultures atteignaient 90% de confluence, elles étaient passées selon les protocoles classiques d'entretien cellulaire. Dans le cas de la comparaison de prolifération entre les cultures 2D et 3D et de la transfection transitoire avec des siRNA, les cellules concernées ont été cultivées dans des plaques de culture à 12- et/ou 96-puits.

2.2. Culture 3D

En condition de culture 3D, les sphéroïdes ont été générés en plaque de culture 96-puits à fond plat, 96-puits à fond arrondi ou 384-puits à fond arrondi. Trois méthodes de cultures 3D ont été employées : le LOT, le HD et les matrices 3D.

2.2.1. Culture en LOT

Après avoir été détachées de leur support de culture, les cellules ont été re-suspendues dans leur milieu de culture complet etensemencées en plaque de culture à puits multiple à faible adhérence à raison de 20 000 cellules dans 100 µL par puits pour les plaques 96-puits ou dans 50 µL par puits pour les plaques 384-puits. Après 1 jour de culture, 50 µL ou 25 µL de milieu complet a été ajouté dans les puits des plaques 96-puits ou 384-puits respectivement. Le milieu de culture a été changé tous les 2 à 3 jours en remplaçant les 2/3 du volume.

2.2.2. Culture en HD

2.2.2.1. Matrice de méthylcellulose

Après avoir été détachées de leur support de culture, les cellules ont été re-suspendues dans leur milieu de culture complet à une concentration de 1×10^6 cellules/mL. Une solution de méthylcellulose préalablement diluée au ½ avec du milieu de culture complet a ensuite été ajoutée à la suspension cellulaire avec un ratio 1:4 méthylcellulose:suspension (concentration finale de la méthylcellulose : 0,1X). Des gouttes de 25 µL de la suspension cellulaire ont ensuite été distribuées à l'intérieur du couvercle d'une boîte de pétri de culture (20 000 cellules/gouttes). Du PBS a été ajouté au sein de la boîte de culture afin d'éviter l'assèchement des gouttes et le couvercle a été repositionné normalement. Les gouttes ont été incubées dans cette position inversées pendant 24h à 37°C, avant d'être transférées à raison d'une goutte par puits dans une plaque 96-puits ou 384-puits à faible-adhérence. 125 µL ou 50 µL de milieu complet a été ajouté dans chaque puits de la plaque 96-puits ou 384-puits respectivement. Le milieu de culture a été changé tous les 2 à 3 jours en remplaçant les 2/3 du volume.

2.2.2.2. Matrice de Geltrex™

Après avoir été détachées de leur support de culture, les cellules ont été re-suspendues dans leur milieu de culture complet à une concentration de $0,83 \times 10^6$ cellules/mL. Une solution de Geltrex™ préalablement diluée au ½ avec du milieu de culture complet est ensuite ajoutée à la suspension cellulaire avec un ratio 1:24 Geltrex™:suspension (concentration finale de Geltrex™ : 0,02X). Des gouttes de 25 µL de la suspension cellulaire ont ensuite été distribuées à l'intérieur du couvercle d'une boîte de pétri de culture (20 000 cellules/gouttes). Du PBS a été ajouté au sein de la boîte de culture afin d'éviter l'assèchement des gouttes et le couvercle a été repositionné normalement. Les gouttes ont été incubées dans cette position inversées pendant 24h à 37°C, avant d'être transférées à raison d'une goutte par puits dans une plaque 96-puits ou 384-puits à faible-adhérence. 125µL ou 50µL de milieu complet a été ajouté dans chaque puits de la plaque 96-puits ou 384-puits respectivement. Le milieu de culture a été changé tous les 2 à 3 jours en remplaçant les 2/3 du volume.

3. MARQUAGE CELLULAIRE ET IMAGERIE

3.1. Coloration de cellules vivantes

3.1.1. Marquage de la membrane cellulaire avec un colorant fluorescent lipophile

A J0, les lignées cellulaires ont été marquées avec le colorant lipophile Vybrant™ DiD Cell-labeling Solution selon les recommandations du fabricant. Après comptage cellulaire et re-suspension des cellules à une densité de 1×10^6 cellules/mL dans du milieu de culture sans sérum, les cellules ont été incubées avec 5 μ L de suspension cellulaire (dilution au 1:200) pendant 10 minutes à 37°C, avant de subir trois lavages successifs avec du milieu sans sérum. Le colorant DiD étant utilisé comme un marqueur de prolifération sur un minimum de 15 jours de culture, les cellules marquées ont été manipulées à l'abri de la lumière directe afin de préserver au maximum la fluorescence. Dans ces conditions, les intensités de fluorescence restent stables dans les populations cellulaires ne se divisant pas, alors qu'elles diminuent de moitié à chaque mitose dans les populations cellulaires se divisant (Jensen, 2012).

3.1.2. Marquage nucléaire des cellules vivantes

Afin de compter par microscopie le nombre de cellules totales et/ou le nombre de cellules positives au DiD, les cellules ont été marquées à l'Hoechst, un colorant perméant qui se fixe à l'ADN et fluoresce dans le bleu (excitation : 350 nm ; émission : 461 nm). Une solution stock à 0,01 μ g/mL (1:5000) dans du PBS a été préparée extemporanément. 50 μ L de cette solution stock ont été ajoutés aux 100 μ L de milieu contenu dans les puits des plaques de cultures. Les cellules ont été incubées avec le colorant pendant 30 minutes à 1 heures à 37°C et à l'abri de la lumière. Avant d'être imagées, les cellules ont été rincées et recouvertes de milieu de culture neuf.

3.1.3. Détection de la viabilité cellulaire par marquage au LIVE/DEAD™

La coloration avec le LIVE/DEAD™ Cell Imaging Kit permet de discriminer les cellules vivantes des cellules mortes grâce à deux molécules : la calcéine AM qui est un colorant cellulaire perméant qui émet une fluorescence dans le vert lorsque convertie en calcéine (excitation : 488 nm ; émission : 515 nm) par l'activité estérase intracellulaire des cellules vivantes ; le BOBO-3 Iodide qui est un colorant cellulaire non perméant ne pouvant donc pénétrer que dans les cellules dont la membrane cellulaire est compromise, et qui fluoresce dans le rouge en se liant à l'ADN (excitation : 570 nm ; émission : 602 nm).

Dans un premier temps, le surnageant des cellules cultivées en 2D ou 3D a été retiré, les cellules ont été lavées et resuspendues dans 25 µL de milieu. Puis, les sondes fluorescentes ont été mélangées en ajoutant 1 mL de Calcéine AM 1 µM à un tube contenant 1 µL de BOBO-3 Iodide afin d'obtenir une solution de travail à 2X. 25 µL de cette solution à 2X ont été ajoutées à chaque puits dans les deux heures après sa préparation. Après 15 minutes d'incubation à température ambiante (20-25°C) et à l'abri de la lumière, les cellules sont imagées par microscopie à fluorescence.

3.2. Histochimie

3.2.1. Préparation des cytoblocks

Afin d'observer par microscopie les parties internes des cellules cultivées en 3D, les sphéroïdes ont été inclus dans du Cryomatrix™. Le montage a été plongé dans le l'isopentane refroidi à l'azote liquide (*snap-freeze*) et le cytoblock congelé a été conservé à -80°C jusqu'à ce qu'il soit coupé par microtome.

Les coupes au microtome des cytoblocks ont été réalisées dans un cryostat dont la chambre était à -20°C. Les coupes de 3 à 6 µm d'épaisseur ont été déposées sur des lames de microscopie avant d'être colorées et montées.

3.2.2. Coloration histochimique HE

Les coupes ont été marquées à l'hématoxyline et à l'éosine (HE), qui colorent le noyau et la matrice respectivement. Les coupes ont été exposées pendant 1 minute 30 à l'hématoxyline, avant d'être rincées abondamment à l'eau courante (agent bleussant). Puis, les coupes ont été plongées pendant une minute dans l'éosine. Le colorant en surplus a été rincé à l'eau courante.

Les lames ont ensuite été rincées avec de l'alcool 100% deux fois, puis plongé dans un bain de xylène 3 fois avant d'être montées.

3.2. Microscopie

Les cellules vivantes ont été imagées avec le microscope Operetta CLS High-Content Analysis System de Perkin Elmer. Les images ont ensuite été analysées via le logiciel Harmony.

Les lames des coupes de sphéroïdes ont été imagées avec le microscope Nikon Eclipse Ni-U5 utilisé en lumière blanche.

4. TRAITEMENTS DES CELLULES

4.1. siRNA et transfection transitoire

La gamme MISSION® esiRNA de Merck a été utilisée pour la sous-expression transitoire de gènes humains. Ces siRNA sont composés d'un mélange hétérogène de siRNA qui ciblent des séquences différentes du même ARNm. Ceci permet de n'utiliser que des faibles concentrations de chaque siRNA individuel et donc de réduire les effets sur des cibles non désirées. Les siRNA visant les gènes d'intérêts suivants ont été utilisés : siETV4, siHELLS, siITGA6, siMCM4, siPRKDC, siRAD21 et siUBE2T. Les siRNA siKIFF11 et siEGFP ont été utilisés comme contrôles positif et négatif respectivement.

Les cellules ont été transfectées avec l'agent de transfection Lipofectamine™ RNAiMAX et le milieu OptiMEM®. La transfection a été réalisée par transfection inverse (transfection et ensemencement simultanés) selon les recommandations du fournisseur, soit avec 10 nM de siRNA pour les conditions de traitement individuelles, soit avec un mélange à 2 nM de siRNA pour la condition Pool (siHELLS + siMCM4 + siPRKDC + siRAD21 + siUBE2T).

La sous-expression des gènes traités avec les différents siRNA a été validée par RTqPCR.

4.2. Chimiothérapie

Pour la comparaison de la sensibilité aux traitements entre les cultures 2D et les cultures 3D, les cellules MNNG/HOS cultivées en 2D ou en 3D ont été traitées pendant 72h avec des concentrations de doxorubicine allant de 0,001 μM à 100 μM .

Pour la comparaison de la sensibilité aux traitements en fonction de la sous-expression des gènes, les cellules MNNG/HOS cultivées en 2D ont été traitées pendant 48h avec une concentration de doxorubicine de 0,8 μM .

Pour toutes les expériences, les cellules ont été traitées une unique fois, un jour après leur ensemencement.

5. BIOLOGIE MOLÉCULAIRE

5.1. Extraction, quantification et reverse transcription de l'ARN

L'ARN total des cellules MNNG/HOS cultivées en 2D a été extrait avec le kit NucleoSpin RNA Plus de Macherey-Nagel par purification sur colonne selon les recommandations du fabricant. La concentration en ARN a été mesurée à l'aide d'un NanoDrop One.

La reverse transcription des ARN en ADNc a été réalisée avec le kit OneScript RT Mix with g/DNAOut d'Ozyme selon les recommandations du fabricant avec l'aide d'un thermocycleur MyCycler™ de chez Bio-Rad®. 100 ng d'ARN ont été rétro-transcrits par échantillon.

5.2. qPCR

La sous-expression des gènes *ETV4*, *HELLS*, *ITGA6*, *MCM4*, *PRKDC*, *RAD21* et *UB2ET* a été évaluée par qPCR. Les séquences des amorces sens et anti-sens ciblant chacun de ces gènes ont été conçues sur le site Primer BLAST du NCBI. Les amorces ont été synthétisées par Sigma-Aldrich®. Les séquences sont décrites dans le **Tableau II.4.1**. Les réactions de qPCR ont été réalisées avec le kit SYBR™ d'Applied biosystem. Les conditions de cycle de chauffage comprenaient 40 cycles divisés en une étape de dénaturation à 95°C pendant 1 seconde et une étape d'hybridation à 60°C pendant 30 secondes. Le coefficient d'extinction ε a été calculé selon la formule : $\varepsilon = 100 * (2^{-\Delta\Delta Ct} CTRL - 2^{-\Delta\Delta Ct} EXP)$. Le changement de l'expression des gènes a été obtenu par normalisation avec les gènes de ménages RPLPO et GAPDH commercialisé par QIAGEN.

Tableau II.5.1. Séquences des amorces

Gène	Amorces
ETV4	Sens : 5' CACCTTCAGCAGCAAATCGC 3' Antisens : 5' GATCTTCAGAGTCGAGGGGC 3'
HELLS	Sens : 5' CATGCACAGCTTCAACACGG 3' Antisens : 5' ATCCGACTGGGGGTTCCAAT 3'
ITGA6	Sens : 5' TGCCAGCAAGGTGTAGCAG 3' Antisens : 5' CTCTACACGAACAATCCCTTTCCA 3'
MCM4	Sens : 5' CAACGGCATCTGCTGTATCG 3' Antisens : 5' CTGACAGATGATCCCAGCCTTT 3'

Tableau II.5.1 (suite). Séquences des amorces

Gène	Amorces
PRKDC	Sens : 5' TGCCCTCATCAGTGGTTTC 3' Antisens : 5' ACTCTTTGGACTAACTCCCTCG 3'
RAD21	Sens : 5' ACTACTTTGGATCTGGCACCG 3' Antisens : 5' GACAGCGTGTAAGAGCTTCAG 3'
UBE2T	Sens : 5' ATTGCCACCAAAGGTGCTTG 3' Antisens : 5' CAGGGTTGGTTCTGACATGA 3'

5.3. Nanostring™

L'ARN des cellules MNNG/HOS DiD⁻ et DiD⁺ a été extrait avec le kit NucleoSpin RNA Plus XS de Macherey-Nagel immédiatement après l'isolement des cellules d'intérêt à la suite du tri cellulaire par cytométrie en flux. La concentration en ARN a été quantifiée sur un NanoDrop. Pour procéder à l'analyse Nanostring™, 50 ng d'ARN dans un volume maximum de 5 µL étaient nécessaires par échantillon.

Afin d'analyser les différences d'expression géniques entre les cellules tumorales DiD⁻ et DiD⁺, le panel Nanostring™ PanCancer Human IO 360™ a été sélectionné. Ce panel permet d'évaluer le niveau d'expression de 770 ARNm différents, décrits comme impliqués dans la croissance tumorale, les réponses immunitaires et l'effet du microenvironnement tumoral. L'hybridation des sondes de capture et rapporteuses avec les ARN cibles a été réalisée selon les recommandations du fabricant. La solution contenant les échantillons d'ARN et les sondes a été placée dans un thermocycleur à 65°C pendant au moins 16 heures.

A la suite de l'hybridation, les échantillons ont été placés dans un automate, l'instrument nCounter Prep Station, pour que les sondes et les ARNm en excès soient éliminés. Les échantillons ainsi purifiés ont alors été chargés sur une cartouche où ils ont pu se fixer via la biotine de la sonde de capture.

Les échantillons fixés sont ensuite chargés dans un second automate, le nCounter Digital Analyzer, qui est un scanner à épifluorescence à plusieurs canaux. L'automate a pris autant d'images que de sondes rapporteuses détectées. Ces images ont alors été converties en valeurs numériques pour l'analyse.

Les données obtenues ont été analysées via le logiciel Nanostring's nSolver Analysis Software avec lequel des tests statistiques ont été réalisés.

6. BIOCHIMIE

6.1. Mesure de la mortalité par relargage LDH

Le LDH (Lactate dehydrogenase) est un composé relargué dans le milieu de culture par les cellules dont la membrane est endommagée. Son dosage a été réalisé avec le kit LDH-Glo™ Cytotoxicity Assay de Promega.

5 µL du surnageant (échantillon 1X) des cellules ont été prélevés juste avant le marquage de ces dernières avec le colorant LIVE/DEAD™. Ce surnageant a été dilué au 1/20^{ème} (échantillon 0,05X) dans du PBS et 10 µL de cette solution au 0,05X a été ajouté à 15 µL de LDH Storage Buffer et 25 µL d'Enzyme Mix fournis dans le kit. Chaque échantillon a été déposé dans le puits d'une plaque blanche à fond opaque. La plaque a été incubée à l'abri de la lumière pendant 1 heure à température ambiante. Puis, la luminescence a été mesurée à l'aide d'un lecteur de plaque VICTOR Nivo de Perkin Elmer. La concentration en LDH a été comparée à une gamme étalon faite en parallèle afin de s'assurer que les valeurs obtenues à partir de échantillons se trouvent bien dans la phase linéaire de l'essai.

7. TESTS STATISTIQUES

Les tests statistiques ont été réalisés avec le logiciel GraphPad Prism v7.0. Les tests sélectionnés sont précisés dans la légende de chaque figure où ils ont été appliqués.

Pour l'analyse de l'expression différentielle des gènes du Nanostring™, les tests statistiques ont été réalisés avec le logiciel nSolver de Nanostring™.

Les tests avec $p < 0,05$ sont considérés comme significatifs.

PARTIE III

RÉSULTATS



1. COMPARAISON DE MÉTHODES DE CULTURE 3D EN MILIEU LIQUIDE POUR LA GÉNÉRATION DE SPHÉROÏDES RÉPÉTABLES ET LE CRIBLAGE DE MOLÉCULES DE CHIMIOTHÉRAPIE

Le développement de thérapies est un procédé en plusieurs étapes qui commence avec la découverte et le développement de candidats médicaments, et qui doit passer par des phases successives de recherche clinique et pré-clinique avant que le produit final puisse être approuvé par les autorités compétentes. Ce processus peut prendre plus de 10 ans et coûter des milliards de dollars dans le cas des médicaments antinéoplasiques (Wouters et al., 2020). Le fort taux d'échec entre l'étape de recherche clinique et les essais cliniques est souvent responsable de l'augmentation des coûts lors du développement de thérapies. Ceci pourrait cependant être partiellement évité en utilisant des modèles précliniques plus pertinents, tels que les méthodes de culture en 3D. En effet, un nombre croissant de preuves souligne l'avantage des modèles de culture 3D pour le criblage de molécules thérapeutiques par rapport aux traditionnelles cultures en monocouche adhérente (2D) (Imamura et al., 2015) dans le cas des tumeurs malignes solides. Les sphéroïdes sont un type de modèle 3D où les cellules cancéreuses s'agrègent pour former une masse multicellulaire plus ou moins dense. Cette organisation sphérique confère des propriétés aux cellules cancéreuses habituellement non observées en culture 2D, telles que la génération d'un gradient de transport, une structure stratifiée, une expression différentielle de gènes et de protéines, et par-dessus tout une variabilité dans la sensibilité aux traitements. Malheureusement, les cultures 2D leurs sont encore souvent préférées car la génération de sphéroïdes répétables peut s'avérer compliquée et, selon les méthodes de culture 3D employées, ne permettent pas leur utilisation pour des criblages à haut débit.

Dans cette étude, nous avons comparé la capacité de différentes lignées cellulaires à se développer en sphéroïdes en culture 3D. La morphologie des sphéroïdes d'adénocarcinome pulmonaire (A549), d'adénocarcinome prostatique (LnCaP), d'ostéosarcome (MNNG/HOS) et de glioblastome (U251) a été comparée en fonction du type de plaque de culture utilisé (fond plat ou fond arrondi) et de la méthode de culture 3D employée (Liquid Overlay Technique (LOT) ou Hanging Drop (HD)). De plus, la réponse à l'exposition d'un traitement à

la doxorubicine des cellules cultivées en 2D ou en 3D a été évaluée. Nous proposons ici un modèle de culture 3D facilement implémentable, permettant la production de sphéroïdes homogènes et utilisable pour le criblage de molécules thérapeutiques.

1.1. Toutes les lignées cancéreuses ne sont pas capables de former spontanément des sphéroïdes en condition LOT

Dans un premier temps, huit lignées de différents types de cancer ont été cultivées par LOT en plaque 96-puits à fond plat. Leur capacité à former spontanément des sphéroïdes a été évaluée par microscopie dix jours après l'ensemencement (**Figure III.1.1A**). Ainsi, les cellules A549 (adénocarcinome pulmonaire), DU145, LnCaP (adénocarcinomes prostatiques), HT29 (adénocarcinome colorectal), MNNG/HOS (ostéosarcome) et U251 (glioblastome) sont capables de former des sphéroïdes, bien qu'ayant des tailles variées. A l'inverse, les cellules PC3 (adénocarcinome prostatique) ne parviennent pas à s'agréger et se maintiennent en tapis cellulaire non adhérent. Les cellules Caco-2 (adénocarcinome colorectal), quant à elles, forment de très nombreux sphéroïdes de petite taille restant à proximité les uns des autres mais ne fusionnant pas. Parmi ces lignées, les paramètres morphologiques de six d'entre elles (A549, DU145, HT29, LnCaP, MNNG/HOS, U251) ont été étudiés (**Figure III.1.1B**). Les six lignées forment des sphéroïdes dont le diamètre minimum fait environ 500 μM . Les DU145 et les U251 ont produits les sphéroïdes les plus petits, et les LnCaP les sphéroïdes les plus grands. Vis-à-vis de la forme, seule les MNNG/HOS s'agrègent en sphéroïde dont la rondeur est en moyenne supérieure à 0,8. Pour toutes les autres lignées, ces conditions de culture ne permettent pas de produire des sphéroïdes ronds. Enfin, les lignées A549, DU145, LnCaP et U251 forment un unique sphéroïde par puits, tandis que les MNNG/HOS en forment entre 1 et 2, et que les cellules HT29 en forment entre 1 et 4.

Au-delà de ces paramètres quantitatifs, les différentes lignées évaluées peuvent être classées selon des caractéristiques morphologiques qualitatives, à savoir leur capacité à former des sphéroïdes, la forme des sphéroïdes, leur taille et leur densité (**Tableau III.1.1**). Ainsi, parmi les lignées capables de s'agréger dans ces conditions, les cellules DU145, U251, MNNG/HOS, Caco-2 et HT29 forment des sphéroïdes de type rond ou ovoïde, tandis que les sphéroïdes issus des lignées cellulaires LnCaP et A549 s'apparentent plus à des pseudo-organoïdes, c'est-à-dire que ces sphéroïdes prennent une morphologie plus complexe.

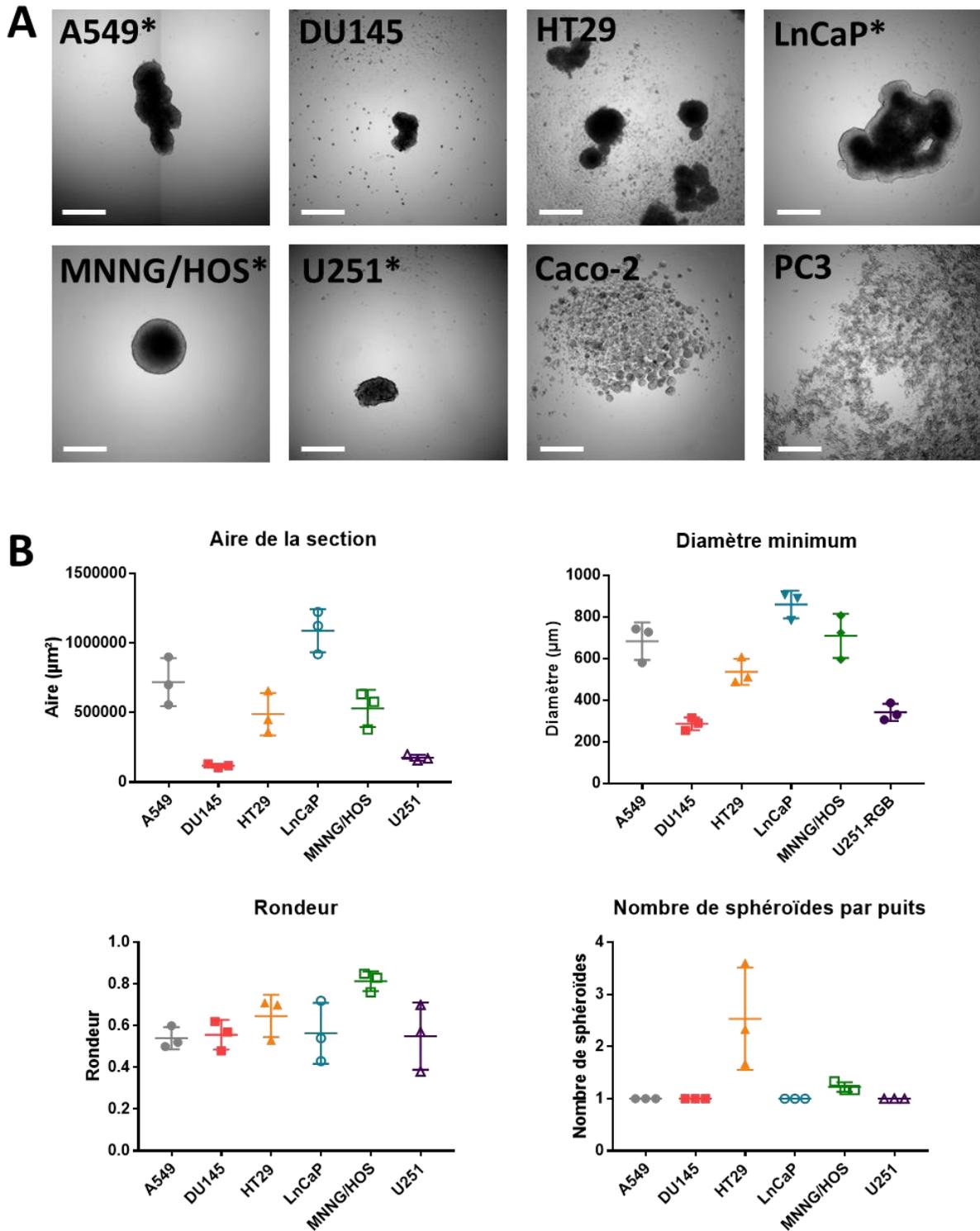


Figure III.1.1. Caractérisation morphologique de différentes lignées cellulaires cancéreuses cultivées par LOT dans des plaques de culture 96-puits à fond plat. A] Des cellules d'adénocarcinome pulmonaire (A549), d'adénocarcinome prostatique (DU145, LnCaP, PC3), d'adénocarcinome colorectal (HT29, Caco-2), d'ostéosarcome MMNG/HOS et de glioblastome (U251) ont été cultivées en 3D pendant 10 jours. Barre d'échelle : 500 µm. * : lignées sélectionnées pour la description de la méthode de culture la plus adaptée à la formation de sphéroïdes répétables. B] L'aire de la section, le diamètre minimum, la rondeur et le nombre de sphéroïdes par puits ont été évalués parmi les lignées cellulaires capables de former des sphéroïdes d'une taille >150 µm (A549, DU145, HT29, LnCaP, MNNG/HOS, U251).

De plus, la densité des sphéroïdes varie en fonction des lignées, et peut être faible (le sphéroïde présente un aspect clair), intermédiaire (le sphéroïde présente un cœur opaque et une bordure claire) ou élevée (le sphéroïde présente un aspect opaque). Les lignées cellulaires LnCaP et MNNG/HOS produisent des sphéroïdes ayant une densité intermédiaire, alors que les sphéroïdes issus des lignées DU145, U251, HT29 et A549 ont une densité élevée. Seuls les sphéroïdes issus des cellules Caco-2 ont une densité faible.

Tableau III.1.1. Classification des lignées cellulaires en fonction de leur capacité à former spontanément des sphéroïdes et de leurs caractéristiques morphologiques qualitatives.

Cancer	Lignée	3D	Morphologie	Taille	Densité
Prostatique	PC3	Non	N/A	N/A	N/A
	DU145	Oui	Ronde/ovoïde	Moyenne	Elevée
	LnCaP	Oui	Pseudo-organoïde	Large	Intermédiaire
Glioblastome	U251	Oui	Ronde/ovoïde	Moyenne	Elevée
Ostéosarcome	MNNG/HOS	Oui	Ronde/ovoïde	Large	Intermédiaire
Colorectal	Caco-2	Oui	Ronde/ovoïde	Petite	Faible
	HT29	Oui	Ronde/ovoïde	Large	Elevée
Pulmonaire	A549	Oui	Pseudo-organoïde	Large	Elevée

Le paramètre 3D correspond à la capacité des lignées à former des sphéroïdes spontanément par LOT en plaque 96-puits à fond plat. Le paramètre morphologie correspond à la forme des sphéroïdes générés. Le paramètre taille correspond au diamètre des sphéroïdes générés (petite : diamètre < 150 µm ; moyenne : 150 µm < diamètre < 500 µm ; large : diamètre > 500 µm). Le paramètre densité correspond à la présence d'une zone sombre (densité élevée : tout le sphéroïde est sombre ; densité intermédiaire : cœur du sphéroïde sombre, bordure claire ; densité faible : sphéroïde clair).

1.2. La forme du support de culture joue un rôle sur l'homogénéité des sphéroïdes générés

Quatre des lignées étudiées précédemment ont été sélectionnées afin d'améliorer la répétabilité des sphéroïdes générés : deux lignées de cancers rares formant des sphéroïdes de type rond/ovoïde (U251, MNNG/HOS) et deux lignées de cancers communs formant des sphéroïdes de type pseudo-organoïde (LnCaP, A549). Ces lignées ont été cultivées pendant

vingt jours par LOT en plaque 96-puits soit à fond plat, soit à fond arrondi. La qualité des sphéroïdes générés a été évaluée à partir de leurs paramètres morphologiques, c'est-à-dire l'aire de la section de la sphère, le diamètre minimum de la sphère, la rondeur de la sphère et le nombre de sphéroïdes par puits. Pour cette étude, un sphéroïde avec une morphologie acceptable doit valider les critères suivants : un diamètre minimum supérieur ou égal à 500 μm , une rondeur supérieure à 0,8 et la présence d'un unique sphéroïde par puits.

Pour toutes les lignées, le type de plaque de culture utilisé n'a pas d'impact significatif au niveau de l'aire de la section ou encore du diamètre minimum, bien que les sphéroïdes cultivés en fond arrondi tendent à être plus larges que ceux cultivés en plaque à fond plat.

Dans le cas de la lignée A549, la culture dans des puits à fond arrondi améliore significativement la rondeur des sphéroïdes générés, passant de moins de 0,7 pour la condition fond plat à près de 0,9 pour la condition fond arrondi 20 jours après l'ensemencement. De plus, la génération d'un unique sphéroïde par puits est rendue possible lorsque les cellules sont cultivées en plaque à fond arrondi. A l'inverse, la culture en plaque à fond plat entraîne la formation de plus d'un sphéroïde par puits et ce, jusqu'à dix jours après l'ensemencement (**Figure III.1.2A**).

Les sphéroïdes issus des cellules LnCaP cultivés en fond arrondi présentent eux aussi une rondeur significativement augmentée. Dans les deux conditions de culture, un unique sphéroïde est obtenu par puits dès le troisième jour après l'ensemencement (**Figure III.1.2B**).

Dans la condition fond arrondi, les sphéroïdes MNNG/HOS voient leur taille (aire de la section et diamètre minimum) augmenter au cours du temps, alors qu'elle diminue pour la condition fond plat. Les deux conditions de culture permettent la génération de sphéroïdes d'une rondeur supérieure à 0,8, bien que cette rondeur ne soit atteinte qu'à partir du dixième jour de culture pour la condition fond plat. Enfin, seule la condition fond arrondi permet de générer un unique sphéroïde par puits dès le premier jour de culture, alors qu'il faut attendre 7 jours de culture pour la condition fond plat (**Figure III.1.2C**).

Dans le cas des cellules U251, la condition fond arrondi permet dans l'ensemble de générer des sphéroïdes plus répétables, que ce soit au niveau de leur taille ou de leur rondeur. De plus, seule la condition fond arrondi assure la production d'un unique sphéroïde sur les 20 jours de culture en LOT dont le diamètre est en moyenne égal à 500 μm (**Figure 2D**).

De façon générale, la condition en fond arrondi améliore significativement la répétabilité des sphéroïdes générés.

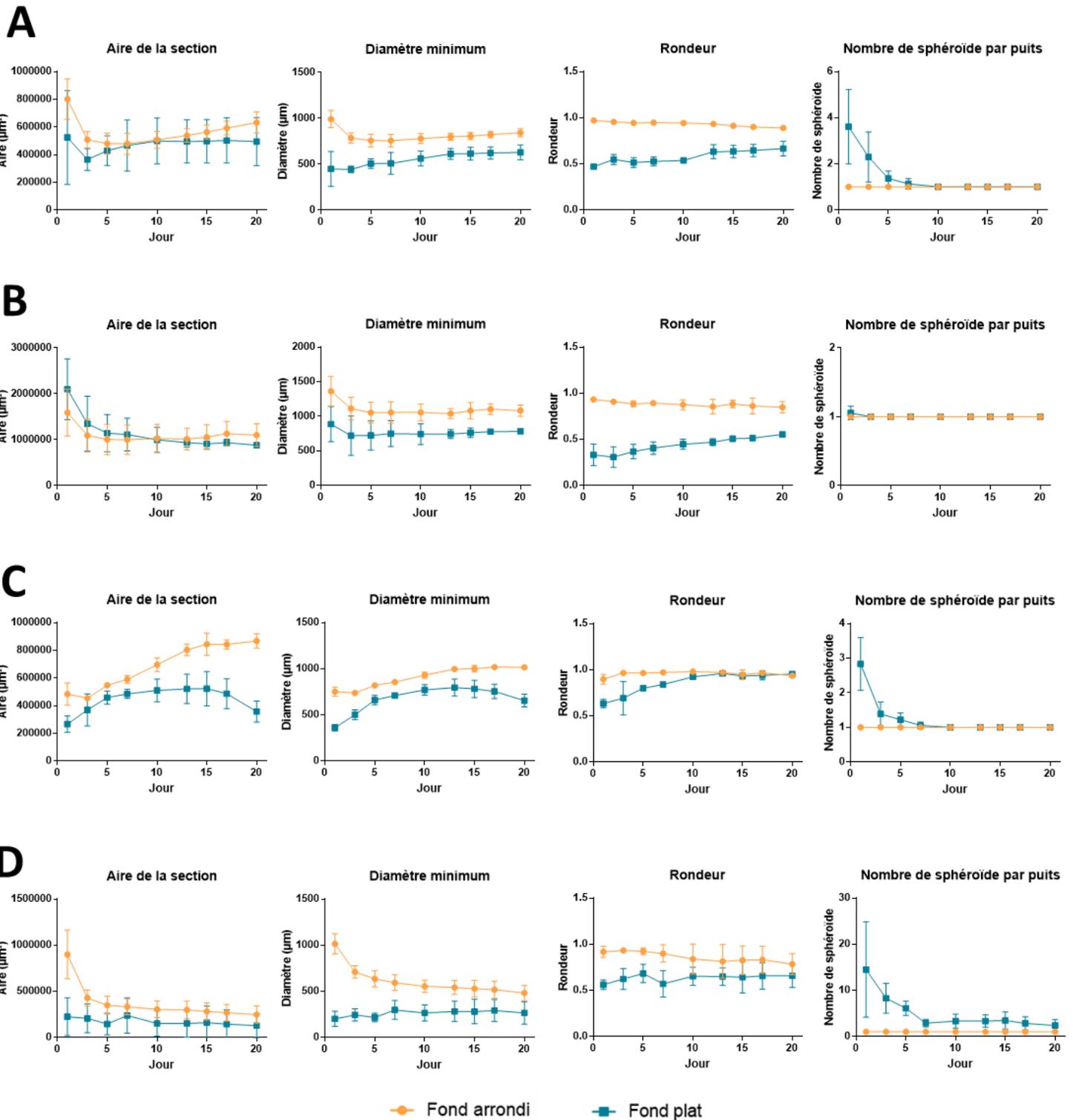


Figure III.1.2. Comparaison de l'impact du type de plaque de culture utilisé sur la répétabilité des sphéroïdes générés par LOT. Les lignées cellulaires A549 (A), LnCaP (B), MNNG/HOS (C) et U251 (D) ont été cultivées pendant 20 jours par LOT en plaque à fond plat ou à fond arrondi. L'aire de la section, le diamètre minimum, la rondeur et le nombre de sphéroïdes par puits ont été évalués par microscopie.

Lorsque cultivées en plaque 96-puits à fond plat, on observe dans la majorité des lignées étudiées une diminution du nombre de sphéroïdes par puits au cours du temps. Cette réduction peut être due à une désagrégation de certains sphéroïdes au profit de la croissance de nouveaux sphéroïdes, d'une élimination involontaire de certains sphéroïdes lors des changements de milieu ou d'une fusion de ces sphéroïdes. Afin de valider l'une de ces hypothèses, des sphéroïdes de cellules MNNG/HOS marqués au DiD ou positives au GFP ont été déposés au sein d'un même puits. Leur devenir a été étudié par microscopie sur 15 jours. A jour 0, on observe deux sphéroïdes distincts, qui commencent à fusionner à partir du cinquième jour. A jour 10, les sphéroïdes DiD⁺ et GFP⁺ ont fusionné en un unique sphéroïde rond qui se maintient à jour 15 (**Figure III.1.3A**). Lorsque leur diamètre de Férét (diamètre maximum) est mesuré, le diamètre moyen des sphères DiD⁺ et GFP⁺ est d'environ 750 μm à jour 0. Lorsque les sphéroïdes fusionnent, une augmentation du diamètre maximum est détectée. Les sphéroïdes complètement fusionnés ont un diamètre maximum qui retombe alors à des valeurs similaires à celles observées à J0 (**Figure III.1.3B**).

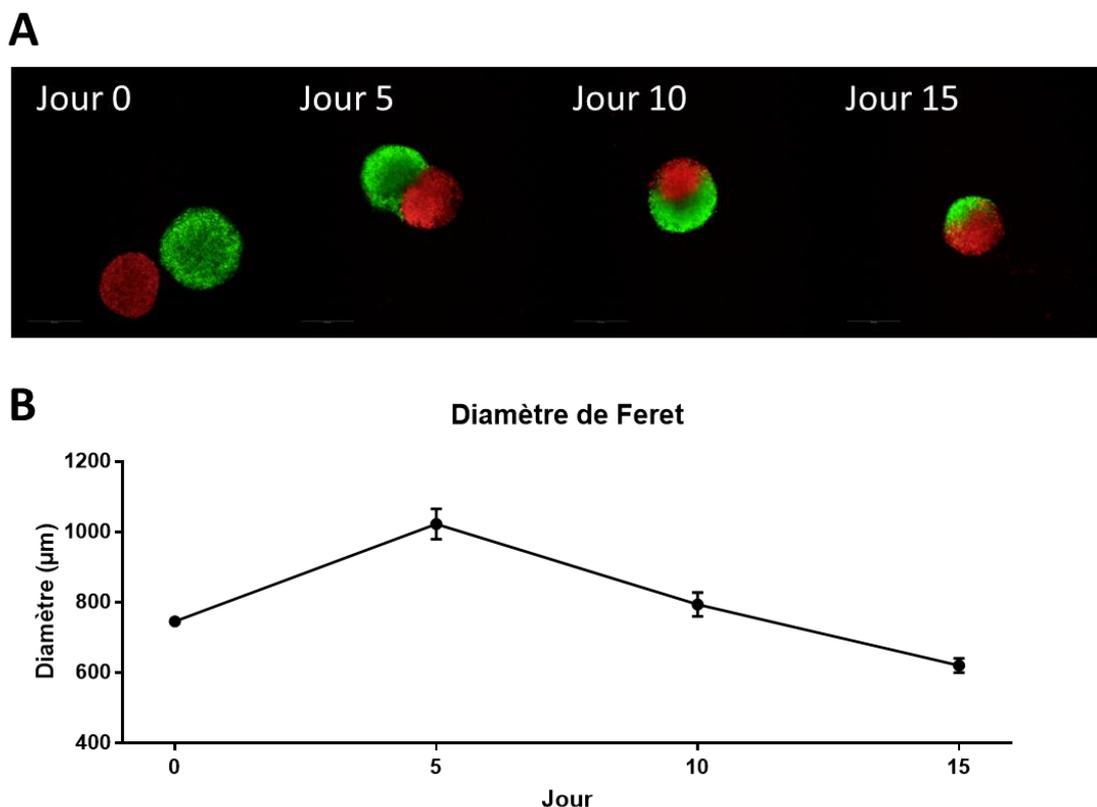


Figure III.1.3. Mécanisme de fusion des sphéroïdes au cours du temps Des sphéroïdes de cellules MNNG/HOS-GFP ou MNNG/HOS-DiD préalablement développés séparément pendant 1 jour ont été mis en co-culture par LOT. (A) Image de microscopie des sphéroïdes en co-culture permettant d'étudier leur comportement sur 15 jours de culture. (B) Mesure du diamètre de Férét (diamètre maximum) des sphéroïdes au cours du temps.

1.3. La concentration d'ensemencement n'a pas d'impact sur la répétabilité des sphéroïdes générés, mais influe sur la vitesse d'agrégation

Afin de savoir si la concentration d'ensemencement peut jouer sur la répétabilité des sphéroïdes générés, les lignées cellulaires A549, LnCaP, MNNG/HOS et U251 ont été cultivées par LOT soit en plaque 96-puits à fond arrondi, soit en plaque 384-puits à fond arrondi. Des images de microscopie représentatives pour chaque condition sont présentées dans la **Figure III.1.4E** et la **Figure Supplémentaire III.3.1**. Aucune différence significative n'a pu être mise en évidence à jour 10 après ensemencement entre ces deux types de plaque de culture, quels que soient le paramètre morphologique et la lignée cellulaire (**Figure III.1.4A-D**). Ceci signifie que le volume de culture n'a pas d'impact sur la répétabilité des sphéroïdes générés dans nos conditions expérimentales.

Des cellules MNNG/HOS-GFP ont été ensemencées à différentes concentrations dans des plaques de culture 96-puits à fond arrondi et cultivées en LOT. Un suivi par microscopie time-lapse sur quatre jours a été réalisé pour étudier la vitesse d'agrégation des cellules (**Figure III.1.5**). A partir de 36h de culture, la condition d'ensemencement la plus concentrée (20 000 cellules/puits) présente une morphologie compacte avec des bordures nettes. Les conditions 10 000 et 5 000 cellules/puits présentent également ce type de morphologie à partir de 48h de culture. Pour les concentrations d'ensemencement plus faible, il faudra attendre plus longtemps pour observer une agrégation en sphéroïde : la condition à 1 000 cellules par puits forme un sphéroïde compact 84h après ensemencement, tandis que la condition à 500 cellules par puits n'y parvient pas dans le temps imparti de l'expérience. Ces résultats montrent que la concentration d'ensemencement joue un rôle dans la vitesse d'agrégation dans le cas des cellules MNNG/HOS : une plus forte concentration initiale accélérerait la vitesse d'agrégation. A noter que pour les concentrations d'ensemencement 10 000 et 20 000 cellules/puits, la taille du sphéroïde formé stagne ou se réduit. A l'inverse, pour les concentrations plus faibles, ces sphéroïdes voient leur taille augmenter de façon constante.

