

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

MÉCANISMES MOLÉCULAIRES DU MIMÉTISME VASCULOGÉNIQUE: IMPLICATIONS DANS
LA RÉGÉNÉRATION TISSULAIRE ET DANS LA VASCULARISATION TUMORALE
CÉRÉBRALE

THÈSE

PRÉSENTÉE

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DU DOCTORAT EN BIOCHIMIE

PAR

MARIE-EVE ROY

DECEMBRE 2025

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de cette thèse se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.12-2023). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Ce travail marque la fin d'un chapitre important et décisif dans ma vie. Chaque petite étape qui l'a constitué n'aurait été possible sans la contribution unique de plusieurs personnes, que je tiens à remercier sincèrement.

Je tiens d'abord à exprimer ma gratitude à celui qui restera toujours mon premier mentor, mon directeur de recherche Dr. Borhane Annabi. Merci d'avoir décelé en moi un potentiel dès mes débuts, et de m'avoir ouvert les portes de multiples facettes de la recherche, tant dans ses aspects les plus lumineux que dans ses zones d'ombres. Vous m'avez aidée à grandir en m'enseignant à porter un regard différent sur chaque difficulté. Je ne l'oublierai pas.

Je souhaiterais dire merci à mon amie, Dre Narjara Gonzalez Suarez, qui m'a formée avec une patience et une rigueur exceptionnelles. Bien au-delà de la science, tu m'as appris à surmonter les déceptions et à célébrer les succès. J'admirerai toujours ta résilience et ta force de caractère.

Je tiens aussi à souligner l'importance des membres du laboratoire du Dr Annabi, avec qui j'ai partagé tant d'heures ces dernières années et qui ont tous contribué à ma réussite. À mes amies Carolane Veilleux, Dre Emmanuelle Boscher, Sahily Rogriguez Torres, Loraine Gresseau, Célia Kassouri, Sarah Kym Pépin, Sima Torabidastgerdooei, Mazilda Djefel, Aleksandra Berenguer ainsi qu'à mes collègues Cyndia, Isabelle, MaryCruz, Prisca, Angélique, Meriem, Souad, Daniil, Bogdan, Khalil, Naoufal et Véronique. Je suis heureuse de vous recroiser aujourd'hui dans de nouveaux contextes, forts de tout ce que nous avons partagé. Un merci tout spécial à ma stagiaire Rahil Elimam, qui a été une alliée clé de cette fin de parcours.

Je tiens à reconnaître le soutien financier de la Chaire en Prévention et Traitement du Cancer ainsi que du Centre d'Excellence en Recherche sur les Maladies Orphelines, qui m'ont permis de mener à bien ces projets, qui me tenaient tant à cœur. J'ajoute un grand merci à nos collaborateurs Dr Alexandre Gagnon et Alexis Paquin, qui nous ont aidé à réaliser l'un des articles présentés grâce à la synthèse de composés innovants.

Merci également à tous les membres de mes comités d'épreuves et d'examens doctoraux. Vos conseils, perspectives et réflexions ont toujours été extrêmement bienveillants. Vos mots et suggestions exerceront une influence certaine sur la scientifique que j'aspire à devenir. Merci aux membres ayant accepté d'évaluer

cette thèse, Dre Diana Alison Averill, Dre Nathalie Lamarche-Vane ainsi que Dre Malika Oubaha, vos suggestions me permettront d'améliorer la qualité de ce travail.

Alain, un immense merci. Tu as été présent pour moi dans les moments où je doutais le plus de moi-même et de mes choix. Ta bonté, ta sagesse et surtout ton amitié sont inestimables.

Seb, mon meilleur ami et frère de cœur, ce parcours n'aurait jamais été possible sans toi. Tu m'as encouragée, réconfortée et parfois confrontée quand il le fallait. Je ne compte plus le nombre de nuits où tu es resté debout à mes côtés à préparer tous ces rapports et examens. Tu éclaires mon quotidien et apaises toutes mes craintes.

À mon papi Marcel, mon modèle de courage, de combativité et de curiosité. Tu répondais à toutes mes questions sur l'univers, les étoiles et la science. Tu me manques terriblement. J'aurais tant aimé pouvoir répondre un jour à tes questions comme tu as répondu aux miennes. Je sais que mamie te racontera tout.

Ma grand-maman, tu t'es battue jusqu'à la dernière seconde pour vivre ce moment à mes côtés. Tu disais que tu tiendrais bon jusqu'à ma soutenance. Aujourd'hui je sais que tu es là, encore plus près de moi. Vole le cœur serein, je sais que tu as rejoins les étoiles pour me guider.

Enfin, à ma famille. Merci à mes parents, qui même sans toujours comprendre ce que je faisais, m'ont soutenue sans jamais faillir. Votre foi en moi ne me quitte jamais. Mon frère Félix, pour ton amour infaillible. J'ai si hâte de te voir briller à ton tour.

DEDICACE

À ma chère famille,
Mes parents et mes grands-parents qui m'ont offert tout l'amour et le soutien du monde pour me
permettre de réussir.

À mon père qui m'insuffle la force de surmonter chaque obstacle,
Et à ma mère qui m'apprend chaque jour à devenir une meilleure personne.

Et à toi, ma grand-maman : tu n'es plus là où je peux te voir,
Mais tu es partout où je vais, chaque victoire et chaque silence.

Je vous dédie ce travail... et tous ceux à venir.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS.....	ii
LISTE DES FIGURES	ix
LISTE DES TABLEAUX	xii
LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES.....	xiii
RÉSUMÉ	xvi
INTRODUCTION	1
CHAPITRE 1 REVUE DE LITTÉRATURE	3
1.1 Le cancer	3
1.1.1 Généralités	3
1.1.2 Cancérogenèse: Étapes clés de la transformation maligne	5
1.1.3 Métastases et invasion tumorale	11
1.1.4 Angiogenèse physiologique et pathologique	14
1.1.5 Mimétisme vasculogénique: définitions, mécanismes et implications biologiques	17
1.1.6 La transition épithélio-mésenchymateuse.....	20
1.2 Les tumeurs cérébrales	24
1.2.1 Catégorisation	24
1.2.2 Classification des gliomes.....	25
1.2.3 Glioblastomes.....	27
1.2.4 Mécanismes de chimiorésistance et adaptation métabolique.....	30
1.2.5 Défis et traitements	33
1.2.6 Modèles cellulaires de tumeurs cérébrales.....	35
1.3 Les cellules souches	37
1.3.1 Définition et classification	37
1.3.3 Rôles dans la niche tumorale	39
1.3.4 Contribution au développement tumoral.....	40
1.3.5 Support à la régénération tissulaire	41
1.3.6 MSC: microenvironnement tumoral et angiogenèse.....	42
1.3.7 MSC et mimétisme vasculogénique.....	42
1.4 Les processus cellulaires et moléculaires du mimétisme vasculogénique	46
1.4.1 Hippo/YAP/TEAD: survie cellulaire et résistance aux traitements.....	46
1.4.2 JAK/STAT: médiateur clé de la signalisation cellulaire.....	48
1.4.3 Voies signalétiques complémentaires; Wnt, Notch, Sortiline.....	50
1.4.4 Hypoxie et reprogrammation métabolique	51
1.4.5 Approches pharmacologiques	53
1.5 Projet de recherche	56
1.5.1 Problématique	56
1.5.2 Hypothèse de travail.....	56
1.5.3 Objectifs.....	57
CHAPITRE 2 ARTICLE 1 Transcriptional regulation of <i>CYR61</i> and <i>CTGF</i> by LM98, a synthetic YAP-TEAD inhibitor that targets <i>in vitro</i> vasculogenic mimicry in glioblastoma cells	59
2.1 Résumé	61

2.2 Abstract	62
2.3 Introduction	63
2.4. Materials and methods.....	65
2.4.1. Materials.....	65
2.4.2. Cell culture and capillary-like structure formation assay	65
2.4.3. Total RNA isolation, cDNA synthesis, and real-time quantitative PCR	66
2.4.4. In silico analysis of transcripts levels in clinical glioblastoma and low-grade glioma tissues	66
2.4.5. TissueScan cDNA arrays of grades I-IV brain tumor tissues	67
2.4.6. Transfection method and RNA interference	67
2.4.7. Real-time cell migration assay	67
2.4.8. Protein-protein interaction	68
2.4.9. Nuclear extraction	68
2.4.10. Western blot	68
2.4.11. Statistical data analysis	68
2.5.1. High transcripts expression of the Hippo signaling pathway mediators in clinically annotated glioblastoma tissues.	69
2.5.2. Human glioblastoma cell line models and GBM clinical samples recapitulate the high expression levels of CYR61 and CTGF transcripts.	69
2.5.3. Increased CYR61 and CTGF transcriptional regulation in U87 glioblastoma cells upon in vitro VM.....	70
2.5.4. SiRNA-mediated repression of CYR61 and CTGF inhibits U87 glioblastoma cells VM.....	70
2.5.5. Protein-protein interaction network predicts YAP-TEAD inter-relationship with downstream biomarkers involved the Hippo pathway and in epithelial-to-mesenchymal transition during U87 capillary-like structure formation.....	70
2.5.6. Silencing of SNAI1 or FOXC2 alters the U87 capillary-like structure formation.	70
2.5.7. Hippo pathway pharmacological targeting alters U87 capillary-like structure formation and nuclear expression of SNAI1.	71
2.6. Discussion	72
CHAPITRE 3 ARTICLE 2 <i>In vitro</i> biomaterial priming of human mesenchymal stromal/stem cells: Implication of the Src/JAK/STAT3 pathway in vasculogenic mimicry.....	82
3.1. Résumé	84
3.2. Abstract	85
3.3. Introduction	86
3.4. Results	88
3.4.1. In vitro mesenchymal stem/stromal cells capillary-like structure formation kinetic on Cultrex	88
3.4.2. Transcriptomic analysis reveals the JAK/STAT signaling pathway as a hub in MSC 3D capillary-like structures.....	88
3.4.3. Protein-protein interaction network predicts STAT3 interrelationship with downstream biomarkers involved in epithelial-to-mesenchymal transition during MSC capillary-like structure formation.....	89
3.4.4. Pharmacological targeting and transient STAT3 gene silencing abrogate MSC capillary-like structure formation, and inhibit the acquisition of an EMT inflammatory molecular signature	89
3.4.5. A role for the 37-kDa laminin receptor precursor/67-kDa laminin receptor (RPSA) in MSC capillary-like structure formation.....	90
3.5. Discussion	91

3.6. Methods	93
3.6.1. Reagents	93
3.6.2. Cell culture and capillary-like structure formation assay	93
3.6.3. Total RNA isolation, cDNA synthesis, and real-time quantitative PCR	94
3.6.4. Transfection method and RNA interference	94
3.6.5. Total RNA library preparation	95
3.6.6. RNA sequencing	95
3.6.7. Reads alignment and differential expression analysis	95
3.6.8. Gene set enrichment analysis	95
3.6.9. Data preparation	96
3.6.11. Western blot	96
3.6.12. Real-time cell migration assay	96
3.6.13. Statistical data analysis	97
CHAPITRE 4 ARTICLE 3 A role for the Hippo/YAP1 pathway in the regulation of in vitro vasculogenic mimicry in glioblastoma cells	105
4.1 Résumé	107
4.2 Abstract	108
4.3. Introduction	109
4.4. Materials	111
4.5. Methods	111
4.5.1. Cell culture and capillary-like structure formation assay	111
4.5.2. Total RNA isolation, cDNA synthesis, and real-time quantitative PCR	112
4.5.3. In silico analysis of TAZ, YAP1 and TEAD1 transcripts levels in clinical glioblastoma and low-grade glioma tissues	112
4.5.4. Transfection method and RNA interference	113
4.5.5. Real-time cell migration assay	113
4.5.6. Nuclear extraction	113
4.5.7. Western blot	113
4.5.8. Statistical data analysis	114
4.6. Results	115
4.6.1. Gene expression profiles of TAZ, YAP1 and TEAD1 in four human glioblastoma cell lines and in clinically annotated glioblastoma tumor tissues.	115
4.6.2. Hippo pathway clinical inhibitors alter the chemotactic cell migration of human U87 and U251 glioblastoma cells	115
4.6.3. Hippo pathway clinical inhibitors alter in vitro vasculogenic mimicry of human U87 glioblastoma cells	116
4.6.4. <i>In vitro</i> VM triggers nuclear YAP1 expression in U87 and U251 glioblastoma cells and is inhibited by Hippo pathway pharmacological targeting.	116
4.6.5. Silencing of YAP1 alters in vitro VM and cell migration in U87 and U251 glioblastoma cells.	117
4.7. Discussion	118
4.8. Conclusion	120
CHAPITRE 5 ARTICLE 4 A SORT1/EGFR molecular interplay as a prognostic biomarker in glioblastoma vasculogenic mimicry: implications in the transcriptional regulation of cancer stemness and drug resistance	126
5.1 Résumé	128

5.2 Abstract	130
5.3. Introduction	131
5.4. Materials and Methods	132
5.4.1. Materials.....	132
5.4.2. Cell culture.....	132
5.4.3. In vitro vasculogenic mimicry assay.....	133
5.4.4. Capillary-like structures image analysis	133
5.4.5. RNA isolation, cDNA synthesis, and quantitative real-time PCR.....	133
5.4.6. Human cancer stem cell/drug resistance profiler PCR arrays.....	134
5.4.7. <i>In silico</i> analysis of SORT1 transcript levels in clinical glioblastoma and low-grade glioma tissues.	134
5.4.8. Transfection and RNA interference	134
5.4.9. Real-time cell migration assay.....	135
5.4.10. Western blot analysis	135
5.4.11. Statistical analysis.....	136
5.5.1. Increased gene expression of EGFR and tetraspanins markers CD9, CD63 and CD81 in glioblastoma tumor tissues.....	136
5.5.2. SORT1 expression is upregulated in grade IV glioma cell lines and tumor tissues.	137
5.5.3. <i>In vitro</i> vasculogenic mimicry of glioblastoma cells.	137
5.5.4. Silencing of SORT1 disrupts VM in glioblastoma cells.....	137
5.5.5. Pharmacological inhibition of SORT1 reduces glioblastoma cell migration.	138
5.5.6. SORT1 silencing alters EGFR expression.	138
5.5.7. Impact of SORT1 and EGFR gene silencing upon the transcriptomic drug resistance and cancer stem cells signature of VM in U87 glioblastoma cells.....	139
5.6. Discussion	140
CHAPITRE 6 DISCUSSION GÉNÉRALE	158
6.1 Synthèse intégrative des principaux résultats.....	159
6.2 Implications biologiques et cliniques.....	161
6.3 Contributions au domaine de recherche	162
CONCLUSION.....	165
RÉFÉRENCES	166

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1. Répartition mondiale des nouveaux cas de cancer et des décès par cancer en 2022 selon le sexe et la région.....	4
Figure 1.2. Processus de cancérogenèse. Les trois étapes majeures de la transformation maligne des cellules.....	8
Figure 1.3. Représentation schématique des étapes de la cancérogenèse.....	10
Figure 1.4. Schéma de la cascade métastatique et influence du microenvironnement tumoral.....	14
Figure 1.5. Illustration schématique du mimétisme vasculogénique.....	19
Figure 1.6. Contribution du microenvironnement tumoral et de la TEM à la formation du VM.....	22
Figure 1.7. Classification des tumeurs du système nerveux central selon l’OMS 2021.....	27
Figure 1.8. Estimation du nombre de cas de cancers du système nerveux central dans le monde 2022-2050, chez les hommes et les femmes âgées de 0 à 85 ans.....	28
Figure 1.9. Survie globale des patients atteints de glioblastome en fonction de l’âge, du traitement chirurgical et de la chimiothérapie.....	29
Figure 1.10. Hétérogénéité transcriptionnelle des cellules tumorales isolées de glioblastomes humains.....	32
Figure 1.11. Stratégies thérapeutiques actuelles du GBM.....	34
Figure 1.12. Hiérarchie des cellules souches et potentiel différenciatif.....	37
Figure 1.13. Mécanismes de communication paracrine entre les MSC et les cellules tumorales.....	40
Figure 1.14. Influence des MSC et du microenvironnement tumoral sur la vascularisation tumorale.....	45
Figure 1.15. Schéma de la voie de signalisation Hippo/YAP/TAZ/TEAD.....	47
Figure 1.16. Voies d’activation de STAT3, partenaires de signalisation et gènes cibles dans le cancer.....	49
Figure 2.1. Increased gene expression of YAP1, TEAD1 and downstream effectors AXL, CTGF and CYR61 in clinically annotated glioblastoma tumor tissues.....	74
Figure 2.2. Expression profiles of YAP1, TEAD1, AXL, CTGF, CYR61, and NF2 in four human glioblastoma cell lines, and in cDNA tissue arrays.....	75
Figure 2.3. <i>In vitro</i> human glioblastoma cell lines, capillary-like structure formation on Cultrex.....	76
Figure 2.4. Silencing of CTGF or CYR61 alters the U87 capillary-like structure formation.....	77
Figure 2.5. Transcriptomic analysis reveals that SNAIL and FOXC2 expression levels are induced in U87 capillary-like structure formation.....	78

Figure 2.6. Silencing of SNAIL or FOXC2 alters the U87 capillary-like structure formation.....	79
Figure 2.7. Hippo pathway pharmacological targeting alters U87 capillary-like structure formation and nuclear expression of SNAIL.....	80
Figure 3.1. <i>In vitro</i> mesenchymal stem/stromal cells capillary-like structure formation on Cultrex.....	98
Figure 3.2. Transcriptomic analysis reveals JAK/STAT signaling pathway as a hub in MSC capillary-like structure formation.....	99
Figure 3.3. Transcriptomic analysis reveals JAK/STAT signaling pathway as a hub in MSC capillary-like structure formation.....	100
Figure 3.4. STAT3 pharmacological targeting alters MSC capillary-like structure formation and nuclear expression of FOXC2 and SNAIL.....	101
Figure 3.5. STAT3 gene silencing alters MSC capillary-like structure formation, cell chemotaxis, and acquisition of an inflammatory phenotype.....	102
Figure 3.6. A role for the 37-kDa laminin receptor precursor/67-kDa laminin receptor (RPSA) in MSC 3D capillary-like structure formation.....	103
Figure 3.7. Scheme summarizing the STAT3 signaling hub and regulatory impact on capillary-like structure formation, and on the acquisition of an angiogenic, inflammatory, and EMT phenotype.....	104
Figure 4.1. Gene expression profiles of TAZ, YAP1 and TEAD1 in four human glioblastoma cell lines and in clinically annotated glioblastoma tumor tissues.....	121
Figure 4.2. Hippo pathway clinical inhibitors alter the chemotactic cell migration of human U87 and U251 glioblastoma cells.....	122
Figure 4.3. Hippo pathway clinical inhibitors alter <i>in vitro</i> vasculogenic mimicry of human U87 glioblastoma cells.....	123
Figure 4.4. <i>In vitro</i> VM triggers nuclear YAP1 expression in U87 and U251 glioblastoma cells and is inhibited by Hippo pathway pharmacological targeting.....	124
Figure 4.5. Silencing of YAP1 alters <i>in vitro</i> VM and cell migration in U87 and U251 glioblastoma cells.....	125
Figure 5.1. Increased gene expression of EGFR and exosomal markers CD9, CD63 and CD81 in clinically annotated glioblastoma tumor tissues.....	144
Figure 5.2. Expression profile of SORT1 and EGFR in grade IV cell lines and tissues.....	145
Figure 5.3. <i>In vitro</i> human analysis of the U87 human glioblastoma cell line's capacity to form capillary-like structures on Cultrex.....	146
Figure 5.4. Silencing of SORT1 alters <i>in vitro</i> VM in glioblastoma cells.....	148

Figure 5.5. Pharmacological targeting of Sortilin function inhibits U87 and U251 glioblastoma cell migration.....	150
Figure 5.6. SORT1 expression levels impact EGFR expression in U87 glioblastoma cells.....	151
Figure 5.7. Impact of SORT1 and EGFR gene silencing upon the transcriptomic drug resistance signature of VM in U87 glioblastoma cells.....	152
Figure 5.8. Impact of SORT1 and EGFR gene silencing upon the transcriptomic cancer stem cells signature of VM in U87 glioblastoma cells.....	153
Figure 5.9. RT-qPCR validation of drug resistance and cancer stem cells gene expression upon VM in siSORT1-transfected U87 glioblastoma cells.....	154
Figure supplémentaire 5.10 Expression profile of SORCS1, SORCS2, SORCS2, and SORL1 transcripts in glioblastoma cell lines and tissues.....	155
Figure supplémentaire 5.11 Silencing of SORT1 or EGFR alters EGFR in U87 and U251 glioblastoma cells.....	156
Figure supplémentaire 5.12 Pharmacological targeting of Sortilin function inhibits VM in U87 glioblastoma cells.....	157

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1 Principaux facteurs de risques endogènes et exogènes impliqués dans la cancérogenèse.....	5
Tableau 1.2 Oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs altérés dans le cancer.....	11
Tableau 1.3 Régulateurs endogènes de l'angiogenèse.....	16
Tableau 1.4 Comparaison entre l'angiogenèse classique et le VM dans le contexte tumoral.....	20
Tableau 1.5 Principales voies de signalisation impliquées dans le VM et la TEM.....	23
Tableau 1.6 Principaux types de tumeurs cérébrales selon leur origine, leur localisation et leur comportement biologique.....	25
Tableau 1.7 Projections mondiales du nombre de cas de cancers du cerveau et du système nerveux central entre 2022 et 2045.....	29
Tableau 1.8 Mécanismes moléculaires principaux de résistance aux traitements dans le GBM.....	33
Tableau 1.9 Principales limites des approches thérapeutiques conventionnelles les plus utilisées dans le GBM.....	35
Tableau 1.10 Critères d'identification des MSC selon l'ISCT.....	38
Tableau 1.11 Comparaison des caractéristiques biologiques et moléculaires entre l'angiogenèse et le mimétisme vasculogénique.....	44
Tableau 1.12 Facteurs de transcription induits ou associés à l'activation de la voie JAK/STAT dans les tumeurs solides.....	50
Tableau 1.13 Principaux gènes régulés par HIF-1 α et HIF-2 α et leurs fonctions.....	53
Tableau 1.14 Agents pharmacologiques ciblant le VM.....	54

LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

ADN	Acide désoxyribonucléique
AF38469	Inhibiteur pharmacologique de SORT1
ARN	Acide ribonucléique
AKT	Protéine kinase B
AXL	<i>Anexelekto receptor tyrosine kinase</i>
BAX	<i>Bcl-2-associated X protein</i>
BCL-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
CAF	<i>Cancer-associated fibroblast</i>
CD31	<i>Platelet endothelial cell adhesion molecule-1</i>
CD44	<i>Cluster of Differentiation 44</i>
CD45	<i>Cluster of Differentiation 45</i>
CD90	<i>Thy-1 cell surface antigen</i>
CD105	<i>Cluster of Differentiation 105</i>
CSC	Cellule souche cancéreuse
CSF1	<i>Macrophage Colony Stimulating Factor</i>
CSF2	<i>Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor</i>
CSF3	<i>Granulocyte Colony Stimulating Factor</i>
CTGF	<i>Connective Tissue Growth Factor</i>
CYR61	<i>Cysteine-rich angiogenic inducer 61</i>
DEG	<i>Differentially Expressed Genes</i>
ECM	<i>Extracellular Matrix</i>
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
EMT / TEM	Transition Épithélio-Mésenchymateuse
EPHA2	<i>Ephrin type A receptor 2</i>
EV	Vésicules extracellulaires
FAK	<i>Focal adhesion kinase</i>
FN1	<i>Fibronectin 1</i>
FOXC2	<i>Forkhead Box C2</i>
GAPDH	<i>Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase</i>
GBM	<i>Glioblastoma Multiforme</i>

GLUT1	<i>Glucose transporter type 1</i>
GO	<i>Gene Ontology</i>
HIF-1 α	<i>Hypoxia-Inducible Factor 1 alpha</i>
IDO	<i>Indoleamine 2,3-dioxygenase</i>
IL6	<i>Interleukine 6</i>
IL1B	<i>Interleukine 1 Beta</i>
JAK	<i>Janus Kinase</i>
LM98 / GNE7883 / VT107 / IAG933: Inhibiteurs de YAP/TEAD	
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MEC	<i>Matrice Extracellulaire</i>
MET	<i>Transition mésenchymo-épithéliale</i>
MGMT	<i>O6-Methylguanine-DNA Methyltransferase</i>
miRNA	<i>microRNA</i>
MMPs	<i>Matrix Metalloproteinases</i>
MSC	<i>Mesenchymal Stromal/Stem Cells</i>
NF2	<i>Neurofibromin 2 (Merlin)</i>
NF-kB	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
PD-1	<i>Programmed cell Death protein 1</i>
PD-L1	<i>Programmed Death-Ligand 1</i>
PECAM-1	<i>Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1</i>
PGE2	<i>Prostaglandin E2</i>
PI3K	<i>Phosphoinositide 3-Kinase</i>
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
PP2	<i>Inhibiteur de Src</i>
PPI	<i>Protein-Protein Interaction</i>
RPSA	<i>Ribosomal Protein SA (Laminin receptor 37/67kDa)</i>
SDF-1	<i>Stromal cell-derived factor-1</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulphate</i>
SLUG	<i>Snail Family Transcriptional Repressor 2</i>
SNAI1	<i>Snail Family Transcriptional Repressor 1</i>
SORT1	<i>Sortilin</i>
SRC	<i>Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src</i>
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
STAT3	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription 3</i>

TAZ	<i>Transcriptional coactivator with PDZ-binding motif</i>
TEAD1	<i>TEA Domain Transcription Factor 1</i>
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor Beta</i>
Tofacitinib / AG490:	Inhibiteurs pharmacologiques de JAK/STAT
TME	Microenvironnement tumoral
TMZ	Témolozomide
TP53	<i>Tumor protein 53</i>
TWIST	<i>Twist Family BHLH Transcription Factor 1</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VE-Cadhérine	<i>Vascular Endothelial cadherin (CD144)</i>
VM	<i>Vasculogenic Mimicry</i>
vWF	<i>von Willebrand Factor</i>
WIMASIS	Logiciel d'analyse morphométrique
Wnt	<i>Wingless-related integration site</i>
YAP1	<i>Yes-associated Protein 1</i>
ZEB1/2	<i>Zinc Finger E-box-Binding Homeobox 1/2</i>

RÉSUMÉ

Le glioblastome (GBM) est le type de tumeur cérébral primaire le plus agressif et le plus létale chez l'adulte. Malgré les traitements combinés incluant la chirurgie, la radiothérapie ainsi que la chimiothérapie, le pronostic demeure très sombre, avec une survie médiane de moins de 15 mois. Cette résistance thérapeutique est en partie attribuable à la capacité du GBM à maintenir son approvisionnement en oxygène et en nutriments via des mécanismes de néovascularisation complexes. Parmi ceux-ci, le mimétisme vasculogénique (VM) représente un processus par lequel des cellules tumorales agressives forment des structures de types capillaires indépendamment des cellules endothéliales. Ce phénomène est associé à une plasticité tumorale accrue, à l'hypoxie, à la chimiorésistance et un pronostic clinique défavorable. Les mécanismes moléculaires sous-jacents au VM demeurent encore peu documentés, bien que plusieurs voies de signalisation émergent comme étant centrales à ce processus. Le premier axe étudié dans ce travail porte sur les cellules souches mésenchymateuses humaines (MSC), connues pour leur rôle en médecine régénérative. Lorsque ces cellules sont cultivées sur une matrice extracellulaire, les MSC arrivent à adopter un phénotype de type capillaire, mimant le VM *in vitro*. Des analyses transcriptomiques et protéiques ont permis d'identifier la voie Src/JAK/STAT3 comme étant largement impliquée dans cette transition. L'inhibition pharmacologique ou génique de cette voie permet l'inhibition de la formation de structures capillaires, la diminution de la migration cellulaire et la suppression de marqueurs de l'inflammation et de la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM), suggérant que STAT3 agit comme un acteur essentiel dans le VM. Parallèlement, la voie de signalisation Hippo, bien connue pour sa régulation de la croissance cellulaire et son implication dans la progression tumorale, a également pu être identifiée comme clé dans le VM. Cette étude a démontré que les effecteurs transcriptionnels YAP1 et TEAD1 étaient surexprimés dans les tissus de GBM et que leurs cibles en aval, CYR61 et CTGF étaient induits lors du processus de formation de structures *in vitro*. L'utilisation d'inhibiteurs synthétiques de l'interaction YAP-TEAD, le composé LM98, permet de réduire la formation de VM et la migration cellulaire. De plus, la répression génique des facteurs transcriptionnels FOXC2 et SNAIL ont permis d'entraîner la réduction de l'expression génique de CYR61 et CTGF ainsi que de la formation de structures capillaires lors du VM, proposant que la transcription nucléaire YAP/TEAD contrôlerait partiellement la formation du VM. Une étude complémentaire nous a permis d'évaluer l'impact de trois différents inhibiteurs pharmacologiques de TEAD (GNE7883, VT107 et IAG933) sur des lignées cellulaires de GBM. Ces composés ont été efficaces pour réduire la migration cellulaire ainsi que la formation de VM via l'inhibition de la translocation nucléaire de YAP1. L'inhibition de cette protéine, tout comme sa répression génique a permis la diminution de l'expression de CYR61 et CTGF, confirmant le rôle du complexe YAP/TEAD comme un régulateur majeur du VM dans le GBM. Enfin, le dernier axe de cette thèse a permis de documenter l'interaction entre le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR) et la sortiline (SORT1), une protéine de tri cellulaire. EGFR est connu pour être fréquemment amplifié et surexprimé dans le GBM. Cette surexpression contribue à la survie cellulaire et à l'invasion. Cette étude a permis de révéler que SORT1 régule l'internalisation et la localisation nucléaire d'EGFR. La répression de SORT1 via inhibiteur pharmacologique (AF38469) ou siARN diminue la migration cellulaire, la formation de VM ainsi que l'expression nucléaire d'EGFR. La perte de SORT1 est associée à une chimiorésistance réduite. L'ensemble de ces données révèle l'existence d'un complexe EGFR/SORT1 agissant comme un effecteur dans la régulation du VM, positionnant cette interaction comme une cible thérapeutique potentielle dans le GBM. Ces trois axes d'étude mettent en lumière un lien complexe entre le trafic intracellulaire des récepteurs, la régulation transcriptionnelle et la signalisation inflammatoire dans la formation et régulation du VM. Cette étude offre une vision multidimensionnelle du VM et ouvre la voie à de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblant tout particulièrement la plasticité cellulaire et la chimiorésistance.

Mots clés: Glioblastome, Mimétisme vasculogénique, Chimiorésistance, YAP/TEAD, SORT1, EGFR, JAK/STAT

ABSTRACT

Glioblastoma (GBM) represents the most aggressive and lethal form of primary brain tumor in adults. Despite multimodal treatments involving surgical resection, radiotherapy, and chemotherapy, the prognosis remains dismal, with a median survival of less than 15 months. This pronounced therapeutic resistance is partly attributable to the capacity of GBM to sustain its oxygen and nutrient supply through complex mechanisms of neovascularization. Among these, vasculogenic mimicry (VM) describes a process by which highly invasive tumor cells generate capillary-like structures independently of endothelial cells. This phenomenon correlates with increased tumor plasticity, hypoxia, chemoresistance, and poor clinical outcomes. The molecular mechanisms governing VM remain incompletely elucidated, although several signaling pathways have emerged as central regulators. The first axis explored in this dissertation focuses on human mesenchymal stem cells (MSCs), widely studied for their role in regenerative medicine. When cultured on an extracellular matrix, MSCs acquire capillary-like features, recapitulating VM in vitro. Transcriptomic and proteomic analyses identified the Src/JAK/STAT3 pathway as a major contributor to this transition. Pharmacological or genetic inhibition of this pathway suppressed capillary-like structure formation, reduced cell migration, and attenuated the expression of inflammatory and epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) markers, suggesting that STAT3 acts as a key driver of VM. In parallel, the Hippo signaling pathway—known for its involvement in cell growth regulation and tumor progression—was also identified as a critical regulator of VM. The present work demonstrates that the transcriptional effectors YAP1 and TEAD1 are overexpressed in GBM tissues, and that their downstream targets, CYR61 and CTGF, are induced during the formation of capillary-like structures in vitro. Treatment with synthetic inhibitors of the YAP–TEAD interaction, such as LM98, markedly reduced VM formation and cell migration. Moreover, genetic repression of the transcription factors FOXC2 and SNAI1 decreased CYR61 and CTGF expression and impaired VM-associated structure formation, supporting the notion that nuclear YAP/TEAD activity partially governs VM. A complementary study evaluated the impact of three additional pharmacological TEAD inhibitors (GNE7883, VT107, and IAG933) in GBM cell lines. These compounds effectively impaired both cell migration and VM formation by preventing the nuclear translocation of YAP1. Consistent with this mechanism, inhibition or silencing of YAP1 reduced CYR61 and CTGF expression, further reinforcing the role of the YAP/TEAD complex as a major regulator of VM in GBM. Finally, the last component of this dissertation investigates the interaction between the epidermal growth factor receptor (EGFR) and sortilin (SORT1), a protein involved in intracellular trafficking. EGFR is frequently amplified and overexpressed in GBM, contributing to enhanced cell survival and invasiveness. This study demonstrates that SORT1 regulates EGFR internalization and nuclear localization. Pharmacological inhibition or siRNA-mediated repression of SORT1 (AF38469) decreased cell migration, VM formation, and nuclear EGFR expression. Loss of SORT1 was also associated with reduced chemoresistance. Collectively, these findings reveal the presence of an EGFR/SORT1 complex functioning as an effector in VM regulation, positioning this interaction as a potential therapeutic target in GBM. Together, these three research axes highlight the intricate interplay between receptor trafficking, transcriptional regulation, and inflammatory signaling in the initiation and maintenance of VM. This work provides a multidimensional perspective on VM and lays the groundwork for novel therapeutic strategies targeting cellular plasticity and treatment resistance.

Key words: Glioblastoma, Vasculogenic mimicry, Chemoresistance, YAP/TEAD, SORT1, EGFR, JAK/STAT

INTRODUCTION

Le glioblastome multiforme est l'un des plus grands défis de la neuro-oncologie moderne. Il s'agit de la tumeur primitive du système nerveux central la plus fréquente et la plus agressive chez l'adulte et se caractérise par une progression rapide, une hétérogénéité cellulaire marquée et une résistance persistante aux traitements standards. Malgré les progrès des approches thérapeutiques, la survie médiane reste inférieure à 15 mois. Cette réalité clinique reflète la capacité du GBM à échapper aux stratégies thérapeutiques par des mécanismes d'adaptation profonds, tant sur le plan génétique que phénotypique. Parmi ces mécanismes, la plasticité tumorale et les stratégies de vascularisation alternatives jouent un rôle central.

L'un des mécanismes les plus déstabilisants pour la prise en charge est le mimétisme vasculogénique (VM), une forme de néovascularisation indépendante des cellules endothéliales. Contrairement à l'angiogenèse classique, le VM permet aux cellules tumorales d'organiser elles-mêmes des structures pseudo-vasculaires qui facilitent la perfusion et la survie dans un microenvironnement hostile. Observé dans les tumeurs les plus agressives, le VM est associé à un pronostic défavorable, à un risque accru de progression et à une résistance marquée aux thérapies anti-angiogéniques. Le VM représente ainsi une adaptation majeure qui permet au GBM d'échapper aux stratégies ciblant la vascularisation conventionnelle, soulignant la nécessité d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques capables de perturber cette organisation alternative.

Au cœur de cette plasticité résident des voies de signalisation dont les rôles cliniques se précisent progressivement. La voie JAK/STAT3, associée aux états inflammatoires et à la survie cellulaire, confère aux cellules tumorales et stromales une capacité d'adaptation favorisant la migration, la formation de structures capillaires et l'acquisition de caractéristiques mésenchymateuses. Parallèlement, la voie Hippo/YAP-TEAD, maître régulateur de la croissance et de la mécanotransduction, est largement dérégulée dans le GBM. Sa surexpression, notamment via YAP1, TEAD1 et leurs cibles CYR61 et CTGF est associée à une agressivité accrue, à une résistance thérapeutique et à un rôle direct dans la formation du VM. Un autre volet clinique émergent concerne la contribution des mécanismes de trafic intracellulaire à la progression tumorale. La protéine SORT1 (sortiline), impliquée dans le tri intracellulaire des protéines, et le récepteur EGFR, amplifié dans près de 50 % des GBM, forment un complexe fonctionnel récemment mis en lumière. Leur interaction module l'internalisation, la signalisation et la localisation nucléaire d'EGFR, influençant directement la migration, l'invasion et la chimiorésistance. Comprendre comment

cette interconnexion régulatrice soutient le VM constitue une avenue d'intérêt majeur, compte tenu de l'importance clinique d'EGFR dans le GBM et du manque d'efficacité des thérapies ciblant ce récepteur.