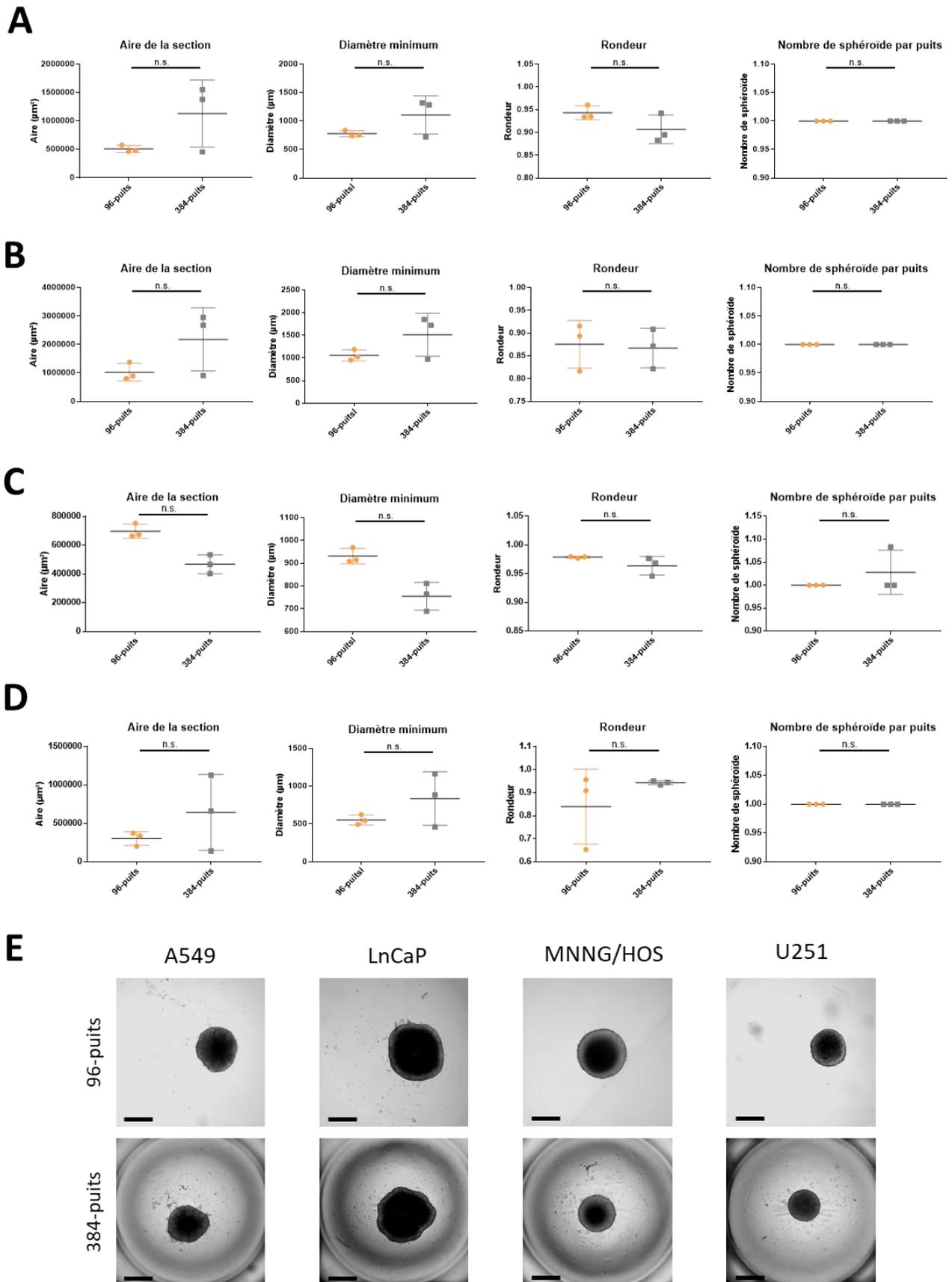


Figure III.1.4. Comparaison de l'effet du volume de culture sur la morphologie des sphéroïdes 10 jours après ensemencement. Les caractéristiques morphologiques de cellules A549 (A), LnCaP (B), MNNG/HOS (C) et U251 (D) ensemencées en plaque 96-puits ou 384-puits à fond arrondi et cultivées par LOT ont été évaluées par microscopie. (E) Images de microscopie représentatives de chaque condition. Barre d'échelle : 500 μm .

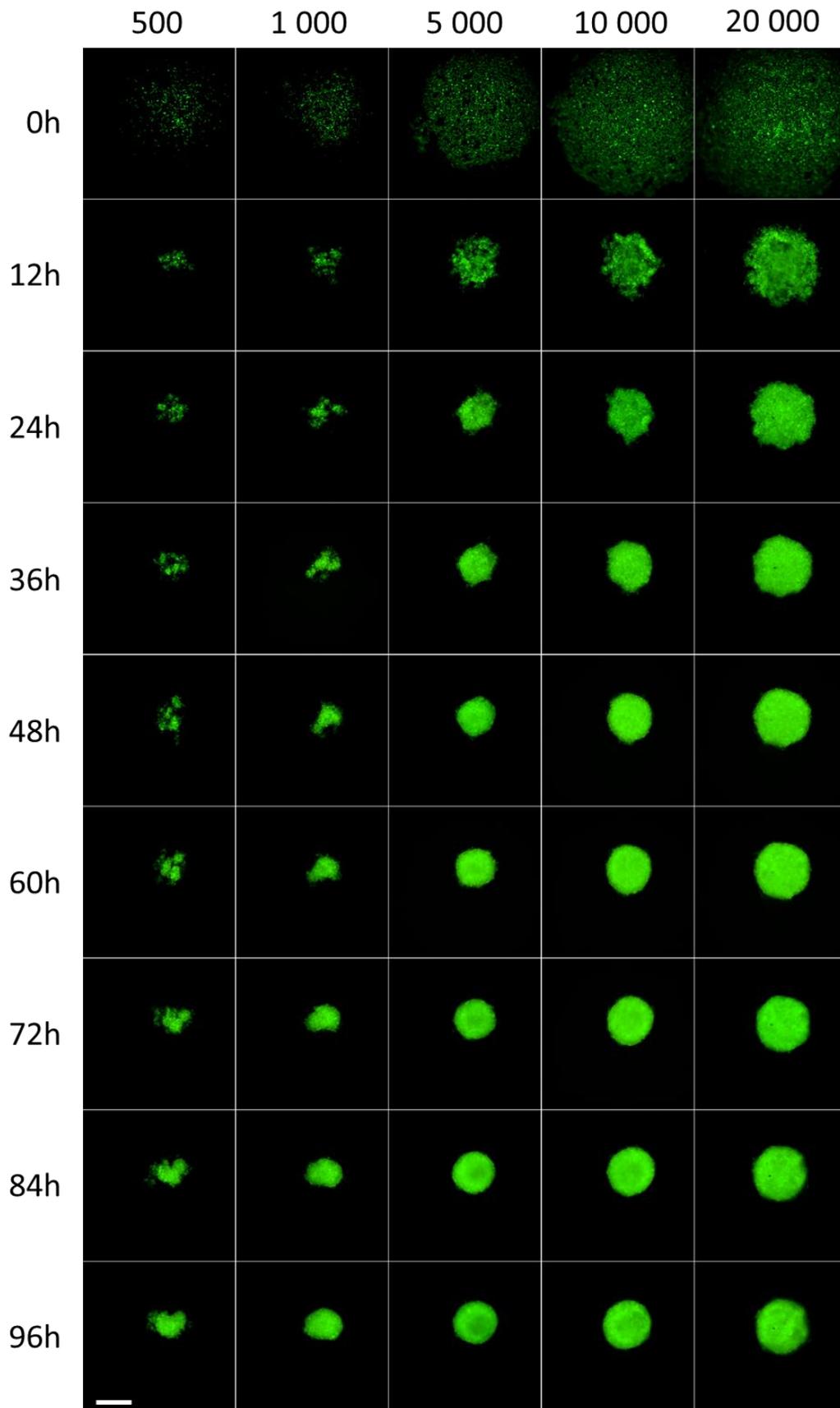


Figure III.1.5. Rôle de la concentration initiale d'ensemencement sur la vitesse d'agrégation. La rapidité avec laquelle des cellules MNNG/HOS-GFP ensemencées en plaque 96-puits à fond arrondi et cultivées par LOT s'agrègent en sphéroïde a été évaluée par microscopie time-lapse pendant 4 jours. Barre d'échelle : 500 μm .

1.4. La méthode de culture en HD n'améliore pas la répétabilité des sphéroïdes générés par rapport au LOT en plaque à fond arrondi

Dans tous les supports de culture, la technique du HD a permis de générer un sphéroïde unique par puits dont la taille et la rondeur remplissaient les critères de sélection (diamètre > 500 μm , rondeur > 0,8) et ceci, dès le premier jour en culture (**Figure Supplémentaire III.3.2**). Pour autant, aucune différence significative dans la morphologie des sphéroïdes générés n'a pu être mise en évidence entre la culture en HD et la culture en LOT en plaque 96-puits à fond arrondi pour toutes les lignées cellulaires (**Figure III.1.6**).

1.5. La culture en 3D diminue la sensibilité au traitement à la doxorubicine des cellules MNNG/HOS par rapport à la culture en 2D

La comparaison de la viabilité cellulaire entre des cellules cultivées en 2D et en 3D est fortement limitée par le fait que ces formes de culture entraînent des morphologies cellulaires très différentes. De fait, il est presque impossible de tirer des conclusions solides avec un seul type de test de viabilité. Pour ces raisons, le choix a été fait d'utiliser deux tests de viabilité complémentaires. Des cellules MNNG/HOS ont été cultivées en 2D ou en 3D par LOT en plaque 96-puits à fond plat et fond arrondi respectivement et traitées avec différentes concentrations de doxorubicine pendant 72h. La viabilité cellulaire en fonction des conditions a été évaluée par microscopie suite à un marquage au LIVE/DEAD™ et par mesure du taux de luminescence associé au relargage de LDH par les cellules mortes.

Les résultats des essais en LIVE/DEAD™ permettent d'observer un changement d'aspect des cellules en fonction de la concentration en doxorubicine à laquelle elles ont été exposées (**Figure III.1.7 et Figure III.1.8A-F**). La morphologie de ces cellules et le ratio de l'aire couverte par les cellules mortes sur l'aire couverte par les cellules vivantes ont été analysés par microscopie à fluorescence (**Figure III.1.8A-F**). Ce choix de travailler en aire plutôt qu'en nombre de cellules résulte de l'impossibilité de visualiser l'ensemble des cellules dans la condition 3D du fait de l'épaisseur des sphéroïdes à imager. À noter que pour les conditions 50 μM et 100 μM en 3D, le bruit de fond provient probablement de la doxorubicine, elle-même fluorescente dans les longueurs d'onde du colorant LIVE/DEAD™ marquant les cellules mortes. La présence de ce bruit de fond biaisant les valeurs de fluorescence pour ces

concentrations, l'analyse de l'aire couverte par les populations de cellules vivantes et mortes n'a été réalisée que jusqu'à la concentration 10 μM .

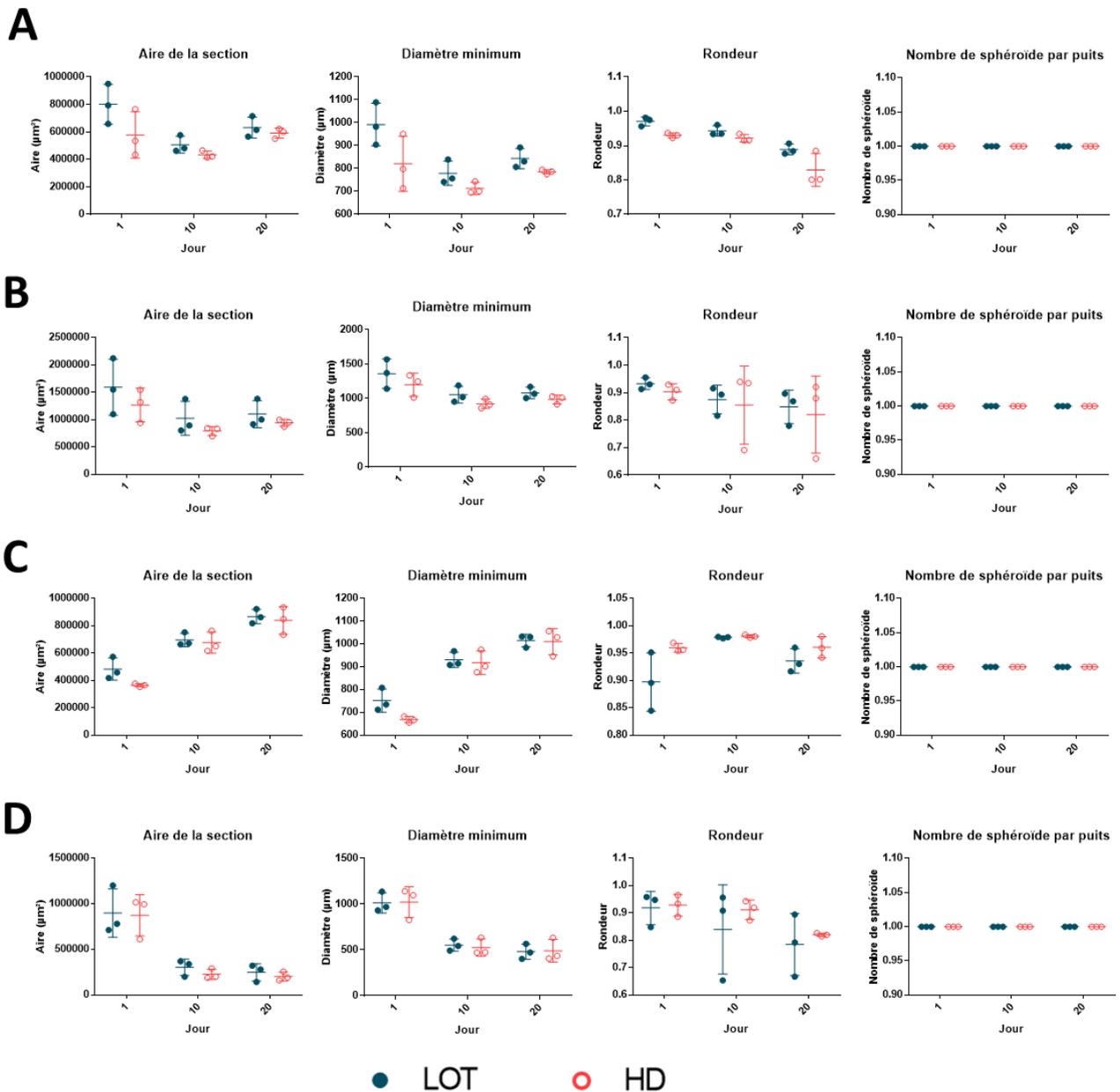
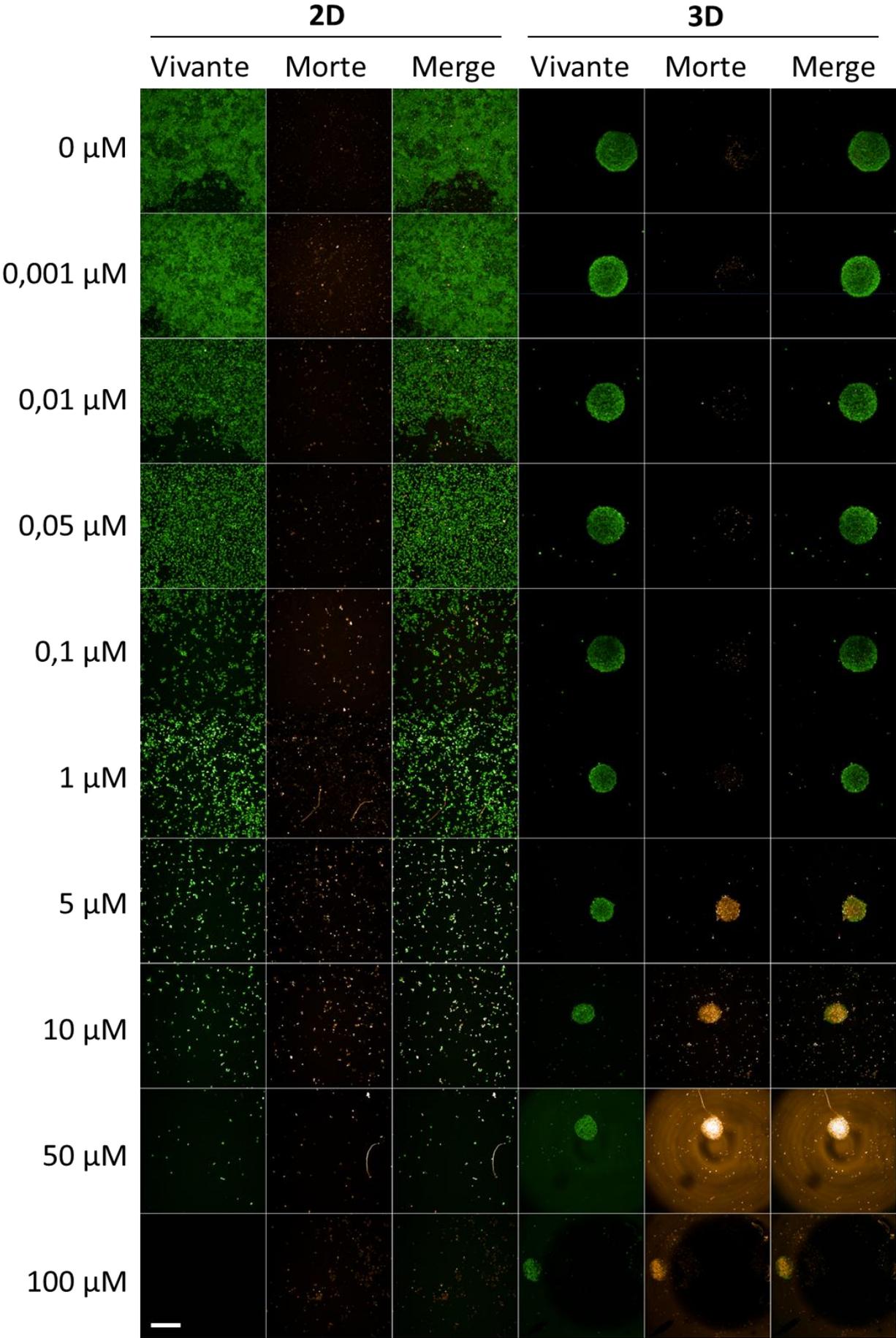


Figure III.1.6. Impact de la méthode de culture sur la répétabilité des sphéroïdes générés. Les lignées cellulaires A549 (A), LnCaP (B), MNNG/HOS (C) et U251 (D) ont été cultivées pendant 20 jours par LOT ou par HD en plaque à fond arrondi. L'aire de la section, le diamètre minimum, la rondeur et le nombre de sphéroïdes par puits ont été évalués par microscopie.

Figure III.1.7. Comparaison qualitative de la sensibilité à un traitement de chimiothérapie de cellules MNNG/HOS cultivées en 2D ou en 3D. Des cellules MNNG/HOS ont été cultivées en 2D ou en 3D par LOT en plaque 96-puits à fond arrondi et traitées avec différentes doses de doxorubicine. La cytotoxicité a été mesurée par marquage avec le colorant LIVE/DEAD™. Coloration verte : cellules vivantes. Coloration orange : cellules mortes. Barre d'échelle : 500 μm .



En 2D, on observe une augmentation de la taille des cellules à partir de la concentration 0,01 μM (**Figure III.1.7**). Une diminution significative de l'aire couverte par les cellules vivantes peut être observée pour les concentrations 5 et 10 μM , bien que cette diminution s'observe graphiquement dès la concentration 0,01 μM (**Figure III.1.8A**). L'aire couverte par les cellules mortes n'évolue pas significativement lorsque la dose de doxorubicine augmente (**Figure III.1.8C**). Au niveau du ratio de l'aire des cellules mortes/aire des cellules vivantes, on observe une augmentation à partir de la concentration 1 μM . A 100 μM , la majorité des cellules restantes sont mortes (**Figure 8E**).

En 3D, on observe également une augmentation de la taille des cellules vivantes en surface du sphéroïde à partir de la concentration à 0,01 μM . À la concentration 1 μM , les cellules en surface diminuent à nouveau de taille, en même temps que le diamètre du sphéroïde. À la concentration 10 μM , on observe une augmentation du nombre de cellules isolées (en particulier mortes) dans le milieu de culture. À la concentration 100 μM , le sphéroïde commence à se désagréger (**Figure III.1.7**). Une diminution de l'aire couverte par les cellules vivantes est observable graphiquement à partir de la concentration 0,05 μM , et devient significative à la concentration 10 μM (* $p < 0,05$) (**Figure III.1.8B**). L'aire couverte par les cellules mortes augmente à partir de la concentration 5 μM (**Figure III.1.8D**). Aucune modification du ratio *aire des cellules mortes/aire des cellules vivantes* n'est observée entre la condition contrôle et la concentration 1 μM . A partir de la concentration 5 μM , ce ratio augmente graphiquement et devient significatif à la concentration 10 μM (* $p < 0,05$) (**figure III.1.8F**).

Dans l'ensemble, les résultats du LIVE/DEAD™ indiquent que l'effet cytotoxique de la doxorubicine apparaît à une concentration 5 fois plus faible en 2D qu'en 3D, ce qui correspond à une moindre sensibilité des cellules cultivées en 3D par rapport à celles cultivées en 2D. Le manque de significativité statistique ne permet cependant pas d'affirmer cette conclusion.

Afin de confirmer la tendance observée par microscopie, un test de relargage du LDH a été réalisé sur les surnageant des cellules imagées (**Figure III.1.8G**). On peut observer une différence entre les courbes de dose-réponse : la courbe de la condition 2D suit plutôt une forme sigmoïde, tandis que celle de la condition 3D suit plutôt une forme exponentielle. De plus, pour la concentration 1 μM et 5 μM , une diminution significative du pourcentage de cytotoxicité peut être observée pour la condition 3D. Ceci se traduit par un IC_{50} 18,8 fois

augmenté pour la condition 3D par rapport à la condition 2D ($IC_{50}3D = 15,07 \pm 0,3 \mu M$; $IC_{50}2D = 0,8 \pm 0,4 \mu M$; * $p < 0,05$).

Ces résultats démontrent une diminution de la sensibilité des cellules MNNG/HOS à la doxorubicine lorsqu'elles sont cultivées en 3D plutôt qu'en 2D.

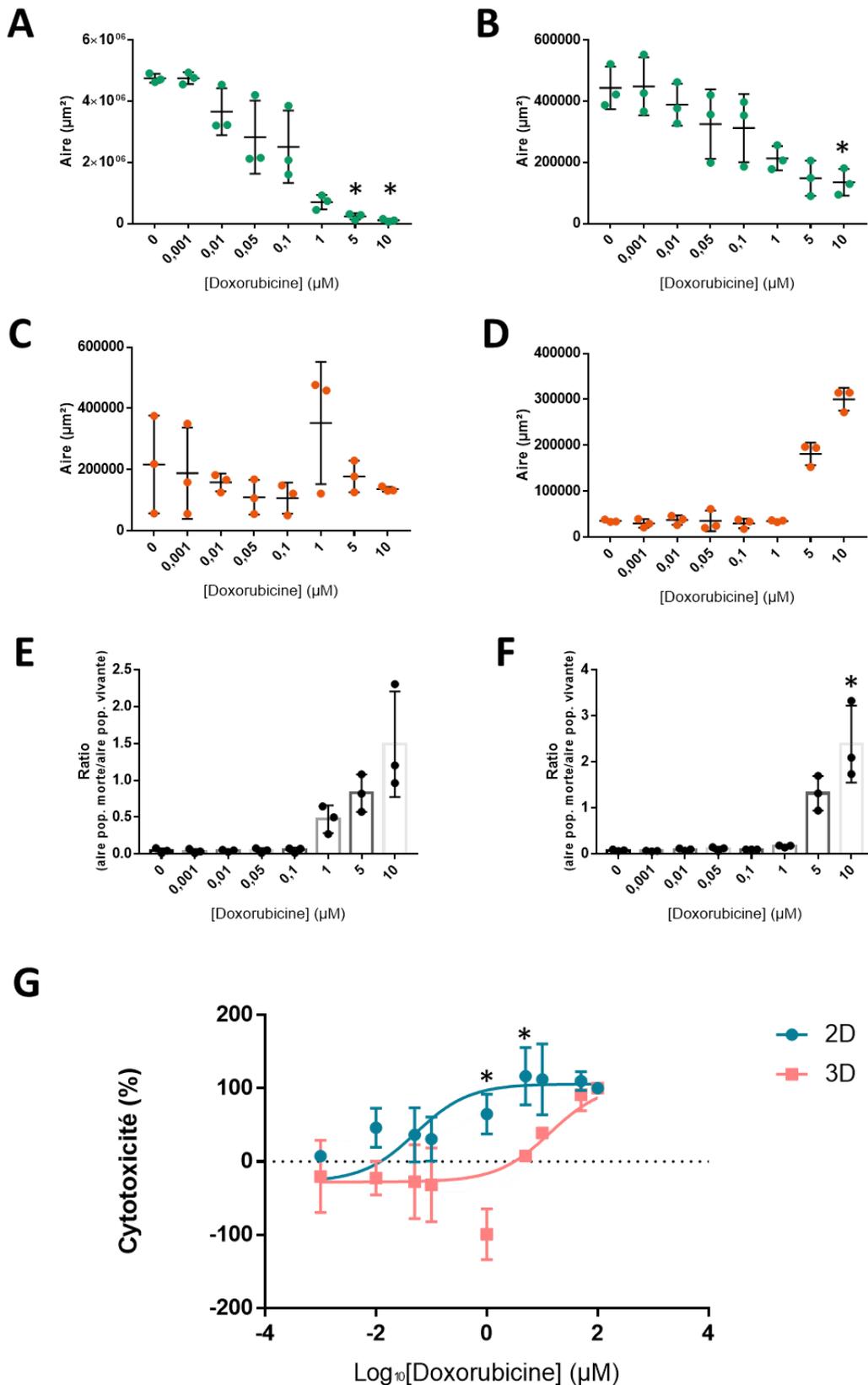


Figure III.1.8. Comparaison quantitative de la sensibilité à un traitement de chimiothérapie de cellules MNNG/HOS cultivées en 2D ou en 3D. L'aire couverte par les cellules vivantes, l'aire couverte par les cellules mortes et le ratio aire couverte par les cellules mortes/aire couverte par les cellules vivantes ont été mesurées en 2D (respectivement A, C et E) et 3D (respectivement B, D et F) par microscopie. Les courbes de doses réponses (G) ont été établies à partir des résultats de l'essai de relargage au LDH. * : $p < 0,05$.

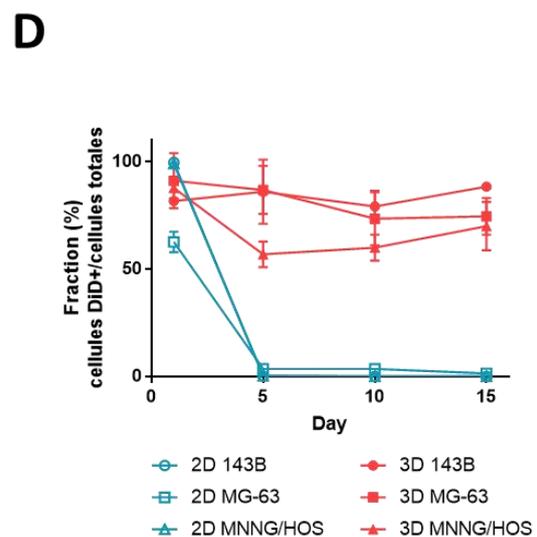
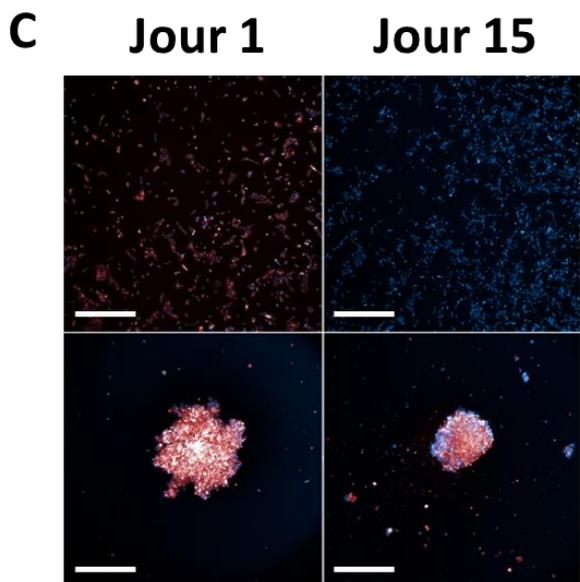
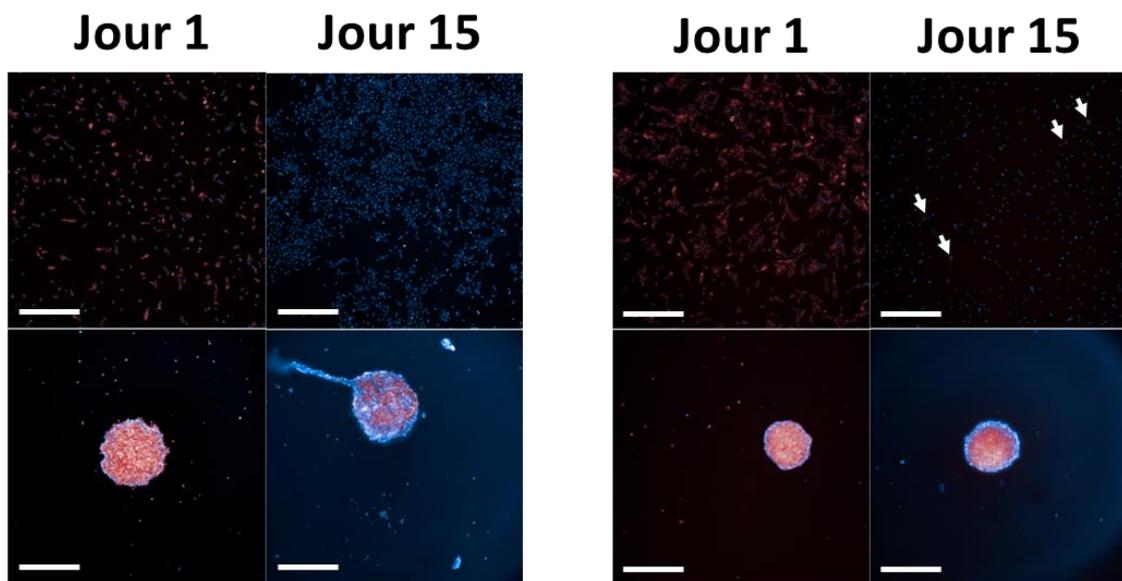
2. CULTURE EN 3D DE LIGNÉES CELLULAIRES D'OSTÉOSARCOME POUR L'ÉTUDE DE LA DORMANCE CANCÉREUSE

Le cancer est une maladie qui se caractérise par une grande hétérogénéité inter- et intra-tumorale. Le caractère dynamique et évolutif de cette hétérogénéité tumorale, amplifié sous une pression de sélection (ex. : chimiothérapie, système immunitaire, hypoxie, etc.) permet aux cellules cancéreuses de s'adapter à leur environnement et est en grande partie responsable des échecs thérapeutiques. Parmi les mécanismes empruntés par les cellules tumorales pour survivre, la dormance cancéreuse pourrait contribuer à la récurrence de la maladie et au développement de mécanismes de résistance aux traitements. La dormance cancéreuse est un phénomène au cours duquel la tumeur interrompt sa croissance parfois pendant de longues périodes, soit du fait de la mise en place d'un équilibre entre prolifération et mort cellulaire (dormance de la masse tumorale), soit parce que les cellules cancéreuses arrêtent ou ralentissent fortement leur prolifération (dormance cancéreuse cellulaire) (Gomis and Gawrzak, 2017). Durant cette période de dormance, aucune masse tumorale n'est détectable par les approches conventionnelles d'imageries médicales et les cellules en dormance peuvent progressivement échapper aux traitements de chimiothérapie et/ou radiothérapie ciblant préférentiellement les cellules en prolifération rapide.

L'ostéosarcome est le cancer primitif de l'os le plus fréquent avec une incidence de 0,4-0,5 patient par an et il affecte principalement les enfants et les jeunes adultes. Si les formes localisées de l'ostéosarcome présentent un taux de survie à 5 ans de plus de 70%, cette valeur chute à 30% pour les patients présentant des métastases (Smeland et al., 2019). Des cas de dormance cancéreuse dans le contexte des ostéosarcomes ont été décrits et leur fréquence est probablement associée aux taux de récurrences de l'ostéosarcome (30% pour les cancers localisés, 90% pour les cancers disséminés) (Odri et al., 2022). Malheureusement, l'étude de la dormance pose un défi de taille, puisqu'en clinique, on sait qu'elle a eu lieu lorsque le patient récidive. Par ailleurs, les modèles *in vitro* de recherche pré-clinique emploient généralement des lignées cellulaires sélectionnées pour leur capacité de prolifération indéfinie en monocouche adhérente, à l'opposé d'un phénotype de dormance cancéreuse.

Afin d'investiguer les facteurs responsables de cette dormance cancéreuse, l'utilisation de modèles de culture permettant son induction spontanée est donc primordial.

Dans cette étude, nous avons mis en évidence la pertinence des cultures 3D pour l'étude des mécanismes de dormances cancéreuses dans le contexte de l'ostéosarcome. Le niveau de prolifération de plusieurs lignées d'ostéosarcome a été comparé selon la méthode de culture employée (2D ou 3D), ou selon la matrice utilisée pour la génération et la croissance des sphéroïdes (sans matrice, méthylcellulose ou Geltrex™). Grâce à l'utilisation de la culture 3D, une signature transcriptomique de la dormance a pu être obtenue. L'étude plus approfondie des gènes impliqués a permis d'envisager leur rôle dans la régulation de la prolifération cellulaire et dans la résistance aux traitements.



2.1. La culture en 3D favorise un ralentissement de la prolifération cellulaire de plusieurs lignées d'ostéosarcome

Après avoir été marquées au colorant lipophile membranaire DiD, les cellules MNNG/HOS ont étéensemencées en 2D ou en 3D dans des plaques 96-puits à fond plat et arrondi respectivement. Le taux de prolifération a été évalué grâce à la décroissance du DiD par microscopie photonique à fluorescence (**Figure III.2.1A-C** et **Figure Supplémentaire III.3.4.**). Un jour après avoir étéensemencées, on constate que la majorité des cellules de chaque lignée est marquée au DiD, que ces cellules soient cultivées en 2D en 3D. Seule les cellules MG-63 cultivées en 2D présentent une fraction de cellules positives plus faible, d'environ 60% (**Figure III.2.1D**). Au cours du temps, le niveau de fluorescence au DiD et le nombre de cellules positives au DiD reste stable pour les lignées cultivées en 3D. A l'inverse, on observe une diminution drastique du nombre de cellules positives au DiD pour toutes les lignées cultivées en 2D dès 5 jours en culture. À jour 15, seules quelques cellules MG-63 sont positives au DiD en 2D (**Figure III.2.1B**), et aucune pour les cellules 143B et MNNG/HOS en 2D (**Figure III.2.1A** et **III.2.2C**).

La culture en 3D de ces lignées est donc associée à un ralentissement de la prolifération cellulaire par rapport à la culture en 2D. De fait, la culture 3D est un modèle de culture intéressant pour étudier le mécanisme de dormance tumorale.

2.2. Les lignées cellulaires d'ostéosarcome cultivées en 3D présentent des profils morphologiques différents

Six lignées d'ostéosarcome (143B, MG-63, MNNG/HOS, SAOS-2, SJSA-1 et U2OS) ont été cultivées en 3D pendant 15 jours. Les paramètres morphologiques des sphéroïdes générés ont été comparés : nombre de sphéroïdes produits par puits, aire de la section, diamètre minimum et rondeur. En fonction des lignées, on observe des profils morphologiques différents. Les sphéroïdes de 143B, MNNG/HOS et SJSA-1 ont une taille importante, puisque que leur diamètre minimum est supérieur à 500 μm durant toute la durée de culture.

◀ **Figure III.2.1. Comparaison de la dilution du DiD entre les cultures 2D et 3D.** Des cellules 143B (A), MG-63 (B) et MNNG/HOS (C) ont été marquées avec le colorant lipophile membranaire DiD avant d'êtreensemencées en 2D ou en 3D en plaque 96-puits. La décroissance du DiD au cours du temps (A-C) et le nombre de cellules positives au DiD (D) ont été évalués par microscopie.

De plus, la taille de ces sphéroïdes augmente au cours du temps et leur diamètre avoisine ainsi les 750 μm à jour 15. Les sphéroïdes de MG-63 ont une taille intermédiaire, avec un diamètre se maintenant aux alentours de 500 μm pendant les 15 jours de culture (**Figure III.2.2B** et **III.2.2C**). Enfin, ces quatre lignées permettent la génération d'un unique sphéroïde par puits dont la rondeur est élevée (**Figure III.2.2A** et **III.2.2D**).

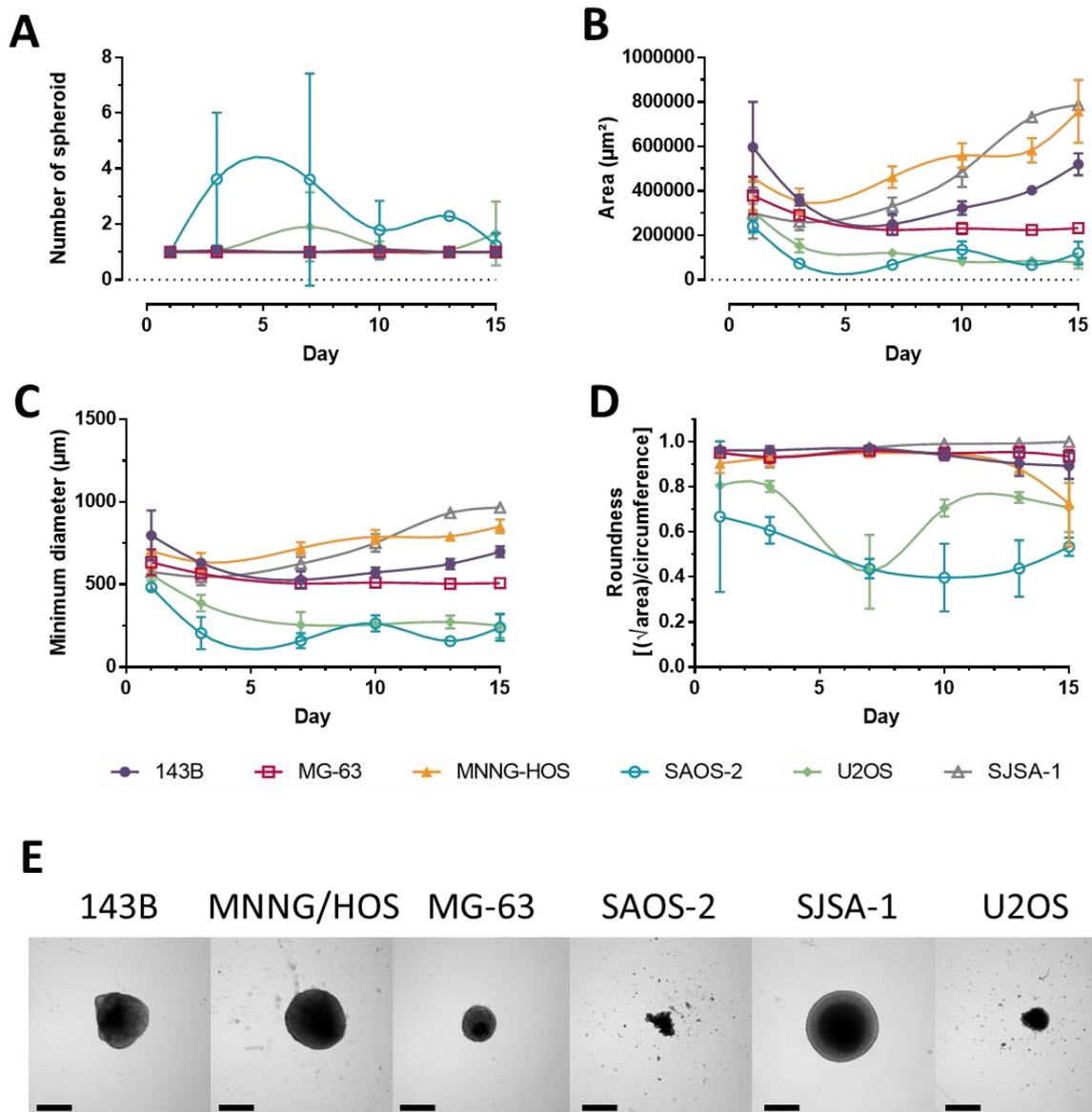


Figure III.2.2. Caractérisation morphologique de différentes lignées cellulaires d'ostéosarcomes cultivées en 3D par LOT. Les paramètres morphologiques des sphéroïdes produits tels que le nombre de sphéroïdes par puits (A), l'aire de la section (B), le diamètre minimum (C) et la rondeur (D) ont été mesurés. (D) Images de microscopie représentatives des sphéroïdes formés par les différentes lignées 15 jours après l'ensemencement. Barre d'échelle = 500 μm .

A l'inverse, les lignées SAOS-2 et U2OS ne permettent pas de générer un unique sphéroïde par puits (**Figure III.2.2A**), et forment des sphéroïdes de taille inférieure aux quatre autres lignées (**Figure III.2.2B** et **III.2.2C**). En particulier, les sphéroïdes de SAOS-2 voient leur aire de section et leur diamètre minimum fluctuer au cours du temps. De plus, les sphéroïdes de SAOS-2 et U2OS ont des valeurs de rondeur beaucoup plus faibles (**Figure III.2.2D**). Enfin, les lignées cellulaires SAOS-2 et U2OS produisent des sphéroïdes très denses, alors que les lignées cellulaires 143B, MG-63, MNNG/HOS et SJSA-1 forment des sphéroïdes d'une densité intermédiaire avec un cœur sombre et une bordure plus claire (**Figure III.2.2F** et **Figure Supplémentaire III.3.5**).

Ces résultats montrent que plusieurs lignées d'ostéosarcome sont capables de former des sphéroïdes dans les conditions de culture utilisées, mais présentent des morphologies différentes. Le comportement de ces lignées en 3D pourrait ainsi témoigner de leurs caractéristiques propres.

2.3. Le microenvironnement tumoral joue un rôle dans la dormance cancéreuse des cellules cultivées en 3D

Parmi les lignées cellulaires étudiées précédemment, deux lignées d'ostéosarcome ont été sélectionnées pour étudier plus en détail le rôle joué par la matrice extracellulaire sur la prolifération cellulaire : une lignée formant des sphéroïdes larges (MNNG/HOS) et une lignée formant des sphéroïdes de petite taille (U2OS). Les cellules ont été marquées au DiD puis cultivées pendant 15 jours soit par LOT, soit par HD enrobées dans de la méthylcellulose à 0,1% ou du Geltrex™ à 0,02%.