La compréhension des voies de signalisation dérégulées et des réseaux de régulation intracellulaire impliqués dans la plasticité tumorale est essentielle pour éclairer les mécanismes qui nourrissent le VM et contribuent à l'échec thérapeutique. Trois axes biologiques émergent comme particulièrement déterminants: le rôle de STAT3 dans l'acquisition d'un phénotype capillaire par les cellules mésenchymateuses, l'implication du complexe transcriptionnel YAP/TEAD dans le VM des cellules de glioblastome, et l'interaction fonctionnelle SORT1/EGFR, qui module les caractéristiques de cellules souches, la migration, la résistance aux traitements et la formation de structures vasculaires alternatives. Ensemble, ces processus dévoilent un réseau moléculaire intégré conférant au GBM une capacité d'adaptation exceptionnelle et suggèrent de nouvelles pistes thérapeutiques ciblant la plasticité cellulaire et les mécanismes non conventionnels de vascularisation.

CHAPITRE 1

REVUE DE LITTÉRATURE

1.1 Le cancer

1.1.1 Généralités

Le cancer demeure l'un des plus grands défis de santé publique mondiale, représentant la deuxième cause de mortalité après les maladies cardiovasculaires selon la Société Américaine du Cancer. En 2022, près de 20 millions de nouveaux cas ont été diagnostiqués. De ceux-ci, 9,7 millions de personnes en sont décédées (American Cancer Society, 2025), la distribution de ces cas est présentée à la figure 1.1.

Ces chiffres illustrent non seulement l'ampleur de la maladie, mais aussi son impact grandissant sur la population mondiale. Malgré des décennies de recherche et des progrès médicaux considérables, le fardeau du cancer continue d'augmenter à un rythme inquiétant. Environ une personne sur cinq développera un cancer au cours de sa vie. Une femme sur douze et un homme sur neuf en mourront. Ces statistiques révèlent qu'un décès sur six dans le monde est causé par un cancer (Bray *et al.*, 2021).

Les projections pour les décennies à venir sont tout aussi préoccupantes. Il est attendu que d'ici 2050, le nombre de nouveaux cas de cancer devrait atteindre 35 millions par an, une hausse principalement due à la croissance démographique, au vieillissement des populations, mais aussi à des facteurs environnementaux et comportementaux (Lewandowska *et al.*, 2019). L'évolution des modes de vie marquée par une sédentarité accrue, une alimentation transformée, la pollution et l'exposition à des agents cancérigènes ou encore le stress chronique contribuent à cette épidémie (Avgerinos *et al.*, 2019). Cela souligne l'urgence d'accélérer le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Le cancer continue d'échapper aux traitements conventionnels, posant un défi majeur pour la recherche biomédicale. Bien que la chirurgie, la chimiothérapie, l'immunothérapie et la radiothérapie aient considérablement amélioré les taux de survie pour certains types de cancer, ces approches atteignent leurs limites face aux tumeurs agressives et résistantes aux traitements, comme le glioblastome (Rodgers *et al.*, 2024).

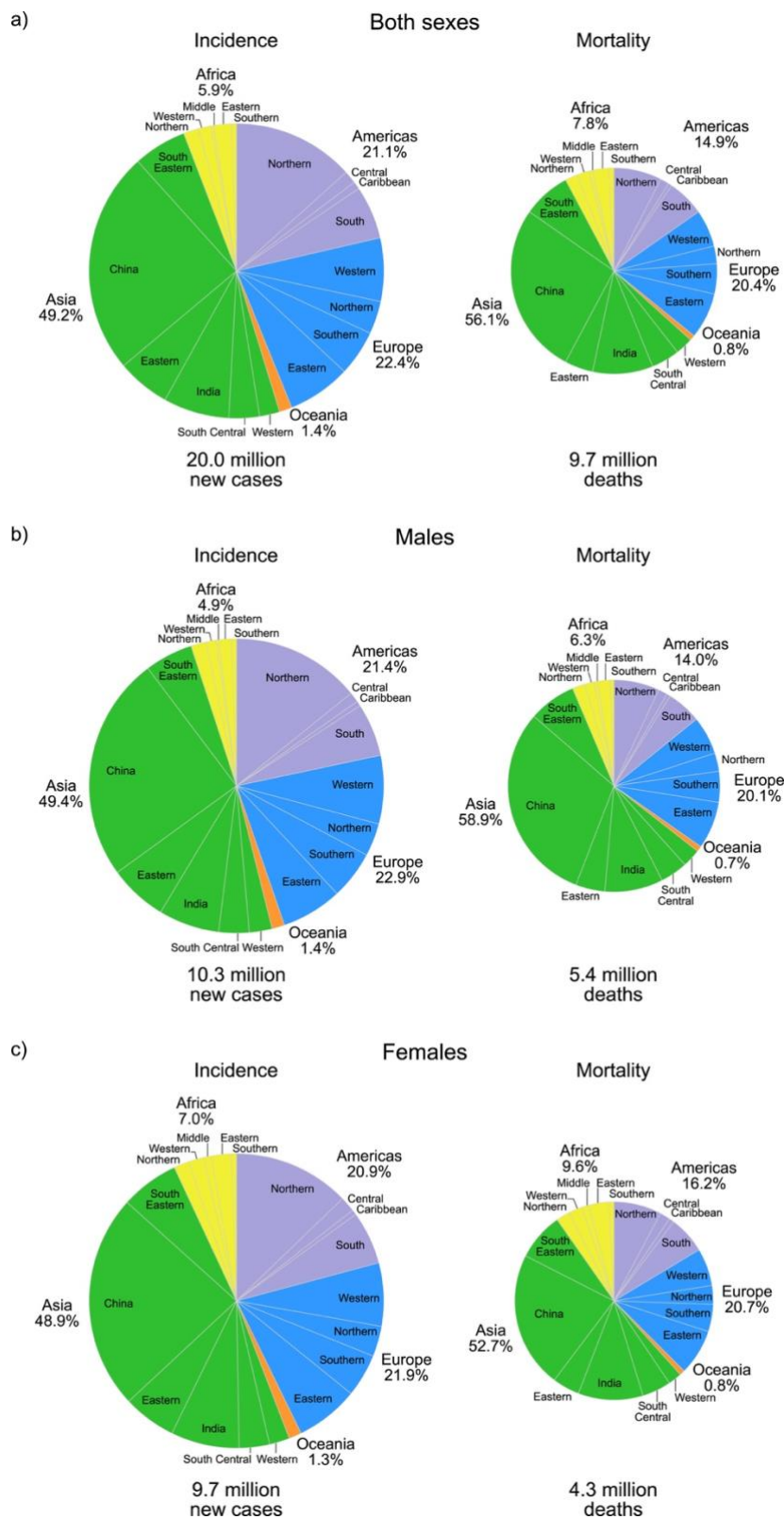


Figure 1.1. Répartition mondiale des nouveaux cas de cancer et des décès par cancer en 2022 selon le sexe et la région. Cette figure illustre la distribution estimée des nouveaux cas de cancer (A) et des décès par cancer (B) selon les régions du monde, en 2022. Les données sont présentées pour l'ensemble de la population (les deux sexes combinés), ainsi que séparément pour les hommes et les femmes. En 2022, on estime à 20,0 millions le nombre de nouveaux cas de cancer dans le monde (19,96 millions).

(Adaptée de Bray *et al.* 2024)

1.1.2 Cancérogenèse: Étapes clés de la transformation maligne

Le cancer est une maladie dynamique, évolutive et hétérogène, caractérisée par une instabilité génomique, une prolifération et une immortalité cellulaire, qui résultent de l'accumulation de mutations au fil du temps (Dagogo-Jack *et al.*, 2017). Ce processus appelé cancérogenèse, repose sur une série d'altérations moléculaires et cellulaires qui confèrent aux cellules tumorales des propriétés leur permettant d'échapper aux mécanismes de régulation physiologique et de proliférer de manière anormale. La cancérogenèse se déroule en trois grandes étapes : l'initiation, la promotion et la progression (Pitot *et al.*, 1993).

L'initiation est caractérisée par l'apparition de nouvelles mutations génétiques et épigénétiques au sein d'une cellule souche ou différenciée. Ces mutations peuvent être induites par des facteurs dits endogènes tels que le stress oxydatif, des erreurs de réplication de l'ADN ou une inflammation chronique. Dans certains cas, ces mutations sont également induites par des facteurs exogènes tels que le tabagisme, des agents chimiques, des radiations ionisantes ou des virus oncogènes, (figure 1.2) (Klaunig *et al.*, 2018). Les facteurs de risque endogènes et exogènes sont résumés dans le tableau 1.1.

Tableau 1.1. Principaux facteurs de risques endogènes et exogènes impliqués dans la cancérogenèse.

Facteurs endogènes	Facteurs exogènes
Mutations génétiques héréditaires (<i>BRCA1</i> , <i>BRCA2</i> , <i>TP53</i>)	Tabagisme, consommation d'alcool
Altérations épigénétiques	Exposition aux rayonnements UV, radiations ionisantes
Déséquilibres hormonaux (œstrogènes, androgènes)	Infections virales (VHB, VHC, HPV), bactériennes (<i>Helicobacter pylori</i>)
Vieillesse cellulaire	Expositions professionnelles (amiante, pesticides)
Inflammation chronique, stress oxydatif	Alimentation déséquilibrée, sédentarité, obésité
Déficits du système immunitaire	Polluants environnementaux (radon, particules fines)

Distinction entre les facteurs endogènes, intrinsèques à l'organisme et les facteurs exogènes, liés à des influences environnementales ou comportementales. Ces éléments favorisent l'apparition, la promotion ou la progression de lésions précancéreuses en perturbant les mécanismes de régulation cellulaire. La compréhension de leur contribution respective est essentielle pour la mise en place de stratégies de prévention ciblée du cancer.

(Adapté de Hanahan & Weinberg, 2011)

L'instabilité génomique est un élément clé de cette étape car elle favorise l'accumulation successive de mutations qui permettent aux cellules tumorales d'acquérir de nouvelles propriétés prolifératives et invasives (Salmaninejad *et al.*, 2021). Les principaux oncogènes et gènes suppresseurs impliqués dans ce processus sont répertoriés dans le tableau 1.2. Les gènes principalement affectés incluent les oncogènes, dont l'activation anormale stimule la prolifération cellulaire et favorise l'échappement aux signaux de contrôle. Dans cette catégorie on retrouve notamment l'epidermal growth factor receptor (EGFR), les gènes rat sarcoma viral oncogene family (RAS) ainsi que MYC proto-oncogene, bHLH transcription factor (MYC) (Talukdar *et al.*, 2020). Les gènes suppresseurs de tumeurs, comme tumor protein p53 (TP53) sont dans certains types de cancers, considérablement sous-exprimés ou inactivés supprimant ainsi les freins naturels à la division cellulaire. Enfin, les gènes de réparation de l'ADN tels que breast cancer 1 and 2, DNA repair associated (BRCA1, BRCA2), d'importants acteurs dans la stabilité du génome. Leur perte de fonction entraîne une accumulation incontrôlée de mutations au sein de la cellule (Voskarides *et al.*, 2023; O'Connor *et al.*, 2015).

Lorsque des altérations dépassent les capacités de réparation de la cellule, et que les signaux d'apoptose sont dysfonctionnels, la cellule entre alors dans une phase de prolifération anormale, amorçant alors la progression tumorale (Wong, 2011).

La phase de promotion est caractérisée par une expansion clonale des cellules mutées, qui acquièrent un avantage sélectif sur les cellules normales. Cette phase est marquée par une prolifération incontrôlée, favorisée par plusieurs mécanismes (Yizhak *et al.*, 2019). L'activation de différentes voies signalétiques a été documenté dans cette phase, telle que les voies phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase / AKT serine-threonine kinase / mechanistic target of rapamycin (PI3K/AKT/mTOR) et mitogen-activated protein kinase (MAPK). Les acteurs de ces voies, lorsque surexprimés, permettent aux cellules cancéreuses de proliférer même en l'absence de signaux de division. De plus, la résistance aux signaux pro-apoptotiques

via la suractivation du gène anti-apoptique B-cell lymphoma 2 (BCL-2) et l'inactivation du gène pro-apoptotique BCL2-associated X (BAX) par exemple, compliquent voire empêchent l'élimination des cellules cancéreuses (Vitale *et al.*, 2023, Kale *et al.*, 2018). Finalement, vient le remodelage du microenvironnement tumoral via la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que l'interleukine-6 (IL-6) et le tumor necrosis factor alpha TNF- α favorisant l'inflammation chronique et la néovascularisation au site tumoral (Annabi *et al.*, 2017).

Bien que complexe, cette phase de promotion reste un processus réversible car certaines cellules pré-tumorales peuvent être ciblées par des mécanismes de surveillance immunitaire ou par l'élimination des facteurs promoteurs, par exemple, l'arrêt du tabac et la réduction de l'inflammation. Lorsqu'à cette phase, la prolifération incontrôlée persiste, les cellules acquièrent progressivement les caractéristiques d'immortalité cellulaire, favorisant la transition vers la dernière phase de la cancérogénèse soit la phase de progression. Ce processus évolutif est résumé dans les figures 1.2. et 1.3.

Cette dernière phase caractérisée par une transformation radicale du comportement cellulaire. À ce stade, les cellules cancéreuses ont d'importants avantages sélectifs sur les cellules saines leur permettant de déjouer les défenses immunitaires et les mécanismes physiologique de régulation. Cette évolution cellulaire repose sur plusieurs mécanismes biologiques complexes notamment l'immortalisation cellulaire, l'évasion immunitaire et des altérations du microenvironnement tumoral favorisant l'expansion tumorale (Hanahan, 2022).

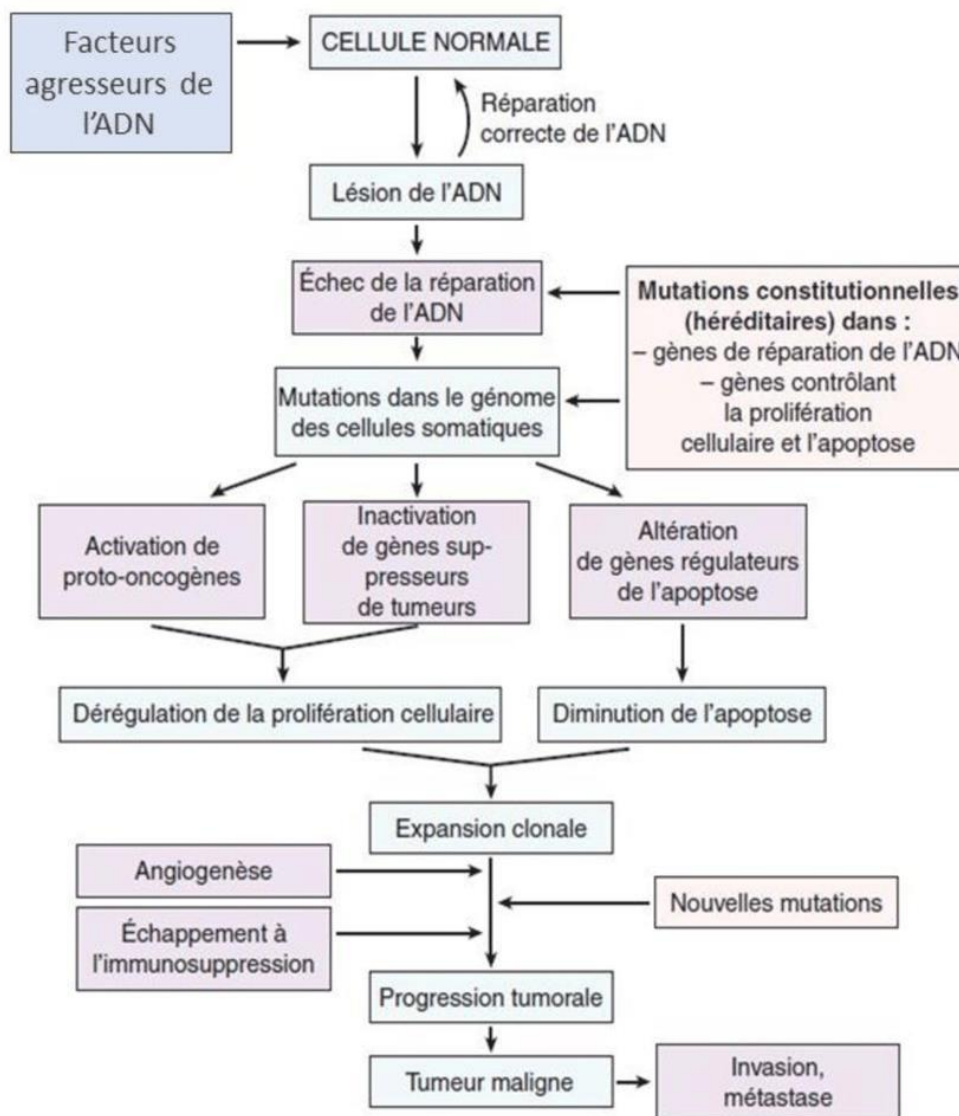


Figure 1.2. Processus de cancérogenèse. Les trois étapes majeures de la transformation maligne des cellules : l'initiation (altérations génétiques précoces induites par des agents cancérogènes), la promotion (expansion clonale des cellules altérées sous l'effet de signaux prolifératifs et de l'inflammation chronique), et la progression (acquisition d'un phénotype invasif, évasion immunitaire et dissémination métastatique).

(Adapté de : Fournié *et al.*, 2020)

Parallèlement, les cellules cancéreuses doivent également échapper aux mécanismes de surveillance immunitaire, un obstacle majeur à la progression maligne. Normalement, le système immunitaire reconnaît et élimine les cellules anormales via la présentation d'antigènes tumoraux aux lymphocytes T cytotoxiques.

Toutefois, les cellules tumorales développent des stratégies pour contourner cette réponse, on parle d'évasion immunitaire. Parmi celles-ci, l'expression accrue du Programmed Death-Ligand 1 (PD-L1) joue un rôle clé. En effet, en interagissant avec le récepteur PD1 des lymphocytes T, cette surexpression va inhiber leur activation, altérant ainsi leur capacité à détecter et détruire les cellules tumorales (Yu *et al.*, 2023). En complément, le remodelage du microenvironnement tumoral par la sécrétion des métalloprotéases matricielles (MMPs), permet de moduler la matrice extracellulaire. Ce processus a une grande importance dans l'expansion tumorale, la modification des interactions intercellulaires et en facilitant la dégradation des barrières tissulaires naturelles (Zhou *et al.*, 2023).

Bien que ces mécanismes permettent à la tumeur de croître localement et d'échapper au système immunitaire, l'acquisition d'un phénotype invasif est une étape déterminante dans la progression tumorale. À ce stade avancé de la progression tumorale, les cellules malignes deviennent hautement plastiques et adaptatives, combinant des mécanismes de prolifération infinie, d'évasion immunitaire et de migration agressive. Cette plasticité et cette résilience leur permet de résister aux traitements conventionnels et de survivre dans des conditions hostiles. Lorsque ces cellules acquièrent la capacité de franchir les barrières biologiques et d'entrer dans la circulation sanguine ou lymphatique, elles amorcent le processus métastatique, qui représente une étape clé de la progression cancéreuse (Zhou *et al.*, 2023).

Cancérogenèse

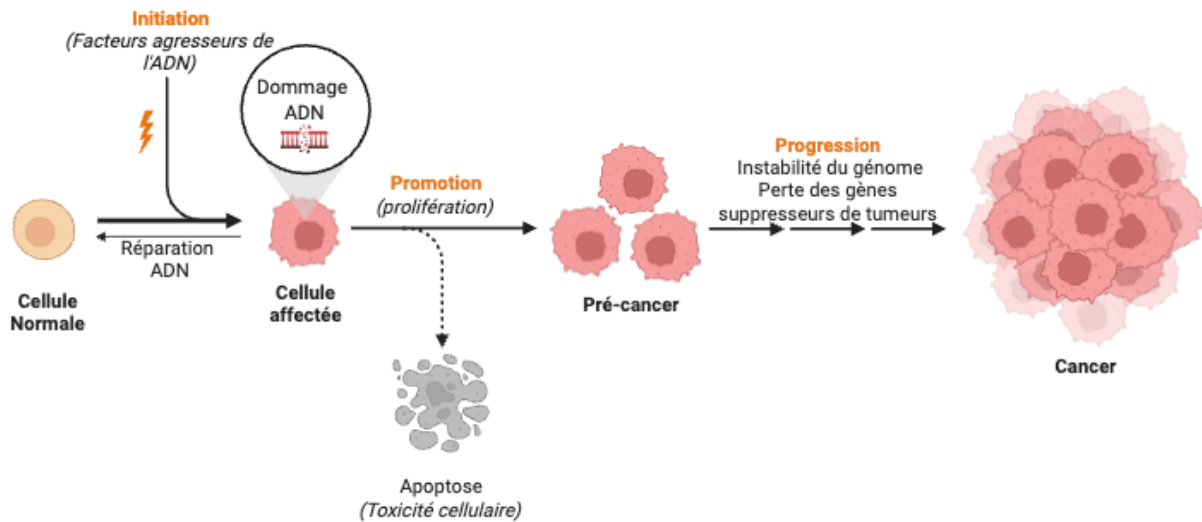


Figure 1.3. Représentation schématique des étapes de la cancérogenèse. Les trois étapes principales du processus de cancérogenèse : l'initiation, la promotion et la progression. L'initiation correspond à l'apparition de mutations génétiques ou épigénétiques, souvent induites par des agents cancérogènes (rayonnements, substances chimiques, virus oncogènes). La phase de promotion est marquée par la prolifération clonale des cellules altérées, sous l'effet de signaux prolifératifs, de l'inflammation chronique et de l'activation de voies signalétiques oncogéniques (ex. : PI3K/AKT, MAPK). La progression correspond à la transformation maligne, caractérisée par l'immortalisation cellulaire, l'évasion immunitaire, des remaniements du microenvironnement tumoral, et l'acquisition d'un phénotype invasif propice à la dissémination métastatique.

(Figure créée à l'aide de BioRender, Marie-Eve Roy)

Tableau 1.2. Oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs altérés dans le cancer.

Type de gène	Gène	Fonction principale	Altérations fréquentes	Cancers associés
Oncogènes	EGFR	Récepteur tyrosine kinase stimulant la prolifération cellulaire	Mutation activatrice, amplification	Glioblastome, cancer du poumon, cancer colorectal
	KRAS	Protéine G impliquée dans la transduction des signaux mitogènes	Mutation ponctuelle (codons 12 et 13)	Pancréas, colorectal, poumon
	MYC	Facteur de transcription favorisant la croissance et la prolifération cellulaire	Amplification, surexpression	Lymphomes, sein, colorectal
	BRAF	Kinase de la voie MAPK	Mutation V600E	Mélanome, thyroïde, colorectal
	HER2 (ERBB2)	Récepteur de facteur de croissance épidermique	Amplification du gène	Sein, estomac
Gènes suppresseurs de tumeurs	TP53	Gardien du génome, contrôle du cycle cellulaire et induction de l'apoptose	Mutation inactivatrice	Sein, colorectal, poumon, glioblastome
	RB1	Régulateur de la transition G1/S du cycle cellulaire	Perte de fonction	Rétinoblastome, ostéosarcome, poumon
	PTEN	Inhibiteur de la voie PI3K/AKT/mTOR, rôle dans la survie cellulaire	Mutation, délétion	Prostate, endomètre, glioblastome
	BRCA1 / BRCA2	Réparation de l'ADN par recombinaison homologue	Mutation germinale ou somatique	Sein, ovaire, prostate
	CDKN2A (p16)	Inhibiteur des kinases CDK4/6, contrôle du cycle cellulaire	Mutation, méthylation du promoteur	Mélanome, pancréas, glioblastome

Sélection des gènes les plus couramment altérés dans les tumeurs malignes. Les oncogènes, lorsqu'ils sont mutés ou surexprimés, contribuent à la prolifération cellulaire incontrôlée. À l'inverse, les gènes suppresseurs de tumeurs exercent normalement un rôle de frein sur la croissance cellulaire, et leur inactivation favorise la tumorigénèse. Les altérations indiquées incluent des mutations ponctuelles, des amplifications génétiques, des pertes de fonction ou des modifications épigénétiques. Ces gènes jouent un rôle central dans les voies de signalisation régulant la croissance, l'apoptose, le cycle cellulaire et la réparation de l'ADN. Leur dérégulation est impliquée dans la majorité des cancers humains.

(Adapté de NCBI Bookshelf)

1.1.3 Métastases et invasion tumorale

Les métastases constituent la principale cause de mortalité liée au cancer, représentant plus de 90% des décès attribuables aux tumeurs malignes (Siegel *et al.*, 2023). Ce processus complexe implique une cascade d'événements cellulaires et moléculaires qui permettent aux cellules de quitter la tumeur primaire, survivre

dans la circulation sanguine et lymphatique, puis de coloniser des organes distants. Contrairement à la croissance tumorale locale, qui repose surtout sur des altérations de type métabolique, la dissémination métastatique repose sur un ensemble de mécanismes sophistiqués permettant aux cellules tumorales d'acquérir un phénotype migratoire, d'interagir avec leur microenvironnement et de résister aux défenses immunitaires (Hanahan & Weinberg, 2011).

L'invasion métastatique repose sur plusieurs étapes successives et interdépendantes. Le processus débute par la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM), une reprogrammation cellulaire qui permet aux cellules cancéreuses de perdre leur adhérence aux cellules voisines et d'acquérir un phénotype migratoire. Sous l'effet des signaux moléculaires comme TGF- β ou Wnt, les cellules cancéreuses perdent leurs caractéristiques épithéliales, notamment l'expression de E-cadhérine, une protéine d'adhésion cellulaire clé. La perte d'adhérence permet de se détacher du tissu tumoral primaire, tandis que l'expression accrue de marqueurs mésenchymateux tels que la vimentine et la N-cadhérine leur confère une mobilité accrue (Suhail Y *et al.*, 2019).

Une fois ces caractéristiques acquises, les cellules tumorales deviennent mobiles et invasives, leur permettant de traverser la membrane basale et de pénétrer dans la matrice extracellulaire environnante. Cette migration active est facilitée par la sécrétion des MMPs qui dégradent les composants de la matrice extracellulaire environnante ouvrant la voie aux cellules cancéreuses (Wang J *et al.*, 2020). Celles-ci utilisent ensuite des mécanismes de chimiotactisme, guidées par des signaux biochimiques provenant du microenvironnement tumoral, pour se diriger vers les vaisseaux sanguins ou lymphatiques (Yang *et al.*, 2023).

L'intravasation marque l'entrée des cellules tumorales dans la circulation, les cellules deviennent alors des cellules tumorales circulantes (CTC), exposées à des contraintes mécaniques et au stress immunitaire. Pour survivre, ces cellules peuvent former des agrégats avec des plaquettes, leur conférant une protection contre le cisaillement des flux sanguins et une évasion partielle de la reconnaissance immunitaire (Chiang *et al.*, 2016). L'extravasation est l'étape suivante, au cours de laquelle les cellules tumorales quittent la circulation pour coloniser un nouvel organe. Ce processus implique des interactions spécifiques entre les cellules endothéliales des vaisseaux et les cellules tumorales, facilitant leur passage à travers la paroi vasculaire. Une fois extravasées, elles doivent s'adapter à leur nouvel environnement, souvent très différent de leur tissu d'origine. Certaines cellules métastatiques restent en dormance pendant des années avant de se réactiver sous l'influence de signaux environnementaux spécifiques, un phénomène connu sous le nom de dormance tumorale. (Lin *et al.*, 2021, Agudo *et al.*, 2024)

Un défi majeur de la prise en charge des métastases repose sur l'extrême hétérogénéité des cellules tumorales disséminées. Celles-ci peuvent présenter des profils génétiques et épigénétiques distincts de la tumeur primaire, influençant leur réponse aux traitements. L'évolution clonale des métastases conduit souvent à l'émergence de sous-populations cellulaires présentant des résistances accrues aux thérapies standards (Greaves *et al.*, 2012).

Le microenvironnement tumoral métastatique joue également un rôle clé dans la progression des lésions secondaires. Les cellules cancéreuses interagissent avec les fibroblastes, les cellules immunitaires et la matrice extracellulaire pour créer l'environnement parfait à leur expansion. Certaines tumeurs métastatiques sont capables de reprogrammer les cellules stromales locales, transformant ainsi l'organe cible en un site propice à la croissance tumorale (Deepak KGK *et al.*, 2020).

Comme illustré à la figure 1.4. L'environnement tumoral métastatique ne se limite pas à l'interaction entre les cellules cancéreuses et les composants stromaux; il repose également sur des mécanismes dynamiques qui favorisent la prolifération et la dissémination tumorale. Parmi eux, l'angiogenèse joue un rôle déterminant en assurant l'apport en oxygène et en nutriments nécessaire à la croissance des lésions secondaires. Si ce processus est essentiel au développement physiologique, son dérèglement dans un contexte tumoral contribue directement à l'agressivité des tumeurs métastatiques (Nghiem *et al.*, 2025).

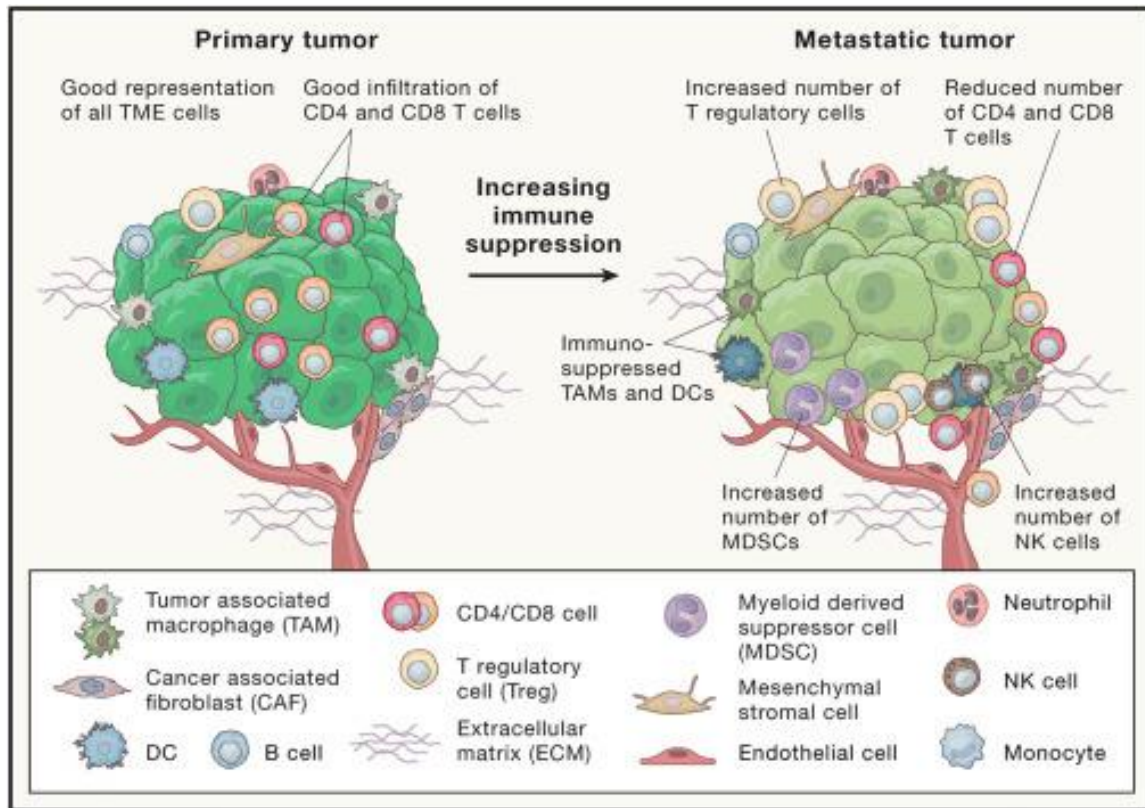


Figure 1.4. Schéma de la cascade métastatique et influence du microenvironnement tumoral. Le TME joue un rôle fondamental dans la croissance et la progression des tumeurs, notamment dans le contexte métastatique. Il est composé d'éléments clés du système immunitaire inné et adaptatif ainsi que de cellules stromales et des éléments de l'EMC. Dans les tumeurs métastatiques, l'environnement immunitaire devient progressivement plus immunosuppresseur, notamment via l'expression accrue de récepteurs de régulation immunitaire, limitant ainsi l'action des cellules immunitaires cytotoxiques.

(Adapté de Gerstberger *et al.*, 2023)

1.1.4 Angiogenèse physiologique et pathologique

Les métastases ne peuvent se développer sans un apport sanguin suffisant pour nourrir les cellules tumorales nouvellement implantées. L'angiogenèse, processus physiologique responsable de la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de capillaires préexistants, joue un rôle dans la croissance tumorale et l'établissement des niches métastatiques. Alors que l'angiogenèse est strictement régulée dans des

conditions normales, comme lors de la cicatrisation ou du développement embryonnaire, les tumeurs détournent ce mécanisme à leur avantage pour assurer leur expansion et leur dissémination. On parle alors d'angiogenèse pathologique; ce processus devient anarchique et dysfonctionnel et favorise grandement la progression tumorale en créant un réseau vasculaire désorganisé, augmentant l'hypoxie tumorale et favorisant l'invasion cellulaire (La Mendola *et al.*, 2022).

L'angiogenèse tumorale est principalement stimulée par l'hypoxie qui induit l'expression de facteurs pro-angiogéniques comme le Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) (Melincovici *et al.*, 2022). L'hypoxie, stabilise le facteur Hypoxia-Inducible Factor 1-alpha (HIF-1 α), qui régule directement la production de VEGF et d'autres facteurs favorisant la prolifération des cellules endothéliales et la perméabilité vasculaire (Tableau 1.3) (Musleh Ud Din *et al.*, 2024). Ce réseau vasculaire nouvellement formé n'est cependant pas fonctionnel : il est immature et mal structuré et contribue ainsi à une perfusion inefficace et à une augmentation du stress hypoxique intra-tumoral (Viallard *et al.*, 2017).

En parallèle, les nouveaux vaisseaux sanguins forment des structures perméables facilitant l'intravasion des cellules tumorales dans la circulation sanguine, augmentant la probabilité de dissémination vers des sites et organes distants. De plus, les niches pré-métastatiques peuvent induire une angiogenèse spécifique avant même l'arrivée des cellules tumorales, préparant ainsi l'environnement pour l'implantation et la prolifération des métastases (Peinado *et al.*, 2017). Les thérapies anti-angiogéniques visent à bloquer cette vascularisation anormale afin de priver la tumeur de nutriments et d'oxygène, limitant ainsi sa croissance et sa dissémination. Des inhibiteurs de VEGF, comme le bévacizumab (Avastin) ont montré une efficacité clinique en ralentissant la progression de certains cancers métastatiques (Hurwitz *et al.*, 2004). Cependant, l'efficacité des traitements anti-VEGF reste limitée par l'émergence de mécanismes de résistance. En réponse à l'inhibition de l'angiogenèse classique, certaines tumeurs adoptent des stratégies alternatives pour assurer leur apport en oxygène et en nutriments (Sharma *et al.*, 2023).

Parmi ces mécanismes alternatifs, le mimétisme vasculogénique (MV) représente une voie singulière par laquelle les cellules tumorales acquièrent des propriétés endothéliales, leur permettant de former des structures vasculaires indépendantes de l'angiogenèse classique. (Lapkina *et al.*, 2023). Contrairement à la néovascularisation dépendante des cellules endothéliales, le mimétisme vasculogénique implique la plasticité phénotypique des cellules cancéreuses elles-mêmes, leur conférant un avantage sélectif dans des conditions de stress hypoxique et sous pression thérapeutique.

Tableau 1.3 Régulateurs endogènes de l'angiogenèse

Type	Facteur	Fonction principale
Pro-angiogénique	VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)	Stimule la prolifération, la migration et la perméabilité des cellules endothéliales.
	FGF (Fibroblast Growth Factor)	Induit la prolifération des cellules endothéliales et la formation de nouveaux capillaires.
	PDGF (Platelet-Derived Growth Factor)	Recrute les cellules périvasculaires et stabilise les néovaisseaux.
	TGF- β (Transforming Growth Factor-beta)	Modulant selon le contexte : peut être pro- ou anti-angiogénique.
	Angiopoïétines (ANG-1, ANG-2)	ANG-1 stabilise les vaisseaux, ANG-2 les rend plus perméables et réactifs à VEGF.
Anti-angiogénique	Thrombospondine-1	Inhibe l'adhésion et la migration des cellules endothéliales.
	Endostatine	Inhibe la prolifération des cellules endothéliales et la néoformation vasculaire.
	Angiostatine	Supprime la formation de nouveaux vaisseaux en bloquant les récepteurs VEGF.
	Interférons (IFN- α/β)	Présentent des propriétés anti-prolifératives et anti-angiogéniques.
	IL-12 (Interleukine-12)	Inhibe indirectement l'angiogenèse via l'activation des cellules NK et T.