Lorsque le diamètre minimum des sphéroïdes de MNNG/HOS est comparé, aucune différence n'est observée entre les trois méthodes de culture 3D (**Figure III.2.3A**). A l'inverse, une augmentation du diamètre minimum est détectable dès le 7^{ème} jour de culture pour les sphéroïdes de U2OS cultivés dans du Geltrex™ par rapport à ceux cultivés par LOT ou dans de la méthylcellulose (**Figure III.2.3B**).

Concernant l'intensité de fluorescence moyenne du DiD encore exprimé par les sphéroïdes, après 15 jours de culture en 3D post-ensemencement, les sphéroïdes U2OS cultivés en Geltrex™ présentent une diminution significative de la fluorescence moyenne par rapport à ceux cultivés par LOT (**Figure III.2.3C** et **III.2.3D**). Ainsi, le Geltrex™ permet de produire des

sphéroïdes de U2OS plus large et dont les cellules prolifèrent plus que dans les autres conditions de culture 3D.

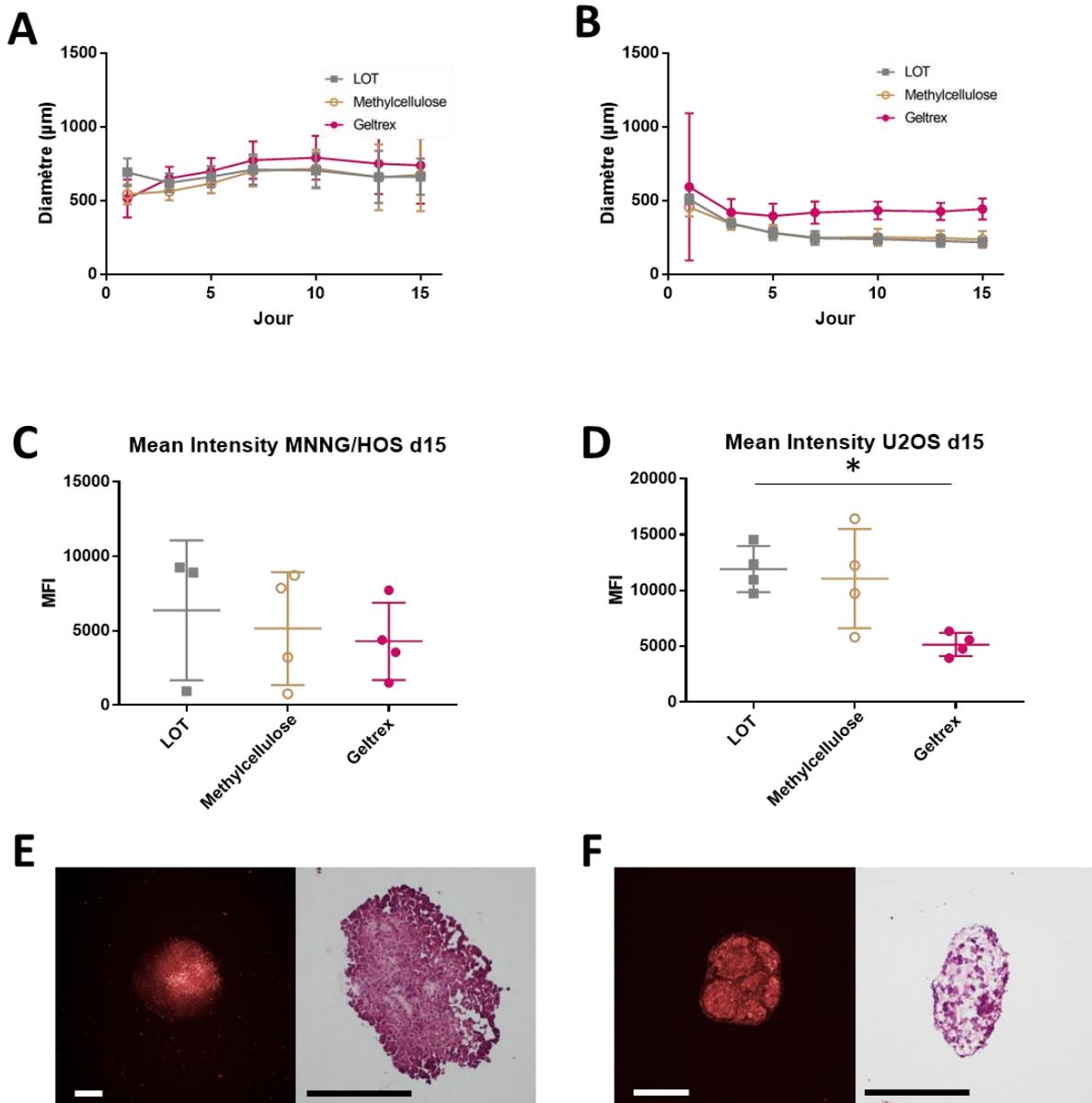


Figure III.2.3. Impact du microenvironnement sur la dormance cancéreuse. Des cellules MNNG/HOS et U2OS ont été marquées avec le colorant lipophile membranaire DiD et cultivées en 3D par LOT ou enrobées dans des matrices extracellulaires composées de Méthylcellulose ou de Geltrex™. (A-B) Mesure au cours du temps du diamètre minimum des sphéroïdes de MNNG/HOS et U2OS respectivement. (C-D) Mesure de l'intensité de fluorescence moyenne du DiD 15 jours après l'ensemencement en 3D des sphéroïdes de MNNG/HOS et U2OS respectivement. (E-F) Images de microscopie à jour 15 des sphéroïdes de MNNG/HOS et U2OS respectivement. A gauche : image de microscopie à fluorescence ; DiD en rouge. A droite, image de microscopie en lumière blanche ; coloration à l'hématoxyline et à l'éosine. Barre d'échelle : 300 µm. Test statistique : Kruskal-Wallis ; *p<0,05.

L'observation au microscope des sphéroïdes cultivés en Geltrex™ à jour 15 montre que les sphéroïdes MNNG/HOS présentent une fluorescence au DiD plus importante au centre de la sphère. De plus, une analyse cytologique des sphéroïdes après coloration HE permet de constater que les cellules sont plus nombreuses en périphérie du sphéroïde (noyau violet), tandis que le cœur est plus riche en matrice extracellulaire (coloration rose pâle) (**Figure III.2.3E**). Dans le cas des cellules U2OS, les sphéroïdes présentent une organisation alvéolaire, avec des zones sphériques séparées par des sillons moins denses en cellules. La présence de larges lacunes composées de matrice extracellulaire est également mise en évidence (**Figure III.2.3F**). Ces résultats permettent d'identifier un rôle potentiel de la matrice extracellulaire sur l'organisation spatiale et la prolifération cellulaire de certaines lignées d'ostéosarcome.

2.4. Les cellules encore positives au DiD après plus d'un mois de culture présentent une signature transcriptomique différente des cellules ayant perdues leur marquage

Parmi les lignées capables de former des sphéroïdes ronds et d'un diamètre minimum supérieur à 500 µm, les cellules MNNG/HOS ont été sélectionnées pour étudier plus précisément le mécanisme de dormance cancéreuse. Pour ce faire, les cellules ont été marquées avec le colorant lipophile DiD et mises en culture 3D. Après 35 jours de culture, les sphéroïdes ont été dissociés et les cellules triées par cytométrie en flux sur la base de leur niveau de positivité au DiD. Deux populations de cellules ont ainsi été obtenues : des cellules fortement marquées et des cellules négatives au DiD. Environ 15% des cellules étaient alors encore fortement positives au DiD (**Figure Supplémentaire III.3.6**). Une analyse transcriptomique par approche Nanostring™ a permis de comparer l'expression de plus de 700 gènes connus pour être impliqués dans les cancers entre les cellules ayant proliférées (DiD⁻) et celles en potentielle dormance (DiD⁺). Une expression différentielle de 18 gènes significativement sous-exprimés dans les cellules DiD⁺ a été obtenue (**Figure III.2.4A**). L'analyse STRING (Szklarczyk et al., 2022) de ces 18 gènes a mis en évidence qu'une majorité interagissait entre eux au niveau protéique que ce soit physiquement ou fonctionnellement, hormis NF2 et ETV4 (**Figure III.2.4B**). Enfin, les voies de signalisation associées à l'expression de ces gènes ont été évaluées (**Figure III.2.4C**). On constate que la moitié des gènes (CCNA2,

CCNB1, PTTG2, MCM4, PCNA, SKP2, PRKDC, SMC3, RAD21) sont impliqués dans les voies du cycle cellulaire et de l'apoptose.

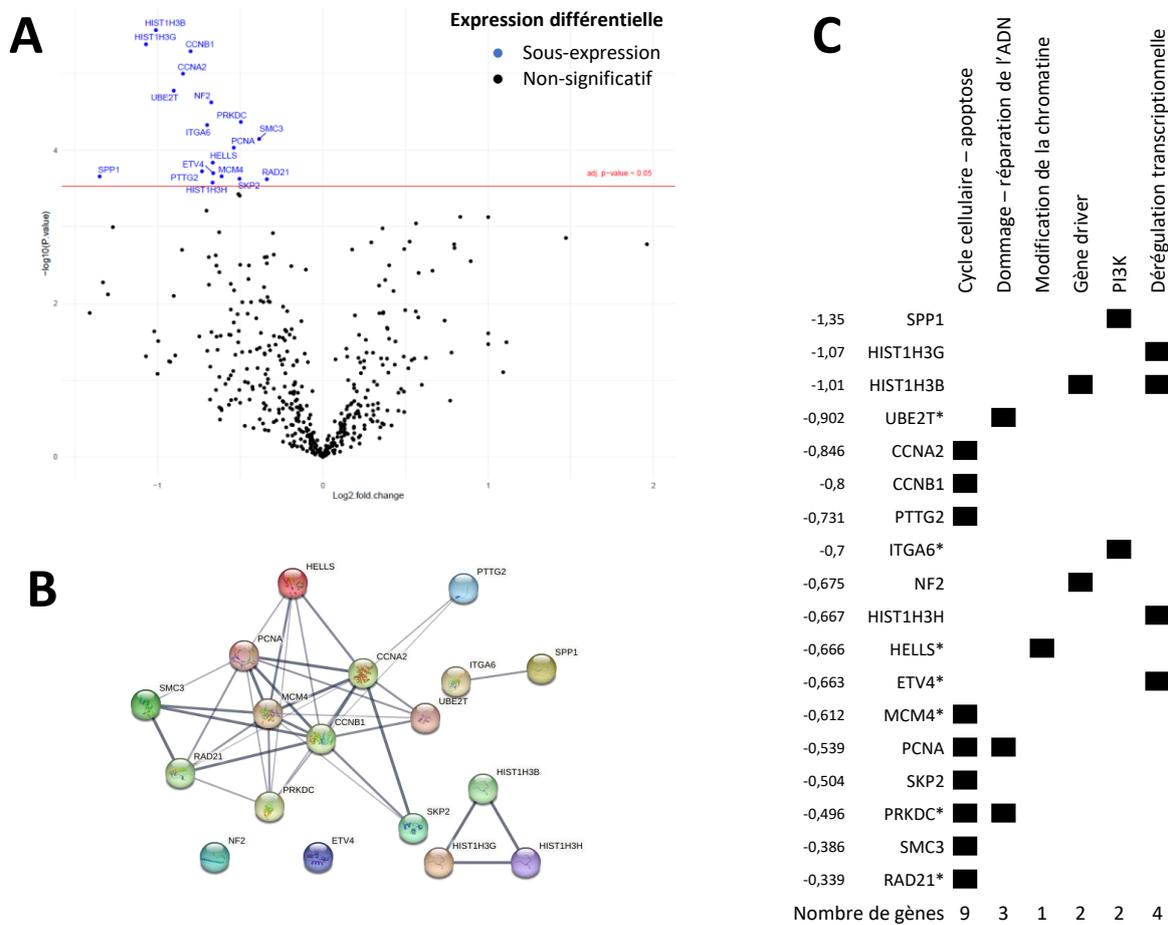


Figure III.2.4. Détection d'une signature transcriptomique de la dormance cancéreuse. Des cellules MNNG/HOS marquées au DiD et cultivées en 3D pendant 35 jours ont été triées par cytométrie en flux. (A) Signature transcriptomique comparant les cellules DiD- et DiD+ obtenue par Nanostring. (B) Interactions protéiques des gènes exprimés différemment de façon significative évaluées par STRING. (C) Voies de signalisations associées aux gènes différemment exprimés. Test statistique : T-test avec correction de Benjamini-Yekutieli ; $p < 0,05$. * correspond aux gènes étudiés plus en détail par la suite.

D'autres voies de signalisation sont également représentées telles que la voie du domage et de la réparation de l'ADN (UBE2T, PCNA, PRKDC), la modification de la chromatine (HELLS), des gènes « driver » du cancer (HIST1H3B, NF2), la voie PI3K (SPP1, ITGA6) et les mécanismes de dérégulation transcriptionnelle (HIST1H3G, HIST1H3B, HIST1H3H, ETV4).

2.5. Le traitement des cellules avec des siRNA entraîne une modification de la prolifération cellulaire

Afin d'étudier l'implication de ces gènes dans la dormance cancéreuse, 7 d'entre eux ont été sélectionnés sur la base de leur originalité bibliographique dans l'ostéosarcome, pour être réprimés par siRNA dans des cellules MNNG/HOS cultivées en 2D : les gènes ETV4, HELLS, ITGA6, MCM4, PRKDC, RAD21 et UBE2T. Une condition supplémentaire, appelée Pool, a été réalisée et correspond au mélange équimolaire de 5 de ces siRNA (dirigés contre les transcrits HELLS, MCM4, PRKDC, RAD21 et UBE2T). Cette condition a été ajoutée car les 5 protéines issues de leur transcrite respectif interagissent ensemble (**Figure Supplémentaire III.3.7**).

La prolifération cellulaire a été mesurée par approche xCELLgence et comparées à plusieurs conditions contrôles : non-traité, traité uniquement avec l'agent de transfection (TR), traité avec le siRNA eGFP (siEGFP) dont le transcrite n'est pas exprimé par les cellules, traité avec le siRNA KIFF11 (siKIFF11) connus pour arrêter la prolifération et aboutir à la mort cellulaire sur le long terme. Les résultats obtenus sont donnés en Cell Index (CI) normalisé en fonction du temps. Plus le CI augmente, plus la surface du puits est recouverte de cellule. La courbe de CI comprend plusieurs étapes : i) une première phase d'adhérence suivie d'une période de croissance exponentielle se traduisant par une pente positive linéaire ; ii) un pic du CI correspondant à un ralentissement puis un arrêt de la prolifération lorsque les cellules tapissent entièrement le puits et n'ont plus de place pour se multiplier ; iii) une phase décroissante correspondant à la mort cellulaire.

De façon générale, il semble y avoir un effet de l'exposition à l'agent de transfection sur la prolifération cellulaire puisque pour les conditions contrôle TR et eGFP on observe une diminution de la hauteur du pic du CI normalisé par rapport à la condition non-traitée. Pour autant, l'étude des profils de courbe des différentes conditions de traitement permet de faire plusieurs constats (**Figure III.3.5A**). Tout d'abord, pour les traitements avec les siRNA ETV4 (siETV4), HELLS (siHELLS), ITGA6 (siITGA6), MCM4 (siMCM4), PRKDC (siPRKDC) et UBE2T (siUBE2T), on observe un décalage des pics du CI par rapport à la condition contrôle siEGFP. De plus, les cellules traitées avec siHELLS, siITGA6 et siUBE2T présentent des phases de croissance exponentielle identiques à la condition contrôle siEGFP, mais leur pic du CI est plus élevé. Les cellules traitées avec siETV4, siMCM4 et siPRKDC présentent quant à elles des phases de croissance exponentielles plus lentes que la condition contrôle siEGFP.

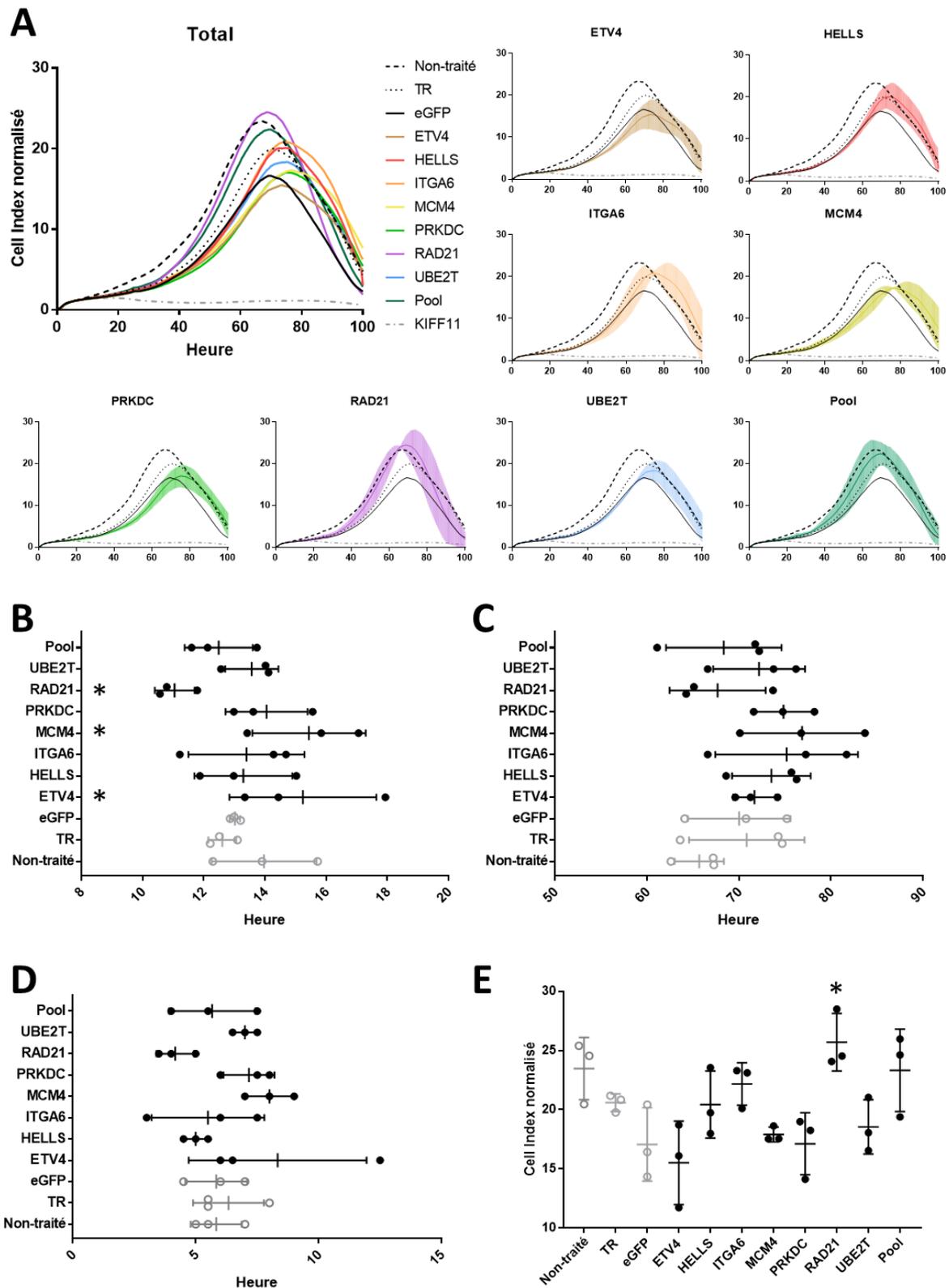


Figure III.2.5. Evaluation de la prolifération cellulaire en fonction des traitements de siRNA. Les cellules MNNG/HOS ont été traitées ou non avec un siRNA visant un gène de la signature transcriptomique ou avec une combinaison de plusieurs siRNA (Pool). (A) Mesure du Cell Index (CI) normalisé des cellules cultivées en 2D pendant 100 heures par xCELLigence. En haut à gauche, chaque condition expérimentale est représentée sans les écarts-types pour plus de clarté. Les écarts types sont observables pour chaque condition de traitement dans les graphiques adjacents. (B) Temps de doublement des cellules par mesure du CI. (C) Heure à laquelle le pic de CI a été mesuré. (D) Durée du plateau autour du pic de CI ($\pm 0,5$). (E) Valeur du CI au pic. Test statistique : Mann-Whitney one-sided, comparaison avec la condition eGFP ; * $p < 0,05$.

De plus, alors que les conditions traitées avec siMCM4 ou siPRKDC présentent des pics du CI similaire à la condition contrôle siEGFP, la condition traitée avec siETV4 présente un pic légèrement réduit. Enfin, les conditions traitées avec siRAD21 et Pool présentent des courbes du CI similaires à la condition non traitée, avec des pics du CI plus élevés et décalés vers la gauche par rapport à la condition contrôle siEGFP (**Figure III.2.5A**).

Lorsqu'on compare plus précisément le temps de doublement (**Figure III.2.5B**), on constate que le traitement avec siETV4 et siMCM4 augmente significativement le temps que met le CI à doubler, tandis que le traitement avec siRAD21 le diminue significativement (* $p < 0,05$). De plus, la valeur du CI au pic de la courbe est significativement plus élevée pour la condition traitée au siRAD21 par rapport à la condition contrôle traitée au siEGFP (* $p < 0,05$; **Figure III.2.5E**). Au niveau de la durée du plateau et de l'heure du pic du CI, aucune différence significative en fonction du traitement n'a pu être mise en évidence (**Figure III.2.5C** et **III.2.5D**).

Pris ensemble, ces résultats indiquent que, lorsque les gènes ETV4 et MCM4 sont sous-exprimés, le temps de doublement augmente. À l'inverse, la sous-expression du gène RAD21 diminue ce temps de doublement. De plus, des différences dans la hauteur du CI ont pu être observées lorsque RAD21 était sous-exprimé, ainsi qu'un décalage dans le temps du pic du CI pour la majorité des cellules traitées avec les siRNA.

2.6. La sous-expression des gènes de la signature pourrait avoir un effet sur la morphologie et la viabilité des cellules cancéreuse

L'instrument xCELLigence permet d'extrapoler la prolifération cellulaire en fonction du CI. Cependant, puisque ce CI correspond à une mesure d'impédance, une augmentation de cette valeur de CI peut non seulement indiquer une augmentation du nombre de cellules adhérant à la surface des puits de culture, mais également une augmentation de la taille ou de la force d'adhérence des cellules. Afin de vérifier la cause des variations observées précédemment au niveau des courbes du CI, plusieurs tests complémentaires ont été réalisés.

Tout d'abord, pour chaque expérience de xCELLigence, le coefficient d'extinction des gènes a été mesuré par RT-qPCR (**Figure III.2.6A**). Un siRNA efficace induit un coefficient d'extinction du gène associé de plus de 70%. Ce taux d'extinction est atteint 24h après le traitement pour la plupart des siRNA utilisés à une concentration de 10 nM hormis PRKDC.

Dans le cas de ce dernier, seul l'un des réplicas d'expérience ne semble pas avoir été éteint correctement par le siRNA, alors que l'extinction était de plus de 80% pour les deux autres réplicas (données non montrées). Pour le traitement avec le mélange de 5 siRNA (HELLS, MCM4, PRKDC, RAD21 et UBE2T) appelé Pool, chaque siRNA a été utilisé à une concentration de 2 nM pour obtenir une solution finale concentrée à 10 nM de siRNA total. Le traitement avec les siRNA de la condition Pool a permis d'atteindre un coefficient d'extinction supérieur à 70% pour tous les gènes visés, en dehors de HELLS. De nouveau, le siRNA ne semble pas avoir fonctionné dans un seul des réplicas d'expérience (données non montrées). Ces résultats démontrent l'efficacité des siRNA sur l'extinction de l'expression des gènes.

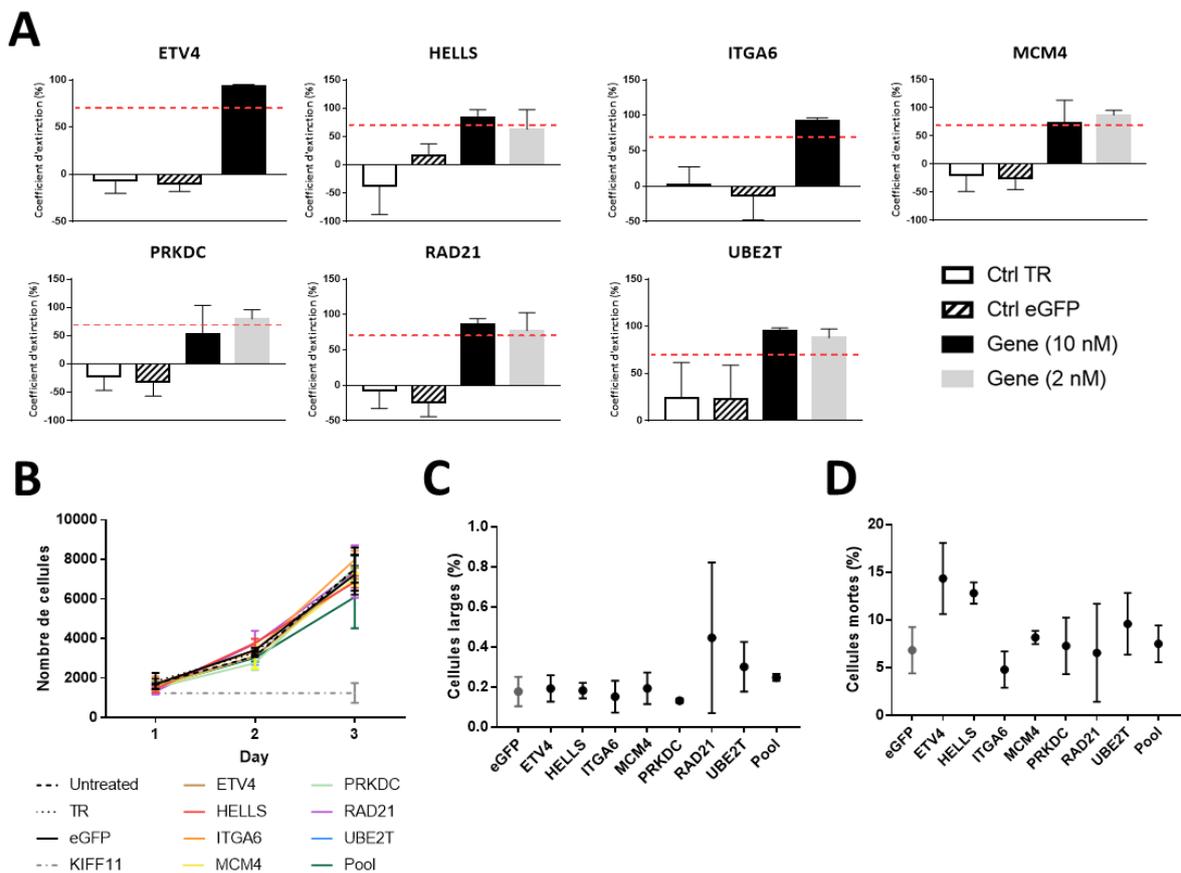


Figure III.2.6. Impact de la sous-expression des gènes sur la prolifération, la morphologie et la viabilité cellulaire. (A) Validation de la sous-expression des différents gènes. Gène (10 nM) correspond aux siRNA utilisés seuls. Gène (2 nM) correspond aux siRNA utilisés en combinaison avec d'autres siRNA (n=3). (B) Dénombrement des noyaux marqués au DAPI en fonction du temps pour toutes les conditions de traitement au siRNA (n=1). (C) Pourcentage de cellules larges (diamètre maximum > 100 µm) 72h après le traitement avec les siRNA (n=1). (D) Pourcentage de cellules mortes (coloration au LIVE/DEAD™) 72h après le traitement avec les siRNA (n=1).

Dans un second temps, le rôle des siRNA précédemment décrits comme impliqués dans des changements du CI a été évalué. Ces expériences ayant été réalisées une seule fois, aucun test statistique n'a pu être réalisé. Des cellules MNNG/HOS ont été marquées au DiD avant d'être ensemencées en 2D et traitées avec les différents siRNA ou contrôles. A 24h, 48h et 72h après traitement, ces mêmes cellules ont été marquées avec du Hoechst et les noyaux cellulaires ont été comptés par microscopie. Pour toutes les conditions de culture, on observe une augmentation du nombre de cellules au cours du temps. Cependant, il ne semble y avoir aucune différence du nombre de cellule en fonction des conditions de traitement (**Figure III.2.6B**).

Si les variations observées au niveau des courbes du CI ne sont pas dues à un nombre différent de cellules adhérentes, celles-ci peuvent découler d'un changement de morphologie des cellules. 72h après avoir été traitées, la taille des cellules MNNG/HOS a été mesurée grâce à l'aire de leur section. Aucune différence quant à la morphologie des cellules traitées avec siETV4 ne peut être observée, mais le traitement avec siPRKDC diminue la taille des cellules, alors que le traitement avec siRAD21 l'augmente (**Figure III.2.6C**). Ainsi, les différences de hauteur de courbes observées par xCELLigence pour les siPRKDC et siRAD21 pourraient s'expliquer par une variation de la taille des cellules adhérentes.

Enfin, par marquage au LIVE/DEAD™, la viabilité des cellules a été mesurée 72h après traitement avec les siRNA ou les contrôles. Lorsqu'on regarde le pourcentage de cellules mortes (nombre de cellules mortes/nombre de cellules totales), le traitement avec siETV4 ou siHELLS augmente ce pourcentage par rapport à toutes les autres conditions (**Figure III.2.6D**). Dans le cas de la condition ETV4, la diminution du temps de doublement (**Figure III.2.6B**) pourrait donc résulter d'une augmentation de la mortalité cellulaire.

En résumé, après avoir mis en évidence que le traitement avec les différents siRNA avait fonctionné, on constate que les variations des courbes du CI obtenues par xCELLigence ne sont en réalité par forcément lié à une modification de la prolifération cellulaire, mais plutôt à des changements dans la morphologie ou la viabilité des cellules traitées.

2.7. Impact de la sous-expression des gènes de la signature transcriptomique sur la sensibilité aux traitements

L'effet de la sous-expression des gènes d'intérêts sur la sensibilité des cellules à la doxorubicine a été étudié. Pour ce faire, des cellules MNNG/HOS ont été cultivées en 2D et traitées avec les différents siRNA et contrôles. 24h après l'ensemencement, les cellules ont été exposées à 0,8 μ M de doxorubicine pendant 48 heures. Puis, les cellules ont été marquées à l'Hoechst et au LIVE/DEAD™ afin d'étudier au microscope la viabilité cellulaire en fonction des gènes sous-exprimés. Cette expérience ayant été réalisée une seule fois, aucun test statistique n'a pu être réalisé.

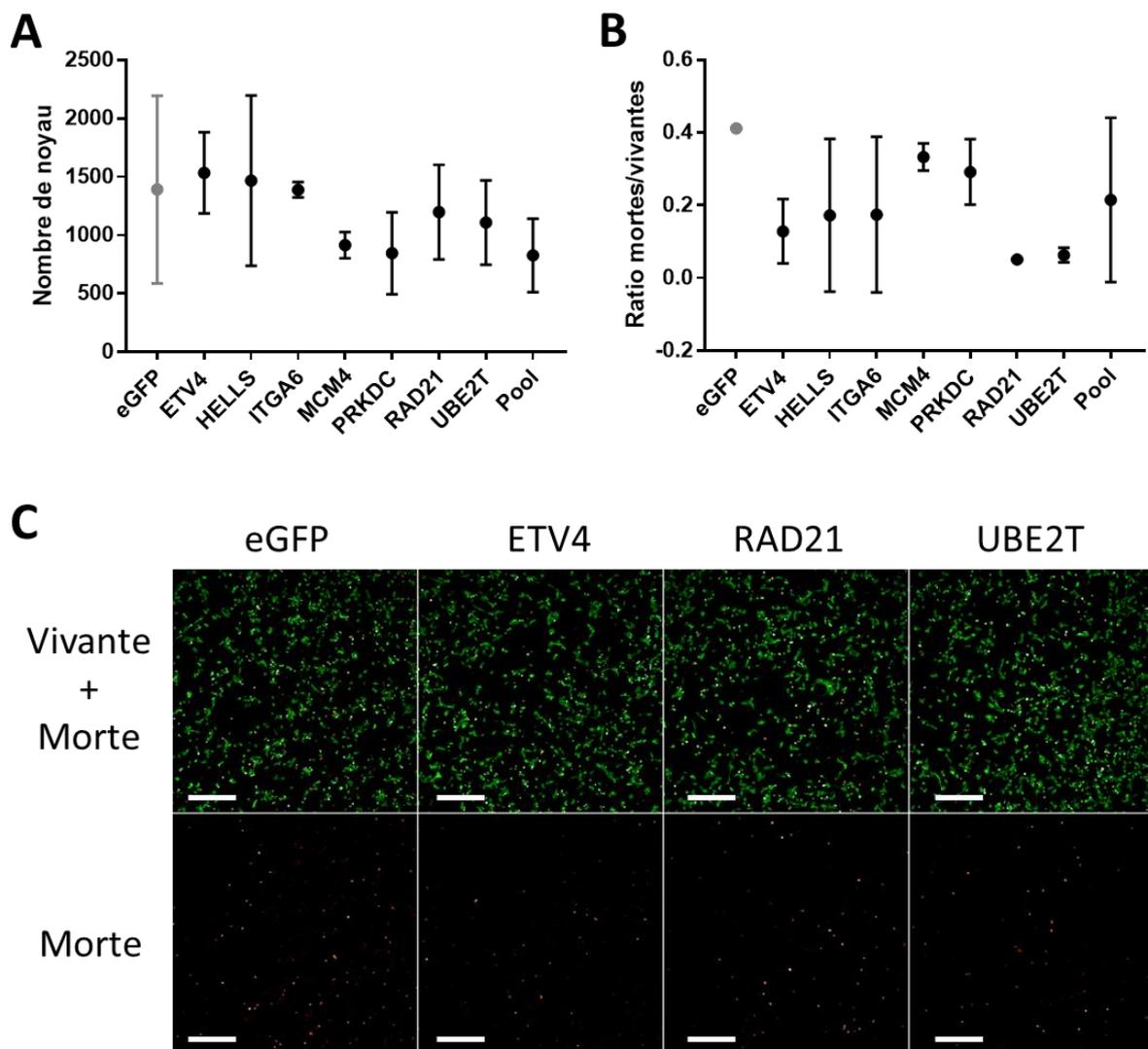


Figure III.2.7. Sensibilité des cellules à un traitement à la doxorubicine en fonction des gènes sous-exprimés. (A) Comparaison du nombre de noyaux comptés par microscopie. (B) Comparaison du ratio cellule mortes/cellules vivantes. (C) Images de microscopie des cellules marquées au Live/Dead™ et traitées avec les siRNA eGFP, ETV4, RAD21 ou UBE2T. Vert : cellules vivantes. Orange : cellules mortes. Barre d'échelle : 500 μ m.

Dans un premier temps, le nombre de noyaux – et donc par extension le nombre de cellules – a été mesuré. On n'observe aucune différence entre les conditions de culture et le contrôle siEGFP quant à la quantité de cellules (**Figure III.2.7A**).

Dans un second temps, le ratio du nombre de cellules mortes/nombre de cellules vivantes a été calculé. Dans le cas des cellules traitées avec les siRNA ETV4, RAD21 et UBE2T, on observe une diminution de ce ratio par rapport à la condition contrôle eGFP (**Figure III.2.7B**), ce qui sous-entend que la sous-expression de ces gènes pourrait réduire la sensibilité des cellules à la doxorubicine. Des images de microscopie représentatives des conditions concernées sont présentées dans la **Figure III.2.7C**.

Ainsi, même si aucun effet sur la prolifération cellulaire n'a pu être mis en évidence, certains des gènes qui ont été décrits comme sous-exprimés dans les cellules n'ayant pas ou peu proliférées pourraient jouer un rôle sur la sensibilité aux traitements de chimiothérapie.

3. FIGURES SUPPLEMENTAIRES

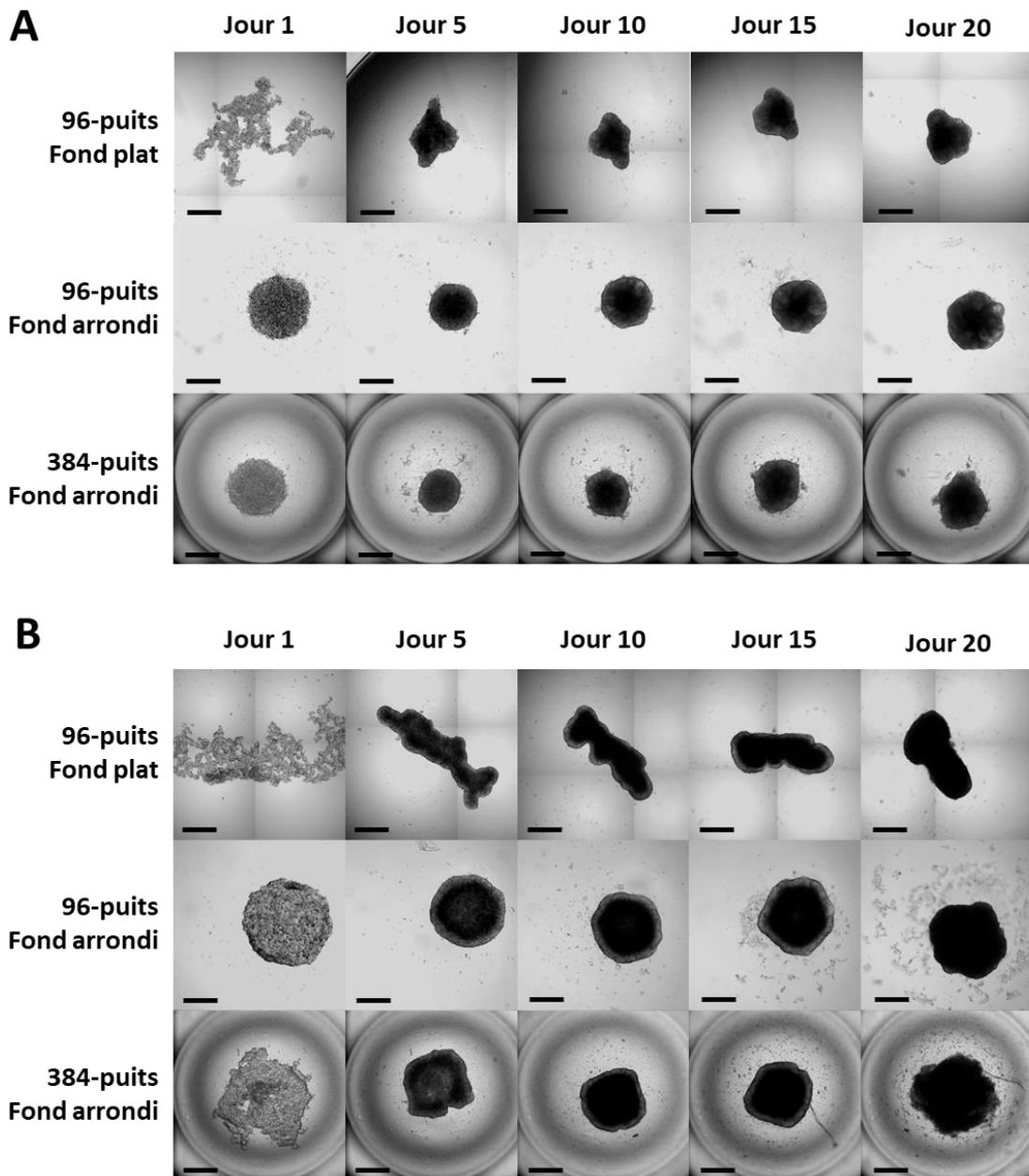


Figure Supplémentaire III.3.1. Evolution morphologique des sphéroïdes cultivés par LOT. Images de microscopie des sphéroïdes d'A549 (A), LnCaP (B), MNNG/HOS (C) et U251 (D) cultivés par LOT pendant 20 jours dans des plaques 96-puits à fond plat ou arrondi ou des plaques 384-puits à fond arrondi. Pour la condition 96-puits à fond plat, quatre images par puits ont été acquises. Afin d'homogénéiser les tailles des images, les images de cette condition ont été coupées. L'échelle est restée inchangée. Barre d'échelle : 500 μ m.

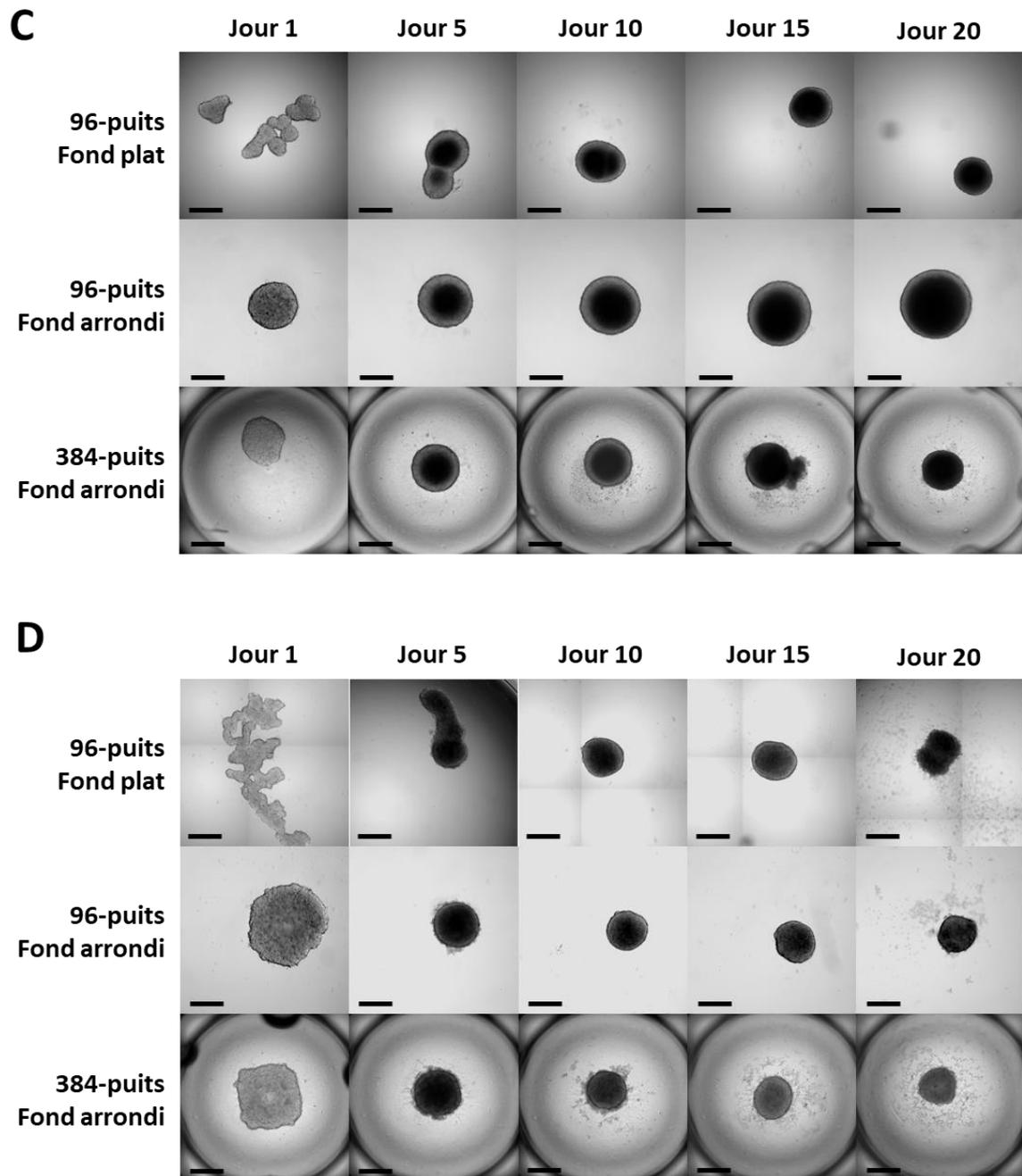


Figure Supplémentaire III.3.1. Evolution morphologique des sphéroïdes cultivés par LOT (suite). Images de microscopie des sphéroïdes d'A549 (A), LnCaP (B), MNNG/HOS (C) et U251 (D) cultivés par LOT pendant 20 jours dans des plaques 96-puits à fond plat ou arrondi ou des plaques 384-puits à fond arrondi. Pour la condition 96-puits à fond plat, quatre images par puits ont été acquises. Afin d'homogénéiser les tailles des images, les images de cette condition ont été coupées. L'échelle est restée inchangée. Barre d'échelle : 500 μm .