Principaux régulateurs endogènes de l'angiogenèse, regroupés selon leur activité pro- ou anti-angiogénique. Les facteurs pro-angiogéniques comme VEGF, FGF ou les angiopoïétines favorisent la croissance, la migration et la différenciation des cellules endothéliales, soutenant ainsi la formation de néovaisseaux. À l'inverse, les régulateurs anti-angiogéniques tels que la thrombospondine-1, l'endostatine ou l'interféron α/β freinent ce processus, limitant ainsi l'expansion vasculaire. L'équilibre entre ces deux groupes est essentiel pour le contrôle physiologique de l'angiogenèse et son dérèglement constitue une signature clé du développement tumoral.

(Adapté de Debnath, *et al.*, 2021)

1.1.5 Mimétisme vasculogénique: définitions, mécanismes et implications biologiques

Le VM représente un phénomène important dans la progression tumorale, où certaines cellules cancéreuses, en particulier les plus agressives, acquièrent la capacité de former des structures vasculaires indépendamment des cellules endothéliales classiques. Cette découverte, initialement rapportée en 1999 par Maniotis et ses collaborateurs dans le mélanome, a profondément bouleversé la compréhension des mécanismes de vascularisation tumorale. (Maniotis *et al.*, 1999) Le VM met en lumière la plasticité phénotypique des cellules tumorales, qui peuvent adopter des caractéristiques endothéliales et organiser un réseau pseudo-vasculaire favorisant la perfusion tumorale (Hendrix *et al.*, 2016).

Ce processus repose sur l'activation de plusieurs voies moléculaires clés, impliquant des facteurs de signalisation spécifiques qui confèrent aux cellules cancéreuses une capacité à remodeler leur microenvironnement. Contrairement aux cellules endothéliales, les cellules impliquées dans le VM n'expriment pas les marqueurs endothéliaux classiques tels que CD31 ou le facteur de von Willebrand (Marques Dos Reis *et al.*, 2022). Elles conservent leur identité tumorale tout en adoptant une organisation pseudo-vasculaire facilitée par le remodelage de la matrice extracellulaire, notamment via la sécrétion de laminine et l'activation des MMPs. La VE-cadhérine (CD144), bien qu'habituellement restreinte aux cellules endothéliales, est parfois exprimée de manière aberrante dans les tumeurs présentant du VM, suggérant un rôle dans l'interaction cellulaire et la structuration des canaux vasculaires, mais son implication exacte reste controversée (Sun *et al.*, 2025).

Le VM repose sur des voies de signalisation spécifiques qui confèrent aux cellules tumorales une plasticité phénotypique leur permettant de remodeler leur microenvironnement. Des régulateurs clés tels que l'EPH receptor A2 (EPHA2), la famille de gènes phosphoinositide 3-kinase (PI3K), la Protein Tyrosine Kinase 2 (PTK2) et les MMPs orchestrent les interactions entre les cellules tumorales et la matrice extracellulaire, facilitant ainsi la formation des structures pseudo-vasculaires (Li *et al.*, 2017). Ce phénomène est particulièrement observé dans les cancers agressifs tels que les glioblastomes, le mélanome, les sarcomes et certains cancers du sein triple négatif (Delgado-Bellido *et al.*, 2023).

Le VM favorise la résistance aux thérapies anti-angiogéniques ciblant le VEGF, car il permet la perfusion tumorale indépendamment de la néoangiogenèse classique. D'autre part, il est associé à une agressivité accrue et à un mauvais pronostic, en favorisant l'invasion cellulaire, la dissémination métastatique et l'échappement immunitaire. (Pandiar *et al.*, 2023) Des études récentes suggèrent même que les cellules

impliquées dans le VM interagissent avec les cellules immunitaires du microenvironnement tumoral, contribuant ainsi à l'établissement d'un milieu immunosuppresseur (Yang *et al.*, 2023).

Face à ces défis, les recherches actuelles s'orientent vers des stratégies combinatoires intégrant l'inhibition des voies moléculaires impliquées dans le VM avec les thérapies anti-angiogéniques et immunothérapeutiques. De nouvelles approches ciblant la plasticité cellulaire, l'interaction avec la matrice extracellulaire et la signalisation adaptative des cellules tumorales pourraient permettre de contourner les résistances thérapeutiques et d'améliorer l'efficacité des traitements (Dudley *et al.*, 2023).

Ainsi, la découverte du VM représente une avancée majeure dans la compréhension de la progression tumorale et ouvre la voie de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblant non seulement la vascularisation, mais également la plasticité phénotypique des cellules cancéreuses. Une illustration schématique de ce processus est présentée à la figure 1.5.

Cette remarquable plasticité des cellules tumorales, largement observée dans les tumeurs agressives, repose sur des altérations profondes de l'identité cellulaire, facilitant l'adaptation au microenvironnement tumoral. Dans un contexte plus large, le remodelage du phénotype cellulaire s'inscrit dans un continuum de plasticité cellulaire où d'autres mécanismes, comme l'EMT sont clés. En effet, si le VM permet de suppléer à la vascularisation, l'EMT leur confère l'avantage migratoire et invasif permettant aux cellules d'acquérir des caractéristiques mésenchymateuses. Ces deux processus, bien que distincts, partagent des régulateurs communs et sont souvent observés dans les tumeurs les plus agressives. Un résumé comparatif des principales différences entre l'angiogenèse classique et le VM est présenté au tableau 1.4. (Liu *et al.*, 2016).

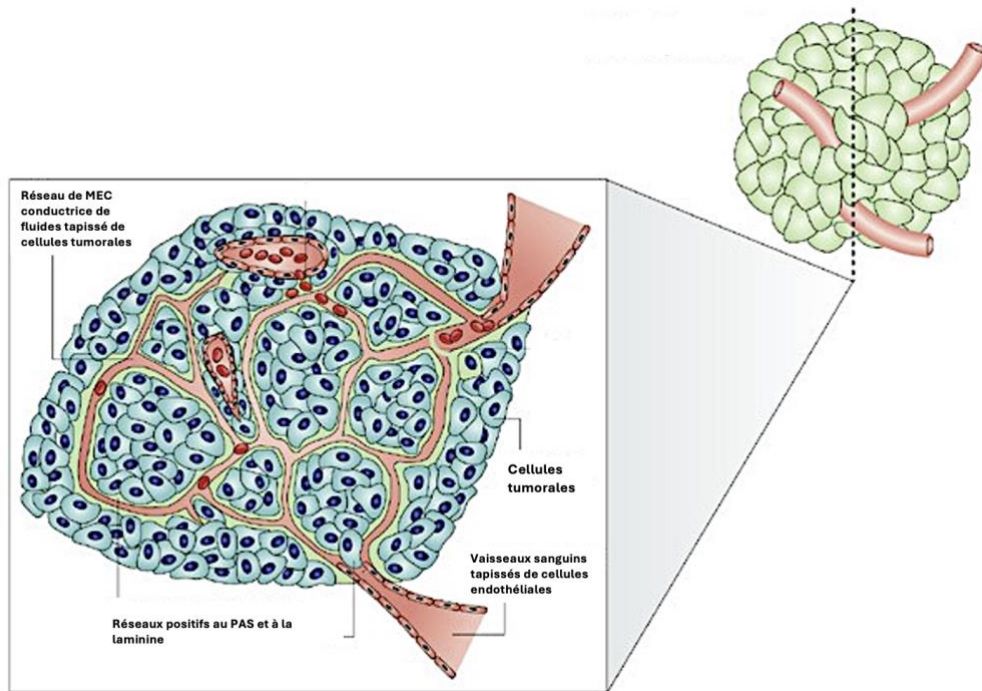


Figure 1.5. Illustration schématique du mimétisme vasculogénique. Les cellules tumorales agressives forment des canaux pseudo-vasculaires dépourvus de cellule endothéliale sous l'effet de facteurs pro-angiogéniques, permettant la perfusion indépendante des vaisseaux sanguins traditionnels. Ces réseaux sont généralement PAS-positifs et laminine-positifs. Ce type d'organisation est associé à l'agressivité accrue des tumeurs et à la dissémination métastatique. Les cellules impliquées imitent un phénotype endothélial tout en gardant leur origine tumorale.

(Adapté de Hendrix *et al.*, 2003)

Tableau 1.4. Comparaison entre l'angiogenèse classique et le VM dans le contexte tumoral.

Caractéristiques	Angiogenèse classique (endothélium dépendante)	Mimétisme vasculogénique (VM)
Cellules impliquées	Cellules endothéliales	Cellules tumorales agressives
Marqueurs moléculaires typiques	CD31, CD34, VE-cadhérine (endothéliale)	VE-cadhérine (non-vasculaire), EphA2, MMPs
Structure formée	Capillaires endothéliaux avec lumière	Réseaux PAS+/laminine+ dépourvus de cellules endothéliales
Inducteurs principaux	VEGF, FGF, HIF1 α , bFGF	Hypoxie, Notch, PI3K, Twist1, HIF1 α , VE-cadhérine
Inhibiteurs connus	Anti-VEGF, angiostatine, endostatine	SiRNA VE-cadhérine, inhibiteurs Notch, PI3K
Rôle dans la progression tumorale	Apport en oxygène et nutriments	Résistance aux thérapies, dissémination métastatique
Réponse aux thérapies anti-angiogéniques	Sensible aux anti-VEGF	Faiblement sensible, contournement thérapeutique

Ce tableau met en contraste les mécanismes, les acteurs moléculaires et les implications biologiques de l'angiogenèse classique dépendante des cellules endothéliales et du VM, où une vascularisation tumorale est assurée par des cellules cancéreuses plastiques.

(Adapté de Delgado-Bellido *et al.*, 2017)

1.1.6 La transition épithélio-mésenchymateuse

La TEM est un programme orchestré par des signaux du microenvironnement tumoral et une cascade de régulateurs transcriptionnels tels que le zinc finger protein (SNAIL), zinc finger protein SNAI2 (SLUG), twist family bHLH transcription factor 1 (TWIST) et zinc finger E-box-binding homeobox 1 et 2 (ZEB1/2), qui inhibent l'expression de protéines d'adhésion épithéliales comme l'epithelial cadherin (E-cadhérine) et induisent des marqueurs mésenchymateux tels que la vimentine, la neural cadherin (N-cadhérine) et la fibronectine. (Bed *et al.*, 2024, Liu *et al.*, 2025). Cette transition est déclenchée par des facteurs solubles, notamment le transforming growth factor beta (TGF- β), Wnt, et les cytokines inflammatoires, ainsi que par des interactions avec le microenvironnement tumoral, en particulier via les fibroblastes associés au cancer (CAFs) et les macrophages (Jia *et al.*, 2025).

En favorisant la migration et l'invasion, l'EMT permet aux cellules tumorales l'intravasation puis l'extravasation tels que décrit précédemment. Cependant, dans les métastases, une transition mésenchymo-épithéliale (MET) inverse peut également survenir, favorisant la formation de macrométastases en restaurant une adhésion intercellulaire et en facilitant l'implantation tumorale. Cette plasticité dynamique entre EMT et MET est un facteur clé de l'hétérogénéité tumorale et de l'adaptabilité des cellules cancéreuses (Bangarh *et al.*, 2024)

Comme le VM, l'EMT est associée à une résistance accrue aux traitements, notamment aux chimiothérapies et aux thérapies ciblées, en raison de l'activation des voies de survie telles que PI3K/AKT/mTor, NF- κ B, JAK/STAT3 ou encore la voie Hippo et d'une diminution de la prolifération cellulaire. De plus, elle contribue au développement des cellules souches cancéreuses (CSC), un sous-groupe de cellules tumorales capables de régénérer la tumeur, même après des traitements agressifs. (Liu *et al.*, 2013). Cibler l'EMT représente toujours l'un des défis majeurs pour limiter la progression métastatique, le développement du VM et améliorer l'efficacité des traitements anticancéreux qui ciblent principalement les cellules prolifératives sans arriver à totalement cibler les cellules tumorales quiescentes ou disséminées (Ran *et al.*, 2024). En effet, les cellules ayant subi une EMT ne sont pas fortement prolifératives. Elles adoptent plutôt une stratégie adaptative : réduction de la prolifération à court terme pour privilégier la migration, l'invasion et la survie, suivie d'une possible réactivation proliférative une fois implantées dans un nouveau site métastatique. Ce processus dynamique et réversible complique leur élimination par des thérapies conventionnelles ciblant principalement les cellules en cycle actif (Nieto *et al.*, 2016; Morel & Ouzounova, 2025). Les voies de signalisation principalement interconnectées entre le VM et l'EMT sont répertoriées dans le tableau 1.5.

Dans les tumeurs solides et notamment les tumeurs cérébrales, l'EMT est très souvent associé aux mécanismes d'adaptation tumorale. Parmi ceux-ci, on retrouve le VM et la modulation du microenvironnement tumoral, deux processus qui contribuent à remodeler l'écosystème tumoral (figure 1.6.). Ces mécanismes favorisent la formation de niches tumorales agressives, capables de soutenir la survie, l'invasion et la dissémination des cellules cancéreuses. Cette dynamique est particulièrement marquée dans le contexte des tumeurs du système nerveux central (SNC), où les contraintes uniques imposées par la barrière hémato-encéphalique (BHE) et la forte densité cellulaire influencent profondément l'évolution tumorale et favorisent des stratégies d'adaptation spécifiques (Sharma *et al.*, 2023; Arvanitis *et al.*, 2020).

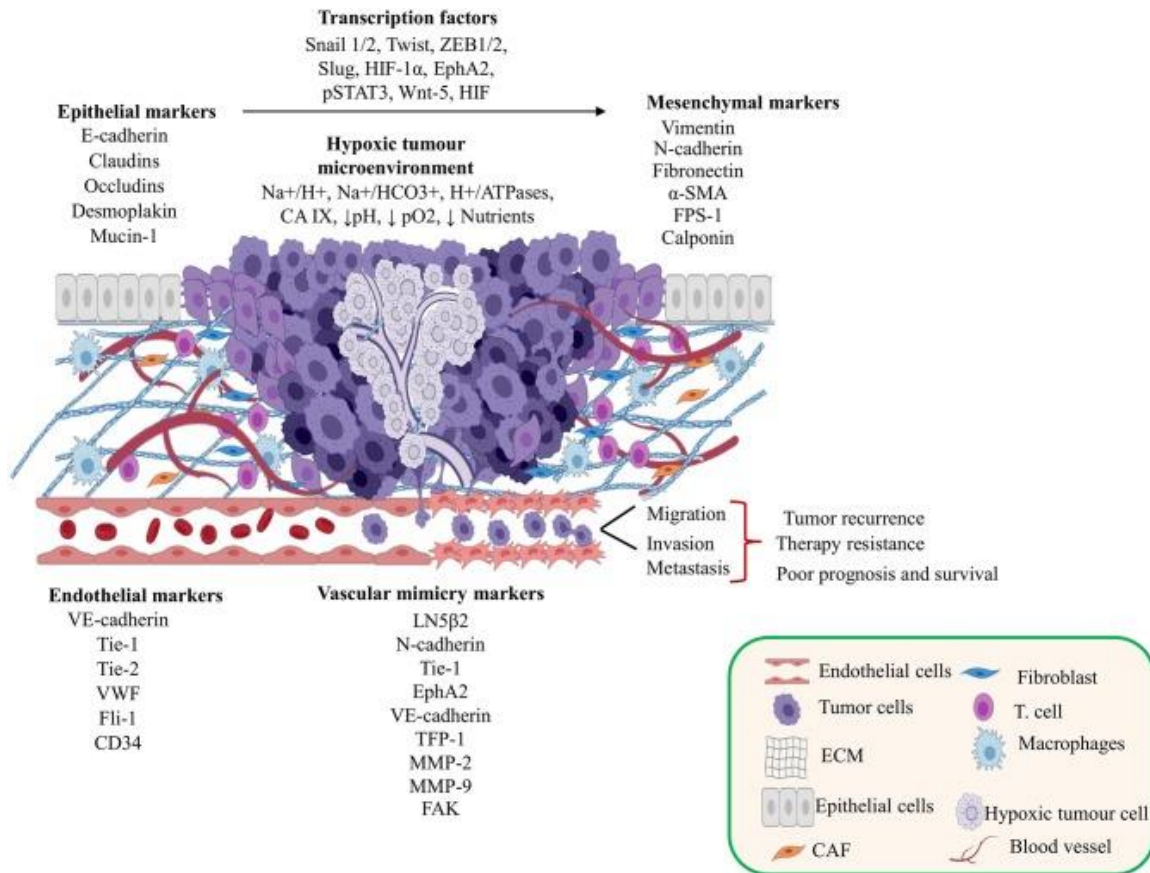


Figure 1.6. Contribution du microenvironnement tumoral et de la TEM à la formation du VM. Les effets du microenvironnement tumoral sur la formation du VM, mettant en évidence les liens entre les facteurs de transcription associés à la TEM, l'expression de marqueurs endothéliaux et les signaux induits par les cellules stromales. La plasticité cellulaire et les voies de signalisation activées dans le microenvironnement tumoral favorise l'émergence de cellules tumorales à phénotype pseudo-endothélial capables de VM. Ce processus contribue à la néovascularisation indépendante de l'endothélium classique et à la progression des tumeurs agressives. Il est important de souligner que les gènes représentés dans la figure tels que N-cadherin, EphA2, FAK entre autres sont présentés à titre d'exemples car ils ont été documentés dans le processus du VM. Ils ne constituent pas des biomarqueurs spécifiques ni exclusifs aux interactions tumorales pro-VM décrites dans cette figure.

(Adapté de Hernandez de la Cruz *et al.*, 2020)

Tableau 1.5. Principales voies de signalisation impliquées dans le VM et la TEM.

Voie de signalisation	Implication dans la TEM	Implication dans le VM
TGF-β	Induit la TEM via l'activation de facteurs de transcription tels que SNAIL, SLUG, ZEB1/2 et TWIST.	Favorise le VM en induisant la plasticité cellulaire et la dédifférenciation.
Wnt/β-caténine	Active la TEM en stabilisant β -caténine, conduisant à l'expression de gènes mésenchymateux.	Contribue au VM en favorisant la plasticité cellulaire et la formation de structures vasculaires.
Notch/Nodal	Maintient les caractéristiques des cellules souches et favorise la TEM.	Impliqué dans le VM en régulant la dédifférenciation et la formation de structures vasculaires.
PI3K/AKT	Active la TEM en favorisant la survie et la migration cellulaire.	Participe au VM en régulant la plasticité cellulaire et la formation de structures vasculaires.
Hypoxie (HIF-1α)	Induit la TEM en réponse à des conditions hypoxiques.	Favorise le VM en activant des gènes associés à la formation de structures vasculaires.
VE-cadhérine/EphA2	Non directement impliquée dans la TEM.	Cruciale pour le VM en facilitant la formation de structures vasculaires indépendantes des cellules endothéliales.
MMPs (MMP-2, MMP-9)	Dégradent la matrice extracellulaire, facilitant la migration cellulaire lors de la TEM.	Essentielles pour le VM en remodelant la matrice extracellulaire pour permettre la formation de structures vasculaires.