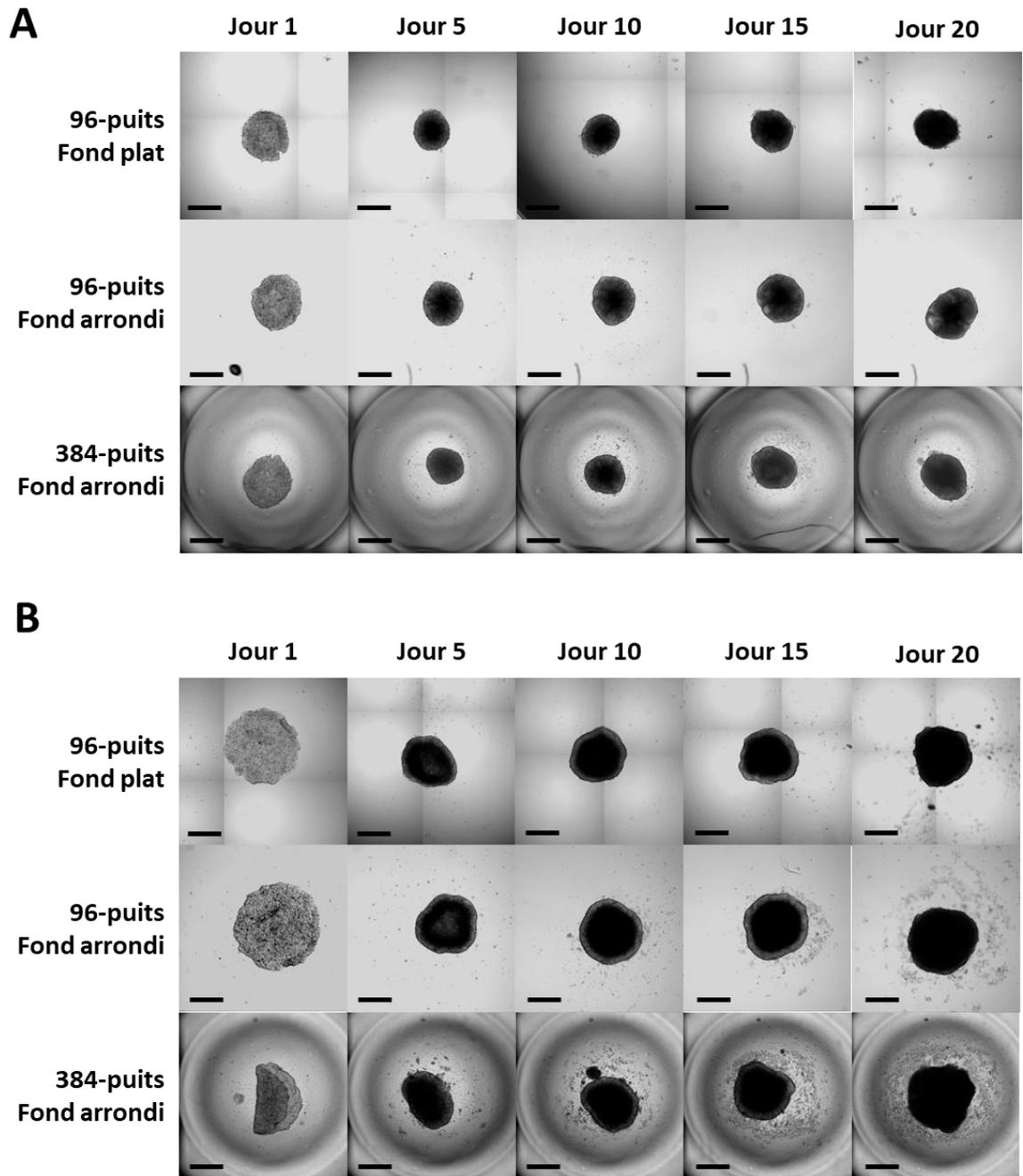


Figure Supplémentaire III.3.2. Evolution morphologique des sphéroïdes cultivés par HD. Images de microscopie des sphéroïdes d'A549 (A), LnCaP (B), MNNG/HOS (C) et U251 (D) cultivés par HD pendant 20 jours dans des plaques 96-puits à fond plat ou arrondi ou des plaques 384-puits à fond arrondi. Pour la condition 96-puits à fond plat, quatre images par puits ont été acquises. Afin d'homogénéiser les tailles des images, les images de cette condition ont été coupées. L'échelle est restée inchangée. Barre d'échelle : 500 μ m.

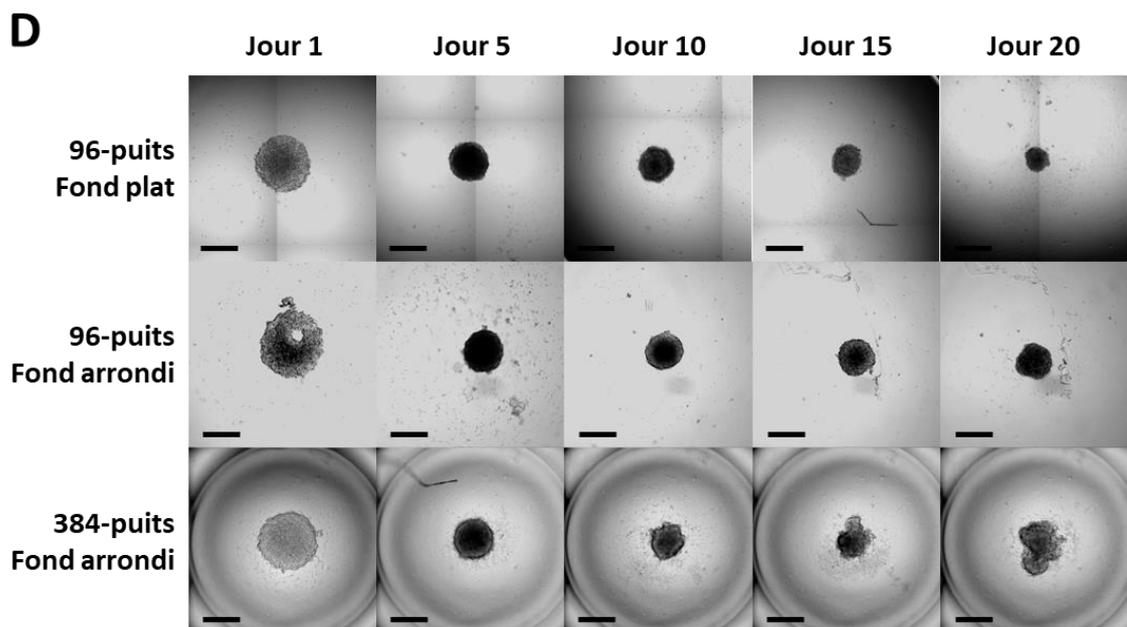
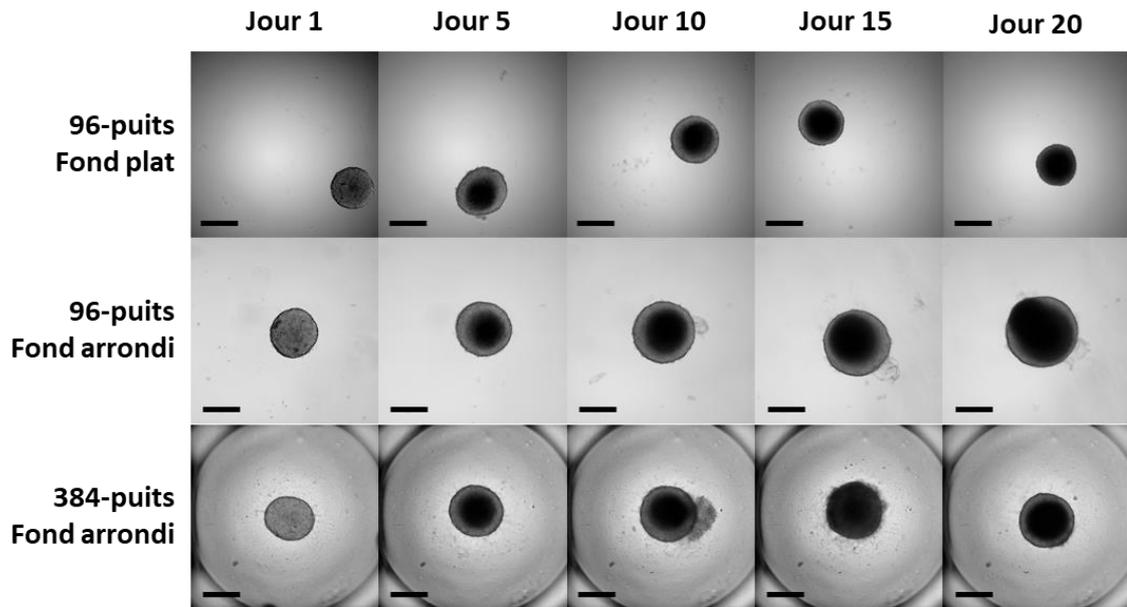


Figure Supplémentaire III.3.2. Evolution morphologique des sphéroïdes cultivés par HD (suite). Images de microscopie des sphéroïdes d'A549 (A), LnCaP (B), MNNG/HOS (C) et U251 (D) cultivés par HD pendant 20 jours dans des plaques 96-puits à fond plat ou arrondi ou des plaques 384-puits à fond arrondi. Pour la condition 96-puits à fond plat, quatre images par puits ont été acquises. Afin d'homogénéiser les tailles des images, les images de cette condition ont été coupées. L'échelle est restée inchangée. Barre d'échelle : 500 μ m.

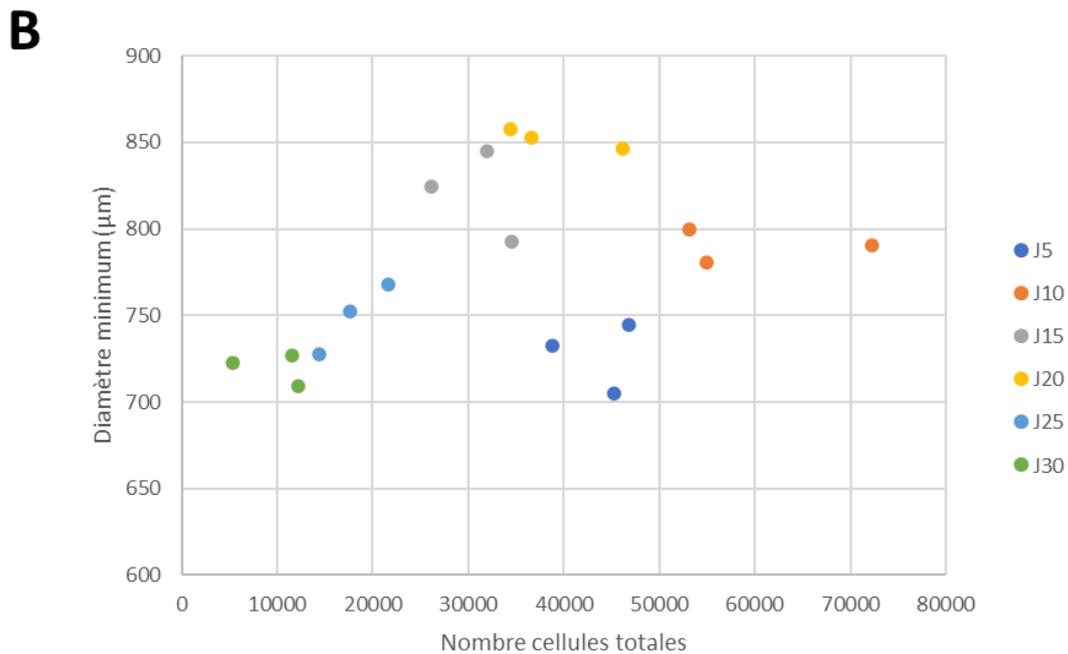
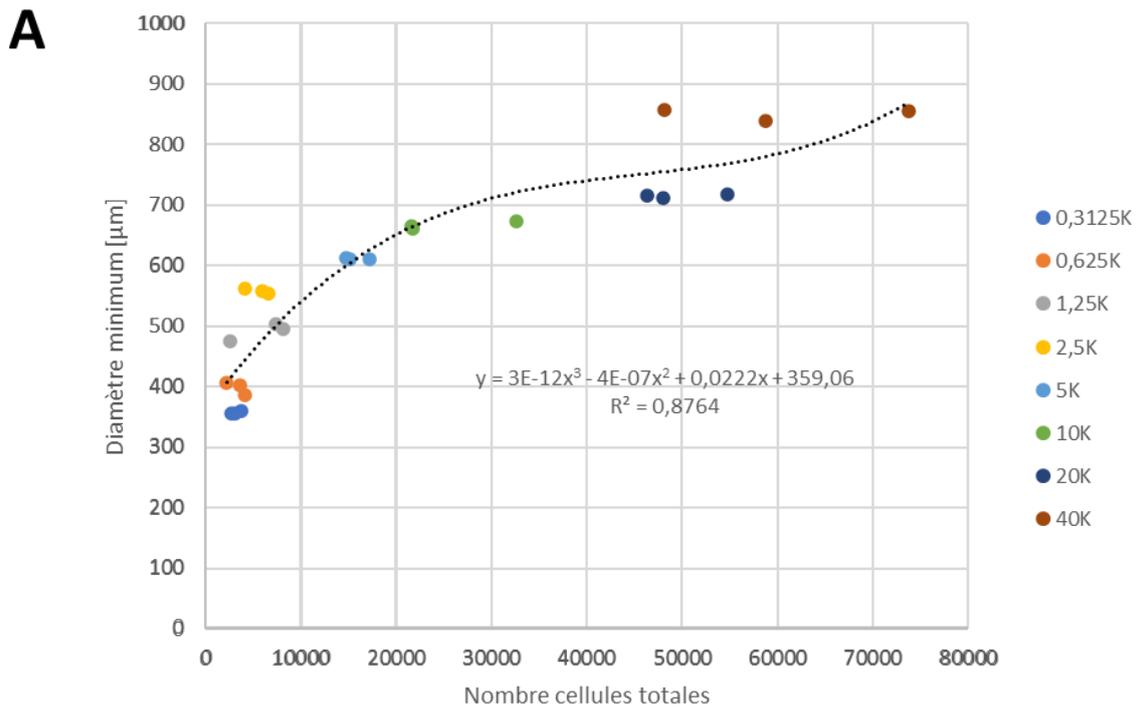


Figure Supplémentaire III.3.3. Relation entre la taille et le nombre de cellules contenus par un sphéroïde. A) Corrélation entre le diamètre de sphéroïdes en culture depuis 5 jours et le nombre de cellules par sphéroïde en fonction de la concentration initiale d'ensemencement. B) Corrélation entre le diamètre de sphéroïdes ensemencés à une densité de 20 000 cellules par puits et le nombre de cellules par sphéroïdes par puits en fonction du temps.

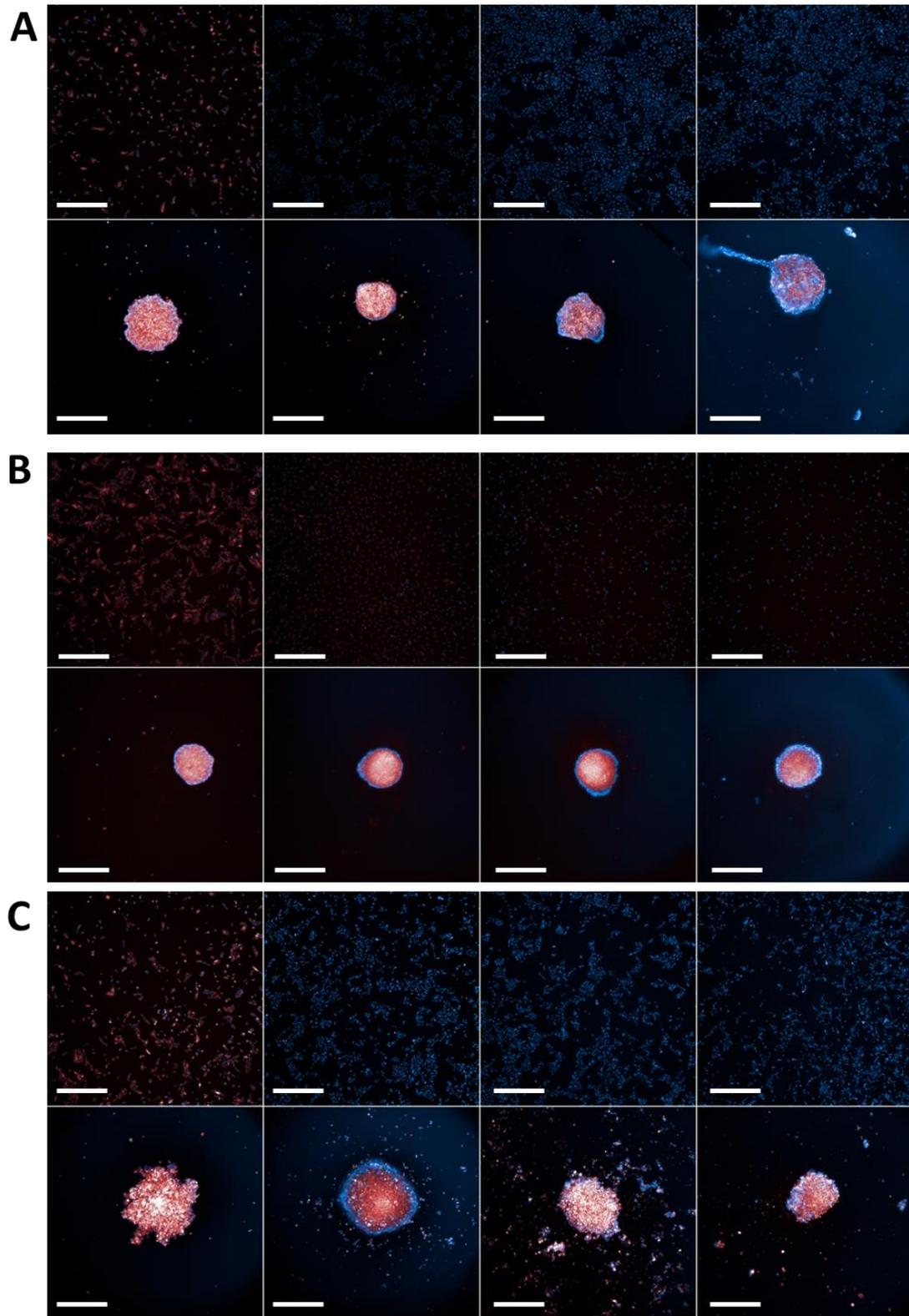


Figure Supplémentaire III.3.4. Images de microscopie illustrant la décroissance du DiD au cours du temps entre des lignées d'ostéosarcome cultivées en 2D ou en 3D. Des cellules 143B (A), MG-63 (B) et MNNG/HOS (C) ont été marquées avec le colorant lipophile membranaire DiD avant d'être ensemencées en 2D ou en 3D en plaque 96-puits. Les images de microscopie ont été acquises à jour 1, jour 5, jour 10 et jour 15 après l'ensemencement. Barre d'échelle : 500 μ m.

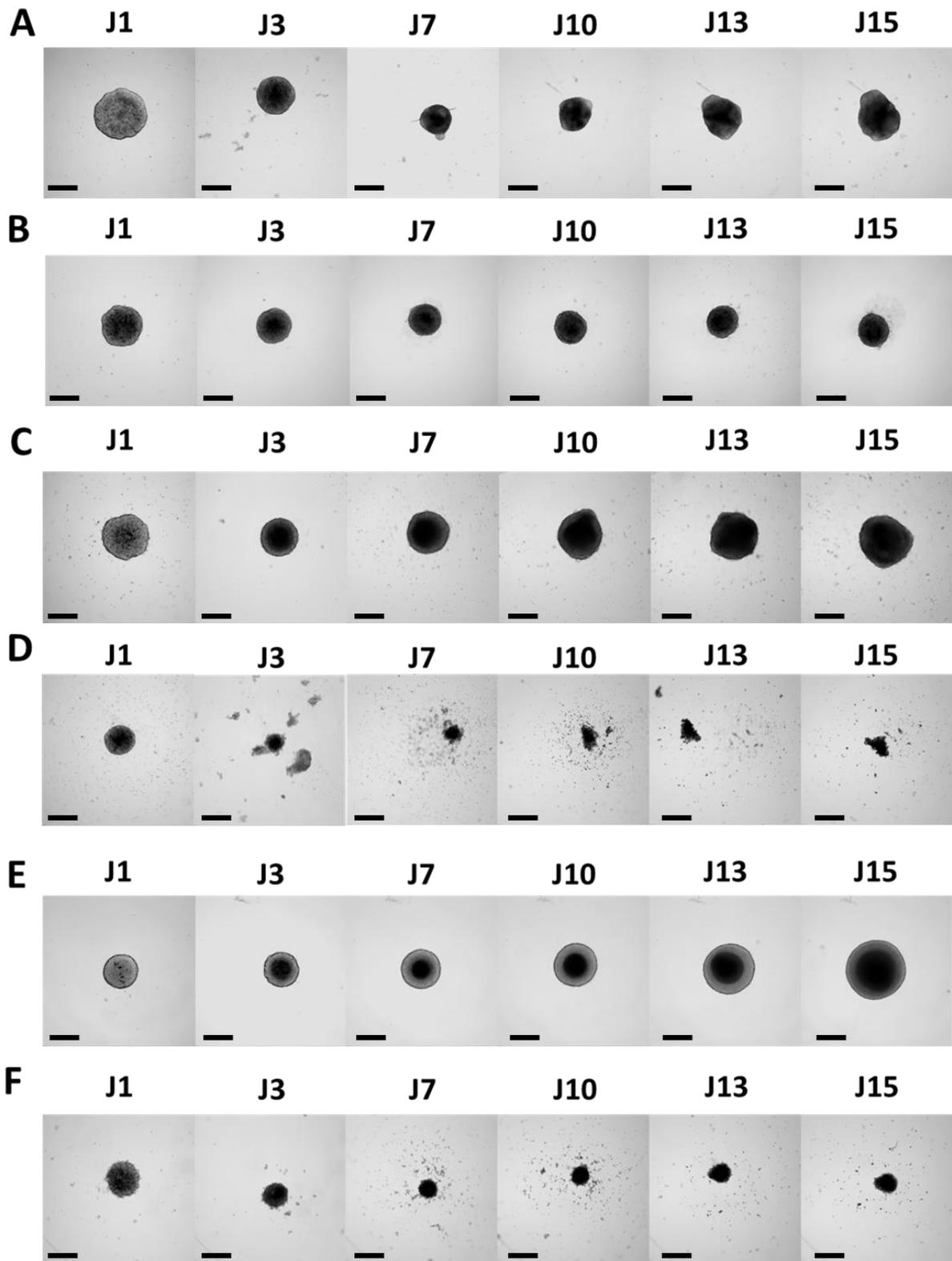


Figure Supplémentaire III.3.5. Images de microscopie illustrant l'évolution de la morphologie des sphéroïdes au cours du temps. Les cellules 143B (A), MG-63 (B), MNNG/HOS (C), SAOS-2 (D), SJSA-1 (E) et U2OS (F) ont été cultivées en 3D par LOT dans des plaques 96-puits à fond arrondi pendant 15 jours. Barre d'échelle : 500 μ m.

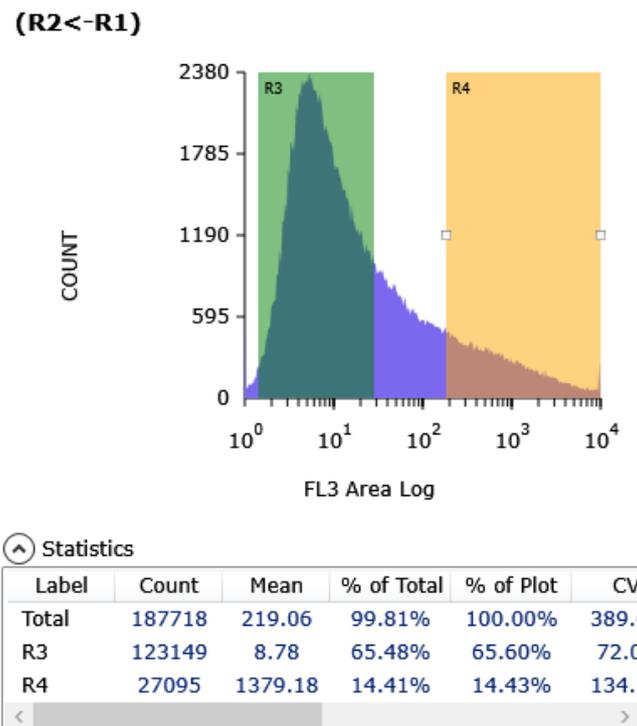


Figure Supplémentaire III.3.6. Histogramme représentatif du tri cellulaire des cellules MNNG/HOS DiD⁻ vs. DiD⁺. Les cellules ont été triées par cytométrie en flux à partir de deux zones de sélection suffisamment éloignées l'une de l'autre afin de bien discriminer les cellules positives des cellules négatives. La zone R3 (verte) correspond aux cellules DiD⁻, tandis que la zone R4 correspond aux cellules DiD⁺. Les pourcentages de cellules triées pour chaque zone sont donnés dans le tableau sous-jacent à l'histogramme.

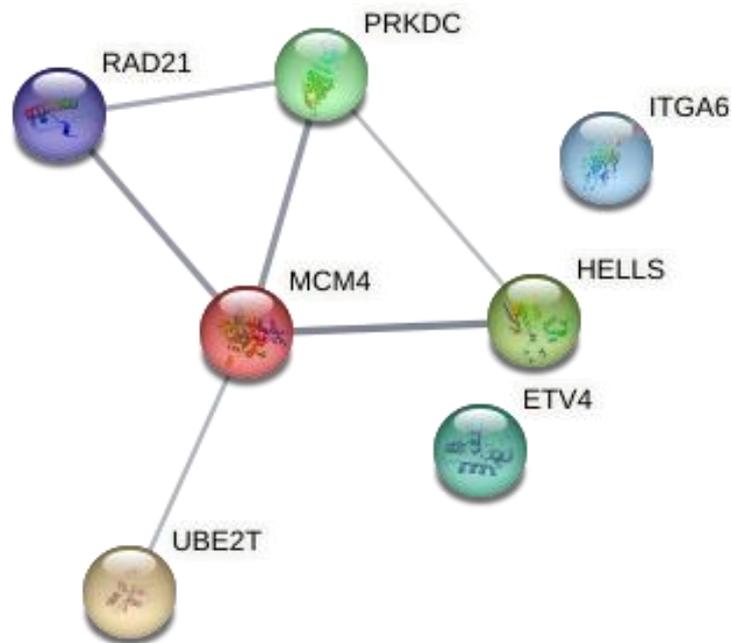


Figure Supplémentaire III.3.7. STRING représentant les interactions protéiques des gènes sélectionnés pour une étude plus approfondies de leur implication dans la dormance cancéreuse. Les bulles représentent les protéines interagissent de façon physique ou fonctionnelle lorsqu'elles sont reliées par un trait. L'épaisseur du trait représente la puissance de la prédiction d'interaction.

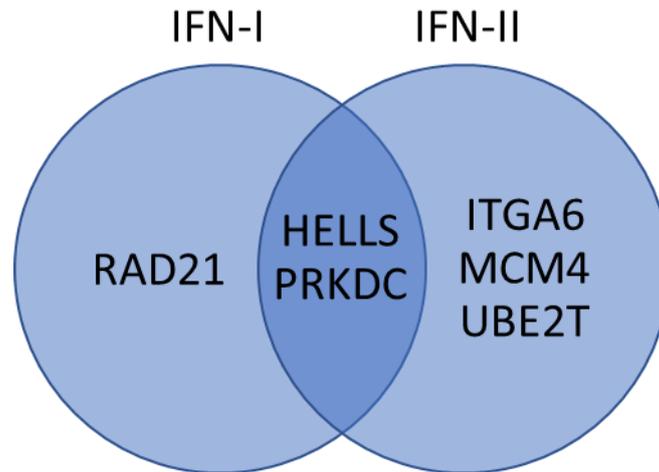


Figure Supplémentaire III.3.8. Gènes régulés pas les interférons. Diagramme de Venn représentant les résultats de la recherche réalisée sur la base de données INTERFEROME.

PARTIE IV

DISCUSSION



1. COMPARAISON DE MÉTHODES DE CULTURE 3D EN MILIEU LIQUIDE POUR LA GÉNÉRATION DE SPHÉROÏDES RÉPÉTABLES ET LE CRIBLAGE DE MOLÉCULES DE CHIMIOTHÉRAPIE

Dans cette étude, nous avons décrit un modèle 3D de culture cellulaire *in vitro* permettant la génération de sphéroïdes tumoraux répétables. Ce modèle 3D se base sur la méthode de culture du LOT dans des plaques de culture à puits multiples et à fond arrondi.

1.1. La morphologie des sphéroïdes formés spontanément par LOT dépend des lignées et pourrait témoigner de la variabilité inter-tumorale

Avec la méthode du LOT la formation des sphéroïdes se base sur la capacité intrinsèque des cellules à s'agréger dans un contexte où les parois du récipient de culture sont traitées pour empêcher l'adhérence cellulaire. Lorsque réalisée dans des plaques 96-puits à fond plat, la culture de plusieurs lignées cellulaires de différents types de cancers met en évidence que toutes les lignées ne parviennent pas à former des sphéroïdes. De plus, la morphologie des sphéroïdes formés varie d'une lignée à une autre. Par exemple, bien que toutes issues d'un cancer de type colorectal, les lignées PC3, DU145 et LnCaP ne se comportent pas de la même manière en 3D. Ainsi, les PC3 s'avèrent incapables de s'agréger en sphéroïdes dans la condition de culture LOT en plaque à fond plat. Les DU145 et les LnCaP, quant à elles, forment des sphéroïdes de forme, de taille et de densité différentes. Ces disparités pourraient s'expliquer par les caractéristiques propres de ces lignées, qui proviennent de patients et de sites métastatiques différents (PC3 : prélevées d'une métastase à l'os ; DU145 : prélevées d'une métastase au cerveau ; LnCaP : prélevées d'une métastase aux ganglions). Bien que ces lignées se distinguent par leur expression du récepteur aux androgènes, ce phénotype ne semble pas influencer sur leur capacité à former des sphéroïdes puisque la lignée LnCaP expriment les récepteurs aux androgènes, tandis que les lignées DU145 et PC3 ne les expriment pas (Alimirah et al., 2006). Une piste plus pertinente pourrait être leur « capacité métastatique », puisque ces trois lignées ont des potentiels métastatiques différents qui sont dans l'ordre du plus faible au plus fort : LnCaP < DU145 < PC3 (Wu et al., 2013). Dans ces conditions de culture 3D en milieu liquide, il se peut que les

PC3 adoptent un phénotype plus mésenchymateux normalement observé lors de la TEM, ce qui augmenterait leurs capacités migratoire et invasive mais réduirait l'efficacité des interactions cellule-cellule. Une étude réalisée dans des conditions de culture 3D similaires aux nôtres sur des PC3 et des DU145 va dans ce sens (Fontana et al., 2019). En effet, les PC3 expriment un taux plus élevé de N-Cadhérine (protéine transmembranaire impliquée dans la migration trans-endothéliale) que les DU145, et cette expression augmente dans la condition de culture 3D par rapport à la condition de culture 2D. Cette hypothèse est également corroborée par une autre étude au cours de laquelle de nombreuses lignées d'adénocarcinome prostatique ont été cultivées en 3D dans du Matrigel™ (Härmä et al., 2010). Dans ces conditions, les PC3 étaient capable de former des sphéroïdes ronds dont la bordure était bien délimitée. La composition du Matrigel™ en laminine et en collagène pourrait induire un phénotype épithélial différencié et ainsi favoriser la formation de sphéroïdes par rapport à une culture en milieu liquide. Pris ensemble, ces résultats mettent en avant le potentiel de la culture 3D comme témoin de l'hétérogénéité inter-tumorale d'un cancer donné.

1.2. Lorsque cultivés par LOT en plaque à fond arrondi, les sphéroïdes générés sont hautement répétables et suivent deux schémas possibles d'évolution morphologique

L'organisation spatiale des sphéroïdes a des conséquences directes sur la diffusion de molécules et sur l'imagerie des cellules composant ces sphéroïdes. Pour que les résultats obtenus en 3D soient scientifiquement significatifs, il est primordial que les sphéroïdes aient une morphologie homogène. Dans ce but, trois principaux critères de validation ont été sélectionnés dans cette étude : i) les sphéroïdes devaient faire un diamètre supérieur ou égal à 500 µm afin de générer un cœur nécrotique ; ii) les sphéroïdes devaient avoir une forme la plus ronde possible (se traduisant par un ratio supérieur à 0,8 – 1 équivalent à un cercle parfait) afin de s'assurer que la diffusion de molécules au sein de chaque sphère soit la plus homogène possible d'une condition à une autre ; iii) la condition de culture 3D devait permettre la génération d'un unique sphéroïde par puits. Sur la base de ces trois critères, la culture par LOT en plaque à fond arrondi s'est montrée plus efficace pour générer des

sphéroïdes répétables que la culture en plaque à fond plat précédemment utilisée, et ce pour les quatre lignées étudiées.

Dans cette condition de culture, deux profils morphologiques ressortent. Le premier concerne les lignées A549, LnCaP et U251 et se caractérise par des courbes de l'aire de la section et du diamètre minimum qui diminuent avec une intensité variable selon les lignées sur les 5 premiers jours, suivie d'une phase de plateau qui se maintient jusqu'à la fin de l'expérience. Puisqu'un unique sphéroïde par puits était généré en plaque à fond arrondi, cette diminution de la section de l'aire et du diamètre minimum ne peuvent pas correspondre à une fusion de plusieurs sphéroïdes. L'hypothèse la plus probable implique une compaction initiale du sphéroïde induisant une réduction de sa taille. Les résultats de l'expérience de fusion entre un sphéroïde de MNNG/HOS-GFP et de MNNG/HOS-DiD⁺ va dans ce sens, puisque le diamètre des sphères fusionnées à jour 10 est similaire à la moyenne du diamètre des deux sphères séparées à jour 0. En l'absence de compaction, les sphéroïdes fusionnés devraient avoir un diamètre supérieur aux sphères initiales. Ce phénomène de compaction pourrait s'expliquer par une réorganisation du cytosquelette, et plus spécifiquement des filaments d'actine qui joueraient également un rôle dans l'agrégation initiale des cellules en sphéroïde et dans la fusion de plusieurs sphères (Tsai et al., 2015).

Le second profil morphologique concerne les cellules MNNG/HOS et se caractérise à l'inverse par une croissance initiale de l'aire de la section et du diamètre minimum, associée à un maintien de la rondeur et de la présence d'un unique sphéroïde par puits du début à la fin de l'expérience. Cette phase de croissance est suivie d'un aplatissement de la courbe à partir de jour 15. Du fait de la présence d'un cœur sombre témoignant d'une densité importante des sphéroïdes MNNG/HOS (**Figure Supplémentaire 1**) dès jour 3 et du maintien de la rondeur sur toute la durée de l'expérience, il est improbable que cette croissance soit due à une dilation du sphéroïde. Plus vraisemblablement, cette augmentation de taille découlerait d'une prolifération continue des cellules ou de l'augmentation de la fraction nécrotique au sein du sphéroïde.

En parallèle de la culture en LOT, les lignées cellulaires étudiées ont été cultivées par HD. Si le HD a permis une augmentation de la répétabilité des sphéroïdes formés en plaque à fond plat, ils n'ont pas montré un avantage significatif dans le cas des plaques à fond arrondi par rapport au LOT. Il est probable que la production d'un sphéroïde unique et répétable passe

par une agrégation rapide de la majorité des cellules ensemencées. La forme arrondi des puits permet d'accélérer et d'augmenter les contacts cellule-cellule par le biais de la gravité, à la manière du HD dans des volumes de milieu qui sont alors inférieurs. Ce constat est cohérent avec le fait qu'un volume de culture de l'ordre de la dizaine ou de la centaine de microlitres n'a pas d'impact significatif sur la morphologie des sphéroïdes, comme le montrent les cultures en plaque 384-puits à fond arrondi.

1.3. Les sphéroïdes ont une taille limite

Dans les deux profils d'évolution morphologique observés pour les quatre lignées étudiées, un plateau est atteint sur le long terme que ce soit après une étape de compaction ou de prolifération. Ceci traduit une taille limite du sphéroïde dont l'ordre de grandeur dépend de la lignée.

Dans le cas du profil de croissance des sphéroïdes MNNG/HOS cultivés en fond arrondi, la corrélation entre le nombre de cellules MNNG/HOS au sein d'un sphéroïde vieux de 5 jours et sa taille en fonction de la concentration d'ensemencement initiale semble indiquer que cette croissance soit due à une prolifération continue, puisque lorsque le diamètre double, le nombre de cellules est multiplié par 20 (**Figure Supplémentaire III.3.3A**). Si cela semble vrai pour les premiers jours de culture, les résultats de la corrélation entre le nombre de cellules MNNG/HOS au sein d'un sphéroïde et sa taille en fonction du temps sous-entendent plutôt qu'un phénomène indépendant à la prolifération est responsable de cet accroissement de taille sur le long terme. En effet, bien qu'une corrélation positive entre le nombre de cellules par sphéroïde et la taille du sphéroïde existe pour les jours 5 et 10 après ensemencement, cette corrélation n'est plus vérifiée à partir du jour 15. Même si l'aire continue d'augmenter au cours du temps, le nombre de cellules par sphéroïde est inférieur aux valeurs obtenues pour jour 5 et jour 10 (**Figure Supplémentaire III.3.3B**). Cette observation pourrait s'expliquer par une augmentation de la taille des cellules au sein du sphéroïde et/ou l'accroissement d'un cœur nécrotique. Sous réserve que les observations réalisées en 2D soient également vrai pour les cellules cultivées en 3D, la première hypothèse se base sur le fait que les cellules hypoxiques tendent à augmenter leur volume cellulaire de façon inversement proportionnelle à la quantité d'oxygène (Brillault et al., 2008; Tsai et al., 2011).

Plus un sphéroïde augmente de taille, moins l'oxygène diffusera jusqu'à son centre. Ceci pourrait induire une hypoxie se traduisant par une augmentation de taille des cellules en manque d'oxygène. La seconde hypothèse, qui n'exclue pas la première, implique l'apparition d'un cœur nécrotique lorsqu'un certain diamètre est atteint, qui se poursuit par une augmentation de la taille de cette fraction nécrotique au cours du temps. Cette supposition a été validée notamment dans un modèle de sphéroïde de mélanome. Les auteurs ont mis en évidence une cinétique de croissance des sphéroïdes en trois phases : la phase 1, au cours de laquelle les sphéroïdes sont suffisamment petits pour n'être composé que de cellules en prolifération ; la phase 2 où, du fait de la forte prolifération, les sphéroïdes augmentent de taille et développent un cœur composé de cellules vivantes mais proliférant plus lentement voire plus du tout ; la phase 3, durant laquelle les sphéroïdes développent un cœur nécrotique. Ces trois fractions (couche périphérique en prolifération, couche intermédiaire à prolifération lente ou arrêtée, cœur nécrotique) continuent d'augmenter de taille proportionnellement les unes aux autres, jusqu'à atteindre un plateau (Browning et al., 2021).

Les différences de taille limite inter lignées s'expliquent potentiellement par une différence dans l'épaisseur de la couche de cellules en prolifération et la taille à partir de laquelle une nécrose débute (Freyer, 1988). Cette notion de taille limite est illustrée par les images de microscopie en time-lapse de sphéroïdes de MNNG-HOS GFP : pour les concentrations d'ensemencement plus faible (de 500 cellules à 5 000 cellules par puits) on observe une augmentation de la taille des sphéroïdes au cours du temps, tandis que pour les concentrations d'ensemencement les plus fortes (10 000 et 20 000 cellules par puits), la taille des sphéroïdes ne semblent plus évoluer 4 jours après l'ensemencement. En regard d'autres résultats obtenus sur des cellules de mélanomes (Browning et al., 2021), il est possible que les sphéroïdes issus d'un ensemencement plus faible continus à croître jusqu'à atteindre un diamètre similaire à celui des sphéroïdes produits à partir d'un ensemencement plus fort. De façon notable, la taille limite des sphéroïdes de MNNG/HOS-GFP est inférieure aux sphéroïdes MNNG/HOS. Ceci peut s'expliquer par deux limitations expérimentales. Tout d'abord, les cellules MNNG/HOS-GFP ont été cultivées pendant quatre jours dans l'enceinte d'un microscope doté d'un thermostat et d'un système d'injection de CO₂, mais dont les niveaux de contrôle sont de loin inférieur à un incubateur de culture. De fait, il est possible que les variations environnementales entre les deux expériences aient aboutis à cette

différence de taille limite. Ensuite, il s'agit d'une lignée transduite avec le gène du GFP, ce qui peut tout à fait avoir modifié certaines caractéristiques de la lignée parentale.

1.4. Les sphéroïdes sont des modèles adaptés au criblage de molécules thérapeutiques

L'utilisation de modèles de culture hautement reproductibles est primordiale au succès des analyses. En effet, la vaste majorité des essais biochimiques ont été créés pour et sont adaptés à la culture cellulaire en 2D. De fait, leur transposition à des modèles 3D de culture cellulaire nécessite invariablement une optimisation des protocoles, puisque l'organisation spatiale des sphéroïdes joue un rôle direct sur la diffusion des molécules. En s'assurant de produire des sphéroïdes de taille et de forme uniformes, il est alors possible de réduire l'influence de la variabilité morphologique sur la significativité des résultats obtenus.