Ces voies, souvent interconnectées, jouent un rôle crucial dans la progression tumorale en favorisant la plasticité cellulaire, la migration, l'invasion et la formation de structures vasculaires indépendantes des cellules endothéliales.

(Adapté de Tang *et al.*, 2014)

1.2 Les tumeurs cérébrales

1.2.1 Catégorisation

Les tumeurs cérébrales représentent un défi majeur en oncologie en raison de leur hétérogénéité moléculaire, de leur capacité d'adaptation et de leur localisation dans un environnement hautement spécialisé. Contrairement aux autres tumeurs solides, celles du système nerveux central doivent contourner des obstacles biologiques uniques, tels que la barrière hémato-encéphalique tout en exploitant des mécanismes spécifiques de croissance, d'invasion et de résistance thérapeutique (Shulz & Prinz., 2025).

Les tumeurs cérébrales regroupent une grande diversité de pathologies qui diffèrent par leur origine cellulaire, leur comportement biologique et leur degré d'agressivité. Elles sont généralement classées en tumeurs primaires, qui prennent naissance dans le SNC et en tumeurs secondaires ou métastatiques, qui résultent de la dissémination de cancers d'autres organes vers le cerveau. On distingue également les tumeurs bénignes qui sont généralement bien délimitées et à croissance lente, bien que leur localisation puisse entraîner des complications neurologiques, des tumeurs malignes, telles que les glioblastomes, tumeurs infiltrantes, évolutives et associées à un pronostic défavorable (Wong *et al.*, 2025).

L'hétérogénéité des tumeurs cérébrales rend leur classification essentielle pour orienter le diagnostic et les choix thérapeutiques. Les tumeurs primaires se développent directement à partir des cellules du SNC. Elles comprennent, entre autres, les gliomes, les méningiomes, les médulloblastomes et les tumeurs des plexus choroïdes. Les tumeurs secondaires résultent de la dissémination de cancers extracérébraux tels que le cancer du poumon, du sein et du mélanome (Classification of tumors of CNS, World Health Organization, 2021).

Cette diversité des tumeurs cérébrales peut être résumée par une classification simplifiée basée sur leur origine au Tableau 1.6. Pour une catégorisation plus rigoureuse et standardisée, la classification 2021 de l'OMS, qui intègre à la fois les critères histopathologiques et moléculaires, permet une stratification diagnostique plus précise des tumeurs du SNC en figure 1.7.

Tableau 1.6. Principaux types de tumeurs cérébrales selon leur origine, leur localisation et leur comportement biologique.

Type de tumeur	Origine cellulaire	Localisation fréquente	Comportement tumoral	Remarques
Gliome	Cellules gliales (astrocytes, oligodendrocytes)	Hémisphères cérébraux	Malin (ex. glioblastome)	Tumeur la plus fréquente chez l'adulte ; hautement infiltrante
Méningiome	Cellules méningées	Convexité cérébrale, base du crâne	Bénin à malin	Généralement bien délimité ; parfois agressif selon le grade histologique
Médulloblastome	Cellules neuroectodermiques	Fosse postérieure (cervelet)	Malin	Fréquent chez l'enfant ; forte capacité de dissémination leptomeningée
Tumeur des plexus choroïdes	Cellules épithéliales des plexus	Ventricules latéraux (enfant) ou 4 ^e ventricule (adulte)	Bénin ou malin	Rare ; peut provoquer hydrocéphalie par obstruction
Tumeur métastatique	Cellules extracérébrales (poumon, sein, mélanome...)	Jonctions cortico-sous-corticales	Malin	Résulte de la dissémination hématogène d'un cancer primaire

Ce tableau présente une synthèse des principales tumeurs cérébrales classées selon leur origine cellulaire, leur localisation et leur comportement (bénin ou malin). Des éléments cliniques et pathologiques distinctifs sont résumés et visent à illustrer l'hétérogénéité des tumeurs du système nerveux central et la nécessité d'une approche personnalisée pour le diagnostic et le traitement. Ce tableau n'inclut pas les tumeurs du tronc cérébral et de la moelle épinière.

1.2.2 Classification des gliomes

La classification moléculaire des gliomes est un domaine en constante évolution qui a profondément modifié la prise en charge de ces pathologies dans les dernières années. Les gliomes constituent le type le plus fréquent de tumeurs cérébrales primaires du SNC et regroupent plusieurs caractéristiques distinctes. La classification la plus couramment utilisée est celle de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Cette classification repose principalement sur les critères histopathologiques et les altérations géniques des

tumeurs et permet de les stratifier selon leur grade de malignité, allant des tumeurs bénignes de grade I aux tumeurs hautement agressives de grade IV.

Parmi les tumeurs gliales, qui représentent environ 80% des tumeurs malignes du cerveau, on distingue plusieurs sous-types :

- Astrocytomes : issus des astrocytes, ils se déclinent en plusieurs grades selon leur agressivité.
- Oligodendrogliomes : caractérisés par des mutations spécifiques comme la co-délétion 1p/19q, souvent associés à une meilleure réponse aux traitements.
- Épendymomes : tumeurs dérivées des cellules épendymaires, pouvant affecter aussi bien l'enfant que l'adulte, souvent associées aux ventricules cérébraux.

Depuis les révisions de 2016 à 2021 de la classification par l'OMS, l'analyse moléculaire est devenue le critère principal pour différencier les gliomes et affiner les pronostics. Cette analyse intègre la détection de différentes mutations telles que l'isocitrate déshydrogénase (IDH). Les gliomes dits IDH-mutants, comprenant les astrocytomes et les oligodendrogliomes, ont un meilleur pronostic et une progression plus lente. Les gliomes IDH-wildtype sont souvent agressifs, on y retrouve les glioblastomes. Les oligodendrogliomes sont caractérisés par la co-délétion 1p/19q et présentent une meilleure sensibilité aux traitements chimiothérapeutiques. Les altérations du promoteur télomerase reverse transcriptase (TERT) et mutations de TP53, principal gène suppresseur de tumeurs impliqué dans l'arrêt du cycle cellulaire et l'induction de l'apoptose, ou alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked (ATRX), gène impliqué dans le remodelage de la chromatine et le maintien de la stabilité télomérique sont, elles caractéristiques des astrocytomes IDH-mutants.

L'activation du promoteur de TERT est fréquente dans les glioblastomes et est un facteur d'un mauvais pronostic car elle entraîne une activité télomérase accrue favorisant la prolifération cellulaire et l'immortalisation tumorale. Enfin, l'hyperméthylation du promoteur O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT), une enzyme de réparation de l'ADN qui élimine les adduits alkylants et améliore la sensibilité aux chimiothérapies alkylantes comme le témozolomide (Arita *et al.*, 2016).

L'intégration des biomarqueurs moléculaires dans la pratique clinique a révolutionné la prise en charge des gliomes en permettant une approche plus personnalisée et optimisée du traitement. Désormais, un gliome présentant une codélétion 1p/19q sera traité complètement différemment d'un glioblastome de type IDH-wildtype par exemple (Arita *et al.*, 2020).

Category	Gliomas, glioneuronal tumours and neuronal tumours						Choroid plexus tumours	Embryonal tumours		Pineal tumours	Mesenchymal/Non-Meningothelial Tumours	Tumours of the sellar region
	Adult-type diffuse gliomas	Paediatric-type high-grade diffuse gliomas	Paediatric-type low-grade diffuse gliomas	Circumscribed astrocytic gliomas	Glioneuronal and neuronal tumours	Ependymal tumours		Medulloblastoma	Other CNS Embryonal tumours		Uncertain differentiation	
Types	Astrocytoma, IDH-mutant	Diffuse midline glioma, H3 K27-altered	Diffuse astrocytoma, MYB or MYBL1-altered	High-grade astrocytoma with piloid features	Diffuse glioneuronal tumor with oligodendroglioma-like features and nuclear clusters (DGONC)	Supratentorial ependymoma, ZFTA fusion-positive	Choroid plexus papilloma	MB, WNT-activated	CNS neuroblastoma, FOXR2-activated	Desmoplastic myxoid tumor of the pineal region, SMARCB1-mutant	Intracranial mesenchymal tumor, FET-CREB fusion positive (provisional type)	Pituitary blastoma
	Oligodendroglioma, IDH-mutant and 1p/19q-codeleted	Diffuse hemispheric glioma, H3 G34-mutant	Polymorphous low-grade neuroepithelial tumour of the young (PLNTY)	Pilocytic astrocytoma	Myxoid glioneuronal tumor	Supratentorial ependymoma, YAP1 fusion-positive	Atypical choroid plexus papilloma	MB, SHH-activated, TP53 - wildtype	CNS tumour with BCOF internal tandem duplication and the provisional type (CNS tumour BCOF ITD)	Pineocytoma	CIC-rearranged sarcoma	Adamantinomatous craniopharyngioma
	Glioblastoma, IDH-wildtype	Diffuse paediatric-type high-grade glioma, H3-wildtype/ IDH-wildtype	Diffuse low-grade glioma, MAPK pathway-altered	Pleomorphic xanthoastrocytoma	Multinodular and vacuolating neuronal tumor (MNT)	Posterior fossa group A (PFA) ependymoma	Choroid plexus carcinoma	MB, SHH-activated, TP53 - mutant	Cirbitform neuroepithelial tumour (CRINET)	Pineal parenchymal tumour of intermediate differentiation	Primary intracranial sarcoma, DICER1-mutant	Papillary craniopharyngioma
		Infant-type hemispheric glioma	Angiocentric glioma	Subependymal giant cell astrocytoma	Diffuse leptomeningeal glioneuronal tumor	Posterior fossa group B (PFB) ependymoma		MB, non-WNT/non-SHH	Atypical teratoid/ rhabdoid tumour (ATRT)	Pineoblastoma	Solitary fibrous tumour	Pituicytoma, granular cell tumour of the sellar region, and spindle cell oncocytoma
				Chordoid glioma	Ganglioglioma	Spinal ependymoma, MYCN-amplified		MB, histologically defined	Embryonal tumour with multi-layered rosettes (ETMR)	Papillary tumor of the pineal region	Ewing sarcoma	Pituitary adenomas
				Astroblastoma, MN1 -altered	Desmoplastic infantile ganglioglioma/desmoplastic infantile astrocytoma	Myxopapillary ependymoma			CNS embryonal tumor			Pituitary neuroendocrine tumour (PNET)
					Dysembryoplastic neuroepithelial tumor	Subependymoma						
					Papillary glioneuronal tumor							
					Rosette-forming glioneuronal tumor							
					Gangliocytoma							
					Dysplastic cerebellar gangliocytoma							
					Central neurocytoma							
					Extraventricular neurocytoma							
					Cerebellar liponeurocytoma							

Note: for Mesenchymal/Non-meningothelial tumours, only the group of "Uncertain differentiation" is shown.

Figure 1.7. Classification des tumeurs du système nerveux central selon l'OMS 2021. Principales catégories de tumeurs du système nerveux central selon la 5e édition de la classification de l'OMS (2021). Cette classification intègre des critères histopathologiques et moléculaires, permettant une stratification diagnostique plus précise. Les nouvelles entités tumorales introduites dans cette édition sont indiquées en gris.

(Adapté de McNamara *et al.*, 2022)

1.2.3 Glioblastomes

Les glioblastomes (GBM) représentent la forme la plus agressive des gliomes et constituent environ 50% des tumeurs malignes du SNC. Ils sont classés grade IV selon la classification de l'OMS notamment en raison de leur forte prolifération, de leur infiltration diffuse dans le parenchyme cérébral et de leur potentiel élevé de récurrence limitant les options thérapeutiques (Belghali *et al.*, 2021).

Les statistiques de survie illustrent la gravité du pronostic associé au GBM. Au Canada, 4,5 personnes sur 100 000 sont diagnostiquées chaque année. De celles-ci le taux de survie à cinq ans est de 4,0%. La survie médiane, c'est-à-dire le temps après lequel 50% des patients sont décédés, est d'environ 14 mois. Ces données, tirées de la National Brain Tumor Society, mettent en évidence la nature particulièrement agressive des GBM et soulignent l'urgence de développer des traitements plus efficaces pour améliorer le pronostic des patients.

Au-delà de ces données nationales, les projections mondiales révèlent une hausse importante du nombre de cas attendus dans les prochaines décennies. Entre 2022 et 2045, le nombre de nouveaux cas de cancers du cerveau et du système nerveux central devrait augmenter de 47,5 %, passant de 321 731 à 474 457 cas annuels, selon les estimations de l'Agence internationale de recherche sur le cancer (CIRC/IARC), représentés aux figures 1.8 et 1.9 ainsi qu'au tableau 1.7. Cette croissance est principalement attribuable à l'augmentation et au vieillissement de la population mondiale, sans changement significatif du risque individuel mais représentera une charge croissante à considérer.

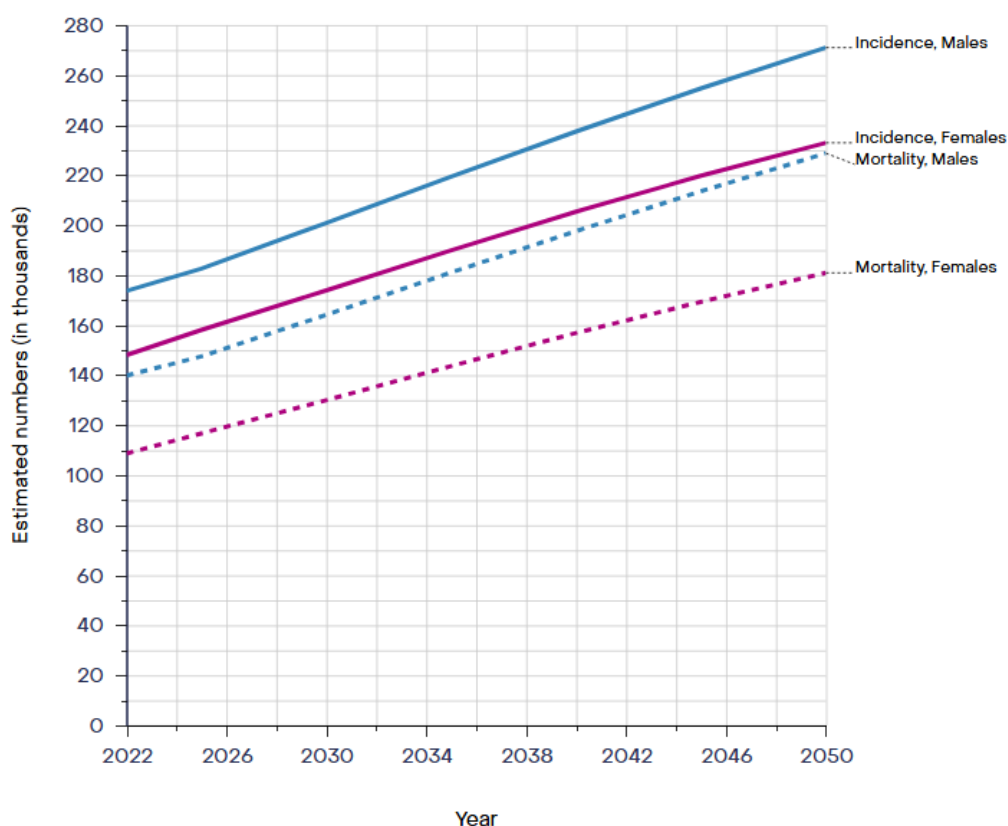


Figure 1.8. Estimation du nombre de cas de cancers du système nerveux central dans le monde 2022-2050, chez les hommes et les femmes âgées de 0 à 85 ans. Projections du nombre de nouveaux cas de cancers du

cerveau et du système nerveux central à l’échelle mondiale entre 2022 et 2050, en distinguant les sexes. On observe une augmentation marquée des cas chez les hommes comme chez les femmes, principalement attribuée au vieillissement et à la croissance de la population mondiale.

(Généré de l’outil de prédiction International Agency for Research on Cancer, 2025)

Tableau 1.7. Projections mondiales du nombre de cas de cancers du cerveau et du système nerveux central entre 2022 et 2045.

Site tumoral	Nombre de cas en 2022	Nombre de décès 2022	Nombre de cas estimé en 2045	Nombre de décès estimé en 2045
Système nerveux central (Cerveau)	321 731	248 500	474 457	383 00

Ce tableau présente les estimations de l’augmentation du nombre de nouveaux cas et de décès de cancers du cerveau et du système nerveux central à l’échelle mondiale, entre 2022 et 2045. La variation observée (+47,5 %) est attribuée à l’augmentation de la population mondiale, sans changement majeur estimé du risque individuel au cours de cette période.

(Généré de l’outil de prédiction International Agency for Research on Cancer, 2025)

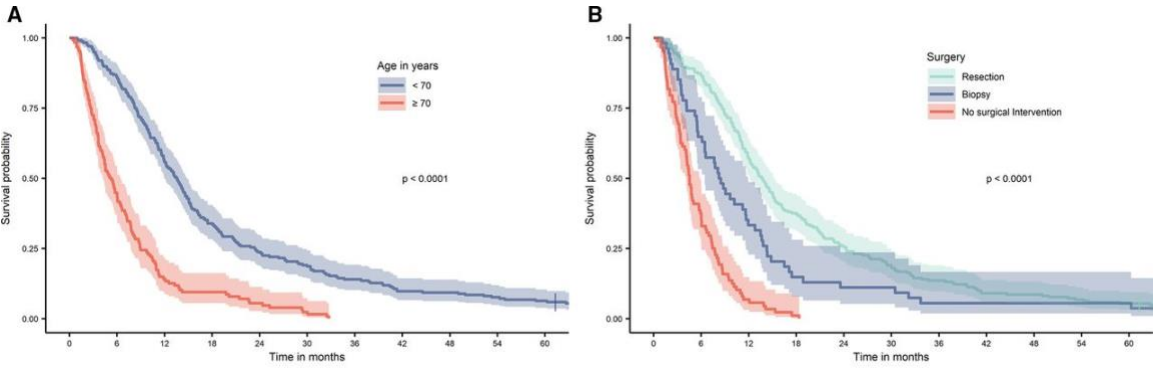


Figure 1.9. Survie globale des patients atteints de glioblastome en fonction de l'âge, du traitement chirurgical et de la chimiothérapie. Taux de survie globale observé chez 363 adultes diagnostiqués avec un glioblastome entre janvier 2007 et décembre 2014. (A) Comparaison de la survie selon les groupes d'âge. (B) Impact du traitement chirurgical sur la survie. (C) Influence de la chimiothérapie et de la radiothérapie combinées sur la survie des patients. Ces données illustrent l'effet pronostique de certains facteurs cliniques sur l'issue du traitement chez les patients atteints de glioblastome.

(Adapté de Bjorland *et al.*, 2021)

Sur le plan histologique, le GBM est caractérisé par une forte densité cellulaire, un pléomorphisme nucléaire marqué, des mitoses abondantes ainsi que des nécroses en pseudopalisades et une prolifération vasculaire aberrante. Cette néovascularisation favorise l'hypoxie tumorale et l'induction du VM, contribuant à son agressivité et la complexité des traitements à son égard. D'un point de vue moléculaire, l'analyse génomique a permis d'identifier des altérations clés dans les GBM, notamment les mutations des gènes TP53, RB transcriptional corepressor 1, codant la protéine du rétinoblastome, régulatrice de la progression G1/S du cycle cellulaire (RB1) et phosphatase and tensin homolog, gène suppresseur de tumeur impliqué dans la régulation négative de la voie PI3K/AKT (PTEN) affectant les voies de prolifération et suppression tumorale. L'amplification du gène epidermal growth factor receptor (EGFR), conduisant à une activation constitutive de la signalisation pro-survie ainsi qu'à l'activation aberrante des voies PI3K/AKT/mTOR et MAPK, favorisant la chimiorésistance. L'hétérogénéité inter- et intra-tumorale du GGM ne complexifie que davantage son traitement, limitant l'efficacité des approches thérapeutiques classiques (Dixit *et al.*, 2025). Malgré une prise en charge multimodale, la survie médiane des patients reste de l'ordre de 5% pour la survie au-delà de cinq ans. La résistance intrinsèque et adaptative aux traitements est le défi majeur et demeure une priorité en recherche oncologique, motivant le développement de nouvelles stratégies ciblées, notamment les immunothérapies, les inhibiteurs de voies de signalisation et les thérapies basées sur la modulation du microenvironnement tumoral.

1.2.4 Mécanismes de chimiorésistance et adaptation métabolique

Les patients atteints de GBM démontrent souvent une chimiorésistance au témozolomide (TMZ), traitement de première ligne. Cette résistance est l'un des principaux obstacles cliniques et repose sur l'activation des mécanismes de réparation de l'ADN, en particulier par la surexpression de l'O6-méthylguanine-ADN-

méthyltransférase (MGMT). Cette enzyme est capable de neutraliser l'effet cytotoxique du TMZ, rendant les cellules insensibles aux traitements. Par ailleurs, des anomalies dans les voies de réparation de l'ADN, notamment le système de réparation des mésappariements (MMR) et des mutations affectant p53, permettent aux cellules tumorales de contourner les dommages génotoxiques et de maintenir leur prolifération malgré l'agression thérapeutique (Dixit *et al.*, 2025).

Parallèlement, les GBM adaptent leur métabolisme pour survivre à des conditions hostiles, notamment en réponse à l'hypoxie et à la privation de nutriments. Ils exploitent l'effet Warburg, une dépendance à la glycolyse aérobie même en présence d'oxygène. Cette caractéristique permet de générer rapidement de l'énergie et des intermédiaires métaboliques essentiels à la croissance cellulaire. Cette flexibilité métabolique utilise des substrats alternatifs tels que le lactate, les acides gras et la glutamine, afin d'optimiser la survie tumorale et de modifier le programme énergétique en fonction des ressources disponibles (D'aprile *et al.*, 2025).

Au-delà des altérations génétiques, l'hétérogénéité transcriptionnelle intra-tumorale du GBM constitue un facteur clé de sa résistance aux traitements. Des analyses de transcriptomique unicellulaire ont permis d'identifier plusieurs modules fonctionnels au sein d'une même tumeur, incluant des signatures d'hypoxie, de prolifération, de réponse immunitaire ou encore de différenciation oligodendrocytaire (Figure 1.10.) Cette hétérogénéité reflète une plasticité cellulaire extrême, permettant à différentes sous-populations tumorales d'adopter des stratégies distinctes de survie et d'adaptation.

Face à ces défis, il devient impératif de mieux comprendre ces processus d'adaptation pour développer de nouvelles approches thérapeutiques capables de contrer ces mécanismes de survie et d'améliorer l'efficacité des traitements existants. Une synthèse des principaux mécanismes moléculaires impliqués dans la résistance aux traitements est présentée dans le tableau 1.8.

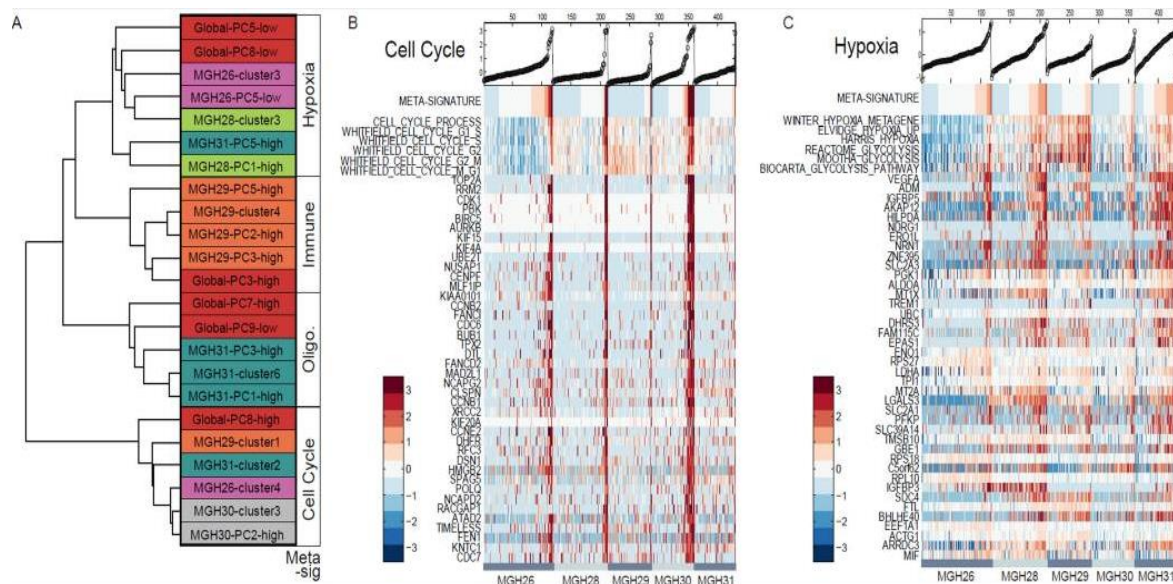


Figure 1.10. Hétérogénéité transcriptionnelle intratumorale dans le glioblastome. Hétérogénéité transcriptionnelle des cellules tumorales isolées de glioblastomes humains. Une analyse non biaisée par composantes principales et regroupement hiérarchique a permis d'identifier quatre modules transcriptionnels cohérents : un module d'hypoxie, un module immunitaire/complémentaire, un module oligodendrocytaire, et un module lié au cycle cellulaire (A). Les cartes de chaleur (B et C) montrent la variabilité de l'expression génique associée au cycle cellulaire et à l'hypoxie au sein des cellules individuelles. Cette hétérogénéité fonctionnelle intra-tumorale contribue à la plasticité cellulaire, à la résistance aux traitements et à l'échec des thérapies standards dans le GBM. Ces observations renforcent l'importance d'approches ciblées intégrant cette diversité transcriptionnelle pour améliorer la réponse thérapeutique.

(Adapté de : Patel *et al.*, 2014)

Tableau 1.8. Mécanismes moléculaires principaux de résistance aux traitements dans le GBM.

Mécanisme	Cible ou acteur principal	Conséquence fonctionnelle	Référence(s)
Réparation de l'ADN	MGMT (O6-methylguanine-DNA methyltransferase)	Contrecarre les effets alkylants du TMZ	Hegi et al., NEJM, 2005
Altérations du système MMR	MSH2, MSH6	Diminution de la détection des mésappariements, résistance accrue	Touat et al., Nat Rev Clin Oncol, 2020
Mutations de p53 et perte de l'apoptose	TP53	Blocage de l'apoptose malgré les dommages géniques	Liu et al., Cell Death Dis, 2021
Activation de voies pro-survie	PI3K/AKT, STAT3, NF-κB	Promotion de la survie cellulaire et échappement thérapeutique	Kim et al., Cancers, 2021 ; Yin et al., 2023
Hypoxie et signalisation HIF-1α	HIF-1α, VEGF	Adaptation à l'hypoxie, induction de la néoangiogenèse	Bao et al., Cancer Cell, 2006 ; Rong et al., 2020
Hétérogénéité transcriptionnelle	Modules hypoxie / prolifération / différenciation	Diversité fonctionnelle intra-tumorale	Neftel et al., Cell, 2019
Plasticité métabolique	Glycolyse, glutaminolyse, bêta-oxydation	Adaptation énergétique, résistance à la privation de nutriments	Vander Heiden et al., Science, 2009

Les principaux mécanismes impliqués dans la chimiorésistance des GBM dans la littérature scientifique incluent les voies de réparation de l'ADN, la signalisation pro-survie, l'adaptation à l'hypoxie ainsi que la plasticité transcriptionnelle et métabolique. Ces mécanismes contribuent à l'échec des traitements conventionnels.

1.2.5 Défis et traitements

La résection chirurgicale constitue généralement la première étape et vise à retirer un maximum de la tumeur tout en préservant les fonctions neurologiques du patient. Cependant, en raison de l'infiltration diffuse des cellules tumorales dans le parenchyme cérébral, une exérèse complète est très souvent, voir toujours impossible, laissant alors derrière elle des cellules malignes. Cette population résiduelle est la cause des récives et progressions de la maladie (Pichardo-Rojas *et al.*, 2025). L'utilisation récente des techniques avancées comme l'imagerie peropératoire par fluorescence (5-ALA), permet de mieux visualiser les marges tumorales, ou encore la stimulation cérébrale en chirurgie éveillée, a permis d'optimiser les résultats et réduire les déficits neurologiques (Olgiewara *et al.*, 2025).

La radiothérapie fractionnée est administrée pour détruire les cellules résiduelles, associée à la chimiothérapie TMZ constitue le traitement standard, améliorant légèrement la survie médiane des patients, en particulier lorsque le promoteur de MGMT est méthylé. Malgré ces stratégies, la majorité des patients rechutent en raison des mécanismes de chimiorésistance intrinsèques des cellules de GBM, notamment l'activation des voies de survie alternatives et la persistance d'une population de cellules souches tumorales résistantes. Le tableau 1.9 présente les limites principales des traitements conventionnels.

Face aux limites des traitements conventionnels, de nouvelles stratégies sont explorées. Les inhibiteurs de points de contrôle immunitaires, comme les anti-programmed cell death protein 1 (PD-1) et anti-cytotoxique T-lymphocyte-associated protein 4 (CTLA-4), ont montré un succès limité en raison du microenvironnement immunosuppresseur des GBM. Les thérapies cibles visant les mutations spécifiques telles que EGFRvIII, PI3K ou l'isocitrate déshydrogénase 1 (IDH1) ont produit des résultats encourageants mais restent limitées par l'hétérogénéité tumorale et l'apparition très rapide de métastases (Zhu *et al.*, 2025). Des équipes de recherche ont mis au point dans les dernières années des virus oncolytiques, ayant pour but d'infecter et tuer les cellules tumorales, ou encore l'utilisation de champs électriques précis de type Optune, perturbant la division cellulaire des cellules cancéreuses.

Malgré les avancées scientifiques, le GBM est un cancer incurable, et l'identification de nouvelles approches thérapeutiques capables de contourner sa plasticité et sa résistance demeure un énorme défi en neuro-oncologie.

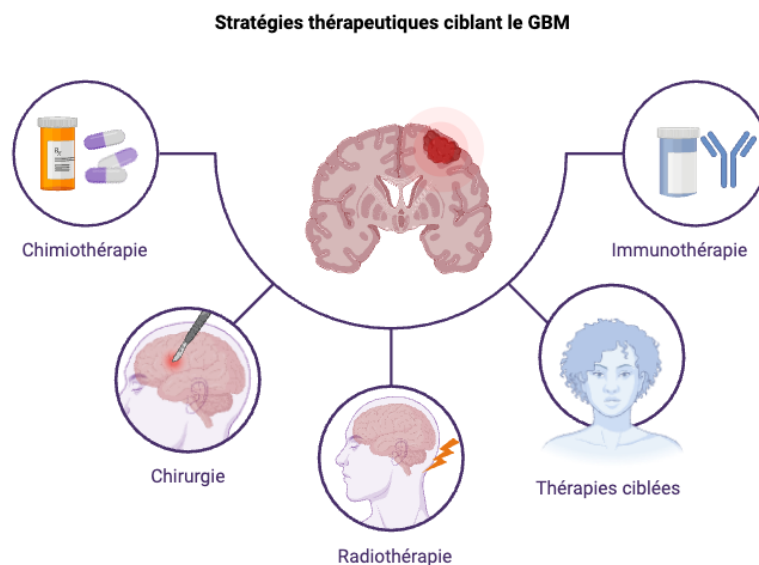


Figure 1.11 Stratégies thérapeutiques actuelles du GBM. Les options thérapeutiques conventionnelles

telles que la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie ainsi que le développement d'approches innovantes telles que l'immunothérapie et les thérapies ciblées.

(Figure créée à l'aide de BioRender, Marie-Eve Roy)

Tableau 1.9. Principales limites des approches thérapeutiques conventionnelles les plus utilisées dans le GBM.

Modalité thérapeutique	Limite principale	Conséquence clinique
Chirurgie	Infiltration tumorale → exérèse complète impossible	Cellules résiduelles responsables de la récurrence
Radiothérapie	Résistance radio-induite de certaines sous-populations tumorales	Efficacité partielle, rechute fréquente
Chimiothérapie (TMZ)	Surexpression de MGMT ou absence de méthylation du promoteur	Réparation de l'ADN → réduction de l'effet cytotoxique du TMZ

Ce tableau illustre les principales limites des approches thérapeutiques standards dans le traitement du GBM. L'infiltration cellulaire limite l'efficacité de la chirurgie tandis que la chimiorésistance et les adaptations du microenvironnement réduisent l'impact des traitements adjuvants. La méthylation du promoteur de MGMT est un facteur également important pour prédire la réponse du patient au TMZ.

1.2.6 Modèles cellulaires de tumeurs cérébrales

Pour mieux étudier ces mécanismes biologiques et développer des stratégies thérapeutiques efficaces, il est essentiel de disposer de modèles expérimentaux représentatifs de la réalité clinique. Les modèles cellulaires jouent un rôle clé dans l'étude des processus tumoraux, permettant d'explorer les interactions entre les cellules cancéreuses et leur microenvironnement, de tester les nouvelles thérapies et identifier les cibles moléculaires potentielles et exploitables. Les différents modèles présentent des avantages et des limites à considérer pour garantir la transposabilité optimale des résultats aux conditions *in vivo*. Parmi ces modèles, les lignées cellulaires de GBM humains U87, U118, U138 et U251 sont les plus largement utilisées et présentent des caractéristiques distinctes.

La lignée U87, isolée des GBM humains est la plus employée dans la littérature scientifique. Elle est un modèle de référence pour l'évaluation des thérapies ciblées. Les lignées U118 et U138, présentent des altérations génétiques distinctes influençant leur comportement tumoral. U118 est caractérisée par l'absence de mutation PTEN, activation constitutive de certaines voies de signalisation impliquées dans la prolifération et la résistance thérapeutique. La lignée U138 montre une sensibilité très variable aux traitements, un modèle pertinent pour l'étude des mécanismes de réponse aux agents chimiothérapeutiques. La lignée U251 se démarque par son origine astrocytaire et ses mutations affectant des voies clés de la tumorigène, notamment la signalisation EGFR et la régulation du cycle cellulaire. Elle est souvent utilisée pour évaluer la réponse aux thérapies combinées et pour modéliser les interactions entre les cellules tumorales et leur microenvironnement.

On retrouve également d'autres lignées cellulaires telles que les T98G, résistantes au TMZ, modèle pertinent pour la chimiorésistance et présentant une mutation de TP53, souvent retrouvée dans les GBM. Les A172, HS683, LN229 sont d'autres exemples de lignées moins fréquemment utilisées mais pertinentes pour étudier les modifications métaboliques des GBM. Les lignées U87, U118, U138 et U251 restent présentement des outils de choix pour le criblage pharmacologique et l'exploration des mécanismes fondamentaux du GBM tels que le VM.

L'émergence de modèles plus sophistiqués, tels que les organoïdes dérivés de patients et les cultures en trois dimensions, permet d'approcher plus fidèlement la physiopathologie hétérogène de la tumeur. L'utilisation combinée de ces modèles permet une vision complète du GBM et permet l'amélioration des stratégies thérapeutiques ciblant les tumeurs hautement agressives (Gomez *et al.*, 2019). Toutefois, une population particulière de cellules au sein des GBM attire l'attention croissante des chercheurs : les cellules souches cancéreuses (CSC). Celles-ci sont dotées d'une capacité d'auto-renouvellement et d'une plasticité phénotypique hors du commun, deux caractéristiques clés dans l'invasion et la chimiorésistance. Cette attention est portée aux modèles de CSC car ceux-ci sont plus représentatifs de la complexité tumorale. Dans le contexte du GBM, les CSC, notamment dérivées de cellules souches neurales ou mésenchymateuses, sont reconnues pour leur capacité d'auto-renouvellement et leur potentiel différenciatif, des caractéristiques clés dans la progression tumorale. Leurs implications dans le VM illustrent leur contribution à une néovascularisation alternative et à l'adaptation en conditions hypoxiques (Bou-Gharios *et al.*, 2024).

1.3 Les cellules souches

1.3.1 Définition et classification

L'étude des cellules souches ne se limite pas aux cancers mais s'étend également à la biologie du développement et aux approches régénératives. Comprendre leurs caractéristiques et régulations est essentiel, que ce soit dans le contexte physiologique et pathologique.

Elles sont classées en fonction de leur potentiel différenciatif tel que présenté à la figure 1.12. Les cellules souches embryonnaires (CSE) sont pluripotentes, c'est-à-dire capables de donner naissance à l'ensemble des types cellulaires de l'organisme. Les cellules souches adultes dites somatiques, sont multipotentes et restreintes à certaines lignées cellulaires. Parmi elles, les cellules souches mésenchymateuses (MSC) et les cellules souches neurales ont une importance particulière en médecine régénérative et en oncologie. Les MSC se retrouvent dans plusieurs tissus, notamment la moelle osseuse, le tissu adipeux et le cordon ombilical. Elles jouent un rôle clé dans la modulation immunitaire, dans la réparation tissulaire et l'homéostasie du microenvironnement cellulaire. Les cellules souches neurales, sont présentes dans certaines niches du cerveau adulte telles que la zone sous-ventriculaire et la zone sous-granulaire de l'hippocampe, or elles contribuent au renouvellement neuronal et glial.