Du fait de la bonne répétabilité des sphéroïdes générés par LOT en plaque de culture à fond arrondi, cette condition de culture a pu être utilisée pour évaluer la différence de sensibilité de cellules MNNG/HOS cultivées en 2D ou en 3D. Comme d'autres études avant elle (Imamura et al., 2015), cette comparaison a mis en évidence une diminution de la sensibilité à la doxorubicine des cellules cultivées en 3D par rapport à celles cultivées en 2D. Cette différence dans la sensibilité peut avoir plusieurs explications.

La présence d'un gradient de diffusion, de conditions hypoxiques et d'interactions cellule-cellule et cellule-MEC sont tout autant de signaux moléculaires qui peuvent affecter l'activation de voies de signalisation, les processus biologiques et l'expression génique et protéique impliqués dans la résistance aux traitements (Jubelin et al., 2022b; Nath and Devi, 2016). Par exemple, des cellules de cancer du sein cultivées en 3D perdent l'activité de la voie de signalisation PI3K/AKT au profit de la voie de signalisation MAPK, ce qui réduit leur sensibilité à un traitement combiné d'agent endocrinien et d'anticorps monoclonaux dirigé contre HER2 (Gangadhara et al., 2016). Dans le cas de cellules de neuroblastome, leur culture en 3D a entraîné une augmentation de l'autophagie, responsable de la baisse de sensibilité à la doxorubicine et à la vincristine observée en 3D par rapport aux cultures 2D (Bingel et al., 2017). Dans les deux cas, la MEC et les contacts cellule-cellule semblent être les principaux responsables de cette plus faible sensibilité aux traitements, une conclusion que tirent également Zschenker *et al.* après avoir mesuré l'expression génique du

transcriptome de lignées de cancers pulmonaires et de carcinomes épidermoïdes (Zschenker et al., 2012).

Ensuite, l'organisation spatiale des sphéroïdes peut limiter l'efficacité des traitements. La présence d'un gradient de diffusion s'applique également aux molécules de chimiothérapie. En effet, contrairement aux cultures en 2D où la doxorubicine est distribuée de façon homogène à toutes les cellules, la doxorubicine pourrait avoir plus de difficulté à atteindre les cellules situées au centre du sphéroïde. Des études sur de pénétration de la doxorubicine dans des cellules de carcinome hépatocellulaire ou de cancer cervical montrent que les noyaux de cellules cultivées en 3D intègrent moins la molécule de chimiothérapie que celles cultivées en 2D (Ma et al., 2012; Ong et al., 2010). Généralement, plus un sphéroïde est compacte et/ou large, moins il sera sensible à la chimiothérapie (Däster et al., 2016; Gencoglu et al., 2018; Thakuri et al., 2019). Dans cette étude, nous avons traité des sphéroïdes de 24 heures. Ce choix a été fait afin de réduire l'écart du nombre de cellules entre la condition de culture 2D et 3D, puisqu'en 3D la prolifération est fortement ralentie. Il est donc possible qu'un traitement sur des sphéroïdes mis en culture 3D depuis plus longtemps et ayant ainsi eu le temps de se densifier et de créer de nombreuses liaisons cellules-cellules aboutirait à une diminution encore plus importante de cette sensibilité à la doxorubicine. Une autre possibilité serait d'utiliser des sphéroïdes générés par HD car cette technique semble accélérer la vitesse de compaction. En effet, Raghavan et al. ont cultivé entre 10 et 500 cellules de cancer du sein (MCF7) et de cancer des ovaires (OVCAR8) en 3D par LOT ou par HD dans une plaque pour culture en HD. En mesurant la taille des sphéroïdes à un même temps, ils ont constatés que pour une même quantité de celluleensemencée, l'aire de la section était réduite en HD par rapport au LOT (Raghavan et al., 2016b). Une autre explication à cette baisse de la sensibilité est que, si le sphéroïde est suffisamment large, une zone hypoxique peut se développer. Or, l'hypoxie peut contribuer à la résistance cancéreuse aux traitements en augmentant l'expression de pompe à efflux à la surface des cellules, en induisant des effets anti-apoptotiques, en favorisant l'instabilité génétique et en ralentissant la prolifération cellulaire (Rohwer and Cramer, 2011). Enfin, de nombreuses molécules de chimiothérapie, dont la doxorubicine, visent les cellules cancéreuses à division rapide. De fait, elles sont inefficaces sur des cellules cancéreuses à prolifération ralentie ou arrêtée que l'on peut retrouver au sein des sphéroïdes (Imamura et al., 2015).

Dans le contexte de notre étude, il est possible qu'un ou plusieurs de ces mécanismes soient responsable de cette baisse de sensibilité observée en 3D. Pour vérifier cela, une comparaison du transcriptome et du protéome entre les cultures 2D et 3D pourrait permettre de mettre en évidence des différences dans l'expression de molécules connues pour favoriser la résistance aux traitements, comme les protéines anti-apoptotiques ou les pompes à efflux. De plus, en mettant à profit l'auto-fluorescence de la doxorubicine, il serait possible d'étudier le profil de diffusion de cette dernière au sein du sphéroïde une fois la problématique liée à l'imagerie de sphéroïde entier résolue. Enfin, la prolifération cellulaire pourrait être évaluée par le marquage de molécules clés du cycle cellulaire tels que ki67 ou p21 ou en utilisant des colorants se diluant au fur et à mesure des divisions cellulaires.

En conclusion, nous avons mis en évidence que la culture en plaque à fond arrondi par LOT permettait la production de sphéroïdes répétables d'un puits à un autre et ce, pour différentes lignées cellulaires. Cette méthode de culture a l'avantage d'être simple à mettre en place, peu coûteuse et d'être adaptable au criblage haut débit. Bien que la culture en sphéroïde nécessite une adaptation des méthodes d'analyses développées pour la culture 2D du fait des problématiques liées à l'organisation 3D des sphéroïdes, nous sommes parvenus à montrer que l'efficacité d'un traitement pouvait être mesurée par différentes méthodes. Pour toutes ces raisons, la culture 3D s'affirme comme un modèle pertinent dans le contexte du criblage de molécules thérapeutiques, qui pourrait réduire l'écart entre les études *in vitro* et *in vivo* et permettre une sélection plus précoce des candidats médicaments prometteurs.

2. CULTURE EN 3D DE LIGNÉES CELLULAIRES D'OSTÉOSARCOME POUR L'ÉTUDE DE LA DORMANCE CANCÉREUSE

Dans cette étude, nous sommes parvenus à étudier le mécanisme de la dormance cancéreuse grâce à l'utilisation de modèles de culture 3D plus favorables à son induction.

2.1. Les sphéroïdes sont des modèles de culture pertinents pour étudier la dormance tumorale

La culture sur plusieurs semaines de cellules de lignées d'ostéosarcomes marquées avec un colorant lipophile membranaire se diluant au fur et à mesure des divisions cellulaires a permis de mettre en évidence une disparition rapide de la fluorescence dans le cas des cultures en 2D, alors que le niveau d'expression du colorant se maintenait dans les sphéroïdes. Ceci traduit un ralentissement de la prolifération des cellules cancéreuses cultivées en 3D. La dormance cancéreuse est un phénomène au cours duquel les cellules entrent dans un état d'arrêt cellulaire ou de croissance ralentie. Au vu des résultats obtenus, les modèles 3D semblent être particulièrement pertinents pour induire et étudier ces mécanismes de dormance cancéreuse.

Ces disparités de prolifération cellulaire entre les cultures 2D et 3D peuvent s'expliquer par l'organisation spatiale prise par les cellules dans ces deux conditions de culture. En effet, les lignées cellulaires cultivées en 2D prolifèrent rapidement tant que les cellules adhérentes disposent de l'espace suffisant pour se multiplier. Dans ces conditions de culture en monocouche adhérente, les cellules ont accès équitablement aux nutriments et à l'oxygène présents dans le milieu de culture. Les conditions de culture utilisées (composition des milieux de culture, etc.) étant favorables à la prolifération et à la viabilité cellulaire, les cellules cancéreuses ne subissent ainsi que peu voire pas de pressions environnementales qui pourraient autrement provoquer le ralentissement de leur prolifération. A l'inverse, l'organisation 3D des sphéroïdes entraîne l'apparition d'un gradient de diffusion centripète pour les nutriments et l'oxygène et centrifuge pour les déchets cellulaires. De plus, selon la taille des sphéroïdes, une stratification phénotypique des cellules peut être observée, avec un cœur nécrotique, une couche intermédiaire de cellules en arrêt ou en ralentissement du

cycle cellulaire et une couche périphérique de cellules prolifératives (Browning et al., 2021). Pour toutes ces raisons, la culture par LOT des cellules cancéreuses encourage le ralentissement de la prolifération cellulaire et est donc pertinente pour étudier les mécanismes qui lui sont associés tels que la dormance cancéreuse.

Dans les conditions de culture par LOT, les sphéroïdes issus des différentes lignées d'ostéosarcome présentent des profils morphologiques différents. Il a été ainsi possible de les classer en trois catégories : i) les sphéroïdes larges et de forme arrondie (143B, MNNG/HOS et SJS-1) ; ii) les sphéroïdes de taille intermédiaire et de forme arrondie (MG-63) ; iii) les sphéroïdes de petite taille et de forme ovoïde (U2OS et SAOS-2). Comme décrit dans le chapitre 1 de cette discussion, ces différences de morphologie entre les lignées cellulaires pourraient témoigner d'une variabilité inter-tumorale. Ainsi, s'il n'est pas étonnant que les lignées cellulaires 143B et MNNG/HOS se comportent de façon similaire en 3D compte tenu de leur origine commune, le lien qu'elles partagent avec la lignée SJS-1 est moins évident. Pour autant, la caractérisation fonctionnelle de plusieurs lignées d'ostéosarcomes a mis en évidence le caractère agressif de ces trois lignées. En effet, les lignées 143B, MNNG/HOS et SJS-1 ont montré des capacités tumorigènes, clonogéniques, invasives, migratoires et prolifératives élevées (Lauvrak et al., 2013; Mohseny et al., 2011). À l'inverse, la lignée cellulaire MG-63 présente une tumorigénicité faible voire inexistante ainsi que des capacités invasives et migratoires réduites, mais une clonogénicité et une prolifération élevée. Enfin, les lignées U2OS et SAOS-2 présentent des similitudes au niveau de leur tumorigénicité faible voire inexistante et de leur clonogénicité et capacités d'invasion et de migration intermédiaires. Leur niveau de prolifération est cependant différent : élevé pour la lignée U2OS, intermédiaire pour la lignée SAOS-2 (Lauvrak et al., 2013; Mohseny et al., 2011). Ainsi, si une corrélation entre le caractère agressif de la lignée et sa capacité à former des sphères larges et rondes semblent se dessiner, il reste difficile d'identifier précisément un paramètre associé à leur morphologie 3D, d'autant plus que les caractéristiques fonctionnelles ont été décrites pour la plupart dans des modèles 2D. La transposition de plusieurs de ces essais vers la culture 3D, notamment les tests d'invasion et la migration, pourrait permettre de mieux comprendre les différences morphologiques observées.

2.2. La MEC est un acteur clé de la régulation de la dormance cancéreuse

L'induction d'un ralentissement de la prolifération et l'acquisition d'un phénotype de dormance cancéreuse peuvent également être régulées par l'ajout d'une matrice de culture lors de la génération des sphéroïdes. Deux lignées d'ostéosarcome ont été sélectionnées pour étudier le rôle du microenvironnement tumoral, et en particulier de la MEC : la lignée cellulaire MMNG/HOS formant des sphéroïdes larges (diamètre > 500 µm), et les cellules U2OS formant des sphéroïdes de taille plus réduite (diamètre < 500 µm) lorsque cultivées par LOT. Dans le cas des cellules MMNG/HOS, l'ajout d'une matrice de culture n'a pas induit de variations morphologiques des sphéroïdes générés. A l'inverse, la culture des cellules U2OS dans du Geltrex™ – une matrice de membrane basale extraite de tumeurs murines Engelbreth-Holm-Swarm – est associée à l'augmentation de la taille des sphéroïdes générés et à une diminution de l'intensité de fluorescence moyenne du DiD membranaire. Ces observations sont en faveur d'une augmentation de la prolifération cellulaire. L'intérêt d'un apport en additifs d'origine animale ou végétale aux cultures 3D pour favoriser la formation et la croissance de sphéroïdes a été mis en évidence notamment pour des lignées cellulaires d'adénocarcinomes prostatiques et mammaires (Badea et al., 2019; Edmondson et al., 2016; Leung et al., 2015). Dans notre étude, la culture avec la méthylcellulose – une matrice dérivée de la cellulose – n'a pas entraîné de différences morphologiques par rapport à la culture par LOT. Contrairement aux conclusions tirées par d'autres auteurs (Leung et al., 2015), ces résultats semblent désigner la composition moléculaire de la matrice plutôt que la viscosité des additifs comme cause de la hausse du taux de prolifération cellulaire dans le cas de la lignée U2OS. Le Geltrex™ est essentiellement composé de laminine, de collagène IV, d'entactine et de protéoglycanes à héparane sulfate qui peuvent servir de signaux pro-prolifératif. De plus, bien que le produit utilisé ait été sélectionné pour sa quantité en facteur de croissance réduite, il est probable que certaines de ces molécules soient encore présentes dans la matrice et interviennent dans la prolifération cellulaire. La MEC correspond à l'ensemble de ces composés, et elle joue un rôle prépondérant dans la progression des ostéosarcomes, que ce soit au niveau de la prolifération, de l'adhésion, de l'invasion ou des métastases (Cui et al., 2020). De plus, le Geltrex™ est produit à partir de tumeurs de souris, et il n'est donc pas aberrant que sa composition soutienne la croissance tumorale.

2.3. Les gènes sous-exprimés dans les cellules DiD⁺ sont cohérents avec une signature de la dormance

Plus d'un mois après leur ensemencement en 3D, une population cellulaire encore fortement marquée avec le colorant lipophile membranaire pouvait être détectée par cytométrie en flux, ce qui signifie qu'un certain nombre de cellules n'ont pas ou peu proliféré sur toute la durée de la culture. La comparaison du profil transcriptomique de la population DiD⁺ par rapport à la population DiD⁻ par approche NanostringTM a mis en évidence l'expression différentielle significative de 18 gènes. Parmi ces gènes, 9 sont impliqués dans les voies du cycle cellulaire. En particulier, la sous-expression d'acteurs clés de la progression du cycle cellulaire tels que CCNA1 et CCNB2 ou encore de plusieurs histones jouant un rôle dans la compaction de l'ADN soutient l'idée qu'il s'agit d'une signature de dormance cancéreuse. En plus des gènes dont le lien avec la dormance cancéreuse est évident, d'autres gènes de cette signature semblent également intervenir de façon plus ou moins directe dans la prolifération cellulaire.

Ainsi, ETV4 est un activateur de la transcription, connu notamment dans le contexte des sarcomes d'Ewing et des adénocarcinomes prostatiques pour fusionner avec d'autres gènes (Sizemore et al., 2017). Dans d'autres types de sarcomes tels que les sarcomes synoviaux, ETV4 intervient au niveau du cycle cellulaire en réduisant la prolifération lorsqu'il est sous-exprimé (DeSalvo et al., 2021). Des résultats allant dans le même sens ont été décrits pour des cancers gastrointestinaux ou de la vessie (Hao et al., 2020; Lecarpentier et al., 2019). Dans le premier cas, la sous-expression d'ETV4 serait associée à une diminution des gènes du cycle cellulaire et de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine, notamment en entraînant la déstabilisation de la β -caténine. En temps normal, la β -caténine se transloque dans le noyau et induit la transcription des gènes *CCND1* et *cMYC* impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire (Lecarpentier et al., 2019). A l'inverse, la déstabilisation de la β -caténine par la sous-expression d'ETV4 aboutit à sa dégradation par le protéasome (Zeng et al., 2017) ce qui expliquerait la réduction de la prolifération observées *in vivo*. Dans le cas du cancer de la vessie, ETV4 jouerait un rôle sur la prolifération cellulaire en se fixant directement sur la région promotrice du gène P3H4. Or, la sous-expression de P3H4 induit une diminution de la quantité de protéines *CCND1 in vitro* et une inhibition de la croissance tumorale *in vivo* (Hao et al., 2020).

ITGA6, un gène codant pour une intégrine intervenant dans l'adhésion cellulaire et la signalisation, semble également jouer un rôle dans la prolifération cellulaire. En effet, une étude réalisée sur des lignées cellulaires d'ostéosarcome a mis en évidence une surexpression d'*ITGA6* dans les tissus tumoraux par rapport aux tissus sains. La sous-expression d'*ITGA6* par l'action d'un microARN endogène - le miR-127-3p – inhibe la prolifération des cellules d'ostéosarcome (Wang et al., 2018).

RAD21 code pour une sous-unité du complexe de la cohésine qui assure la cohésion des chromatides sœurs de la réplication de l'ADN en phase S à leur ségrégation lors de la mitose. De plus, l'interactome de *RAD21* comprend plus d'une centaine de molécules, et cette protéine intervient de fait sur de nombreuses autres voies biologiques telles que la régulation de la transcription, l'apoptose ou encore la réponse aux dommages à l'ADN (Panigrahi et al., 2012). Sa sous-expression dans la lignée de cancer mammaire MDA-MB-231 induit l'apparition de plusieurs marqueurs de la sénescence tels que la β -galactosidase ou p21. L'acquisition de ce phénotype sénescence pourrait résulter de la sous-expression de c-Myc ce qui favoriserait l'activation de la voie de signalisation impliquant RB1, un répresseur du cycle cellulaire (Zhu et al., 2016).

UBE2T est une protéine qui joue non seulement un rôle crucial dans les processus de dégradation des protéines par le système du protéasome, mais qui est également impliquée dans la réponse aux dommages à l'ADN. Surexprimée dans plusieurs cancers tels que l'ostéosarcome, l'adénocarcinome gastrique, le carcinome hépatocellulaire et le glioblastome (Heitor da Silva Maués et al., 2020; Huang et al., 2020; Shen et al., 2019; Tao et al., 2020), la sous-expression d'UBE2T dans des cellules d'ostéosarcome empêche la prolifération cellulaire via l'inhibition de la voie de signalisation PI3K/AKT (Wang et al., 2016).

Le gène *HELLS*, quant à lui, code pour l'hélicase LSH intervenant dans la séparation des brins d'ADN lors de la réplication, la réparation, la recombinaison ou encore la transcription. LSH, et par extension *HELLS*, joue également un rôle au niveau de la méthylation de l'ADN et l'enroulement de la chromatine. Si *HELLS* a été décrit comme surexprimé dans plusieurs sarcomes, dont l'ostéosarcome et les sarcomes des tissus mous (Huang et al., 2021; Wu and Benavente, 2018) ainsi que dans de nombreux autres cancers (Liang et al., 2022), son rôle direct dans la prolifération cellulaire n'a pas encore été mis en évidence dans le contexte du cancer. Pour autant, des souris génétiquement modifiées pour avoir un génotype *HELLS*^{-/-}

présentent un phénotype de vieillissement accéléré associé à une sénescence répllicative précoce et augmentée (Sun et al., 2004).

MCM4 est un autre gène dont le rôle direct dans la prolifération cancéreuse n'a pas été mis en évidence. *MCM4* est une protéine impliquée dans la réplication du génome et dont l'expression est augmentée dans plusieurs sarcomes (Liu et al., 2021; Zhou et al., 2021). Dans une lignée de fibroblastes humains dont la prolifération est limitée à un certain nombre de divisions cellulaires, le taux d'expression de *MCM4* diminue drastiquement à l'approche de la sénescence (Suzuki et al., 2019). Des résultats similaires ont été obtenus dans des modèles de levures (Lee and Osley, 2021).

PRKDC est surexprimé dans le contexte de l'ostéosarcome (Mamo et al., 2017). Il s'agit de la sous-unité catalytique de la protéine kinase dépendante de l'ADN qui intervient dans la réparation de l'ADN par jonction d'extrémités non homologues et phosphoryle notamment la protéine TP53. La sous-expression de *PRKDC* devrait donc être plutôt pro-oncogénique, mais plusieurs études ont mis en avant son rôle dans la maintenance de la longueur des télomères. Ainsi, sa sous-expression entraîne une accélération de la dégradation des télomères associée à une prolifération cellulaire réduite sans augmentation de l'apoptose *in vivo* (Espejel et al., 2002). De plus, les souris *PRKDC*^{-/-} ont une durée de vie plus courte et présentent plus précocement des pathologies liées au vieillissement (Espejel et al., 2004). *PRKDC* pourrait donc jouer sur la sénescence répllicative.

Un autre point intéressant est l'existence de plusieurs signatures transcriptomiques de la dormance dont les gènes sont régulés par la voie des interférons (IFN). Khoo et al. ont ainsi marqué des cellules de myélome murin 5TGM1-eGFP avec le colorant DiD et les ont injecté dans des souris. 3 semaines plus tard, les cellules ont été collectées et triées en fonction de leur niveau d'expression du DiD. Les auteurs ont alors réalisé un RNAseq sur cellule unique. La comparaison du transcriptome des cellules dormantes par rapport aux cellules proliférantes a révélé un enrichissement des voies de signalisations impliquant l'IFN de type II (IFN- γ) (Khoo et al., 2019). Les cellules d'origine du myélome multiple étant les plasmocytes (lymphocytes B complètement différenciés sécréteurs d'anticorps), il n'est pas étonnant que la régulation de leur prolifération soit associée à la voie de signalisation des IFN (Braun et al., 2002; Jurado et al., 1989; Syedbasha et al., 2020; Young et al., 1997). Une autre étude plus récente portant sur le cancer de la prostate a cependant également mis en évidence un rôle de la voie de signalisation des IFN dans la régulation de la dormance, et en

particulier des IFN de type I (IFN- α/β) (Owen et al., 2020). En regard de ces résultats, nous avons soumis les 7 gènes de la signature transcriptomique décrits plus haut à la base de données INTERFEROME, qui rassemble les gènes régulés par les IFN de type I, II et III (Rusinova et al., 2013). De façon intéressante, 6 des 7 gènes sont régulés par la voie des IFN : 1 par l'IFN de type I (*RAD21*), 3 par l'IFN de type II (*ITGA6*, *MCM4* et *UBE2T*) et 2 à la fois par l'IFN de type I et l'IFN de type II (*HELLS*, *PRKDC*). Seul *ETV4* n'a pas été décrit comme régulé par la voie des IFN (**Figure Supplémentaire 5**).

Dans l'ensemble et après comparaison avec les données de la littérature, on peut conclure que les gènes différentiellement exprimés dans les cellules MNNG/HOS DiD⁺ sont en accord avec une signature de la dormance.

2.4. La sous-expression des gènes de la signature transcriptomique influe sur le profil des courbes du CI

Afin de vérifier le rôle des gènes *ETV4*, *HELLS*, *ITGA6*, *MCM4*, *PRKDC*, *RAD21* et *UBE2T* dans l'induction de la dormance, une sous-expression de leur transcrite respectif a été induite par interférence par ARN. Pour la suite des expériences, un choix a dû être fait quant au modèle de culture utilisé. Bien que la signature transcriptomique ait été obtenue à partir de culture en 3D, le traitement des sphéroïdes avec des siRNA pose le problème de la diffusion des molécules au sein de la sphère. En effet, contrairement aux cultures en monocouche adhérente où toutes les cellules reçoivent une quantité homogène de siRNA, la culture 3D risque d'induire un gradient de diffusion et les cellules du centre pourraient recevoir une concentration en molécule de siRNA beaucoup plus faible que celles localisées en périphérie. De fait, la sous-expression sera hétérogène, ce qui pourrait biaiser les résultats obtenus. Un modèle de sous-expression permanent par transduction avec des shRNA a été envisagé, mais les gènes visés étant potentiellement impliqués dans la multiplication cellulaire, il aurait alors été impossible d'amplifier les cellules transduites. Une option aurait été de générer un modèle de transduction induite, où la sous-expression est contrôlée par la présence ou l'absence d'une molécule spécifique dans l'environnement des cellules. Malheureusement, cette solution se serait de nouveau heurtée à la problématique de la diffusion de l'agent inducteur jusqu'au centre de la sphère. Enfin, le xCELLigence est une méthode simple et directe pour l'étude de la prolifération cellulaire, mais elle n'est adaptée qu'aux cultures en monocouche adhérente. Pour toutes ces raisons, le choix a été fait de

valider l'effet de la sous-expression des différents gènes d'intérêt en culture 2D plutôt qu'en culture 3D.

Un décalage des courbes de CI vers la droite a pu être observé pour les traitements avec le siETV4, siMCM4 et siPRKDC. Si *ETV4* avait déjà été décrit comme impliqué dans la régulation de la prolifération cellulaire (DeSalvo et al., 2021; Hao et al., 2020; Lecarpentier et al., 2019), c'est la première fois à notre connaissance qu'est mis en évidence un tel rôle pour *MCM4* et *PRKDC* dans le contexte du cancer. Le calcul du temps de doublement du CI mesuré dans la phase exponentielle de croissance (entre 36h et 60h) confirme ces résultats pour *ETV4* et *MCM4*.

Aucune différence au niveau de la phase de croissance des courbes du CI n'a été constatée pour les cellules traitées avec les siHELLS, siITGA6 et siUBE2T. Dans le cas de *HELLS*, une autre étude réalisée dans l'ostéosarcome avait déjà montré que la perte de l'expression de *HELLS* n'avait aucun effet sur la prolifération cellulaire (Wu and Benavente, 2018). Il est possible que la sous-expression d'*HELLS* soit une conséquence de la dormance plutôt qu'une cause, ce qui expliquerait sa détection dans la signature transcriptomique. A l'inverse de ce qui a été décrits dans la littérature, la sous-expression d'*ITGA6* et d'*UBE2T* ne semble pas avoir d'impact sur la prolifération cellulaire (Wang et al., 2016, 2018). Ceci souligne potentiellement les limites du modèle sélectionné pour étudier la prolifération cellulaire. En effet, la signature transcriptomique a été obtenue à partir de sphéroïdes dont les cellules DiD⁺ étaient en culture depuis plus d'un mois. Lors des tests xCELLigence, la sous-expression des gènes d'intérêts n'a été étudiée que sur une durée de 4 jours. Or, il est possible que l'induction de la dormance soit un processus long à mettre en place, et l'effet tardif de la sous-expression des gènes ne peut pas être observé dans notre modèle d'étude. De plus, les cellules n'ont été traitées qu'une unique fois avec les siRNA au début de l'expérience. Si la sous-expression des transcrits a été validée par RT-qPCR à 24h, rien de garanti que le coefficient d'extinction soit toujours supérieur à 70% au-delà de ce délai. Ensuite, le taux de protéines n'a pas été évalué. Il se peut que ce taux n'ait pas diminué malgré l'ajout des siRNA. Une telle situation serait possible si la quantité de protéines requise par la cellule pour son fonctionnement est faible et que, par extension, peu de transcrits sont nécessaires pour assurer la fonction biologique. Ainsi, puisque le coefficient d'extinction n'est pas de 100%, les ARNm restant pourraient suffire à maintenir une réponse biologique normale malgré la sous-expression du transcrit. Une autre hypothèse serait l'existence d'un faible

taux de renouvellement des protéines d'intérêts. Si de nombreuses protéines ont une demi-vie de quelques jours, d'autres mettent parfois plusieurs semaines à être renouvelées (Rolfes et al., 2021). De fait, la durée de l'expérience pourrait être plus courte que la demi-vie des protéines ITGA6 et UBE2T.

Enfin, le profil des courbes de RAD21 et de la condition « Pool » est à l'opposé de ce que l'on s'attendait à voir *a priori*. En effet, elles sont décalées vers la gauche par rapport au contrôle eGFP, résultat en faveur d'une accélération de la prolifération cellulaire. Une diminution significative du temps de doublement du CI n'est observée que pour les cellules traitées avec le siRAD21. Puisque la condition « Pool » correspond à un mélange équimolaire des siHELLS, siMCM4, siPRKDC, siRAD21 et siUBE2T dont la concentration de chacun est 5 fois inférieure à celle des cellules traitées avec un unique siRNA, il est probable que ce décalage de la courbe vers la gauche soit principalement dû à l'effet de la sous-expression de RAD21. De plus, ce décalage est associé à une augmentation significative de la hauteur du pic du CI.

2.5. La sous-expression des gènes de la signature agirait sur la morphologie et la viabilité des cellules cancéreuses plutôt que sur la prolifération cellulaire

Aussi simple et direct que soit la technologie xCELLigence, elle a malgré tout ses limites. Comme abordé dans le chapitre 2 de la partie Résultats, cette technologie se base sur une mesure d'impédance. Lorsque cette mesure d'impédance (CI) augmente, cela peut traduire plusieurs phénomènes : une prolifération cellulaire, un étalement cellulaire ou une augmentation de l'adhérence des cellules à leur substrat. De fait, le décalage des courbes observé précédemment ne signifie pas nécessairement une modification de la prolifération cellulaire.

En effet, le dénombrement des cellules à 24h, 48h et 72h après le début des traitements avec les différents siRNA n'a pas mis en évidence un changement du nombre de cellules en fonction des traitements, ce qui sous-entend que les effets observés pour ETV4, MCM4, PRKDC et RAD21 ne sont en réalité pas dû à une modification de la prolifération cellulaire.

Dans le cas de RAD21, l'augmentation du pic du CI et le décalage de la courbe pourraient s'expliquer par un étalement supérieur des cellules. Ainsi, même si le nombre de cellules reste inchangé, l'augmentation de la taille des cellules pourrait être associée une hausse de l'impédance. La sous-expression de RAD21 dans une lignée de cancer mammaire a induit un

phénotype de sénescence (Zhu et al., 2016), qui est souvent associé à un élargissement des cellules (Biran et al., 2017). Au vu du faible pourcentage de cellules larges, il est possible que les différences de courbes observées soient également dues à une augmentation de la force d'adhésion des cellules par le biais d'un mécanisme indéterminé.

Un autre aspect pouvant influencer sur le profil des courbes du CI est la viabilité cellulaire. C'est notamment le cas pour les cellules traitées avec le siETV4, puisqu'on observe une hausse du pourcentage de cellules mortes. Or, la mort cellulaire induit une réduction de l'adhérence cellulaire qui se traduit par une diminution des valeurs du CI. Cette augmentation de la mortalité cellulaire suite à la sous-expression d'ETV4 a notamment été décrite dans le contexte du glioblastome multiforme. Elle serait alors due à l'inhibition de la voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR qui promouvrait l'autophagie et l'apoptose (Wang et al., 2022).

2.6. La sous-expression d'ETV4, RAD21 et UBE2T diminuerait la sensibilité des cellules à la chimiothérapie.

Bien qu'aucun effet sur la prolifération n'ait pu être mis en évidence avec notre protocole expérimental, nous nous sommes interrogés sur l'impact des différents cas de sous-expression quant à la sensibilité aux traitements de chimiothérapie. Des cellules MNNG/HOS traitées ou non avec des siRNA dirigés contre les différents gènes de la signature transcriptomique ont été exposées à de la doxorubicine pendant 48h et la viabilité cellulaire a alors été analysée. Parmi toutes les conditions, seules les conditions utilisant les siETV4, siRAD21 et siUBE2T réduiraient la mortalité cellulaire. Ainsi la sous-expression de ces gènes diminueraient la sensibilité des cellules cancéreuses à la doxorubicine.

L'effet chimio-protecteur de la sous-expression d'ETV4 est en accord avec l'hypothèse précédemment énoncée d'une augmentation de l'autophagie. En effet, l'effet toxique de la doxorubicine passe notamment par la production de ROS, or le processus d'autophagie pourrait permettre l'élimination des mitochondries qui tendent à les stocker (Vera-Ramirez et al., 2018). A noter que l'autophagie est une voie de signalisation couramment surexprimée dans le contexte de la dormance cancéreuse (Akkoc et al., 2021). A l'inverse, l'augmentation de la sensibilité des cellules cancéreuses à la radiothérapie ou à la chimiothérapie décrite dans la littérature lorsque PRKDC est sous-exprimé n'a pas été retrouvée dans notre étude (Li et al., 2016, 2015; Mamo et al., 2017).

Pour résumer, nous avons mis en évidence la pertinence de l'utilisation de la culture 3D pour étudier des mécanismes de la progression tumorale telles que la dormance dans le contexte de l'ostéosarcome. Grâce aux méthodes de culture 3D développées dans le chapitre 1 de la partie **Résultats**, nous sommes parvenus à cultiver des lignées d'ostéosarcome sous forme de sphéroïdes à partir desquels des cellules en potentielle dormance ont pu être détectées et isolées. Ceci a permis l'identification d'une expression transcriptomique différentielle de 18 gènes qui, en regard de la littérature, pourraient correspondre à une signature transcriptomique de la dormance. L'étude plus approfondie de 7 de ces gènes n'a certes pas permis de mettre en évidence un ralentissement de la prolifération lorsqu'ils étaient sous-exprimés, mais des modifications de la morphologie et de la viabilité cellulaire ont pu être décrites, en plus d'un rôle potentiel dans la résistance aux traitements de chimiothérapie. La dormance cancéreuse est un aspect complexe de la biologie des cancers qui joue un rôle important dans la progression tumorale et la résistance aux traitements. Avec cette étude, nous participons à la recherche sur les mécanismes impliqués dans cette dormance cancéreuse, dont la connaissance est primordiale afin d'améliorer les traitements proposés aux patients.

3. CONCLUSION

Cette thèse s'est divisée en deux étapes consécutives. Dans un premier temps, un modèle de culture 3D a été développé pour permettre la génération de sphéroïdes dont la morphologie est homogène d'une expérience à l'autre. Ce modèle, basé sur la méthode de culture LOT dans des plaques à puits multiples et à fond arrondis, a permis une agrégation rapide et régulière des cellules en sphéroïde. Selon les lignées cellulaires, des profils morphologiques différents ont été observés qui pourraient être corrélés à la limite de prolifération des cellules en trois-dimensions.

Grâce à ce modèle de culture 3D, des mécanismes importants de la progression tumorales ont pu être étudiés. Tout d'abord, une diminution de la sensibilité à un traitement avec de la doxorubicine au niveau des cellules cultivées en 3D par rapport à celles cultivées en 2D a pu être détecté. Ceci souligne la pertinence de l'utilisation des modèles 3D pour le criblage de candidats médicaments. Cette diminution de la sensibilité pourrait s'expliquer par une diffusion limitée de la molécule thérapeutique en 3D, mais également par un changement de phénotype des cellules composant les sphéroïdes par rapport à leurs homologues en monocouche adhérente. Un ralentissement important de la prolifération cellulaire a été mis en évidence dans les cultures en 3D par rapport aux cultures en 2D. Ceci est caractéristique d'un phénotype de dormance cancéreuse, déjà décrit dans la littérature pour la culture en sphéroïde. De fait, le modèle de culture 3D développé ici a également permis d'induire *in vitro* cette dormance cancéreuse, alors que celle-ci n'était pas observable en culture 2D. Une signature de la dormance a ainsi été établie, dont les différents acteurs sont cohérents avec les données de la littérature. Le rôle joué par ces gènes a ensuite été étudié plus en détail au niveau de la prolifération, de la morphologie et de la viabilité cellulaire, ainsi qu'au niveau de la résistance aux traitements.

Il faut cependant souligner les limites de cette étude. Tout d'abord, la méthode de culture en LOT développée pour générer des sphéroïdes répétables est certes simple et rapide à mettre en place, mais elle n'est pas universellement adaptée à toutes les lignées cellulaires. Comme cela a été montré notamment avec des lignées d'ostéosarcome, il peut être nécessaire d'affiner la composition des milieux de culture pour améliorer la formation des sphéroïdes.

Notamment, l'addition de matrices de support 3D telles que la méthylcellulose ou le Geltrex™ peut être une solution pour permettre la croissance de certaines lignées en 3D.

Ensuite, ce modèle à l'inconvénient de rester relativement éloigné de la réalité biologique des cancers. En effet, une tumeur est une entité composée non-seulement de cellules cancéreuses, mais d'un microenvironnement tumoral riche en molécules et en cellules variées. Il pourrait donc être intéressant de complexifier ce modèle de sphéroïde en incorporant des éléments du microenvironnement. Ceci a été en partie réalisé au cours de cette thèse, puisque des sphéroïdes de cellules MNNG/HOS ont été co-cultivées avec différentes molécules du microenvironnement, à savoir de l'IL-34, du BMP-2, de l'IL6 et du TGF- β (données non montrées). Cependant, aucun effet significatif de ces différentes cytokines et facteurs de croissance n'a pu être mis en évidence, ni sur la morphologie des sphéroïdes, ni sur la régulation de la dormance. Il est également envisageable de co-cultiver les cellules cancéreuses avec d'autres cellules du microenvironnement, telles que des cellules endothéliales, des fibroblastes ou encore des cellules de l'immunité. Cela nécessitera cependant un certain nombre de mises au point au niveau de la composition du milieu de culture pour permettre la survie des différents types cellulaires.

Enfin, notre modèle 3D se base sur l'utilisation de lignées cellulaires cancéreuses qui, si elles ont l'avantage d'être facilement accessibles et manipulables, ont été modifiées pour permettre leur culture infinie *in vitro*. Or, ceci a entraîné des dérives par rapport aux tumeurs initiales dont elles sont issues, limitant ainsi leur représentativité. Dans un souci de mimétisme de la maladie, l'utilisation d'échantillons de patients doit être envisagé dans le futur. L'hétérogénéité inter et intra-tumorale nécessitera assurément une importante optimisation des conditions de cultures ne serait-ce qu'entre les différents types de cancer, mais la puissance de prédiction de ces modèles permettra de faire un bond en avant dans des domaines tels que la médecine personnalisée.

Concernant l'étude de la dormance cancéreuse, le principal écueil est que la signature de la dormance n'a été étudiée qu'au niveau transcriptomique. *Quid* de l'expression protéique ? En effet, une sous-expression des ARNm ne garantit pas pour autant une diminution similaire au niveau protéique. Or, dans la majorité des situations, l'activité biologique d'intérêt résulte principalement de l'expression et de l'activité des protéines. Malheureusement, il est beaucoup plus difficile d'obtenir une quantité de protéine suffisante à partir des sphéroïdes pour réaliser un Western Blot classique. Cependant, notre

laboratoire a acquis récemment l'instrument Milo™, un système de Western Blot sur puce permettant la mesure de l'expression de protéines à l'échelle de la cellule unique à partir d'un échantillon de 10 000 cellules ou plus. Avec cet outil, il serait possible de valider la sous-expression des protéines de la signature transcriptomique.

Une autre option serait la détection des protéines par immunocytochimie. Cette technique à notamment l'avantage de permettre la visualisation de l'expression des protéines en fonction de la position des cellules au sein du sphéroïde. Deux possibilités sont réalisables : soit les sphéroïdes sont immunomarqués entiers, soit ils sont découpés et les coupes sont montées sur lames pour être immunomarquées. Dans le premier cas, la taille des sphéroïdes peut être un problème notamment au niveau de la diffusion des anticorps et des sondes fluorescentes jusqu'au cœur du spécimen. Une optimisation minutieuse des concentrations de molécules sera donc nécessaire afin de s'assurer que les anticorps atteignent la totalité des cellules du sphéroïde. Autrement, l'intensité du marquage observée pourrait être liée non pas au taux d'expression de la protéine d'intérêt mais à la position des cellules au sein du sphéroïde, ce qui biaiserait les résultats. Une autre problématique associée au marquage de sphéroïdes entiers est la diffraction de la lumière. En effet, dans les spécimens épais, même la microscopie confocale ne permet pas de pénétrer suffisamment profondément pour visualiser l'entièreté du sphéroïde. Une option serait la clarification des sphéroïdes avec des produits chimiques permettant d'homogénéiser les indices de réfractifs et de rendre les spécimens transparents. Malheureusement, la plupart des méthodes de clarification dissolvent la fraction lipidique des cellules, or le colorant marquant les cellules ayant peu ou pas proliférées utilisé dans cette étude s'intègre dans les membranes lipidiques des cellules.

La seconde option pour visualiser par microscopie nos protéines d'intérêts serait de cryopréserver les sphéroïdes avant de les découper. Les coupes obtenues pourraient alors être immunomarquées comme le serait une monocouche adhérente de cellules. La structure spatiale, bien que réduite à un plan unique, serait maintenue dans la limite où la coupe n'aurait pas entraînée un écrasement ou un déchirement du tissu.

Enfin, une importante limite de cette étude est que l'expression de marqueurs connus de la dormance n'a pas été étudié. En réalité, ceci a été tenté sur des coupes de sphéroïdes par immunocytochimie, mais sans succès. La mise au point s'est avérée complexe. Dans le temps imparti de ce projet, et compte tenu des autres expériences en cours, il n'a pas été possible

de pousser plus loin cet aspect. En particulier, la détection de p21 (une protéine détectée notamment dans les cellules en sénescence) a été réalisée, mais aucun signal n'a pu être mesuré. L'absence d'un modèle cellulaire servant de contrôle positif a empêché de conclure sur la significativité de ces résultats, puisqu'ils pouvaient tout aussi bien témoigner d'une absence de la protéine, que d'un manque d'efficacité des anticorps utilisés. Dans le cadre de la poursuite de ce projet, le développement de cette partie immuno-histo/cytochimie serait la première étape.

Pour conclure, ce projet de thèse a permis de développer un modèle de culture 3D utilisable par un grand nombre de scientifique puisqu'aucune compétence pointue n'est nécessaire. Le choix des méthodes d'analyses est plus complexe, mais l'utilisation des modèles 3D étant de plus en plus répandue, de nouveaux essais expérimentaux adaptés à ce type de culture voient le jour, et de nombreux autres sont parfaitement adaptables après quelques mises au point, comme cela a été démontré dans ce manuscrit.

Ainsi, la culture en 3D est parfaitement réalisable dans n'importe quel laboratoire et j'encourage son intégration aux projets de recherches pré-clinique *in vitro*, puisqu'elle permet d'étudier des mécanismes tels que la résistance aux traitements et la dormance cancéreuses qui ne serait pas spontanément observable en culture 2D. De plus, c'est un modèle de culture particulièrement puissant dans le contexte de la médecine personnalisée lorsque des échantillons de patients sont utilisés pour générer des organoïdes.

BIBLIOGRAPHIE



BIBLIOGRAPHIE

- Adam, A.P., George, A., Schewe, D., Bragado, P., Iglesias, B.V., Ranganathan, A.C., Kourtidis, A., Conklin, D.S., Aguirre-Ghiso, J.A., 2009. Computational identification of a p38SAPK regulated transcription factor network required for tumor cell quiescence. *Cancer research* 69, 5664. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-3820>
- Aguirre-Ghiso, J.A., Estrada, Y., Liu, D., Ossowski, L., 2003. ERK(MAPK) activity as a determinant of tumor growth and dormancy; regulation by p38(SAPK). *Cancer Res* 63, 1684–1695.
- Aguirre-Ghiso, J.A., Ossowski, L., Rosenbaum, S.K., 2004. Green fluorescent protein tagging of extracellular signal-regulated kinase and p38 pathways reveals novel dynamics of pathway activation during primary and metastatic growth. *Cancer Res* 64, 7336–7345. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-0113>
- Aizawa, R., Takayama, K., Nakamura, K., Inoue, T., Yamasaki, T., Kobayashi, T., Akamatsu, S., Ogawa, O., Mizowaki, T., 2020. Low incidence of late recurrence in patients with intermediate-risk prostate cancer treated by intensity-modulated radiation therapy plus short-term androgen deprivation therapy. *Int J Clin Oncol* 25, 713–719. <https://doi.org/10.1007/s10147-019-01596-7>
- Akkoc, Y., Peker, N., Akcay, A., Gozuacik, D., 2021. Autophagy and Cancer Dormancy. *Front Oncol* 11, 627023. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.627023>
- Al Habyan, S., Kalos, C., Szymborski, J., McCaffrey, L., 2018. Multicellular detachment generates metastatic spheroids during intra-abdominal dissemination in epithelial ovarian cancer. *Oncogene* 37, 5127–5135. <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0317-x>
- Al Hillan, A., Al-Banaa, K., Mohamed, M., Hawa, F., Turtel, P., 2020. A Case of Late Recurrence of Colon Cancer After Curative Treatment. *Cureus* 12, e8083. <https://doi.org/10.7759/cureus.8083>
- Albregues, J., Shields, M., Ng, D., Park, C.G., Ambrico, A., Poindexter, M., Upadhyay, P., Uyeminami, D., Pommier, A., Küttner, V., Bružas, E., Maiorino, L., Bautista, C., Carmona, E.M., Gimotty, P.A., Fearon, D.T., Chang, K., Lyons, S.K., Pinkerton, K., Trotman, L.C., Goldberg, M.S., Yeh, J.T.-H., Egeblad, M., 2018. Neutrophil extracellular traps produced during inflammation awaken dormant cancer cells in mice. *Science* 361, eaao4227. <https://doi.org/10.1126/science.aao4227>
- Alimirah, F., Chen, J., Basrawala, Z., Xin, H., Choubey, D., 2006. DU-145 and PC-3 human prostate cancer cell lines express androgen receptor: implications for the androgen receptor functions and regulation. *FEBS Lett* 580, 2294–2300. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.03.041>
- Al-Ramadan, A., Mortensen, A.C., Carlsson, J., Nestor, M.V., 2018. Analysis of radiation effects in two irradiated tumor spheroid models. *Oncol Lett* 15, 3008–3016. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.7716>
- Amarasekara, D.S., Kim, S., Rho, J., 2021. Regulation of Osteoblast Differentiation by Cytokine Networks. *International Journal of Molecular Sciences* 22, 2851. <https://doi.org/10.3390/ijms22062851>
- Anderson, N.M., Simon, M.C., 2020. The tumor microenvironment. *Curr Biol* 30, R921–R925. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.06.081>
- Ashworth, J.C., Thompson, J.L., James, J.R., Slater, C.E., Pijuan-Galitó, S., Lis-Slimak, K., Holley, R.J., Meade, K.A., Thompson, A., Arkill, K.P., Tassieri, M., Wright, A.J., Farnie, G., Merry, C.L.R., 2020. Peptide gels of fully-defined composition and mechanics for

- probing cell-cell and cell-matrix interactions in vitro. *Matrix Biol* 85–86, 15–33. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2019.06.009>
- Avnet, S., Lemma, S., Cortini, M., Di Pompo, G., Perut, F., Lipreri, M.V., Roncuzzi, L., Columbaro, M., Errani, C., Longhi, A., Zini, N., Heymann, D., Dominici, M., Grisendi, G., Golinelli, G., Consolino, L., Longo, D.L., Nanni, C., Righi, A., Baldini, N., 2021. The Release of Inflammatory Mediators from Acid-Stimulated Mesenchymal Stromal Cells Favours Tumour Invasiveness and Metastasis in Osteosarcoma. *Cancers (Basel)* 13, 5855. <https://doi.org/10.3390/cancers13225855>
- Avril, T., Vauléon, E., Chevet, E., 2017. Endoplasmic reticulum stress signaling and chemotherapy resistance in solid cancers. *Oncogenesis* 6, e373. <https://doi.org/10.1038/oncsis.2017.72>
- Ayuso, J.M., Vitek, R., Swick, A.D., Skala, M.C., Wisinski, K.B., Kimple, R.J., Lambert, P.F., Beebe, D.J., 2019. Effects of culture method on response to EGFR therapy in head and neck squamous cell carcinoma cells. *Sci Rep* 9, 12480. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48764-3>
- Azar, J., Bahmad, H.F., Daher, D., Moubarak, M.M., Hadadeh, O., Monzer, A., Al Bitar, S., Jamal, M., Al-Sayegh, M., Abou-Kheir, W., 2021. The Use of Stem Cell-Derived Organoids in Disease Modeling: An Update. *Int J Mol Sci* 22, 7667. <https://doi.org/10.3390/ijms22147667>
- Badea, M.A., Balas, M., Hermenean, A., Ciceu, A., Herman, H., Ionita, D., Dinischiotu, A., 2019. Influence of Matrigel on Single- and Multiple-Spheroid Cultures in Breast Cancer Research. *SLAS Discovery* 24, 563–578. <https://doi.org/10.1177/2472555219834698>
- Bähr, O., Herrlinger, U., Weller, M., Steinbach, J.P., 2009. Very late relapses in glioblastoma long-term survivors. *J Neurol* 256, 1756–1758. <https://doi.org/10.1007/s00415-009-5167-6>
- Baldominos, P., Barbera-Mourelle, A., Barreiro, O., Huang, Y., Wight, A., Cho, J.-W., Zhao, X., Estivill, G., Adam, I., Sanchez, X., McCarthy, S., Schaller, J., Khan, Z., Ruzo, A., Pastorello, R., Richardson, E.T., Dillon, D., Montero-Llopis, P., Barroso-Sousa, R., Forman, J., Shukla, S.A., Tolaney, S.M., Mittendorf, E.A., von Andrian, U.H., Wucherpennig, K.W., Hemberg, M., Agudo, J., 2022. Quiescent cancer cells resist T cell attack by forming an immunosuppressive niche. *Cell* 185, 1694-1708.e19. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.03.033>
- Barnes, B.M., 1989. Freeze avoidance in a mammal: body temperatures below 0 degree C in an Arctic hibernator. *Science* 244, 1593–1595. <https://doi.org/10.1126/science.2740905>
- Bartosh, T.J., Ullah, M., Zeitouni, S., Beaver, J., Prockop, D.J., 2016. Cancer cells enter dormancy after cannibalizing mesenchymal stem/stromal cells (MSCs). *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113, E6447–E6456. <https://doi.org/10.1073/pnas.1612290113>
- Bassi, G., Panseri, S., Dozio, S.M., Sandri, M., Campodoni, E., Dapporto, M., Sprio, S., Tampieri, A., Montesi, M., 2020. Scaffold-based 3D cellular models mimicking the heterogeneity of osteosarcoma stem cell niche. *Sci Rep* 10, 22294. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-79448-y>
- Beck, J.N., Singh, A., Rothenberg, A.R., Elisseeff, J.H., Ewald, A.J., 2013. The independent roles of mechanical, structural and adhesion characteristics of 3D hydrogels on the

BIBLIOGRAPHIE

- regulation of cancer invasion and dissemination. *Biomaterials* 34, 9486–9495. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.08.077>
- Belisario, D.C., Akman, M., Godel, M., Campani, V., Patrizio, M.P., Scotti, L., Hattinger, C.M., De Rosa, G., Donadelli, M., Serra, M., Kopecka, J., Riganti, C., 2020. ABCA1/ABCB1 Ratio Determines Chemo- and Immune-Sensitivity in Human Osteosarcoma. *Cells* 9, 647. <https://doi.org/10.3390/cells9030647>
- Benton, G., Arnaoutova, I., George, J., Kleinman, H.K., Koblinski, J., 2014. Matrigel: from discovery and ECM mimicry to assays and models for cancer research. *Adv Drug Deliv Rev* 79–80, 3–18. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2014.06.005>
- Berthier, E., Young, E.W.K., Beebe, D., 2012. Engineers are from PDMS-land, Biologists are from Polystyrenia. *Lab Chip* 12, 1224–1237. <https://doi.org/10.1039/c2lc20982a>
- Betriu, N., Semino, C.E., 2018. Development of a 3D Co-Culture System as a Cancer Model Using a Self-Assembling Peptide Scaffold. *Gels* 4. <https://doi.org/10.3390/gels4030065>
- Bingel, C., Koeneke, E., Ridinger, J., Bittmann, A., Sill, M., Peterziel, H., Wrobel, J.K., Rettig, I., Milde, T., Fernekorn, U., Weise, F., Schober, A., Witt, O., Oehme, I., 2017. Three-dimensional tumor cell growth stimulates autophagic flux and recapitulates chemotherapy resistance. *Cell Death Dis* 8, e3013. <https://doi.org/10.1038/cddis.2017.398>
- Biran, A., Zada, L., Abou Karam, P., Vadai, E., Roitman, L., Ovadya, Y., Porat, Z., Krizhanovsky, V., 2017. Quantitative identification of senescent cells in aging and disease. *Aging Cell* 16, 661–671. <https://doi.org/10.1111/acer.12592>
- Birzu, C., French, P., Caccese, M., Cerretti, G., Idbaih, A., Zaganel, V., Lombardi, G., 2020. Recurrent Glioblastoma: From Molecular Landscape to New Treatment Perspectives. *Cancers (Basel)* 13, 47. <https://doi.org/10.3390/cancers13010047>
- Blay, J.-Y., Brahmi, M., Marec-Berard, P., Corradini, N., Dufresne, A., 2022. Chapter 52 - New therapeutic advances of bone sarcomas, in: Heymann, D. (Ed.), *Bone Sarcomas and Bone Metastases - From Bench to Bedside (Third Edition)*. Academic Press, pp. 755–766. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821666-8.00072-4>
- Boj, S.F., Hwang, C.-I., Baker, L.A., Chio, I.I.C., Engle, D.D., Corbo, V., Jager, M., Ponz-Sarvisé, M., Tiriác, H., Spector, M.S., Gračanin, A., Oni, T., Yu, K.H., van Boxtel, R., Huch, M., Rivera, K.D., Wilson, J.P., Feigin, M.E., Öhlund, D., Handly-Santana, A., Ardito-Abraham, C.M., Ludwig, M., Elyada, E., Alagesan, B., Biffi, G., Yordanov, G.N., Delcuze, B., Creighton, B., Wright, K., Park, Y., Morsink, F.H.M., Molenaar, I.Q., Borel Rinkes, I.H., Cuppen, E., Hao, Y., Jin, Y., Nijman, I.J., Iacobuzio-Donahue, C., Leach, S.D., Pappin, D.J., Hammell, M., Klimstra, D.S., Basturk, O., Hruban, R.H., Offerhaus, G.J., Vries, R.G.J., Clevers, H., Tuveson, D.A., 2015. Organoid models of human and mouse ductal pancreatic cancer. *Cell* 160, 324–338. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.12.021>
- Bouvier, A.-M., Launoy, G., Bouvier, V., Rollot, F., Manfredi, S., Faivre, J., Cottet, V., Jooste, V., 2015. Incidence and patterns of late recurrences in colon cancer patients. *Int J Cancer* 137, 2133–2138. <https://doi.org/10.1002/ijc.29578>
- Boyerinas, B., Zafrir, M., Yesilkanal, A.E., Price, T.T., Hyjek, E.M., Sipkins, D.A., 2013. Adhesion to osteopontin in the bone marrow niche regulates lymphoblastic leukemia cell dormancy. *Blood* 121, 4821–4831. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-12-475483>
- Braumüller, H., Wieder, T., Brenner, E., Aßmann, S., Hahn, M., Alkhaled, M., Schilbach, K., Essmann, F., Kneilling, M., Griessinger, C., Ranta, F., Ullrich, S., Mocikat, R., Braungart,

BIBLIOGRAPHIE

- K., Mehra, T., Fehrenbacher, B., Berdel, J., Niessner, H., Meier, F., van den Broek, M., Häring, H.-U., Handgretinger, R., Quintanilla-Martinez, L., Fend, F., Pesic, M., Bauer, J., Zender, L., Schaller, M., Schulze-Osthoff, K., Röcken, M., 2013. T-helper-1-cell cytokines drive cancer into senescence. *Nature* 494, 361–365. <https://doi.org/10.1038/nature11824>
- Braun, D., Caramalho, I., Demengeot, J., 2002. IFN- α/β enhances BCR-dependent B cell responses. *International Immunology* 14, 411–419. <https://doi.org/10.1093/intimm/14.4.411>
- Bray, F., Laversanne, M., Weiderpass, E., Soerjomataram, I., 2021. The ever-increasing importance of cancer as a leading cause of premature death worldwide. *Cancer* 127, 3029–3030. <https://doi.org/10.1002/cncr.33587>
- Breasted, J., 1930. *The Edwin Smith Surgical Papyrus*. University of Chicago Press, Chicago.
- Brillault, J., Lam, T.I., Rutkowsky, J.M., Foroutan, S., O'Donnell, M.E., 2008. Hypoxia effects on cell volume and ion uptake of cerebral microvascular endothelial cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 294, C88–C96. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00148.2007>
- Broutier, L., Mastrogiovanni, G., Verstegen, M.M.A., Francies, H.E., Gavarró, L.M., Bradshaw, C.R., Allen, G.E., Arnes-Benito, R., Sidorova, O., Gaspersz, M.P., Georgakopoulos, N., Koo, B.-K., Dietmann, S., Davies, S.E., Praseedom, R.K., Lieshout, R., IJzermans, J.N.M., Wigmore, S.J., Saeb-Parsy, K., Garnett, M.J., van der Laan, L.J.W., Huch, M., 2017. Human Primary Liver Cancer -derived Organoid Cultures for disease modelling and drug screening. *Nat Med* 23, 1424–1435. <https://doi.org/10.1038/nm.4438>
- Browning, A.P., Sharp, J.A., Murphy, R.J., Gunasingh, G., Lawson, B., Burrage, K., Haass, N.K., Simpson, M., 2021. Quantitative analysis of tumour spheroid structure. *eLife* 10, e73020. <https://doi.org/10.7554/eLife.73020>
- Bruschini, S., Ciliberto, G., Mancini, R., 2020. The emerging role of cancer cell plasticity and cell-cycle quiescence in immune escape. *Cell Death Dis* 11, 1–3. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-2669-8>
- Cackowski, F.C., Anderson, J.L., Patrene, K.D., Choksi, R.J., Shapiro, S.D., Windle, J.J., Blair, H.C., Roodman, G.D., 2010. Osteoclasts are important for bone angiogenesis. *Blood* 115, 140–149. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-08-237628>
- Campbell, J.J., Davidenko, N., Caffarel, M.M., Cameron, R.E., Watson, C.J., 2011. A multifunctional 3D co-culture system for studies of mammary tissue morphogenesis and stem cell biology. *PLoS One* 6, e25661. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025661>
- Capasso, L.L., 2005. Antiquity of cancer. *Int J Cancer* 113, 2–13. <https://doi.org/10.1002/ijc.20610>
- Cardoso, L., Herman, B.C., Verborgt, O., Laudier, D., Majeska, R.J., Schaffler, M.B., 2009. Osteocyte Apoptosis Controls Activation of Intracortical Resorption in Response to Bone Fatigue. *J Bone Miner Res* 24, 597–605. <https://doi.org/10.1359/JBMR.081210>
- Carlsson, J., Yuhas, J.M., 1984. Liquid-overlay culture of cellular spheroids. *Recent Results Cancer Res* 95, 1–23. https://doi.org/10.1007/978-3-642-82340-4_1
- Carvalho, M.P., Costa, E.C., Correia, I.J., 2017. Assembly of breast cancer heterotypic spheroids on hyaluronic acid coated surfaces. *Biotechnol Prog* 33, 1346–1357. <https://doi.org/10.1002/btpr.2497>
- CELSUS, A.C./ C., 1876. *Traité de médecine de A.C. Celse : traduction nouvelle*. Paris : Masson.

BIBLIOGRAPHIE

- Chaffer, C.L., Brueckmann, I., Scheel, C., Kaestli, A.J., Wiggins, P.A., Rodrigues, L.O., Brooks, M., Reinhardt, F., Su, Y., Polyak, K., Arendt, L.M., Kuperwasser, C., Bierie, B., Weinberg, R.A., 2011. Normal and neoplastic nonstem cells can spontaneously convert to a stem-like state. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 7950–7955. <https://doi.org/10.1073/pnas.1102454108>
- Chandek, C., Mooi, W.J., 2010. Oncogene-induced Cellular Senescence. *Advances in Anatomic Pathology* 17, 42. <https://doi.org/10.1097/PAP.0b013e3181c66f4e>
- Cleton-Jansen, A.-M., 2022. Chapter 12 - The role of mesenchymal stem cells in bone cancer: initiation, propagation, and metastasis, in: Heymann, D. (Ed.), *Bone Sarcomas and Bone Metastases - From Bench to Bedside (Third Edition)*. Academic Press, pp. 145–156. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821666-8.00031-1>
- Clevers, H., 2011. The cancer stem cell: premises, promises and challenges. *Nat Med* 17, 313–319. <https://doi.org/10.1038/nm.2304>
- Colleoni, M., Sun, Z., Price, K.N., Karlsson, P., Forbes, J.F., Thürlimann, B., Gianni, L., Castiglione, M., Gelber, R.D., Coates, A.S., Goldhirsch, A., 2016. Annual Hazard Rates of Recurrence for Breast Cancer During 24 Years of Follow-Up: Results From the International Breast Cancer Study Group Trials I to V. *J Clin Oncol* 34, 927–935. <https://doi.org/10.1200/JCO.2015.62.3504>
- Coppé, J.-P., Desprez, P.-Y., Krtolica, A., Campisi, J., 2010. The Senescence-Associated Secretory Phenotype: The Dark Side of Tumor Suppression. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 5, 99–118. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-121808-102144>
- Cui, J., Dean, D., Hornicek, F.J., Chen, Z., Duan, Z., 2020. The role of extracellular matrix in osteosarcoma progression and metastasis. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 39, 178. <https://doi.org/10.1186/s13046-020-01685-w>
- Curcio, E., Salerno, S., Barbieri, G., De Bartolo, L., Drioli, E., Bader, A., 2007. Mass transfer and metabolic reactions in hepatocyte spheroids cultured in rotating wall gas-permeable membrane system. *Biomaterials* 28, 5487–5497. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.08.033>
- Dangi-Garimella, S., Sahai, V., Ebine, K., Kumar, K., Munshi, H.G., 2013. Three-dimensional collagen I promotes gemcitabine resistance in vitro in pancreatic cancer cells through HMGA2-dependent histone acetyltransferase expression. *PLoS One* 8, e64566. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064566>
- Däster, S., Amatruda, N., Calabrese, D., Ivanek, R., Turrini, E., Droeser, R.A., Zajac, P., Fimognari, C., Spagnoli, G.C., Iezzi, G., Mele, V., Muraro, M.G., 2016. Induction of hypoxia and necrosis in multicellular tumor spheroids is associated with resistance to chemotherapy treatment. *Oncotarget* 8, 1725–1736. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.13857>
- De Falco, S., 2014. Antiangiogenesis therapy: An update after the first decade. *The Korean journal of internal medicine* 29, 1–11. <https://doi.org/10.3904/kjim.2014.29.1.1>
- De Spiegelaere, W., Casteleyn, C., Van den Broeck, W., Plendl, J., Bahramsoltani, M., Simoens, P., Djonov, V., Cornillie, P., 2012. Intussusceptive Angiogenesis: A Biologically Relevant Form of Angiogenesis. *J Vasc Res* 49, 390–404. <https://doi.org/10.1159/000338278>
- Demicheli, R., 2001. Tumour dormancy: findings and hypotheses from clinical research on breast cancer. *Semin. Cancer Biol.* 11, 297–306. <https://doi.org/10.1006/scbi.2001.0385>

BIBLIOGRAPHIE

- DeSalvo, J., Ban, Y., Li, L., Sun, X., Jiang, Z., Kerr, D.A., Khanlari, M., Boulina, M., Capecchi, M.R., Partanen, J.M., Chen, L., Kondo, T., Ornitz, D.M., Trent, J.C., Eid, J.E., 2021. ETV4 and ETV5 drive synovial sarcoma through cell cycle and DUX4 embryonic pathway control. *J Clin Invest* 131, e141908. <https://doi.org/10.1172/JCI141908>
- Dhimolea, E., Simoes, R. de M., Kansara, D., Al'Khafaji, A., Bouyssou, J., Weng, X., Sharma, S., Raja, J., Awate, P., Shirasaki, R., Tang, H., Glassner, B.J., Liu, Z., Gao, D., Bryan, J., Bender, S., Roth, J., Scheffer, M., Jeselsohn, R., Gray, N.S., Georgakoudi, I., Vazquez, F., Tsherniak, A., Chen, Y., Welm, A., Duy, C., Melnick, A., Bartholdy, B., Brown, M., Culhane, A.C., Mitsiades, C.S., 2021. An Embryonic Diapause-like Adaptation with Suppressed Myc Activity Enables Tumor Treatment Persistence. *Cancer Cell* 39, 240-256.e11. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2020.12.002>
- Dijkstra, K.K., Cattaneo, C.M., Weeber, F., Chalabi, M., van de Haar, J., Fanchi, L.F., Slagter, M., van der Velden, D.L., Kaing, S., Kelderman, S., van Rooij, N., van Leerdam, M.E., Depla, A., Smit, E.F., Hartemink, K.J., de Groot, R., Wolkers, M.C., Sachs, N., Snaebjornsson, P., Monkhorst, K., Haanen, J., Clevers, H., Schumacher, T.N., Voest, E.E., 2018. Generation of tumor-reactive T cells by co-culture of peripheral blood lymphocytes and tumor organoids. *Cell* 174, 1586-1598.e12. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.07.009>
- Discher, D.E., Janmey, P., Wang, Y.-L., 2005. Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science* 310, 1139–1143. <https://doi.org/10.1126/science.1116995>
- Drake, C.J., 2003. Embryonic and adult vasculogenesis. *Birth Defects Res C Embryo Today* 69, 73–82. <https://doi.org/10.1002/bdrc.10003>
- Dubois, C., Dufour, R., Daumar, P., Aubel, C., Szczepaniak, C., Blavignac, C., Mounetou, E., Penault-Llorca, F., Bamdad, M., 2017. Development and cytotoxic response of two proliferative MDA-MB-231 and non-proliferative SUM1315 three-dimensional cell culture models of triple-negative basal-like breast cancer cell lines. *Oncotarget* 8, 95316–95331. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.20517>
- Dunn, G.P., Bruce, A.T., Ikeda, H., Old, L.J., Schreiber, R.D., 2002. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 3, 991–998. <https://doi.org/10.1038/ni1102-991>
- Eder, T., Eder, I.E., 2017. 3D Hanging Drop Culture to Establish Prostate Cancer Organoids. *Methods Mol Biol* 1612, 167–175. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7021-6_12
- Edmondson, R., Adcock, A.F., Yang, L., 2016. Influence of Matrices on 3D-Cultured Prostate Cancer Cells' Drug Response and Expression of Drug-Action Associated Proteins. *PLOS ONE* 11, e0158116. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158116>
- Ekhtiari, S., Chiba, K., Popovic, S., Crowther, R., Wohl, G., Wong, A.K.O., Tanke, D.H., Dufault, D.M., Geen, O.D., Parasu, N., Crowther, M.A., Evans, D.C., 2020. First case of osteosarcoma in a dinosaur: a multimodal diagnosis. *The Lancet Oncology* 21, 1021–1022. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(20\)30171-6](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(20)30171-6)
- Elia, I., Broekaert, D., Christen, S., Boon, R., Radaelli, E., Orth, M.F., Verfaillie, C., Grünewald, T.G.P., Fendt, S.-M., 2017. Proline metabolism supports metastasis formation and could be inhibited to selectively target metastasizing cancer cells. *Nat Commun* 8, 15267. <https://doi.org/10.1038/ncomms15267>
- Engert, F., Kovac, M., Baumhoer, D., Nathrath, M., Fulda, S., 2017. Osteosarcoma cells with genetic signatures of BRCAness are susceptible to the PARP inhibitor talazoparib alone or in combination with chemotherapeutics. *Oncotarget* 8, 48794–48806. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10720>

BIBLIOGRAPHIE

- Espejel, S., Franco, S., Sgura, A., Gae, D., Bailey, S.M., Taccioli, G.E., Blasco, M.A., 2002. Functional interaction between DNA-PKcs and telomerase in telomere length maintenance. *EMBO J* 21, 6275–6287. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf593>
- Espejel, S., Martín, M., Klatt, P., Martín-Caballero, J., Flores, J.M., Blasco, M.A., 2004. Shorter telomeres, accelerated ageing and increased lymphoma in DNA-PKcs-deficient mice. *EMBO Rep* 5, 503–509. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400127>
- Everts, V., Delaissé, J.M., Korper, W., Jansen, D.C., Tigchelaar-Gutter, W., Saftig, P., Beertsen, W., 2002. The Bone Lining Cell: Its Role in Cleaning Howship's Lacunae and Initiating Bone Formation. *Journal of Bone and Mineral Research* 17, 77–90. <https://doi.org/10.1359/jbmr.2002.17.1.77>
- Ewald, J.A., Desotelle, J.A., Wilding, G., Jarrard, D.F., 2010. Therapy-Induced Senescence in Cancer. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* 102, 1536–1546. <https://doi.org/10.1093/jnci/djq364>
- Faguet, G.B., 2015. A brief history of cancer: Age-old milestones underlying our current knowledge database. *International Journal of Cancer* 136, 2022–2036. <https://doi.org/10.1002/ijc.29134>
- Fallica, B., Maffei, J.S., Villa, S., Makin, G., Zaman, M., 2012. Alteration of Cellular Behavior and Response to PI3K Pathway Inhibition by Culture in 3D Collagen Gels. *PLoS One* 7, e48024. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048024>
- Fan, T., Sun, G., Sun, X., Zhao, L., Zhong, R., Peng, Y., 2019. Tumor Energy Metabolism and Potential of 3-Bromopyruvate as an Inhibitor of Aerobic Glycolysis: Implications in Tumor Treatment. *Cancers* 11, 317. <https://doi.org/10.3390/cancers11030317>
- Fei, F., Harada, S., Wei, S., Siegal, G.P., 2022. Chapter 40 - Molecular pathology of osteosarcoma, in: Heymann, D. (Ed.), *Bone Sarcomas and Bone Metastases - From Bench to Bedside (Third Edition)*. Academic Press, pp. 579–590. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821666-8.00029-3>
- Fleurence, J., Cochonneau, D., Fougerey, S., Oliver, L., Geraldo, F., Terme, M., Dorvillius, M., Loussouarn, D., Vallette, F., Paris, F., Birklé, S., 2016. Targeting and killing glioblastoma with monoclonal antibody to O-acetyl GD2 ganglioside. *Oncotarget* 7, 41172–41185. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9226>
- Florescio-Silva, R., Sasso, G.R. da S., Sasso-Cerri, E., Simões, M.J., Cerri, P.S., 2015. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *Biomed Res Int* 2015, 421746. <https://doi.org/10.1155/2015/421746>
- Flores, M.J., Popham, D.L., 2020. Bacterial Endospores, in: *ELS*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 1–8. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0000300.pub3>
- Fontana, F., Raimondi, M., Marzagalli, M., Sommariva, M., Limonta, P., Gagliano, N., 2019. Epithelial-To-Mesenchymal Transition Markers and CD44 Isoforms Are Differently Expressed in 2D and 3D Cell Cultures of Prostate Cancer Cells. *Cells* 8, 143. <https://doi.org/10.3390/cells8020143>
- Freyer, J.P., 1988. Role of necrosis in regulating the growth saturation of multicellular spheroids. *Cancer Res* 48, 2432–2439.
- Fridlyand, D.M., Keller, F.G., Sabnis, H.S., Patterson, B.C., Gadde, J.A., Peragallo, J.H., Biousse, V., Wechsler, D.S., 2020. Very late recurrence of B-cell acute lymphoblastic leukemia masquerading as a pituitary tumor. *Pediatr Hematol Oncol* 37, 438–444. <https://doi.org/10.1080/08880018.2020.1751754>

- Friedrich, J., Seidel, C., Ebner, R., Kunz-Schughart, L.A., 2009. Spheroid-based drug screen: considerations and practical approach. *Nat Protoc* 4, 309–324. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.226>
- Frøehlich, K., Haeger, J.-D., Heger, J., Pastuschek, J., Photini, S.M., Yan, Y., Lupp, A., Pfarrer, C., Mrowka, R., Schleußner, E., Markert, U.R., Schmidt, A., 2016. Generation of Multicellular Breast Cancer Tumor Spheroids: Comparison of Different Protocols. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 21, 89–98. <https://doi.org/10.1007/s10911-016-9359-2>
- Frøen, R.C., Johnsen, E.O., Petrovski, G., Berényi, E., Facskó, A., Berta, A., Nicolaisen, B., Moe, M.C., 2011. Pigment epithelial cells isolated from human peripheral iridectomies have limited properties of retinal stem cells. *Acta Ophthalmol* 89, e635–644. <https://doi.org/10.1111/j.1755-3768.2011.02198.x>
- Fröhlich, E., Bonstingl, G., Höfler, A., Meindl, C., Leitinger, G., Pieber, T.R., Roblegg, E., 2013. Comparison of two in vitro systems to assess cellular effects of nanoparticles-containing aerosols. *Toxicol In Vitro* 27–360, 409–417. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2012.08.008>
- Fujimaki, K., Yao, G., 2020. Cell dormancy plasticity: quiescence deepens into senescence through a dimmer switch. *Physiological Genomics* 52, 558–562. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00068.2020>
- Ganesh, K., Wu, C., O'Rourke, K.P., Szeglin, B.C., Zheng, Y., Sauvé, C.-E.G., Adileh, M., Wasserman, I., Marco, M.R., Kim, A.S., Shady, M., Sanchez-Vega, F., Karthaus, W.R., Won, H.H., Choi, S.-H., Pelossof, R., Barlas, A., Ntiamoah, P., Pappou, E., Elghouayel, A., Strong, J.S., Chen, C.-T., Harris, J.W., Weiser, M.R., Nash, G.M., Guillem, J.G., Wei, I.H., Kolesnick, R.N., Veeraraghavan, H., Ortiz, E.J., Petkovska, I., Cercek, A., Manova-Todorova, K.O., Saltz, L.B., Lavery, J.A., DeMatteo, R.P., Massagué, J., Paty, P.B., Yaeger, R., Chen, X., Patil, S., Clevers, H., Berger, M.F., Lowe, S.W., Shia, J., Romesser, P.B., Dow, L.E., Garcia-Aguilar, J., Sawyers, C.L., Smith, J.J., 2019. A rectal cancer organoid platform to study individual responses to chemoradiation. *Nat Med* 25, 1607–1614. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0584-2>
- Gangadhara, S., Smith, C., Barrett-Lee, P., Hiscox, S., 2016. 3D culture of Her2+ breast cancer cells promotes AKT to MAPK switching and a loss of therapeutic response. *BMC Cancer* 16, 345. <https://doi.org/10.1186/s12885-016-2377-z>
- Gao, H., Chakraborty, G., Lee-Lim, A.P., Mavrakis, K.J., Wendel, H.-G., Giancotti, F.G., 2014. Forward genetic screens in mice uncover mediators and suppressors of metastatic reactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 16532–16537. <https://doi.org/10.1073/pnas.1403234111>
- Gencoglu, M.F., Barney, L.E., Hall, C.L., Brooks, E.A., Schwartz, A.D., Corbett, D.C., Stevens, K.R., Peyton, S.R., 2018. Comparative Study of Multicellular Tumor Spheroid Formation Methods and Implications for Drug Screening. *ACS Biomater. Sci. Eng.* 4, 410–420. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.7b00069>
- Ghajar, C.M., Peinado, H., Mori, H., Matei, I.R., Evason, K.J., Brazier, H., Almeida, D., Koller, A., Hajar, K.A., Stainier, D.Y.R., Chen, E.I., Lyden, D., Bissell, M.J., 2013. The perivascular niche regulates breast tumor dormancy. *Nat Cell Biol* 15, 807–817. <https://doi.org/10.1038/ncb2767>
- Giannakeas, V., Narod, S.A., 2019. A generalizable relationship between mortality and time-to-death among breast cancer patients can be explained by tumour dormancy. *Breast Cancer Res Treat* 177, 691–703. <https://doi.org/10.1007/s10549-019-05334-5>

BIBLIOGRAPHIE

- Gilpin, A., Yang, Y., 2017. Decellularization Strategies for Regenerative Medicine: From Processing Techniques to Applications. *Biomed Res Int* 2017, 9831534. <https://doi.org/10.1155/2017/9831534>
- Gomis, R.R., Gawrzak, S., 2017. Tumor cell dormancy. *Molecular Oncology* 11, 62–78. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2016.09.009>
- Göpferich, A., 1996. Mechanisms of polymer degradation and erosion. *Biomaterials* 17, 103–114. [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(96\)85755-3](https://doi.org/10.1016/0142-9612(96)85755-3)
- Guidetti, R., Altiero, T., Rebecchi, L., 2011. On dormancy strategies in tardigrades. *Journal of Insect Physiology, Dormancy and Developmental Arrest in Invertebrates* 57, 567–576. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2011.03.003>
- Guo, W.M., Loh, X.J., Tan, E.Y., Loo, J.S.C., Ho, V.H.B., 2014. Development of a magnetic 3D spheroid platform with potential application for high-throughput drug screening. *Mol Pharm* 11, 2182–2189. <https://doi.org/10.1021/mp5000604>
- Gurski, L.A., Jha, A.K., Zhang, C., Jia, X., Farach-Carson, M.C., 2009. Hyaluronic acid-based hydrogels as 3D matrices for in vitro evaluation of chemotherapeutic drugs using poorly adherent prostate cancer cells. *Biomaterials* 30, 6076–6085. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.07.054>
- Gurski, L.A., Xu, X., Labrada, L.N., Nguyen, N.T., Xiao, L., van Golen, K.L., Jia, X., Farach-Carson, M.C., 2012. Hyaluronan (HA) interacting proteins RHAMM and hyaluronidase impact prostate cancer cell behavior and invadopodia formation in 3D HA-based hydrogels. *PLoS One* 7, e50075. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050075>
- Hadfield, G., 1954. The Dormant Cancer Cell. *Br Med J* 2, 607-610.1.
- Hamza, B., Miller, A.B., Meier, L., Stockslager, M., Ng, S.R., King, E.M., Lin, L., DeGouveia, K.L., Mulugeta, N., Calistri, N.L., Strouf, H., Bray, C., Rodriguez, F., Freed-Pastor, W.A., Chin, C.R., Jaramillo, G.C., Burger, M.L., Weinberg, R.A., Shalek, A.K., Jacks, T., Manalis, S.R., 2021. Measuring kinetics and metastatic propensity of CTCs by blood exchange between mice. *Nat Commun* 12, 5680. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25917-5>
- Han, J.S., Lim, S.-B., Park, J.-H., Hong, Y.S., 2021. Late Recurrence in a Rectal Cancer Patient Who Underwent Preoperative Chemoradiotherapy Followed by Local Excision: A Case Report. *Ann Coloproctol* 37, S24–S27. <https://doi.org/10.3393/ac.2020.00073.0010>
- Hanahan, D., 2022. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov* 12, 31–46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>
- Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57–70. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81683-9)
- Hao, L., Pang, K., Pang, H., Zhang, J., Zhang, Z., He, H., Zhou, R., Shi, Z., Han, C., 2020. Knockdown of P3H4 inhibits proliferation and invasion of bladder cancer. *Aging (Albany NY)* 12, 2156–2168. <https://doi.org/10.18632/aging.102732>
- Härmä, V., Virtanen, J., Mäkelä, R., Happonen, A., Mpindi, J.-P., Knuutila, M., Kohonen, P., Lötjönen, J., Kallioniemi, O., Nees, M., 2010. A Comprehensive Panel of Three-Dimensional Models for Studies of Prostate Cancer Growth, Invasion and Drug Responses. *PLOS ONE* 5, e10431. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010431>
- Harrison, R.G., 1910. The outgrowth of the nerve fiber as a mode of protoplasmic movement. *J Exp Zool* 142, 5–73. <https://doi.org/10.1002/jez.1401420103>

BIBLIOGRAPHIE

- Hashimoto, Y., Kawasumi, M., Saito, M., 2007. Effect of static magnetic field on cell migration. *Electrical Engineering in Japan* 160, 46–52. <https://doi.org/10.1002/ej.20203>
- Hauge, E.M., Qvesel, D., Eriksen, E.F., Mosekilde, L., Melsen, F., 2001. Cancellous bone remodeling occurs in specialized compartments lined by cells expressing osteoblastic markers. *J Bone Miner Res* 16, 1575–1582. <https://doi.org/10.1359/jbmr.2001.16.9.1575>
- Hayflick, L., Moorhead, P.S., 1961. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 25, 585–621. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(61\)90192-6](https://doi.org/10.1016/0014-4827(61)90192-6)
- Heinrich, M.A., Bansal, R., Lammers, T., Zhang, Y.S., Michel Schiffelers, R., Prakash, J., 2019. 3D-Bioprinted Mini-Brain: A Glioblastoma Model to Study Cellular Interactions and Therapeutics. *Adv Mater* 31, e1806590. <https://doi.org/10.1002/adma.201806590>
- Heitor da Silva Maués, J., Ferreira Ribeiro, H., de Maria Maués Sacramento, R., Maia de Sousa, R., Pereira de Tommaso, R., Dourado Kovacs Machado Costa, B., Cardoso Soares, P., Pimentel Assumpção, P., de Fátima Aquino Moreira-Nunes, C., Mário Rodriguez Burbano, R., 2020. Downregulated genes by silencing MYC pathway identified with RNA-SEQ analysis as potential prognostic biomarkers in gastric adenocarcinoma. *Aging (Albany NY)* 12, 24651–24670. <https://doi.org/10.18632/aging.202260>
- Herbert, S.P., Stainier, D.Y.R., 2011. Molecular control of endothelial cell behaviour during blood vessel morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12, 551–564. <https://doi.org/10.1038/nrm3176>
- Hermanek, P., Hutter, R.V.P., Sobin, L.H., Wittekind, C., 1999. Classification of isolated tumor cells and micrometastasis. *Cancer* 86, 2668–2673. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0142\(19991215\)86:12<2668::AID-CNCR11>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0142(19991215)86:12<2668::AID-CNCR11>3.0.CO;2-R)
- Holmgren, L., O'Reilly, M.S., Folkman, J., 1995. Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nat Med* 1, 149–153. <https://doi.org/10.1038/nm0295-149>
- Horneck, G., 1993. Responses of *Bacillus subtilis* spores to space environment: results from experiments in space. *Orig Life Evol Biosph* 23, 37–52. <https://doi.org/10.1007/BF01581989>
- Hoshiba, T., Tanaka, M., 2016. Decellularized matrices as in vitro models of extracellular matrix in tumor tissues at different malignant levels: Mechanism of 5-fluorouracil resistance in colorectal tumor cells. *Biochim Biophys Acta* 1863, 2749–2757. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.08.009>
- Hosseini, H., Obradović, M.M.S., Hoffmann, M., Harper, K., Sosa, M.S., Werner-Klein, M., Nanduri, L.K., Werno, C., Ehrl, C., Maneck, M., Patwary, N., Haunschild, G., Gužvić, M., Reimelt, C., Grauvogl, M., Eichner, N., Weber, F., Hartkopf, A., Taran, F.-A., Brucker, S.Y., Fehm, T., Rack, B., Buchholz, S., Spang, R., Meister, G., Aguirre-Ghiso, J.A., Klein, C.A., 2016. Early dissemination seeds metastasis in breast cancer. *Nature* 540, 552–558. <https://doi.org/10.1038/nature20785>
- Howlader, N., Noone, A., Krapcho, M., Miller, D., Brest, A., Yu, M., Ruhl, J., Tatalovich, Z., Mariotto, A., Lewis, D., Chen, H., Feuer, E., Cronin, K., 2021. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2018 [WWW Document]. SEER. URL https://seer.cancer.gov/csr/1975_2018/index.html (accessed 3.22.23).

BIBLIOGRAPHIE

- Hsu, S.-K., Chiu, C.-C., Dahms, H.-U., Chou, C.-K., Cheng, C.-M., Chang, W.-T., Cheng, K.-C., Wang, H.-M.D., Lin, I.-L., 2019. Unfolded Protein Response (UPR) in Survival, Dormancy, Immunosuppression, Metastasis, and Treatments of Cancer Cells. *Int J Mol Sci* 20, 2518. <https://doi.org/10.3390/ijms20102518>
- Huang, P., Guo, Y., Zhao, Z., Ning, W., Wang, H., Gu, C., Zhang, M., Qu, Y., Zhang, H., Song, Y., 2020. UBE2T promotes glioblastoma invasion and migration via stabilizing GRP78 and regulating EMT. *Aging (Albany NY)* 12, 10275–10289. <https://doi.org/10.18632/aging.103239>
- Huang, W., Duan, Y., Yang, X., Shang, C., Chen, X., Zhang, H., Li, F., 2021. Identification of Novel Prognostic Risk Signatures of Soft Tissue Sarcoma Based on Ferroptosis-Related Genes. *Front Oncol* 11, 629868. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.629868>
- Imamura, Y., Mukohara, T., Shimono, Y., Funakoshi, Y., Chayahara, N., Toyoda, M., Kiyota, N., Takao, S., Kono, S., Nakatsura, T., Minami, H., 2015. Comparison of 2D- and 3D-culture models as drug-testing platforms in breast cancer. *Oncol Rep* 33, 1837–1843. <https://doi.org/10.3892/or.2015.3767>
- Inch, W.R., McCredie, J.A., Sutherland, R.M., 1970. Growth of nodular carcinomas in rodents compared with multi-cell spheroids in tissue culture. *Growth* 34, 271–282.
- Indraccolo, S., Stievano, L., Minuzzo, S., Tosello, V., Esposito, G., Piovan, E., Zamarchi, R., Chieco-Bianchi, L., Amadori, A., 2006. Interruption of tumor dormancy by a transient angiogenic burst within the tumor microenvironment. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, 4216–4221. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506200103>
- Ingber, D.E., 2006. Cellular mechanotransduction: putting all the pieces together again. *FASEB J* 20, 811–827. <https://doi.org/10.1096/fj.05-5424rev>
- Ingram, M., Techy, G.B., Saroufeem, R., Yazan, O., Narayan, K.S., Goodwin, T.J., Spaulding, G.F., 1997. Three-dimensional growth patterns of various human tumor cell lines in simulated microgravity of a NASA bioreactor. *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Animal* 33, 459–466. <https://doi.org/10.1007/s11626-997-0064-8>
- Ivascu, A., Kubbies, M., 2006. Rapid generation of single-tumor spheroids for high-throughput cell function and toxicity analysis. *J Biomol Screen* 11, 922–932. <https://doi.org/10.1177/1087057106292763>
- Jacob, F., Salinas, R.D., Zhang, D.Y., Nguyen, P.T.T., Schnoll, J.G., Wong, S.Z.H., Thokala, R., Sheikh, S., Saxena, D., Prokop, S., Liu, D., Qian, X., Petrov, D., Lucas, T., Chen, H.I., Dorsey, J.F., Christian, K.M., Binder, Z.A., Nasrallah, M., Brem, S., O'Rourke, D.M., Ming, G., Song, H., 2020. A Patient-Derived Glioblastoma Organoid Model and Biobank Recapitulates Inter- and Intra-tumoral Heterogeneity. *Cell* 180, 188-204.e22. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.11.036>
- Jaganathan, H., Gage, J., Leonard, F., Srinivasan, S., Souza, G.R., Dave, B., Godin, B., 2014. Three-dimensional in vitro co-culture model of breast tumor using magnetic levitation. *Sci Rep* 4, 6468. <https://doi.org/10.1038/srep06468>
- Jakubikova, J., Cholujova, D., Hideshima, T., Gronosova, P., Soltysova, A., Harada, T., Joo, J., Kong, S.-Y., Szalat, R.E., Richardson, P.G., Munshi, N.C., Dorfman, D.M., Anderson, K.C., 2016. A novel 3D mesenchymal stem cell model of the multiple myeloma bone marrow niche: biologic and clinical applications. *Oncotarget* 7, 77326–77341. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12643>
- Jensen, E.C., 2012. Use of fluorescent probes: their effect on cell biology and limitations. *Anat Rec (Hoboken)* 295, 2031–2036. <https://doi.org/10.1002/ar.22602>

BIBLIOGRAPHIE

- Jeon, J.S., Bersini, S., Gilardi, M., Dubini, G., Charest, J.L., Moretti, M., Kamm, R.D., 2015. Human 3D vascularized organotypic microfluidic assays to study breast cancer cell extravasation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, 214–219. <https://doi.org/10.1073/pnas.1417115112>
- Jiang, S., Zhao, H., Zhang, W., Wang, J., Liu, Y., Cao, Y., Zheng, H., Hu, Z., Wang, S., Zhu, Y., Wang, W., Cui, S., Lobie, P.E., Huang, L., Ma, S., 2020. An Automated Organoid Platform with Inter-organoid Homogeneity and Inter-patient Heterogeneity. *Cell Rep Med* 1, 100161. <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2020.100161>
- Jiang, T., Xu, G., Chen, X., Huang, X., Zhao, J., Zheng, L., 2019a. Impact of Hydrogel Elasticity and Adherence on Osteosarcoma Cells and Osteoblasts. *Adv Healthc Mater* 8, e1801587. <https://doi.org/10.1002/adhm.201801587>
- Jiang, T., Zhao, J., Yu, S., Mao, Z., Gao, C., Zhu, Y., Mao, C., Zheng, L., 2019b. Untangling the response of bone tumor cells and bone forming cells to matrix stiffness and adhesion ligand density by means of hydrogels. *Biomaterials* 188, 130–143. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.10.015>
- Jönsson, K.I., Rabbow, E., Schill, R.O., Harms-Ringdahl, M., Rettberg, P., 2008. Tardigrades survive exposure to space in low Earth orbit. *Current Biology* 18, R729–R731. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.06.048>
- Jordan, C.T., 2009. Cancer Stem Cells: Controversial or Just Misunderstood? *Cell Stem Cell* 4, 203–205. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.02.003>
- Joutsivuo, T., 1997. [Vesalius and *De humani corporis fabrica*: Galen's errors and the change of anatomy in the sixteenth century]. *Hippokrates (Helsinki)* 98–112.
- Jubelin, C., Muñoz-García, J., Cochonneau, D., Moranton, E., Heymann, M.-F., Heymann, D., 2022a. Biological evidence of cancer stem-like cells and recurrent disease in osteosarcoma. *Cancer Drug Resistance* 5, 184. <https://doi.org/10.20517/cdr.2021.130>
- Jubelin, C., Muñoz-García, J., Griscom, L., Cochonneau, D., Ollivier, E., Heymann, M.-F., Vallette, F.M., Oliver, L., Heymann, D., 2022b. Three-dimensional in vitro culture models in oncology research. *Cell & Bioscience* 12, 155. <https://doi.org/10.1186/s13578-022-00887-3>
- Junttila, M.R., de Sauvage, F.J., 2013. Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response. *Nature* 501, 346–354. <https://doi.org/10.1038/nature12626>
- Jurado, A., Carballido, J., Griffel, H., Hochkeppel, H.K., Wetzel, G.D., 1989. The immunomodulatory effects of interferon-gamma on mature B-lymphocyte responses. *Experientia* 45, 521–526. <https://doi.org/10.1007/BF01990501>
- Kaneuchi, Y., Hakozaiki, M., Yamada, H., Hasegawa, O., Yamada, S., Oka, Y., Watanabe, K., Konno, S., 2020. Very late relapse of high-grade osteosarcoma. *Medicine (Baltimore)* 99, e21206. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000021206>
- Kano, J., Ishiyama, T., Nakamura, N., Iijima, T., Morishita, Y., Noguchi, M., 2003. Establishment of hepatic stem-like cell lines from normal adult porcine liver in a poly-D-lysine-coated dish with NAIR-1 medium. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 39, 440–448. [https://doi.org/10.1290/1543-706X\(2003\)039<0440:EOHSCL>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1290/1543-706X(2003)039<0440:EOHSCL>2.0.CO;2)
- Kauffman, H.M., McBride, M.A., Delmonico, F.L., 2000. First report of the United Network for Organ Sharing Transplant Tumor Registry: donors with a history of cancer. *Transplantation* 70, 1747–1751. <https://doi.org/10.1097/00007890-200012270-00014>

BIBLIOGRAPHIE

- Kenkre, J., Bassett, J., 2018. The bone remodelling cycle. *Ann Clin Biochem* 55, 308–327. <https://doi.org/10.1177/0004563218759371>
- Kenner, T., 1989. The measurement of blood density and its meaning. *Basic Res Cardiol* 84, 111–124. <https://doi.org/10.1007/BF01907921>
- Khoo, W.H., Ledergor, G., Weiner, A., Roden, D.L., Terry, R.L., McDonald, M.M., Chai, R.C., De Veirman, K., Owen, K.L., Opperman, K.S., Vandyke, K., Clark, J.R., Seckinger, A., Kovacic, N., Nguyen, A., Mohanty, S.T., Pettitt, J.A., Xiao, Y., Corr, A.P., Seeliger, C., Novotny, M., Lasken, R.S., Nguyen, T.V., Oyajobi, B.O., Aftab, D., Swarbrick, A., Parker, B., Hewett, D.R., Hose, D., Vanderkerken, K., Zannettino, A.C.W., Amit, I., Phan, T.G., Croucher, P.I., 2019. A niche-dependent myeloid transcriptome signature defines dormant myeloma cells. *Blood* 134, 30–43. <https://doi.org/10.1182/blood.2018880930>
- Kim, H.J., Ji, Y.R., Lee, Y.M., 2022. Crosstalk between angiogenesis and immune regulation in the tumor microenvironment. *Arch. Pharm. Res.* 45, 401–416. <https://doi.org/10.1007/s12272-022-01389-z>
- Kim, S.H., Yeon, Y.K., Lee, J.M., Chao, J.R., Lee, Y.J., Seo, Y.B., Sultan, M.T., Lee, O.J., Lee, J.S., Yoon, S.-I., Hong, I.-S., Khang, G., Lee, S.J., Yoo, J.J., Park, C.H., 2018. Precisely printable and biocompatible silk fibroin bioink for digital light processing 3D printing. *Nat Commun* 9, 1620. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03759-y>
- Kiss, A., Ráduly, A.P., Regdon, Z., Polgár, Z., Tarapcsák, S., Sturniolo, I., El-Hamoly, T., Virág, L., Hegedűs, C., 2020. Targeting Nuclear NAD⁺ Synthesis Inhibits DNA Repair, Impairs Metabolic Adaptation and Increases Chemosensitivity of U-2OS Osteosarcoma Cells. *Cancers (Basel)* 12. <https://doi.org/10.3390/cancers12051180>
- Kleinman, H.K., Martin, G.R., 2005. Matrigel: basement membrane matrix with biological activity. *Semin Cancer Biol* 15, 378–386. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2005.05.004>
- Ko, J., Ahn, J., Kim, S., Lee, Y., Lee, J., Park, D., Jeon, N.L., 2019. Tumor spheroid-on-a-chip: a standardized microfluidic culture platform for investigating tumor angiogenesis. *Lab Chip* 19, 2822–2833. <https://doi.org/10.1039/c9lc00140a>
- Kobayashi, A., Okuda, H., Xing, F., Pandey, P.R., Watabe, M., Hirota, S., Pai, S.K., Liu, W., Fukuda, K., Chambers, C., Wilber, A., Watabe, K., 2011. Bone morphogenetic protein 7 in dormancy and metastasis of prostate cancer stem-like cells in bone. *Journal of Experimental Medicine* 208, 2641–2655. <https://doi.org/10.1084/jem.20110840>
- Koebel, C.M., Vermi, W., Swann, J.B., Zerafa, N., Rodig, S.J., Old, L.J., Smyth, M.J., Schreiber, R.D., 2007. Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature* 450, 903–907. <https://doi.org/10.1038/nature06309>
- Kopec, M., Abramczyk, H., 2022. The role of pro- and antiangiogenic factors in angiogenesis process by Raman spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 268, 120667. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2021.120667>
- Kuczynski, E.A., Vermeulen, P.B., Pezzella, F., Kerbel, R.S., Reynolds, A.R., 2019. Vessel co-option in cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 16, 469–493. <https://doi.org/10.1038/s41571-019-0181-9>
- Kwon, J.S., Everetts, N.J., Wang, X., Wang, W., Croce, K.D., Xing, J., Yao, G., 2017. Controlling Depth of Cellular Quiescence by an Rb-E2F Network Switch. *Cell Reports* 20, 3223–3235. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.09.007>
- La Belle Flynn, A., Calhoun, B.C., Sharma, A., Chang, J.C., Almasan, A., Schiemann, W.P., 2019. Autophagy inhibition elicits emergence from metastatic dormancy by inducing and

- stabilizing Pfkfb3 expression. *Nat Commun* 10, 3668. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11640-9>
- Lapidot, T., Sirard, C., Vormoor, J., Murdoch, B., Hoang, T., Caceres-Cortes, J., Minden, M., Paterson, B., Caligiuri, M.A., Dick, J.E., 1994. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 367, 645–648. <https://doi.org/10.1038/367645a0>
- Lauvrak, S.U., Munthe, E., Kresse, S.H., Stratford, E.W., Namløs, H.M., Meza-Zepeda, L.A., Myklebost, O., 2013. Functional characterisation of osteosarcoma cell lines and identification of mRNAs and miRNAs associated with aggressive cancer phenotypes. *Br J Cancer* 109, 2228–2236. <https://doi.org/10.1038/bjc.2013.549>
- Lawson, M.A., McDonald, M.M., Kovacic, N., Hua Khoo, W., Terry, R.L., Down, J., Kaplan, W., Paton-Hough, J., Fellows, C., Pettitt, J.A., Neil Dear, T., Van Valckenborgh, E., Baldock, P.A., Rogers, M.J., Eaton, C.L., Vanderkerken, K., Pettit, A.R., Quinn, J.M.W., Zannettino, A.C.W., Phan, T.G., Croucher, P.I., 2015. Osteoclasts control reactivation of dormant myeloma cells by remodelling the endosteal niche. *Nat Commun* 6, 8983. <https://doi.org/10.1038/ncomms9983>
- Lecarpentier, Y., Schussler, O., Hébert, J.-L., Vallée, A., 2019. Multiple Targets of the Canonical WNT/ β -Catenin Signaling in Cancers. *Frontiers in Oncology* 9.
- Lee, G.Y., Kenny, P.A., Lee, E.H., Bissell, M.J., 2007. Three-dimensional culture models of normal and malignant breast epithelial cells. *Nat Methods* 4, 359–365. <https://doi.org/10.1038/nmeth1015>
- Lee, N.K., Sowa, H., Hinoi, E., Ferron, M., Ahn, J.D., Confavreux, C., Dacquin, R., Mee, P.J., McKee, M.D., Jung, D.Y., Zhang, Z., Kim, J.K., Mauvais-Jarvis, F., Ducy, P., Karsenty, G., 2007. Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. *Cell* 130, 456–469. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.047>
- Lee, P.-H., Osley, M.A., 2021. Chromatin structure restricts origin utilization when quiescent cells re-enter the cell cycle. *Nucleic Acids Res* 49, 864–878. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1148>
- Lee, R.E., 2009. Chapter 79 - Dormancy, in: Resh, V.H., Cardé, R.T. (Eds.), *Encyclopedia of Insects* (Second Edition). Academic Press, San Diego, pp. 300–301. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374144-8.00088-6>
- Lee, S., Trinh, T.H.T., Yoo, M., Shin, J., Lee, H., Kim, J., Hwang, E., Lim, Y.-B., Ryou, C., 2019. Self-Assembling Peptides and Their Application in the Treatment of Diseases. *Int J Mol Sci* 20. <https://doi.org/10.3390/ijms20235850>
- Lenna, S., Bellotti, C., Duchi, S., Martella, E., Columbaro, M., Dozza, B., Ballestri, M., Guerrini, A., Sotgiu, G., Frisoni, T., Cevolani, L., Varchi, G., Ferrari, M., Donati, D.M., Lucarelli, E., 2020. Mesenchymal stromal cells mediated delivery of photoactive nanoparticles inhibits osteosarcoma growth in vitro and in a murine in vivo ectopic model. *J Exp Clin Cancer Res* 39, 40. <https://doi.org/10.1186/s13046-020-01548-4>
- Lennon, J.T., Jones, S.E., 2011. Microbial seed banks: the ecological and evolutionary implications of dormancy. *Nat Rev Microbiol* 9, 119–130. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2504>
- Létourneau, I.J., Quinn, M.C.J., Wang, L.-L., Portelance, L., Caceres, K.Y., Cyr, L., Delvoye, N., Meunier, L., de Ladurantaye, M., Shen, Z., Arcand, S.L., Tonin, P.N., Provencher, D.M., Mes-Masson, A.-M., 2012. Derivation and characterization of matched cell lines from primary and recurrent serous ovarian cancer. *BMC Cancer* 12, 379. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-12-379>

BIBLIOGRAPHIE

- Leung, B.M., Leshner-Perez, S.C., Matsuoka, T., Moraes, C., Takayama, S., 2015. Media additives to promote spheroid circularity and compactness in hanging drop platform. *Biomater Sci* 3, 336–344. <https://doi.org/10.1039/c4bm00319e>
- Li, K., Li, X., Tian, J., Wang, H., Pan, J., Li, J., 2016. Downregulation of DNA-PKcs suppresses P-gp expression via inhibition of the Akt/NF- κ B pathway in CD133-positive osteosarcoma MG-63 cells. *Oncol Rep* 36, 1973–1980. <https://doi.org/10.3892/or.2016.4991>
- Li, X., Tian, J., Bo, Q., Li, K., Wang, H., Liu, T., Li, J., 2015. Targeting DNA-PKcs increased anticancer drug sensitivity by suppressing DNA damage repair in osteosarcoma cell line MG63. *Tumour Biol* 36, 9365–9372. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-3642-5>
- Li, X., Zhang, Y., Kang, H., Liu, W., Liu, P., Zhang, J., Harris, S.E., Wu, D., 2005. Sclerostin binds to LRP5/6 and antagonizes canonical Wnt signaling. *J Biol Chem* 280, 19883–19887. <https://doi.org/10.1074/jbc.M413274200>
- Li, Z.-L., Wang, Z.-J., Wei, G.-H., Yang, Y., Wang, X.-W., 2020. Changes in extracellular matrix in different stages of colorectal cancer and their effects on proliferation of cancer cells. *World J Gastrointest Oncol* 12, 267–275. <https://doi.org/10.4251/wjgo.v12.i3.267>
- Liang, X., Li, L., Fan, Y., 2022. Diagnostic, Prognostic, and Immunological Roles of HELLS in Pan-Cancer: A Bioinformatics Analysis. *Front Immunol* 13, 870726. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.870726>
- Liang, Y., Jeong, J., DeVolder, R.J., Cha, C., Wang, F., Tong, Y.W., Kong, H., 2011. A cell-instructive hydrogel to regulate malignancy of 3D tumor spheroids with matrix rigidity. *Biomaterials* 32, 9308–9315. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.08.045>
- Lin, X., Patil, S., Gao, Y.-G., Qian, A., 2020. The Bone Extracellular Matrix in Bone Formation and Regeneration. *Frontiers in Pharmacology* 11.
- Liu, C., Lewin Mejia, D., Chiang, B., Luker, K.E., Luker, G.D., 2018. Hybrid collagen alginate hydrogel as a platform for 3D tumor spheroid invasion. *Acta Biomater* 75, 213–225. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.06.003>
- Liu, H.-Y., Korc, M., Lin, C.-C., 2018. Biomimetic and enzyme-responsive dynamic hydrogels for studying cell-matrix interactions in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Biomaterials* 160, 24–36. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.01.012>
- Liu, J., Huang, W., Pang, Y., Huang, P., Zhu, X., Zhou, Y., Yan, D., 2011. Molecular self-assembly of a homopolymer: an alternative to fabricate drug-delivery platforms for cancer therapy. *Angew Chem Int Ed Engl* 50, 9162–9166. <https://doi.org/10.1002/anie.201102280>
- Liu, Q., Bao, Q., Xu, Y., Fu, Y., Jin, Z., Wang, J., Zhang, W., Shen, Y., 2021. MCM4 Is a Novel Biomarker Associated With Genomic Instability, BRCAness Phenotype, and Therapeutic Potentials in Soft-Tissue Sarcoma. *Front Cell Dev Biol* 9, 666376. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.666376>
- Lovitt, C.J., Shelper, T.B., Avery, V.M., 2018. Doxorubicin resistance in breast cancer cells is mediated by extracellular matrix proteins. *BMC Cancer* 18, 41. <https://doi.org/10.1186/s12885-017-3953-6>
- Lu, Z., Luo, R.Z., Lu, Y., Zhang, X., Yu, Q., Khare, S., Kondo, S., Kondo, Y., Yu, Y., Mills, G.B., Liao, W.S.-L., Bast, R.C., 2008. The tumor suppressor gene ARHI regulates autophagy and tumor dormancy in human ovarian cancer cells. *J Clin Invest* 118, 3917–3929. <https://doi.org/10.1172/JCI35512>

BIBLIOGRAPHIE

- Lugano, R., Ramachandran, M., Dimberg, A., 2020. Tumor angiogenesis: causes, consequences, challenges and opportunities. *Cell Mol Life Sci* 77, 1745–1770. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03351-7>
- Luo, Q., Wang, J., Zhao, W., Peng, Z., Liu, X., Li, B., Zhang, H., Shan, B., Zhang, C., Duan, C., 2020. Vasculogenic mimicry in carcinogenesis and clinical applications. *Journal of Hematology & Oncology* 13, 19. <https://doi.org/10.1186/s13045-020-00858-6>
- LYTTON, D.G., RESUHR, L.M., 1978. Galen on Abnormal Swellings. *Journal of the History of Medicine and Allied Sciences* XXXIII, 531–549. <https://doi.org/10.1093/jhmas/XXXIII.4.531>
- Ma, H., Jiang, Q., Han, S., Wu, Y., Cui Tomshine, J., Wang, D., Gan, Y., Zou, G., Liang, X.-J., 2012. Multicellular tumor spheroids as an in vivo-like tumor model for three-dimensional imaging of chemotherapeutic and nano material cellular penetration. *Mol Imaging* 11, 487–498.
- Ma, X.-L., Sun, Y.-F., Wang, B.-L., Shen, M.-N., Zhou, Y., Chen, J.-W., Hu, B., Gong, Z.-J., Zhang, X., Cao, Y., Pan, B.-S., Zhou, J., Fan, J., Guo, W., Yang, X.-R., 2019. Sphere-forming culture enriches liver cancer stem cells and reveals Stearoyl-CoA desaturase 1 as a potential therapeutic target. *BMC Cancer* 19, 760. <https://doi.org/10.1186/s12885-019-5963-z>
- Maeda, R., Yoshida, J., Ishii, G., Aokage, K., Hishida, T., Nishimura, M., Nishiwaki, Y., Nagai, K., 2010. Long-Term Outcome and Late Recurrence in Patients with Completely Resected Stage IA Non-small Cell Lung Cancer. *Journal of Thoracic Oncology* 5, 1246–1250. <https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e3181e2f247>
- Maliszewska-Olejniczak, K., Brodaczevska, K.K., Bielecka, Z.F., Czarnecka, A.M., 2018. Three-Dimensional Cell Culture Model Utilization in Renal Carcinoma Cancer Stem Cell Research. *Methods Mol Biol* 1817, 47–66. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8600-2_6
- Malladi, S., Macalinao, D.G., Jin, X., He, L., Basnet, H., Zou, Y., de Stanchina, E., Massagué, J., 2016. Metastatic Latency and Immune Evasion through Autocrine Inhibition of WNT. *Cell* 165, 45–60. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.02.025>
- Mamo, T., Mladek, A.C., Shogren, K.L., Gustafson, C., Gupta, S.K., Riester, S.M., Maran, A., Galindo, M., van Wijnen, A.J., Sarkaria, J.N., Yaszemski, M.J., 2017. Inhibiting DNA-PKCS Radiosensitizes Human Osteosarcoma Cells. *Biochem Biophys Res Commun* 486, 307–313. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.03.033>
- Manjili, M.H., 2017. Tumor dormancy and relapse: from a natural by-product of evolution to a disease state. *Cancer Res* 77, 2564–2569. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-0068>
- Mao, Z., Ke, Z., Gorbunova, V., Seluanov, A., 2012. Replicatively senescent cells are arrested in G1 and G2 phases. *Aging (Albany NY)* 4, 431–435. <https://doi.org/10.18632/aging.100467>
- Marech, I., Leporini, C., Ammendola, M., Porcelli, M., Gadaleta, C.D., Russo, E., De Sarro, G., Ranieri, G., 2016. Classical and non-classical proangiogenic factors as a target of antiangiogenic therapy in tumor microenvironment. *Cancer Lett* 380, 216–226. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.07.028>
- Marinoff, A.E., Spurr, L.F., Fong, C., Li, Y.Y., Forrest, S.J., Ward, A., Doan, D., Corson, L., Mauguen, A., Pinto, N., Maese, L., Colace, S., Macy, M.E., Kim, A., Sabnis, A.J., Applebaum, M.A., Laetsch, T.W., Glade-Bender, J., Weiser, D.A., Anderson, M., Crompton, B.D., Meyers, P., Zehir, A., MacConaill, L., Lindeman, N., Nowak, J.A.,

- Ladanyi, M., Church, A.J., Cherniack, A.D., Shukla, N., Janeway, K.A., 2023. Clinical Targeted Next-Generation Panel Sequencing Reveals MYC Amplification Is a Poor Prognostic Factor in Osteosarcoma. *JCO Precis Oncol* 7, e2200334. <https://doi.org/10.1200/PO.22.00334>
- Masiello, T., Dhall, A., Hemachandra, L.P.M., Tokranova, N., Melendez, J.A., Castracane, J., 2018. A Dynamic Culture Method to Produce Ovarian Cancer Spheroids under Physiologically-Relevant Shear Stress. *Cells* 7. <https://doi.org/10.3390/cells7120277>
- Matic, I., Matthews, B.G., Wang, X., Dymont, N.A., Worthley, D.L., Rowe, D.W., Grcevic, D., Kalajic, I., 2016. Quiescent Bone Lining Cells Are a Major Source of Osteoblasts During Adulthood. *Stem Cells* 34, 2930–2942. <https://doi.org/10.1002/stem.2474>
- Mavrogenis, A.F., Angelini, A., Ruggieri, P., 2022. Chapter 47 - Current therapeutic approaches of bone sarcomas, in: Heymann, D. (Ed.), *Bone Sarcomas and Bone Metastases - From Bench to Bedside (Third Edition)*. Academic Press, pp. 689–696. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821666-8.00044-X>
- Mayo, V., Bowles, A.C., Wubker, L.E., Ortiz, I., Cordoves, A.M., Cote, R.J., Correa, D., Agarwal, A., 2021. Human-derived osteoblast-like cells and pericyte-like cells induce distinct metastatic phenotypes in primary breast cancer cells. *Exp Biol Med (Maywood)* 246, 971–985. <https://doi.org/10.1177/1535370220971599>
- Mayor, P.C., Eng, K.H., Singel, K.L., Abrams, S.I., Odunsi, K., Moysich, K.B., Fuleihan, R., Garabedian, E., Lugar, P., Ochs, H.D., Bonilla, F.A., Buckley, R.H., Sullivan, K.E., Ballas, Z.K., Cunningham-Rundles, C., Segal, B.H., 2018. Cancer in primary immunodeficiency diseases: Cancer incidence in the United States Immune Deficiency Network Registry. *J Allergy Clin Immunol* 141, 1028–1035. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.05.024>
- McMurtrey, R.J., 2016. Analytic Models of Oxygen and Nutrient Diffusion, Metabolism Dynamics, and Architecture Optimization in Three-Dimensional Tissue Constructs with Applications and Insights in Cerebral Organoids. *Tissue Eng Part C Methods* 22, 221–249. <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2015.0375>
- Meng, S., Tripathy, D., Frenkel, E.P., Shete, S., Naftalis, E.Z., Huth, J.F., Beitsch, P.D., Leitch, M., Hoover, S., Euhus, D., Haley, B., Morrison, L., Fleming, T.P., Herlyn, D., Terstappen, L.W.M.M., Fehm, T., Tucker, T.F., Lane, N., Wang, J., Uhr, J.W., 2004. Circulating Tumor Cells in Patients with Breast Cancer Dormancy. *Clinical Cancer Research* 10, 8152–8162. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-1110>
- Mi, K., Wang, G., Liu, Z., Feng, Z., Huang, B., Zhao, X., 2009. Influence of a self-assembling peptide, RADA16, compared with collagen I and Matrigel on the malignant phenotype of human breast-cancer cells in 3D cultures and in vivo. *Macromol Biosci* 9, 437–443. <https://doi.org/10.1002/mabi.200800262>
- Miller, A.K., Brown, J.S., Enderling, H., Basanta, D., Whelan, C.J., 2021. The Evolutionary Ecology of Dormancy in Nature and in Cancer. *Frontiers in Ecology and Evolution* 9.
- Miller, C.P., Tsuchida, C., Zheng, Y., Himmelfarb, J., Akilesh, S., 2018. A 3D Human Renal Cell Carcinoma-on-a-Chip for the Study of Tumor Angiogenesis. *Neoplasia* 20, 610–620. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2018.02.011>
- Misaghi, A., Goldin, A., Awad, M., Kulidjian, A.A., 2018. Osteosarcoma: a comprehensive review. *SICOT J* 4, 12. <https://doi.org/10.1051/sicotj/2017028>
- Mohseny, A.B., Hogendoorn, P.C.W., 2011. Concise review: mesenchymal tumors: when stem cells go mad. *Stem Cells* 29, 397–403. <https://doi.org/10.1002/stem.596>
- Mohseny, A.B., Machado, I., Cai, Y., Schaefer, K.-L., Serra, M., Hogendoorn, P.C.W., Llombart-Bosch, A., Cleton-Jansen, A.-M., 2011. Functional characterization of osteosarcoma

- cell lines provides representative models to study the human disease. *Lab Invest* 91, 1195–1205. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2011.72>
- Müller, J., 1840. On the Nature and Structural Characteristics of Cancer, and of Those Morbid Growths Which May Be Confounded with It. *Med Chir Rev* 33, 119–148.
- Munoz-Garcia, J., Jubelin, C., Loussouarn, A., Goumard, M., Griscom, L., Renodon-Cornière, A., Heymann, M.-F., Heymann, D., 2021. In vitro three-dimensional cell cultures for bone sarcomas. *J Bone Oncol* 30, 100379. <https://doi.org/10.1016/j.jbo.2021.100379>
- Naba, A., Clauser, K.R., Whittaker, C.A., Carr, S.A., Tanabe, K.K., Hynes, R.O., 2014. Extracellular matrix signatures of human primary metastatic colon cancers and their metastases to liver. *BMC Cancer* 14, 518. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-518>
- Nader, E., Skinner, S., Romana, M., Fort, R., Lemonne, N., Guillot, N., Gauthier, A., Antoine-Jonville, S., Renoux, C., Hardy-Dessources, M.-D., Stauffer, E., Joly, P., Bertrand, Y., Connes, P., 2019. Blood Rheology: Key Parameters, Impact on Blood Flow, Role in Sickle Cell Disease and Effects of Exercise. *Frontiers in Physiology* 10, 1329. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.01329>
- Nagano, T., Itoh, S., Miyashita, Y., Shimagaki, T., Wang, H., Kurihara, T., Nagao, Y., Toshima, T., Harada, N., Kohashi, K., Ogata, Y., Oki, E., Oda, Y., Yoshizumi, T., Mori, M., 2021. Late recurrence of cancer stem cell-positive colorectal cancer liver metastases after 15 years. *Clin J Gastroenterol* 14, 613–616. <https://doi.org/10.1007/s12328-020-01330-1>
- Nair, A.K., Gautieri, A., Chang, S.-W., Buehler, M.J., 2013. Molecular mechanics of mineralized collagen fibrils in bone. *Nat Commun* 4, 1724. <https://doi.org/10.1038/ncomms2720>
- Nakamura, T., Kato, Y., Fuji, H., Horiuchi, T., Chiba, Y., Tanaka, K., 2003. E-cadherin-dependent intercellular adhesion enhances chemoresistance. *Int J Mol Med* 12, 693–700.
- Nakashima, K., Zhou, X., Kunkel, G., Zhang, Z., Deng, J.M., Behringer, R.R., de Crombrughe, B., 2002. The Novel Zinc Finger-Containing Transcription Factor Osterix Is Required for Osteoblast Differentiation and Bone Formation. *Cell* 108, 17–29. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00622-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00622-5)
- Naruse, M., Ochiai, M., Sekine, S., Taniguchi, H., Yoshida, T., Ichikawa, H., Sakamoto, H., Kubo, T., Matsumoto, K., Ochiai, A., Imai, T., 2021. Re-expression of REG family and DUOXs genes in CRC organoids by co-culturing with CAFs. *Sci Rep* 11, 2077. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-81475-2>
- Nath, S., Devi, G.R., 2016. Three-Dimensional Culture Systems in Cancer Research: Focus on Tumor Spheroid Model. *Pharmacol Ther* 163, 94–108. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.03.013>
- Naumov, G.N., Bender, E., Zurakowski, D., Kang, S.-Y., Sampson, D., Flynn, E., Watnick, R.S., Straume, O., Akslen, L.A., Folkman, J., Almog, N., 2006. A model of human tumor dormancy: an angiogenic switch from the nonangiogenic phenotype. *J Natl Cancer Inst* 98, 316–325. <https://doi.org/10.1093/jnci/djj068>
- Naumov, G.N., Townson, J.L., MacDonald, I.C., Wilson, S.M., Bramwell, V.H.C., Groom, A.C., Chambers, A.F., 2003. Ineffectiveness of doxorubicin treatment on solitary dormant mammary carcinoma cells or late-developing metastases. *Breast Cancer Res Treat* 82, 199–206. <https://doi.org/10.1023/B:BREA.0000004377.12288.3c>
- Nayak, B., Balachander, G.M., Manjunath, S., Rangarajan, A., Chatterjee, K., 2019. Tissue mimetic 3D scaffold for breast tumor-derived organoid culture toward personalized

BIBLIOGRAPHIE

- chemotherapy. *Colloids Surf B Biointerfaces* 180, 334–343. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.04.056>
- Nejman, D., Livyatan, I., Fuks, G., Gavert, N., Zwang, Y., Geller, L.T., Rotter-Maskowitz, A., Weiser, R., Mallel, G., Gigi, E., Meltser, A., Douglas, G.M., Kamer, I., Gopalakrishnan, V., Dadosh, T., Levin-Zaidman, S., Avnet, S., Atlan, T., Cooper, Z.A., Arora, R., Cogdill, A.P., Khan, M.A.W., Ologun, G., Bussi, Y., Weinberger, A., Lotan-Pompan, M., Golani, O., Perry, G., Rokah, M., Bahar-Shany, K., Rozeman, E.A., Blank, C.U., Ronai, A., Shaoul, R., Amit, A., Dorfman, T., Kremer, R., Cohen, Z.R., Harnof, S., Siegal, T., Yehuda-Shnaidman, E., Gal-Yam, E.N., Shapira, H., Baldini, N., Langille, M.G.I., Ben-Nun, A., Kaufman, B., Nissan, A., Golan, T., Dadiani, M., Levanon, K., Bar, J., Yust-Katz, S., Barshack, I., Peeper, D.S., Raz, D.J., Segal, E., Wargo, J.A., Sandbank, J., Shental, N., Straussman, R., 2020. The human tumor microbiome is composed of tumor type-specific intracellular bacteria. *Science* 368, 973–980. <https://doi.org/10.1126/science.aay9189>
- Nemir, S., West, J.L., 2010. Synthetic materials in the study of cell response to substrate rigidity. *Ann Biomed Eng* 38, 2–20. <https://doi.org/10.1007/s10439-009-9811-1>
- Netti, P.A., Berk, D.A., Swartz, M.A., Grodzinsky, A.J., Jain, R.K., 2000. Role of extracellular matrix assembly in interstitial transport in solid tumors. *Cancer Res* 60, 2497–2503.
- Nielsen, M., Thomsen, J.L., Primdahl, S., Dyreborg, U., Andersen, J.A., 1987. Breast cancer and atypia among young and middle-aged women: a study of 110 medicolegal autopsies. *Br J Cancer* 56, 814–819. <https://doi.org/10.1038/bjc.1987.296>
- Noel, P., Muñoz, R., Rogers, G.W., Neilson, A., Von Hoff, D.D., Han, H., 2017. Preparation and Metabolic Assay of 3-dimensional Spheroid Co-cultures of Pancreatic Cancer Cells and Fibroblasts. *J Vis Exp*. <https://doi.org/10.3791/56081>
- O'Donnell, J.S., Teng, M.W.L., Smyth, M.J., 2019. Cancer immunoediting and resistance to T cell-based immunotherapy. *Nat Rev Clin Oncol* 16, 151–167. <https://doi.org/10.1038/s41571-018-0142-8>
- Odri, G.A., Tchicaya-Bouanga, J., Yoon, D.J.Y., Modrowski, D., 2022. Metastatic Progression of Osteosarcomas: A Review of Current Knowledge of Environmental versus Oncogenic Drivers. *Cancers (Basel)* 14, 360. <https://doi.org/10.3390/cancers14020360>
- Office of the Surgeon General (US), 2004. The Basics of Bone in Health and Disease, Bone Health and Osteoporosis: A Report of the Surgeon General. Office of the Surgeon General (US).
- Ogasawara, N., Ohkura, Y., Ueno, M., Haruta, S., Nakayama, A., Fujii, T., Honda, A., Tanaka, T., Udagawa, H., 2020. Late recurrence of gastric carcinoma 15 years after surgery. *Clin J Gastroenterol* 13, 746–753. <https://doi.org/10.1007/s12328-020-01143-2>
- Ohta, Y., Fujii, M., Takahashi, S., Takano, A., Nanki, K., Matano, M., Hanyu, H., Saito, M., Shimokawa, M., Nishikori, S., Hatano, Y., Ishii, R., Sawada, K., Machinaga, A., Ikeda, W., Imamura, T., Sato, T., 2022. Cell-matrix interface regulates dormancy in human colon cancer stem cells. *Nature* 608, 784–794. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-05043-y>
- Ollivier, L., Supiot, S., Valentine, M., Emmanuel, J., 2022. Chapter 51 - Radiation therapy for primary bone tumors, in: Heymann, D. (Ed.), *Bone Sarcomas and Bone Metastases - From Bench to Bedside (Third Edition)*. Academic Press, pp. 727–753. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821666-8.00021-9>

- Olovnikov, A.M., 1996. Telomeres, telomerase, and aging: Origin of the theory. *Experimental Gerontology* 31, 443–448. [https://doi.org/10.1016/0531-5565\(96\)00005-8](https://doi.org/10.1016/0531-5565(96)00005-8)
- Ong, S.-M., Zhao, Z., Arooz, T., Zhao, D., Zhang, S., Du, T., Wasser, M., van Noort, D., Yu, H., 2010. Engineering a scaffold-free 3D tumor model for in vitro drug penetration studies. *Biomaterials* 31, 1180–1190. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.10.049>
- Ootani, A., Li, X., Sangiorgi, E., Ho, Q.T., Ueno, H., Toda, S., Sugihara, H., Fujimoto, K., Weissman, I.L., Capecchi, M.R., Kuo, C.J., 2009. Sustained in vitro intestinal epithelial culture within a Wnt-dependent stem cell niche. *Nat Med* 15, 701–706. <https://doi.org/10.1038/nm.1951>
- Ottaviani, G., Jaffe, N., 2009a. The epidemiology of osteosarcoma. *Cancer Treat Res* 152, 3–13. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0284-9_1
- Ottaviani, G., Jaffe, N., 2009b. The etiology of osteosarcoma. *Cancer Treat Res* 152, 15–32. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0284-9_2
- Owen, K.L., Gearing, L.J., Zanker, D.J., Brockwell, N.K., Khoo, W.H., Roden, D.L., Cmero, M., Mangiola, S., Hong, M.K., Spurling, A.J., McDonald, M., Chan, C., Pasam, A., Lyons, R.J., Duivenvoorden, H.M., Ryan, A., Butler, L.M., Mariadason, J.M., Giang Phan, T., Hayes, V.M., Sandhu, S., Swarbrick, A., Corcoran, N.M., Hertzog, P.J., Croucher, P.I., Hovens, C., Parker, B.S., 2020. Prostate cancer cell-intrinsic interferon signaling regulates dormancy and metastatic outgrowth in bone. *EMBO Rep* 21, e50162. <https://doi.org/10.15252/embr.202050162>
- Ozturk, S., Gorgun, C., Gokalp, S., Vatansever, S., Sendemir, A., 2020. Development and characterization of cancer stem cell-based tumoroids as an osteosarcoma model. *Biotechnol Bioeng* 117, 2527–2539. <https://doi.org/10.1002/bit.27381>
- Palikuqi, B., Nguyen, D.-H.T., Li, G., Schreiner, R., Pellegata, A.F., Liu, Y., Redmond, D., Geng, F., Lin, Y., Gómez-Salineró, J.M., Yokoyama, M., Zumbo, P., Zhang, T., Kunar, B., Witherspoon, M., Han, T., Tedeschi, A.M., Scottoni, F., Lipkin, S.M., Dow, L., Elemento, O., Xiang, J.Z., Shido, K., Spence, J.R., Zhou, Q.J., Schwartz, R.E., De Coppi, P., Rabbany, S.Y., Rafii, S., 2020. Adaptable haemodynamic endothelial cells for organogenesis and tumorigenesis. *Nature* 1–7. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2712-z>
- Pan, H., Gray, R., Braybrooke, J., Davies, C., Taylor, C., McGale, P., Peto, R., Pritchard, K.I., Bergh, J., Dowsett, M., Hayes, D.F., 2017. 20-Year Risks of Breast-Cancer Recurrence after Stopping Endocrine Therapy at 5 Years. *New England Journal of Medicine* 377, 1836–1846. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1701830>
- Panigrahi, A.K., Zhang, N., Otta, S.K., Pati, D., 2012. A cohesin-RAD21 interactome. *Biochem J* 442, 661–670. <https://doi.org/10.1042/BJ20111745>
- Parreno, J., Nabavi Niaki, M., Andrejevic, K., Jiang, A., Wu, P.-H., Kandel, R.A., 2017. Interplay between cytoskeletal polymerization and the chondrogenic phenotype in chondrocytes passaged in monolayer culture. *J Anat* 230, 234–248. <https://doi.org/10.1111/joa.12554>
- Pasch, C.A., Favreau, P.F., Yueh, A.E., Babiarez, C.P., Gillette, A.A., Sharick, J.T., Karim, M.R., Nickel, K.P., DeZeeuw, A.K., Sprackling, C.M., Emmerich, P.B., DeStefanis, R.A., Pitera, R.T., Payne, S.N., Korkos, D.P., Clipson, L., Walsh, C.M., Miller, D., Carchman, E.H., Burkard, M.E., Lemmon, K.K., Matkowskyj, K.A., Newton, M.A., Ong, I.M., Bassetti, M.F., Kimple, R.J., Skala, M.C., Deming, D.A., 2019. Patient-derived cancer organoid

BIBLIOGRAPHIE

- cultures to predict sensitivity to chemotherapy and radiation. *Clin Cancer Res* 25, 5376–5387. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-3590>
- Payne, K.K., Keim, R.C., Graham, L., Idowu, M.O., Wan, W., Wang, X.-Y., Toor, A.A., Bear, H.D., Manjili, M.H., 2016. Tumor-reactive immune cells protect against metastatic tumor and induce immunoediting of indolent but not quiescent tumor cells. *Journal of Leukocyte Biology* 100, 625–635. <https://doi.org/10.1189/jlb.5A1215-580R>
- Pedersen, R.N., Esen, B.Ö., Mellekjær, L., Christiansen, P., Ejlersen, B., Lash, T.L., Nørgaard, M., Cronin-Fenton, D., 2022. The Incidence of Breast Cancer Recurrence 10-32 Years After Primary Diagnosis. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* 114, 391–399. <https://doi.org/10.1093/jnci/djab202>
- Pellegrini, E., Desando, G., Petretta, M., Cellamare, A., Cristalli, C., Pasello, M., Manara, M.C., Grigolo, B., Scotlandi, K., 2022. A 3D Collagen-Based Bioprinted Model to Study Osteosarcoma Invasiveness and Drug Response. *Polymers (Basel)* 14, 4070. <https://doi.org/10.3390/polym14194070>
- Perdana, N.R., Mochtar, C.A., Umbas, R., Hamid, A.R.A., 2016. The Risk Factors of Prostate Cancer and Its Prevention: A Literature Review. *Acta Med Indones* 48, 228–238.
- Pescarini, E., Spanikova, G., Mbaidjol, Z., De Antoni, E., Vindigni, V., Bassetto, F., 2020. Late Metastatic Melanoma after 25 Years: A Case Report and a Brief Literature Review. *Case Rep Surg* 2020, 2938236. <https://doi.org/10.1155/2020/2938236>
- Petta, D., Armiento, A.R., Grijpma, D., Alini, M., Eglin, D., D’Este, M., 2018. 3D bioprinting of a hyaluronan bioink through enzymatic-and visible light-crosslinking. *Biofabrication* 10, 044104. <https://doi.org/10.1088/1758-5090/aadf58>
- Ping, Y.-F., Bian, X.-W., 2011. Concise review: Contribution of cancer stem cells to neovascularization. *Stem Cells* 29, 888–894. <https://doi.org/10.1002/stem.650>
- Pinto, M.L., Rios, E., Silva, A.C., Neves, S.C., Caires, H.R., Pinto, A.T., Durães, C., Carvalho, F.A., Cardoso, A.P., Santos, N.C., Barrias, C.C., Nascimento, D.S., Pinto-do-Ó, P., Barbosa, M.A., Carneiro, F., Oliveira, M.J., 2017. Decellularized human colorectal cancer matrices polarize macrophages towards an anti-inflammatory phenotype promoting cancer cell invasion via CCL18. *Biomaterials* 124, 211–224. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.02.004>
- Poon, C., 2020. Measuring the density and viscosity of culture media for optimized computational fluid dynamics analysis of in vitro devices. <https://doi.org/10.1101/2020.08.25.266221>
- Pradhan, S., Slater, J.H., 2019. Fabrication, characterization, and implementation of engineered hydrogels for controlling breast cancer cell phenotype and dormancy. *MethodsX* 6, 2744–2766. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2019.11.011>
- Price, T.T., Burness, M.L., Sivan, A., Warner, M.J., Cheng, R., Lee, C.H., Olivere, L., Comatas, K., Magnani, J., Kim Lyerly, H., Cheng, Q., McCall, C.M., Sipkins, D.A., 2016. Dormant breast cancer micrometastases reside in specific bone marrow niches that regulate their transit to and from bone. *Sci Transl Med* 8, 340ra73. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aad4059>
- Qin, X., Yan, M., Zhang, J., Wang, X., Shen, Z., Lv, Z., Li, Z., Wei, W., Chen, W., 2016. TGFβ3-mediated induction of Periostin facilitates head and neck cancer growth and is associated with metastasis. *Sci Rep* 6, 20587. <https://doi.org/10.1038/srep20587>
- Raghavan, S., Mehta, P., Horst, E.N., Ward, M.R., Rowley, K.R., Mehta, G., 2016a. Comparative analysis of tumor spheroid generation techniques for differential in

BIBLIOGRAPHIE

- vitro drug toxicity. *Oncotarget* 7, 16948–16961. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7659>
- Raghavan, S., Mehta, P., Horst, E.N., Ward, M.R., Rowley, K.R., Mehta, G., 2016b. Comparative analysis of tumor spheroid generation techniques for differential in vitro drug toxicity. *Oncotarget* 7, 16948–16961. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7659>
- Ranganathan, A.C., Zhang, L., Adam, A.P., Aguirre-Ghiso, J.A., 2006. Functional Coupling of p38-Induced Up-regulation of BiP and Activation of RNA-Dependent Protein Kinase-Like Endoplasmic Reticulum Kinase to Drug Resistance of Dormant Carcinoma Cells. *Cancer Res* 66, 1702–1711. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-3092>
- Rao, S.S., Dejesus, J., Short, A.R., Otero, J.J., Sarkar, A., Winter, J.O., 2013. Glioblastoma behaviors in three-dimensional collagen-hyaluronan composite hydrogels. *ACS Appl Mater Interfaces* 5, 9276–9284. <https://doi.org/10.1021/am402097j>
- Ren, D., Dai, Y., Yang, Q., Zhang, X., Guo, W., Ye, L., Huang, S., Chen, X., Lai, Y., Du, H., Lin, C., Peng, X., Song, L., 2018. Wnt5a induces and maintains prostate cancer cells dormancy in bone. *Journal of Experimental Medicine* 216, 428–449. <https://doi.org/10.1084/jem.20180661>
- Rimann, M., Laternser, S., Gvozdenovic, A., Muff, R., Fuchs, B., Kelm, J.M., Graf-Hausner, U., 2014. An in vitro osteosarcoma 3D microtissue model for drug development. *J. Biotechnol.* 189, 129–135. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.09.005>
- Riss, T., Trask, O.J., 2021. Factors to consider when interrogating 3D culture models with plate readers or automated microscopes. *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Animal* 57, 238–256. <https://doi.org/10.1007/s11626-020-00537-3>
- Roberson, R.S., Kussick, S.J., Vallieres, E., Chen, S.-Y.J., Wu, D.Y., 2005. Escape from Therapy-Induced Accelerated Cellular Senescence in p53-Null Lung Cancer Cells and in Human Lung Cancers. *Cancer Research* 65, 2795–2803. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-1270>
- Rocca, V., Blandino, G., D’Antona, L., Iuliano, R., Di Agostino, S., 2022. Li-Fraumeni Syndrome: Mutation of TP53 Is a Biomarker of Hereditary Predisposition to Tumor: New Insights and Advances in the Treatment. *Cancers (Basel)* 14, 3664. <https://doi.org/10.3390/cancers14153664>
- Rohwer, N., Cramer, T., 2011. Hypoxia-mediated drug resistance: novel insights on the functional interaction of HIFs and cell death pathways. *Drug Resist Updat* 14, 191–201. <https://doi.org/10.1016/j.drup.2011.03.001>
- Rolfs, Z., Frey, B.L., Shi, X., Kawai, Y., Smith, L.M., Welham, N.V., 2021. An atlas of protein turnover rates in mouse tissues. *Nat Commun* 12, 6778. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-26842-3>
- Roulis, M., Kaklamanos, A., Schernthanner, M., Bielecki, P., Zhao, J., Kaffe, E., Frommelt, L.-S., Qu, R., Knapp, M.S., Henriques, A., Chalkidi, N., Koliaraki, V., Jiao, J., Brewer, J.R., Bacher, M., Blackburn, H.N., Zhao, X., Breyer, R.M., Aidinis, V., Jain, D., Su, B., Herschman, H.R., Kluger, Y., Kollias, G., Flavell, R.A., 2020. Paracrine orchestration of intestinal tumorigenesis by a mesenchymal niche. *Nature* 580, 524–529. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2166-3>
- Rouschop, K.M.A., van den Beucken, T., Dubois, L., Niessen, H., Bussink, J., Savelkoul, K., Keulers, T., Mujcic, H., Landuyt, W., Voncken, J.W., Lambin, P., van der Kogel, A.J., Koritzinsky, M., Wouters, B.G., 2010. The unfolded protein response protects human

BIBLIOGRAPHIE

- tumor cells during hypoxia through regulation of the autophagy genes MAP1LC3B and ATG5. *J Clin Invest* 120, 127–141. <https://doi.org/10.1172/JCI40027>
- Rousselle, A.-V., Heymann, D., 2002. Osteoclastic acidification pathways during bone resorption. *Bone* 30, 533–540. [https://doi.org/10.1016/s8756-3282\(02\)00672-5](https://doi.org/10.1016/s8756-3282(02)00672-5)
- Rusinova, I., Forster, S., Yu, S., Kannan, A., Masse, M., Cumming, H., Chapman, R., Hertzog, P.J., 2013. Interferome v2.0: an updated database of annotated interferon-regulated genes. *Nucleic Acids Res* 41, D1040-1046. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1215>
- Rutz, A.L., Hyland, K.E., Jakus, A.E., Burghardt, W.R., Shah, R.N., 2015. A multimaterial bioink method for 3D printing tunable, cell-compatible hydrogels. *Adv Mater* 27, 1607–1614. <https://doi.org/10.1002/adma.201405076>
- Sakr, W.A., Haas, G.P., Cassin, B.F., Pontes, J.E., Crissman, J.D., 1993. The frequency of carcinoma and intraepithelial neoplasia of the prostate in young male patients. *J Urol* 150, 379–385. [https://doi.org/10.1016/s0022-5347\(17\)35487-3](https://doi.org/10.1016/s0022-5347(17)35487-3)
- Salaroglio, I.C., Panada, E., Moiso, E., Buondonno, I., Provero, P., Rubinstein, M., Kopecka, J., Riganti, C., 2017. PERK induces resistance to cell death elicited by endoplasmic reticulum stress and chemotherapy. *Mol Cancer* 16, 91. <https://doi.org/10.1186/s12943-017-0657-0>
- Saleh, T., Tyutyunyk-Massey, L., Murray, G.F., Alotaibi, M.R., Kawale, A.S., Elsayed, Z., Henderson, S.C., Yakovlev, V., Elmore, L.W., Toor, A., Harada, H., Reed, J., Landry, J.W., Gewirtz, D.A., 2019. Tumor cell escape from therapy-induced senescence. *Biochemical Pharmacology, Canonical, non-canonical and immunogenic cell death: Basic mechanisms and translational applications* 162, 202–212. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.12.013>
- Santoni-Rugiu, P., Sykes, P.J. (Eds.), 2007. Healing of Wounds and the Development of Surgery, in: *A History of Plastic Surgery*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 39–78. https://doi.org/10.1007/978-3-540-46241-5_2
- Saravanan, S., Vimalraj, S., Pavani, K., Nikarika, R., Sumantran, V.N., 2020. Intussusceptive angiogenesis as a key therapeutic target for cancer therapy. *Life Sci* 252, 117670. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117670>
- Sarkar, S., Peng, C.-C., Tung, Y.-C., 2020. Comparison of VEGF-A secretion from tumor cells under cellular stresses in conventional monolayer culture and microfluidic three-dimensional spheroid models. *PLoS One* 15, e0240833. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240833>
- Saudemont, A., Quesnel, B., 2004. In a model of tumor dormancy, long-term persistent leukemic cells have increased B7-H1 and B7.1 expression and resist CTL-mediated lysis. *Blood* 104, 2124–2133. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-01-0064>
- Schmidt, M., Lu, Y., Parant, J.M., Lozano, G., Bacher, G., Beckers, T., Fan, Z., 2001. Differential roles of p21(Waf1) and p27(Kip1) in modulating chemosensitivity and their possible application in drug discovery studies. *Mol Pharmacol* 60, 900–906. <https://doi.org/10.1124/mol.60.5.900>
- Schofield, R., 1978. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells* 4, 7–25.
- Schreiber, R.D., Old, L.J., Smyth, M.J., 2011. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* 331, 1565–1570. <https://doi.org/10.1126/science.1203486>

- Schroeder, T.M., Jensen, E.D., Westendorf, J.J., 2005. Runx2: A master organizer of gene transcription in developing and maturing osteoblasts. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews* 75, 213–225. <https://doi.org/10.1002/bdrc.20043>
- Schuster, B., Junkin, M., Kashaf, S.S., Romero-Calvo, I., Kirby, K., Matthews, J., Weber, C.R., Rzhetsky, A., White, K.P., Tay, S., 2020. Automated microfluidic platform for dynamic and combinatorial drug screening of tumor organoids. *Nat Commun* 11, 5271. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19058-4>
- Schwann, T., 1839. *Mikroskopische Untersuchungen über die Uebereinstimmung in der Struktur und dem Wachsthum der Thiere und Pflanzen*. Sander.
- Schwann, T., Schleyden, M.J., 1847. *Microscopical researches into the accordance in the structure and growth of animals and plants*. Printed for the Sydenham Society, London.
- Senthebane, D.A., Jonker, T., Rowe, A., Thomford, N.E., Munro, D., Dandara, C., Wonkam, A., Govender, D., Calder, B., Soares, N.C., Blackburn, J.M., Parker, M.I., Dzobo, K., 2018. The Role of Tumor Microenvironment in Chemoresistance: 3D Extracellular Matrices as Accomplices. *Int J Mol Sci* 19. <https://doi.org/10.3390/ijms19102861>
- Seppälä, T.T., Zimmerman, J.W., Sereni, E., Plenker, D., Suri, R., Rozich, N., Blair, A., Thomas, D.L., Teinor, J., Javed, A., Patel, H., Cameron, J.L., Burns, W.R., He, J., Tuveson, D.A., Jaffee, E.M., Eshleman, J., Szabolcs, A., Ryan, D.P., Ting, D.T., Wolfgang, C.L., Burkhart, R.A., 2020. Patient-derived organoid pharmacotyping is a clinically tractable strategy for precision medicine in pancreatic cancer. *Ann Surg* 272, 427–435. <https://doi.org/10.1097/SLA.0000000000004200>
- Shaker, J.L., Deftos, L., 2000. Calcium and Phosphate Homeostasis, in: Feingold, K.R., Anawalt, B., Blackman, M.R., Boyce, A., Chrousos, G., Corpas, E., de Herder, W.W., Dhatariya, K., Dungan, K., Hofland, J., Kalra, S., Kaltsas, G., Kapoor, N., Koch, C., Kopp, P., Korbonits, M., Kovacs, C.S., Kuohung, W., Laferrère, B., Levy, M., McGee, E.A., McLachlan, R., New, M., Purnell, J., Sahay, R., Singer, F., Sperling, M.A., Stratakis, C.A., Trencé, D.L., Wilson, D.P. (Eds.), *Endotext*. MDText.com, Inc., South Dartmouth (MA).
- Shankaran, V., Ikeda, H., Bruce, A.T., White, J.M., Swanson, P.E., Old, L.J., Schreiber, R.D., 2001. IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 410, 1107–1111. <https://doi.org/10.1038/35074122>
- Shen, L., Zhao, K., Li, H., Ning, B., Wang, W., Liu, R., Zhang, Y., Zhang, A., 2019. Downregulation of UBE2T can enhance the radiosensitivity of osteosarcoma in vitro and in vivo. *Epigenomics* 11, 1283–1305. <https://doi.org/10.2217/epi-2019-0125>
- Shen, Y.-I., Abaci, H.E., Krupsi, Y., Weng, L.-C., Burdick, J.A., Gerecht, S., 2014. Hyaluronic acid hydrogel stiffness and oxygen tension affect cancer cell fate and endothelial sprouting. *Biomater Sci* 2, 655–665. <https://doi.org/10.1039/C3BM60274E>
- Shimizu, H., Takeishi, S., Nakatsumi, H., Nakayama, K.I., 2019. Prevention of cancer dormancy by Fbxw7 ablation eradicates disseminated tumor cells. *JCI Insight* 4. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.125138>
- Shimizu, T., Sugihara, E., Yamaguchi-Iwai, S., Tamaki, S., Koyama, Y., Kamel, W., Ueki, A., Ishikawa, T., Chiyoda, T., Osuka, S., Onishi, N., Ikeda, H., Kamei, J., Matsuo, K., Fukuchi, Y., Nagai, T., Toguchida, J., Toyama, Y., Muto, A., Saya, H., 2014. IGF2 preserves osteosarcoma cell survival by creating an autophagic state of dormancy that protects cells against chemotherapeutic stress. *Cancer Res* 74, 6531–6541. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-0914>

BIBLIOGRAPHIE

- Shiozawa, Y., Pedersen, E.A., Havens, A.M., Jung, Y., Mishra, A., Joseph, J., Kim, J.K., Patel, L.R., Ying, C., Ziegler, A.M., Pienta, M.J., Song, J., Wang, J., Loberg, R.D., Krebsbach, P.H., Pienta, K.J., Taichman, R.S., 2011. Human prostate cancer metastases target the hematopoietic stem cell niche to establish footholds in mouse bone marrow. *J Clin Invest* 121, 1298–1312. <https://doi.org/10.1172/JCI43414>
- Shoulders, M.D., Raines, R.T., 2009. Collagen structure and stability. *Annu Rev Biochem* 78, 929–958. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.77.032207.120833>
- Sieh, S., Taubenberger, A.V., Rizzi, S.C., Sadowski, M., Lehman, M.L., Rockstroh, A., An, J., Clements, J.A., Nelson, C.C., Hutmacher, D.W., 2012. Phenotypic characterization of prostate cancer LNCaP cells cultured within a bioengineered microenvironment. *PLoS One* 7, e40217. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040217>
- Sizemore, G.M., Pitarresi, J.R., Balakrishnan, S., Ostrowski, M.C., 2017. The ETS family of oncogenic transcription factors in solid tumours. *Nat Rev Cancer* 17, 337–351. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.20>
- Smeland, S., Bielack, S.S., Whelan, J., Bernstein, M., Hogendoorn, P., Krailo, M.D., Gorlick, R., Janeway, K.A., Ingleby, F.C., Anninga, J., Antal, I., Arndt, C., Brown, K.L.B., Butterfass-Bahloul, T., Calaminus, G., Capra, M., Dhooge, C., Eriksson, M., Flanagan, A.M., Friedel, G., Gebhardt, M.C., Gelderblom, H., Goldsby, R., Grier, H.E., Grimer, R., Hawkins, D.S., Hecker-Nolting, S., Sundby Hall, K., Isakoff, M.S., Jovic, G., Kühne, T., Kager, L., von Kalle, T., Kabickova, E., Lang, S., Lau, C.C., Leavey, P.J., Lessnick, S.L., Mascarenhas, L., Mayer-Steinacker, R., Meyers, P.A., Nagarajan, R., Randall, R.L., Reichardt, P., Renard, M., Rechnitzer, C., Schwartz, C.L., Strauss, S., Teot, L., Timmermann, B., Sydes, M.R., Marina, N., 2019. Survival and prognosis with osteosarcoma: outcomes in more than 2000 patients in the EURAMOS-1 (European and American Osteosarcoma Study) cohort. *Eur J Cancer* 109, 36–50. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2018.11.027>
- Smida, J., Xu, H., Zhang, Y., Baumhoer, D., Ribí, S., Kovac, M., von Luetlichau, I., Bielack, S., O’Leary, V.B., Leib-Mösch, C., Frishman, D., Nathrath, M., 2017. Genome-wide analysis of somatic copy number alterations and chromosomal breakages in osteosarcoma. *Int J Cancer* 141, 816–828. <https://doi.org/10.1002/ijc.30778>
- Smyrek, I., Stelzer, E.H.K., 2017. Quantitative three-dimensional evaluation of immunofluorescence staining for large whole mount spheroids with light sheet microscopy. *Biomed Opt Express* 8, 484–499. <https://doi.org/10.1364/BOE.8.000484>
- Solon, J., Levental, I., Sengupta, K., Georges, P.C., Janmey, P.A., 2007. Fibroblast adaptation and stiffness matching to soft elastic substrates. *Biophys J* 93, 4453–4461. <https://doi.org/10.1529/biophysj.106.101386>
- Song, H., Han, Y.-Z., Cai, G.-H., Tang, F.-S., Yang, Z.-H., Ao, D.-S., Zhou, A., 2015. The effects of self-assembling peptide RADA16 hydrogel on malignant phenotype of human hepatocellular carcinoma cell. *Int J Clin Exp Med* 8, 14906–14915.
- Sonoda, D., Matsuura, Y., Ichinose, J., Nakao, M., Ninomiya, H., Mun, M., Ishikawa, Y., Nakagawa, K., Satoh, Y., Okumura, S., 2019. Ultra-late recurrence of non-small cell lung cancer over 10 years after curative resection. *Cancer Manag Res* 11, 6765–6774. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S213553>
- Sosa, M.S., Parikh, F., Maia, A.G., Estrada, Y., Bosch, A., Bragado, P., Ekpin, E., George, A., Zheng, Y., Lam, H.-M., Morrissey, C., Chung, C.-Y., Farias, E.F., Bernstein, E., Aguirre-Ghiso, J.A., 2015. NR2F1 controls tumor cell dormancy via SOX9 and RAR β driven quiescence programs. *Nat Commun* 6, 6170. <https://doi.org/10.1038/ncomms7170>

BIBLIOGRAPHIE

- Souza, G.R., Molina, J.R., Raphael, R.M., Ozawa, M.G., Stark, D.J., Levin, C.S., Bronk, L.F., Ananta, J.S., Mandelin, J., Georgescu, M.-M., Bankson, J.A., Gelovani, J.G., Killian, T.C., Arap, W., Pasqualini, R., 2010. Three-dimensional tissue culture based on magnetic cell levitation. *Nat Nanotechnol* 5, 291–296. <https://doi.org/10.1038/nnano.2010.23>
- Stöhr, D., Schmid, J.O., Beigl, T.B., Mack, A., Maichl, D.S., Cao, K., Budai, B., Fullstone, G., Kontermann, R.E., Mürdter, T.E., Tait, S.W.G., Hagenlocher, C., Pollak, N., Scheurich, P., Rehm, M., 2020. Stress-induced TRAILR2 expression overcomes TRAIL resistance in cancer cell spheroids. *Cell Death Differ* 27, 3037–3052. <https://doi.org/10.1038/s41418-020-0559-3>
- Strauss, S.J., Frezza, A.M., Abecassis, N., Bajpai, J., Bauer, S., Biagini, R., Bielack, S., Blay, J.Y., Bolle, S., Bonvalot, S., Boukovinas, I., Bovee, J.V.M.G., Boye, K., Brennan, B., Brodowicz, T., Buonadonna, A., Álava, E. de, Tos, A.P.D., Muro, X.G. del, Dufresne, A., Eriksson, M., Fagioli, F., Fedenko, A., Ferraresi, V., Ferrari, A., Gaspar, N., Gasperoni, S., Gelderblom, H., Gouin, F., Grignani, G., Gronchi, A., Haas, R., Hassan, A.B., Hecker-Nolting, S., Hindi, N., Hohenberger, P., Joensuu, H., Jones, R.L., Jungels, C., Jutte, P., Kager, L., Kasper, B., Kawai, A., Kopeckova, K., Krákorová, D.A., Cesne, A.L., Grange, F.L., Legius, E., Leithner, A., Pousa, A.L., Martin-Broto, J., Merimsky, O., Messiou, C., Miah, A.B., Mir, O., Montemurro, M., Morland, B., Morosi, C., Palmerini, E., Pantaleo, M.A., Piana, R., Piperno-Neumann, S., Reichardt, P., Rutkowski, P., Safwat, A.A., Sangalli, C., Sbaraglia, M., Scheipl, S., Schöffski, P., Sleijfer, S., Strauss, D., Hall, K.S., Trama, A., Unk, M., Sande, M.A.J. van de, Graaf, W.T.A. van der, Houdt, W.J. van, Frebourg, T., Ladenstein, R., Casali, P.G., Stacchiotti, S., 2021. Bone sarcomas: ESMO–EURACAN–GENTURIS–ERN PaedCan Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up☆. *Annals of Oncology* 32, 1520–1536. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2021.08.1995>
- Summers, M.A., McDonald, M.M., Croucher, P.I., 2020. Cancer Cell Dormancy in Metastasis. *Cold Spring Harb Perspect Med* 10, a037556. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a037556>
- Sun, L.-Q., Lee, D.W., Zhang, Q., Xiao, W., Raabe, E.H., Meeker, A., Miao, D., Huso, D.L., Arceci, R.J., 2004. Growth retardation and premature aging phenotypes in mice with disruption of the SNF2-like gene, PASG. *Genes Dev* 18, 1035–1046. <https://doi.org/10.1101/gad.1176104>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R.L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., Bray, F., 2021. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 71, 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Suzuki, Y., Yamaguchi, Y., Hanada, H., Ishimi, Y., 2019. Changes in MCM2-7 proteins at senescence. *Genes Genet Syst* 94, 123–132. <https://doi.org/10.1266/ggs.18-00062>
- Syedbasha, M., Bonfiglio, F., Linnik, J., Stuehler, C., Wüthrich, D., Egli, A., 2020. Interferon- λ Enhances the Differentiation of Naive B Cells into Plasmablasts via the mTORC1 Pathway. *Cell Reports* 33, 108211. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108211>
- Szczepek, B., Szymańska, D., Decker, E., Wasowska, H., Slupek, A., Rowińska-Zakrzewska, E., 1994. Risk of late recurrence and/or second lung cancer after treatment of patients with small cell lung cancer (SCLC). *Lung Cancer* 11, 93–104. [https://doi.org/10.1016/0169-5002\(94\)90286-0](https://doi.org/10.1016/0169-5002(94)90286-0)
- Szklarczyk, D., Kirsch, R., Koutrouli, M., Nastou, K., Mehryary, F., Hachilif, R., Gable, A.L., Fang, T., Doncheva, N.T., Pyysalo, S., Bork, P., Jensen, L.J., von Mering, C., 2022. The

BIBLIOGRAPHIE

- STRING database in 2023: protein–protein association networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest. *Nucleic Acids Res* 51, D638–D646. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1000>
- Szot, C.S., Buchanan, C.F., Freeman, J.W., Rylander, M.N., 2011. 3D in vitro bioengineered tumors based on collagen I hydrogels. *Biomaterials* 32, 7905–7912. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.07.001>
- Tan, P.H.S., Aung, K.Z., Toh, S.L., Goh, J.C.H., Nathan, S.S., 2011. Three-dimensional porous silk tumor constructs in the approximation of in vivo osteosarcoma physiology. *Biomaterials* 32, 6131–6137. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.04.084>
- Tang, Y., Huang, B., Dong, Y., Wang, W., Zheng, X., Zhou, W., Zhang, K., Du, Z., 2017. Three-dimensional prostate tumor model based on a hyaluronic acid-alginate hydrogel for evaluation of anti-cancer drug efficacy. *J Biomater Sci Polym Ed* 28, 1603–1616. <https://doi.org/10.1080/09205063.2017.1338502>
- Tao, Y., Li, R., Shen, C., Li, J., Zhang, Q., Ma, Z., Wang, F., Wang, Z., 2020. SENP1 is a crucial promotor for hepatocellular carcinoma through deSUMOylation of UBE2T. *Aging (Albany NY)* 12, 1563–1576. <https://doi.org/10.18632/aging.102700>
- Tchoryk, A., Taresco, V., Argent, R.H., Ashford, M., Gellert, P.R., Stolnik, S., Grabowska, A., Garnett, M.C., 2019. Penetration and Uptake of Nanoparticles in 3D Tumor Spheroids. *Bioconjug Chem* 30, 1371–1384. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.9b00136>
- Tellez-Gabriel, M., Cochonneau, D., Cadé, M., Jubellin, C., Heymann, M.-F., Heymann, D., 2018. Circulating Tumor Cell-Derived Pre-Clinical Models for Personalized Medicine. *Cancers (Basel)* 11. <https://doi.org/10.3390/cancers11010019>
- Tellez-Gabriel, M., Ory, B., Lamoureux, F., Heymann, M.-F., Heymann, D., 2016. Tumour Heterogeneity: The Key Advantages of Single-Cell Analysis. *Int J Mol Sci* 17, 2142. <https://doi.org/10.3390/ijms17122142>
- Teng, M.W.L., Swann, J.B., Koebel, C.M., Schreiber, R.D., Smyth, M.J., 2008. Immune-mediated dormancy: an equilibrium with cancer. *Journal of Leukocyte Biology* 84, 988–993. <https://doi.org/10.1189/jlb.1107774>
- Thakuri, P.S., Gupta, M., Plaster, M., Tavana, H., 2019. Quantitative Size-Based Analysis of Tumor Spheroids and Responses to Therapeutics. *ASSAY and Drug Development Technologies* 17, 140–149. <https://doi.org/10.1089/adt.2018.895>
- Thippabhotla, S., Zhong, C., He, M., 2019. 3D cell culture stimulates the secretion of in vivo like extracellular vesicles. *Sci Rep* 9, 13012. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49671-3>
- Thurber, G.M., Wittrup, K.D., 2008. Quantitative spatiotemporal analysis of antibody fragment diffusion and endocytic consumption in tumor spheroids. *Cancer Res* 68, 3334–3341. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-3018>
- Tivari, S., Lu, H., Dasgupta, T., De Lorenzo, M.S., Wieder, R., 2018. Reawakening of dormant estrogen-dependent human breast cancer cells by bone marrow stroma secretory senescence. *Cell Commun Signal* 16, 48. <https://doi.org/10.1186/s12964-018-0259-5>
- Tsai, A.-C., Liu, Y., Yuan, X., Ma, T., 2015. Compaction, Fusion, and Functional Activation of Three-Dimensional Human Mesenchymal Stem Cell Aggregate. *Tissue Eng Part A* 21, 1705–1719. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2014.0314>
- Tsai, C.-C., Chen, Y.-J., Yew, T.-L., Chen, L.-L., Wang, J.-Y., Chiu, C.-H., Hung, S.-C., 2011. Hypoxia inhibits senescence and maintains mesenchymal stem cell properties

BIBLIOGRAPHIE

- through down-regulation of E2A-p21 by HIF-TWIST. *Blood* 117, 459–469. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-05-287508>
- Tsao, C.-T., Kievit, F.M., Wang, K., Erickson, A.E., Ellenbogen, R.G., Zhang, M., 2014. Chitosan-based thermoreversible hydrogel as an in vitro tumor microenvironment for testing breast cancer therapies. *Mol Pharm* 11, 2134–2142. <https://doi.org/10.1021/mp5002119>
- Tung, Y.-C., Hsiao, A.Y., Allen, S.G., Torisawa, Y., Ho, M., Takayama, S., 2011. High-throughput 3D spheroid culture and drug testing using a 384 hanging drop array. *Analyst* 136, 473–478. <https://doi.org/10.1039/c0an00609b>
- Vallette, F.M., Olivier, C., Lézot, F., Oliver, L., Cochonneau, D., Laliér, L., Cartron, P.-F., Heymann, D., 2019. Dormant, quiescent, tolerant and persister cells: Four synonyms for the same target in cancer. *Biochem Pharmacol* 162, 169–176. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.11.004>
- van Bezooijen, R.L., Svensson, J.P., Eefting, D., Visser, A., van der Horst, G., Karperien, M., Quax, P.H.A., Vrieling, H., Papapoulos, S.E., ten Dijke, P., Löwik, C.W.G.M., 2007. Wnt but not BMP signaling is involved in the inhibitory action of sclerostin on BMP-stimulated bone formation. *J Bone Miner Res* 22, 19–28. <https://doi.org/10.1359/jbmr.061002>
- van de Wouw, A.J., Janssen-Heijnen, M.L.G., Coebergh, J.W.W., Hillen, H.F.P., 2002. Epidemiology of unknown primary tumours; incidence and population-based survival of 1285 patients in Southeast Netherlands, 1984-1992. *Eur J Cancer* 38, 409–413. [https://doi.org/10.1016/s0959-8049\(01\)00378-1](https://doi.org/10.1016/s0959-8049(01)00378-1)
- Vera-Ramirez, L., Vodnala, S.K., Nini, R., Hunter, K.W., Green, J.E., 2018. Autophagy promotes the survival of dormant breast cancer cells and metastatic tumour recurrence. *Nat Commun* 9, 1944. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04070-6>
- Visvader, J.E., Lindeman, G.J., 2008. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat Rev Cancer* 8, 755–768. <https://doi.org/10.1038/nrc2499>
- Wang, D., Tang, L., Wu, H., Wang, K., Gu, D., 2018. MiR-127-3p inhibits cell growth and invasiveness by targeting ITGA6 in human osteosarcoma. *IUBMB Life* 70, 411–419. <https://doi.org/10.1002/iub.1710>
- Wang, J., Sun, C., Li, J., Jiang, H., Qiu, Y., Gong, M., 2022. Knockdown of ETV4 promotes autophagy-dependent apoptosis in GBM cells by reducing the transcriptional activation of EMP1. *Oncol Lett* 23, 41. <https://doi.org/10.3892/ol.2021.13159>
- Wang, X., Yang, P., 2008. In vitro differentiation of mouse embryonic stem (mES) cells using the hanging drop method. *J Vis Exp*. <https://doi.org/10.3791/825>
- Wang, Y., Leng, H., Chen, H., Wang, L., Jiang, N., Huo, X., Yu, B., 2016. Knockdown of UBE2T Inhibits Osteosarcoma Cell Proliferation, Migration, and Invasion by Suppressing the PI3K/Akt Signaling Pathway. *Oncol Res* 24, 361–369. <https://doi.org/10.3727/096504016X14685034103310>
- Wang, Z., Yang, P., Xu, H., Qian, A., Hu, L., Shang, P., 2009. Inhibitory effects of a gradient static magnetic field on normal angiogenesis. *Bioelectromagnetics* 30, 446–453. <https://doi.org/10.1002/bem.20501>
- Watson, J.D., Crick, F.H., 1953. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 171, 737–738. <https://doi.org/10.1038/171737a0>
- Weeber, F., van de Wetering, M., Hoogstraat, M., Dijkstra, K.K., Krijgsman, O., Kuilman, T., Gadellaa-van Hooijdonk, C.G.M., van der Velden, D.L., Peeper, D.S., Cuppen, E.P.J.G.,

BIBLIOGRAPHIE

- Vries, R.G., Clevers, H., Voest, E.E., 2015. Preserved genetic diversity in organoids cultured from biopsies of human colorectal cancer metastases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, 13308–13311. <https://doi.org/10.1073/pnas.1516689112>
- Weyers, A., Yang, B., Yoon, D.S., Park, J.-H., Zhang, F., Lee, K.B., Linhardt, R.J., 2012. A structural analysis of glycosaminoglycans from lethal and nonlethal breast cancer tissues: toward a novel class of theragnostics for personalized medicine in oncology? *OMICS* 16, 79–89. <https://doi.org/10.1089/omi.2011.0102>
- Wiecek, A.J., Jacobson, D.H., Lason, W., Secrier, M., 2021. Pan-Cancer Survey of Tumor Mass Dormancy and Underlying Mutational Processes. *Front Cell Dev Biol* 9, 698659. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.698659>
- Wisdom, K.M., Adebowale, K., Chang, J., Lee, J.Y., Nam, S., Desai, R., Rossen, N.S., Rafat, M., West, R.B., Hodgson, L., Chaudhuri, O., 2018. Matrix mechanical plasticity regulates cancer cell migration through confining microenvironments. *Nat Commun* 9, 4144. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06641-z>
- Worthington, P., Pochan, D.J., Langhans, S.A., 2015. Peptide Hydrogels - Versatile Matrices for 3D Cell Culture in Cancer Medicine. *Front Oncol* 5, 92. <https://doi.org/10.3389/fonc.2015.00092>
- Wouters, O.J., McKee, M., Luyten, J., 2020. Estimated Research and Development Investment Needed to Bring a New Medicine to Market, 2009-2018. *JAMA* 323, 844–853. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.1166>
- Wu, H., Uchimura, K., Donnelly, E.L., Kirita, Y., Morris, S.A., Humphreys, B.D., 2018. Comparative Analysis and Refinement of Human PSC-Derived Kidney Organoid Differentiation with Single-Cell Transcriptomics. *Cell Stem Cell* 23, 869-881.e8. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.10.010>
- Wu, L.Y., Di Carlo, D., Lee, L.P., 2008. Microfluidic self-assembly of tumor spheroids for anticancer drug discovery. *Biomed Microdevices* 10, 197–202. <https://doi.org/10.1007/s10544-007-9125-8>
- Wu, S.C., Benavente, C.A., 2018. Chromatin remodeling protein HELLS is upregulated by inactivation of the RB-E2F pathway and is nonessential for osteosarcoma tumorigenesis. *Oncotarget* 9, 32580–32592. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.25953>
- Wu, X., Gong, S., Roy-Burman, P., Lee, P., Culig, Z., 2013. Current mouse and cell models in prostate cancer research. *Endocr Relat Cancer* 20, 10.1530/ERC-12-0285. <https://doi.org/10.1530/ERC-12-0285>
- Xiang, X., Phung, Y., Feng, M., Nagashima, K., Zhang, J., Broaddus, V.C., Hassan, R., Fitzgerald, D., Ho, M., 2011. The development and characterization of a human mesothelioma in vitro 3D model to investigate immunotoxin therapy. *PLoS One* 6, e14640. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014640>
- Xiao, W., Mohseny, A.B., Hogendoorn, P.C.W., Cleton-Jansen, A.-M., 2013. Mesenchymal stem cell transformation and sarcoma genesis. *Clin Sarcoma Res* 3, 10. <https://doi.org/10.1186/2045-3329-3-10>
- Xiao, W., Zhang, R., Sohrabi, A., Ehsanipour, A., Sun, S., Liang, J., Walthers, C.M., Ta, L., Nathanson, D.A., Seidlits, S.K., 2018. Brain-Mimetic 3D Culture Platforms Allow Investigation of Cooperative Effects of Extracellular Matrix Features on Therapeutic Resistance in Glioblastoma. *Cancer Res* 78, 1358–1370. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-2429>

BIBLIOGRAPHIE

- Xu, G., Wu, H., Zhang, Y., Xu, Y., Guo, X., Baklaushev, V.P., Chekhonin, V.P., Peltzer, K., Wang, J., Lu, F., Wang, G., Wang, X., Ma, W., Zhang, C., 2022. Risk and Prognostic Factors for Different Organ Metastasis in Primary Osteosarcoma: A Large Population-Based Analysis. *Orthopaedic Surgery* 14, 714–719. <https://doi.org/10.1111/os.13243>
- Xu, X., Gurski, L.A., Zhang, C., Harrington, D.A., Farach-Carson, M.C., Jia, X., 2012. Recreating the tumor microenvironment in a bilayer, hyaluronic acid hydrogel construct for the growth of prostate cancer spheroids. *Biomaterials* 33, 9049–9060. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.08.061>
- Yip, D., Cho, C.H., 2013. A multicellular 3D heterospheroid model of liver tumor and stromal cells in collagen gel for anti-cancer drug testing. *Biochem Biophys Res Commun* 433, 327–332. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.03.008>
- Young, H.A., Klinman, D.M., Reynolds, D.A., Grzegorzewski, K.J., Nii, A., Ward, J.M., Winkler-Pickett, R.T., Ortaldo, J.R., Kenny, J.J., Komschlies, K.L., 1997. Bone Marrow and Thymus Expression of Interferon- γ Results in Severe B-Cell Lineage Reduction, T-Cell Lineage Alterations, and Hematopoietic Progenitor Deficiencies. *Blood* 89, 583–595. <https://doi.org/10.1182/blood.V89.2.583>
- Yu-Lee, L.-Y., Yu, G., Lee, Y.-C., Lin, S.-C., Pan, J., Pan, T., Yu, K.-J., Liu, B., Creighton, C.J., Rodriguez-Canales, J., Villalobos, P.A., Wistuba, I.I., de Nadal, E., Posas, F., Gallick, G.E., Lin, S.-H., 2018. Osteoblast-Secreted Factors Mediate Dormancy of Metastatic Prostate Cancer in the Bone via Activation of the TGF β RIII–p38MAPK–pS249/T252RB Pathway. *Cancer Research* 78, 2911–2924. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-1051>
- Zablotskii, V., Polyakova, T., Lunov, O., Dejneka, A., 2016. How a High-Gradient Magnetic Field Could Affect Cell Life. *Sci Rep* 6, 37407. <https://doi.org/10.1038/srep37407>
- Zanoni, M., Piccinini, F., Arienti, C., Zamagni, A., Santi, S., Polico, R., Bevilacqua, A., Tesei, A., 2016. 3D tumor spheroid models for in vitro therapeutic screening: a systematic approach to enhance the biological relevance of data obtained. *Sci Rep* 6, 19103. <https://doi.org/10.1038/srep19103>
- Zeng, S., Seifert, A.M., Zhang, J.Q., Kim, T.S., Bowler, T.G., Cavnar, M.J., Medina, B.D., Vitiello, G.A., Rossi, F., Loo, J.K., Param, N.J., DeMatteo, R.P., 2017. ETV4 collaborates with Wnt/ β -catenin signaling to alter cell cycle activity and promote tumor aggressiveness in gastrointestinal stromal tumor. *Oncotarget* 8, 114195–114209. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23173>
- Zhang, J.A., Kwee, S.A., Wong, L.L., 2017. Late recurrence of hepatocellular carcinoma after liver transplantation. *Hepatoma Res* 3, 58–66. <https://doi.org/10.20517/2394-5079.2017.05>
- Zhang, S., 2003. Fabrication of novel biomaterials through molecular self-assembly. *Nat Biotechnol* 21, 1171–1178. <https://doi.org/10.1038/nbt874>
- Zhang, W., Ren, Z., Jia, L., Li, X., Jia, X., Han, Y., 2019. Fbxw7 and Skp2 Regulate Stem Cell Switch between Quiescence and Mitotic Division in Lung Adenocarcinoma. *Biomed Res Int* 2019, 9648269. <https://doi.org/10.1155/2019/9648269>
- Zhang, X., Zhang, J., Zhou, H., Fan, G., Li, Q., 2019. Molecular Mechanisms and Anticancer Therapeutic Strategies in Vasculogenic Mimicry. *J Cancer* 10, 6327–6340. <https://doi.org/10.7150/jca.34171>
- Zhang, Y., Jiang, B., Lee, M.H., 2020. A Novel 3D Model for Visualization and Tracking of Fibroblast-Guided Directional Cancer Cell Migration. *Biology (Basel)* 9. <https://doi.org/10.3390/biology9100328>

BIBLIOGRAPHIE

- Zhao, W., Lin, Z.X., Zhang, Z.Q., 2004. Cisplatin-induced premature senescence with concomitant reduction of gap junctions in human fibroblasts. *Cell Res* 14, 60–66. <https://doi.org/10.1038/sj.cr.7290203>
- Zheng, L., Hu, X., Huang, Y., Xu, G., Yang, J., Li, L., 2015. In vivo bioengineered ovarian tumors based on collagen, matrigel, alginate and agarose hydrogels: a comparative study. *Biomed Mater* 10, 015016. <https://doi.org/10.1088/1748-6041/10/1/015016>
- Zhou, J., Wang, M., Zhou, Z., Wang, W., Duan, J., Wu, G., 2021. Expression and Prognostic Value of MCM Family Genes in Osteosarcoma. *Front Mol Biosci* 8, 668402. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.668402>
- Zhu, J., 2010. Bioactive modification of poly(ethylene glycol) hydrogels for tissue engineering. *Biomaterials* 31, 4639–4656. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.02.044>
- Zhu, S., Zhao, L., Li, Y., Hou, P., Yao, R., Tan, J., Liu, D., Han, L., Huang, B., Lu, J., Zhang, Y., 2016. Suppression of RAD21 Induces Senescence of MDA-MB-231 Human Breast Cancer Cells Through RB1 Pathway Activation Via c-Myc Downregulation. *J Cell Biochem* 117, 1359–1369. <https://doi.org/10.1002/jcb.25426>
- Zou, L., Barnett, B., Safah, H., LaRussa, V.F., Evdemon-Hogan, M., Mottram, P., Wei, S., David, O., Curiel, T.J., Zou, W., 2004. Bone Marrow Is a Reservoir for CD4+CD25+ Regulatory T Cells that Traffic through CXCL12/CXCR4 Signals. *Cancer Research* 64, 8451–8455. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-1987>
- Zschenker, O., Streichert, T., Hehlhans, S., Cordes, N., 2012. Genome-wide gene expression analysis in cancer cells reveals 3D growth to affect ECM and processes associated with cell adhesion but not DNA repair. *PLoS One* 7, e34279. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034279>

ANNEXES

The background features a large teal triangle on the left side. To its right, there is a white area containing a pattern of small dots that fades out towards the right. Further to the right, there is a pattern of thin, parallel teal lines that also fades out towards the right edge of the page.