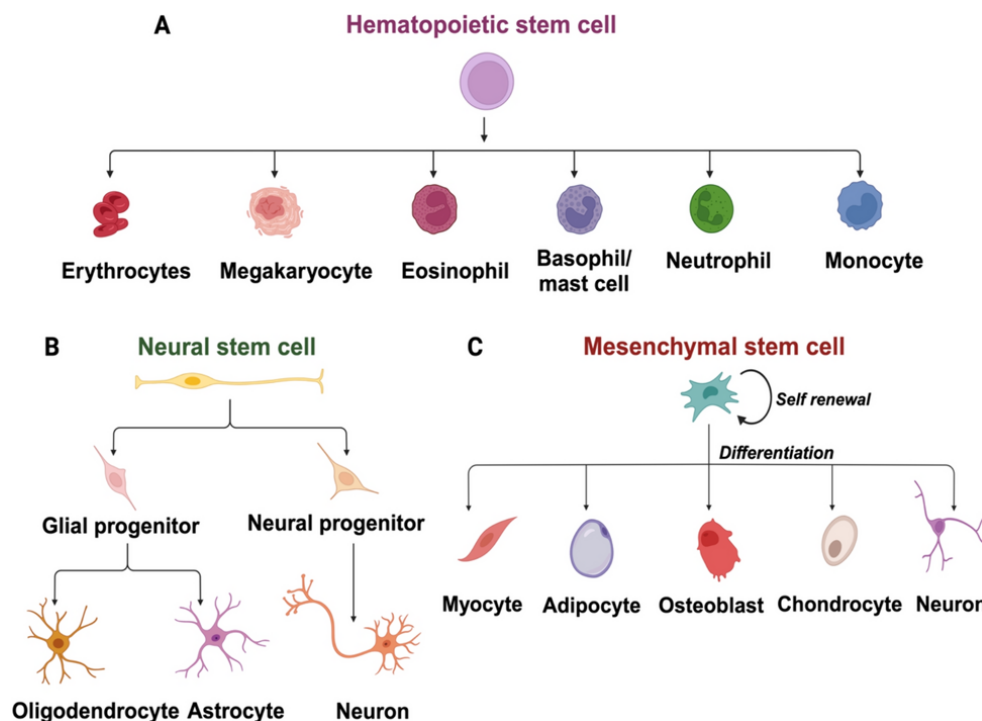


Figure 1.12. Hiérarchie des cellules souches et potentiel différenciatif. Les différents types de cellules souches selon leur potentiel de différenciation respectif sont représentés. Parmi ces cellules multipotentes, figurent les MSC capables de se différencier en cellules osseuses, sanguines ou neuronales. Leur origine non embryonnaire et leur accessibilité en font des outils prometteurs en médecine régénérative.

(Adapté de Rajalekshmi, *et al.* 2024)

1.3.2 Cellules souches/stromales mésenchymateuses (MSC)

Les MSC sont définies par leur capacité d’adhérence au plastique, leur morphologie fibroblastique et l’expression de marqueurs spécifiques comme CD73, CD90 et CD105. Elles n’expriment pas les marqueurs hématopoïétiques CD34 et CD45 mais possèdent une plasticité phénotypique leur permettant de se différencier en plusieurs types cellulaires, notamment les ostéoblastes, les adipocytes et les chondrocytes (Lyu *et al.*, 2025; Molaei *et al.*, 2025).

Outre leur rôle dans la réparation des tissus endommagés, les MSC exercent des fonctions immunomodulatrices importantes. Elles interagissent avec les cellules immunitaires via la sécrétion de cytokines et de facteurs solubles. Ces propriétés en font des candidates prometteuses dans différentes thérapies cellulaires et dans l’ingénierie tissulaire. Dans un contexte tumoral, leur présence peut avoir des effets ambivalents favorisant parfois la suppression immunitaire bénéfique aux cellules cancéreuses, parfois la production de signaux pro-inflammatoires amplifiant la survie et la progression tumorale (Ju *et al.*, 2025).

Tableau 1.10. Critères d’identification des MSC selon l’ISCT.

Critère	Description
Adhérence au plastique	Capacité des MSC à adhérer aux surfaces plastiques lors de la culture <i>in vitro</i>
Phénotype spécifique (cytométrie)	Expression positive : CD73, CD90, CD105 Expression négative : CD14, CD34, CD45, CD11b, CD79α, HLA-DR
Potentiel de différenciation	Capacité à se différencier <i>in vitro</i> en cellules ostéoblastiques, chondrocytaires et adipeuses

Ce tableau présente les critères principaux définis par l’International Society for Cellular Therapy (ISCT) pour l’identification des MSC en culture, incluant leur adhérence cellulaire, le profil immunophénotypique

et la capacité de différenciation. Ces critères sont importants dans la compréhension des fonctionnalités des MSC utilisées en recherche et en thérapie cellulaire.

1.3.3 Rôles dans la niche tumorale

Les MSC jouent un rôle fondamental dans la régulation du microenvironnement par des mécanismes complexes de communication cellulaire et de plasticité phénotypique. Elles interagissent avec les cellules cancéreuses et les autres composants stromaux via des signaux solubles, des vésicules extracellulaires et des contacts cellulaires directs. Ces interactions influencent la progression tumorale et la réponse aux traitements (Starska-Kowarska, 2024).

Ces cellules exercent leur influence principalement via les mécanismes de communication paracrine, tels que la sécrétion de cytokines, de chimiokines et de facteurs de croissance. Parmi ces nombreux médiateurs, le TGF- β , l'IL-6, le VEGF et le SDF-1 jouent un rôle clé dans l'angiogenèse, la migration cellulaire et l'évasion immunitaire des cellules tumorales. En sécrétant ces facteurs, les MSC favorisent le remodelage de la MEC et la formation d'un microenvironnement permissif à la croissance tumorale. Un aspect majeur de la communication paracrine est la sécrétion de vésicules extracellulaires (EVs), incluant les exosomes, les microvésicules. Ceux-ci transportent du matériel génétique tel que des ARNs non codants mais également des protéines et des lipides bioactifs pouvant transférer des signaux pro-tumoraux aux cellules cancéreuses modulant ainsi leur prolifération, leur plasticité et leur capacité à résister aux traitements. Des études récentes ont montré que les exosomes dérivés des MSC peuvent contenir des microARNs (miR-21, miR-155, miR-146a...) impliqués dans la régulation d'une signalisation inflammatoire intéressante pour la survie des cellules tumorales (Ghoyal *et al.*, 2025). Cette communication paracrine est schématisée à la figure 1.13.

La plasticité cellulaire des MSC leur permet d'adapter leur fonction selon les signaux émis par la tumeur. Cette caractéristique leur permet d'influencer l'EMT et contribuer à la formation de structures néo-vasculaires aberrantes favorisant l'hypoxie tumorale. De plus, cette plasticité leur permet d'adopter un phénotype immunosuppresseur, un avantage majeur dans l'échappement tumoral. Elles peuvent alors inhiber l'activation des lymphocytes T cytotoxiques (CD8⁺), des cellules NK et des macrophages M1. Cela contribue à l'instauration d'un microenvironnement favorable à la croissance tumorale, et réduit d'emblée l'efficacité des traitements d'immunothérapies. Ce profil immunosuppresseur des MSC dans la niche

tumorale, joue un rôle clé dans la chimiorésistance, l'adaptation métabolique et la modulation des voies de survie des cellules cancéreuses (Minev *et al.*, 2024).

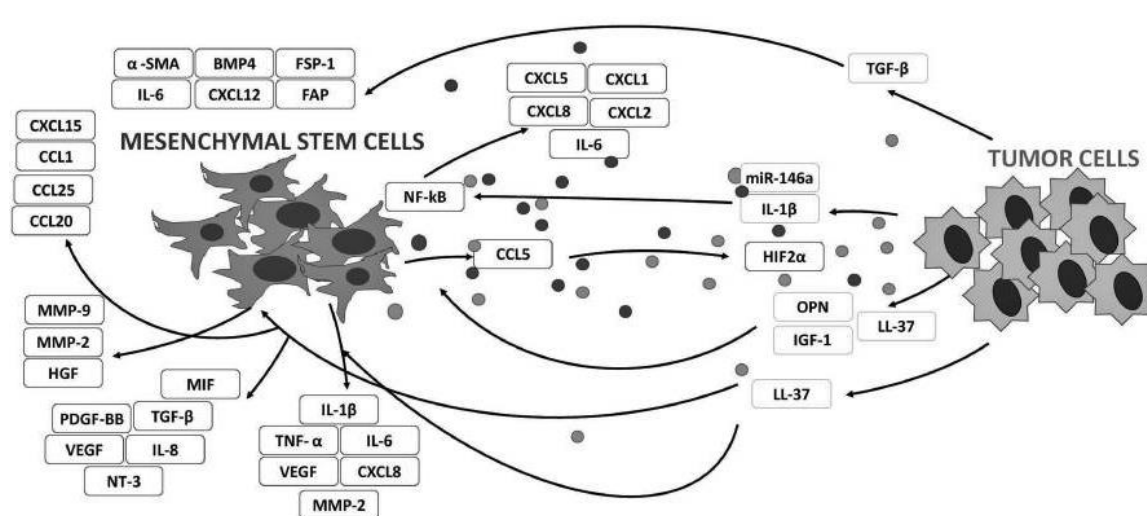


Figure 1.13. Mécanismes de communication paracrine entre les MSC et les cellules tumorales. Illustration des interactions paracrines entre les MSC et les cellules tumorales au sein du microenvironnement tumoral. Les MSC sécrètent divers facteurs solubles tels que le TGF- β , IL-6, VEGF ainsi que des vésicules extracellulaires (exosomes et microvésicules) contenant des microARNs. Ces facteurs influencent directement la prolifération, la migration, l'angiogenèse, l'évasion tumorale et la résistance aux traitements des cellules tumorales.

(Adapté de Muralikumar, *et al.* 2021)

1.3.4 Contribution au développement tumoral

Au-delà de leur rôle dans la niche tumorale, les MSC sont connues pour exercer un rôle direct sur le système immunitaire via la sécrétion de la prostaglandine E2 (PGE2), l'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO) et TGF- β . Ces facteurs limitent la réponse inflammatoire et influencent directement les processus biologiques tels que la prolifération, l'invasion, la résistance aux traitements et la formation même de nouvelles niches métastatiques. Les interactions entre les MSC et l'EMT permettent l'acquisition d'un phénotype plus agressif et d'un remodelage important de la matrice extracellulaire disséminant plus facilement les cellules cancéreuses vers des sites éloignés.

La présence de MSC aux sites tumoraux a été documentée comme un élément activateur des voies de signalisation pro-survie (PI3K/AKT, NF- κ B et Wnt/ β -caténine). L'expression aberrante de ces voies signalétiques permet aux cellules d'échapper aux effets cytotoxiques des traitements en renforçant leur résistance et compliquant la prise en charge clinique des patients. Enfin, la capacité des MSC à se reprogrammer et s'intégrer dans des niches métastatiques suggère qu'elles pourraient exercer un rôle dans la colonisation des organes distants et l'adaptation des cellules tumorales à de nouveaux environnements. L'ensemble de ces éléments fait des MSC des cibles thérapeutiques potentielles pour limiter la progression de cancers agressifs tels que les GBM et améliorer l'efficacité des traitements existants (Starska-Kowarska, 2024).

1.3.5 Support à la régénération tissulaire

En raison de ces mêmes propriétés immunomodulatrices largement étudiées dans le microenvironnement tumoral, les MSC suscitent également un intérêt considérable en médecine régénérative. Leur capacité à sécréter des facteurs trophiques favorise la réparation tissulaire, ce qui a conduit à explorer leur utilisation dans des applications allant de la régénération osseuse et musculaire à la réparation de lésions neurologiques. La libération des cytokines et des EVs stimule la prolifération et la différenciation des cellules résidentes permettant de moduler l'inflammation et ainsi améliorer la vascularisation des tissus lésés ou hypoxiques. De plus, l'interaction entre MSC et cellules immunitaires permet de limiter la réponse inflammatoire excessive et favoriser l'environnement parfait à la régénération (Wu *et al.*, 2024).

Ce pouvoir régénératif et immunomodulateur leur confère un fort potentiel thérapeutique, mais celui-ci est à double tranchant dans un contexte tumoral. L'influence sur le microenvironnement peut soutenir la croissance tumorale plutôt que de la combattre. Les MSC induisent donc une dualité entre la régénération et la promotion tumorale encore peu étudiée et très importante dans la compréhension des mécanismes sous-jacents. L'ambiguïté fonctionnelle des MSC illustre la complexité de leur rôle en oncologie et en médecine régénérative. Cette dynamique pose une question importante dans les stratégies thérapeutiques qui pourraient exploiter leur potentiel tout en évitant leurs effets délétères dans des contextes de pathologies malignes (Nasiri *et al.*, 2025).

1.3.6 MSC: microenvironnement tumoral et angiogenèse

Le microenvironnement tumoral est dynamique et complexe où l'on retrouve les MSC interagissant avec les cellules cancéreuses, les cellules immunitaires, les fibroblastes, la MEC et le réseau vasculaire. Dans cet environnement, l'un des éléments critiques à l'agressivité tumorale est la néoangiogenèse. Contrairement à l'angiogenèse finement régulée lors du développement et de la cicatrisation, l'angiogenèse supportée par les MSC est souvent anarchique et caractérisée par des vaisseaux sanguins immatures, perméables et inefficaces favorisant alors un environnement hypoxique ainsi que l'instabilité tumorale (Han *et al.*, 2025).

Les MSC sécrètent des facteurs pro-angiogéniques pour supporter cette vascularisation tels que le VEGF, le bFGF et l'angiopoïétine-1 qui stimulent l'expansion du réseau vasculaire tumorale. Toutefois, l'effet des MSC ne se limite pas à cet effet paracrine. Des études récentes ont mis en évidence leur implication dans un processus contribuant fortement à l'agressivité tumorale : le mimétisme vasculogénique, où les cellules tumorales elles-mêmes adoptent des propriétés vasculaires pour supporter les déficiences d'un réseau sanguin classique.

1.3.7 MSC et mimétisme vasculogénique

Les MSC interviennent à plusieurs niveaux pour favoriser la régulation et la promotion du VM. Dans un premier temps, le même effet paracrine que décrit précédemment permet de moduler la sécrétion d'une vaste gamme de facteurs solubles ainsi que des exosomes pouvant moduler le comportement des cellules cancéreuses et initier le mimétisme vasculogénique. Le vascular endothelial growth factor (VEGF), l'IL-6 et le TGF- β ont été documentés comme étant impliqués dans le maintien du VM via la surexpression de gènes associés aux cellules endothéliales stimulant différentes voies de signalisation pro-survie. Parmi ces gènes, on retrouve le VEGF, stimulant les voies PI3K/AKT1/mTOR et MAPK/ERK α connues pour favoriser la plasticité cellulaire et la différenciation pseudo-endothéliale.

Ensuite, la surexpression de TGF- β permet une transition vers un phénotype vasculogénique en activant les voies Smad2/3 (Wei *et al.*, 2021). La perte de l'identité tumorale classique est un élément clé pour l'adoption d'un phénotype plus plastique et invasif facilitant la formation de structures de type capillaire. De plus, les MSC en produisant des MMPs, contribuent activement à la dégradation de la MEC, ce qui

facilite le remodelage tissulaire et la formation des structures vasculaires dérivées des cellules tumorales (Gnao *et al.*, 2025). La régulation de la laminine-5 (LAMA5) et de la thrombospondine-1 en sont de bons exemples, ils ont été récemment documentés comme en partis responsables de l'induction du VM (Tianli *et al.*, 2025). Ces mécanismes sont résumés dans la figure 1.14 où on trouve les interactions entre le microenvironnement tumoral, les MSC, et la formation de structures vasculaires dérivées des cellules tumorales.

En parallèle à la surexpression génique, les MSC sécrètent des exosomes contenant des miARN, des protéines et des ARN messagers capables de reprogrammer les cellules tumorales. Bien qu'étant un domaine de recherche nouveau, il a été documenté que certains miARNs comme miR-126 et miR-221 régulent la signalisation impliquée dans la différenciation endothéliale des cellules tumorales (Lofty *et al.*, 2023).

L'implication des MSC dans le support du VM dans un contexte oncologique confère une résistance accrue aux traitements conventionnels, en particulier aux thérapies anti-angiogéniques ciblant VEGF ou ses récepteurs (Rytlewski *et al.*, 2015). En effet, lorsque l'angiogenèse classique est inhibée, le VM arrive à prendre le relai sans dépendre du réseau de vaisseaux endothéliaux. Cette particularité influence drastiquement l'efficacité de la chimiothérapie et radiothérapie.

Tableau 1.11. Comparaison des caractéristiques biologiques et moléculaires entre l'angiogenèse et le VM.

Critères	Angiogenèse	Mimétisme vasculaire (VM)
Type cellulaire principal	Cellules endothéliales	Cellules tumorales hautement plastiques
Structure formée	Vaisseaux tapissés d'endothélium	Canaux vasculaires sans endothélium (cellules tumorales)
Marqueurs spécifiques	CD31, VE-cadhérine, VEGFR-2	VE-cadhérine, MMP2/9, LAMC2, EphA2, Galectin-1
Mécanismes impliqués	Prolifération, migration, différenciation des cellules endothéliales	Transition épithélio-mésenchymateuse, plasticité phénotypique
Voies de signalisation connues	VEGF/VEGFR, Notch, PI3K/AKT	PI3K/AKT, FAK, Wnt, EphA2, HIF-1 α , Notch, TGF- β
Fonction principale	Apport en oxygène et nutriments	Adaptation tumorale au microenvironnement hypoxique, contribution à la perfusion tumorale
Implication clinique	Cible des anti-angiogéniques (ex. bevacizumab)	Associé à une résistance aux thérapies et un mauvais pronostic

Contrairement à l'angiogenèse, qui repose sur la prolifération de cellules endothéliales, le VM implique la capacité des cellules tumorales à former des structures vasculaires mimant les vaisseaux sanguins. Ce phénomène est observé dans plusieurs types de cancers agressifs, notamment le mélanome et le glioblastome, et est associé à une progression tumorale accrue, une hypoxie persistante et une résistance aux traitements.

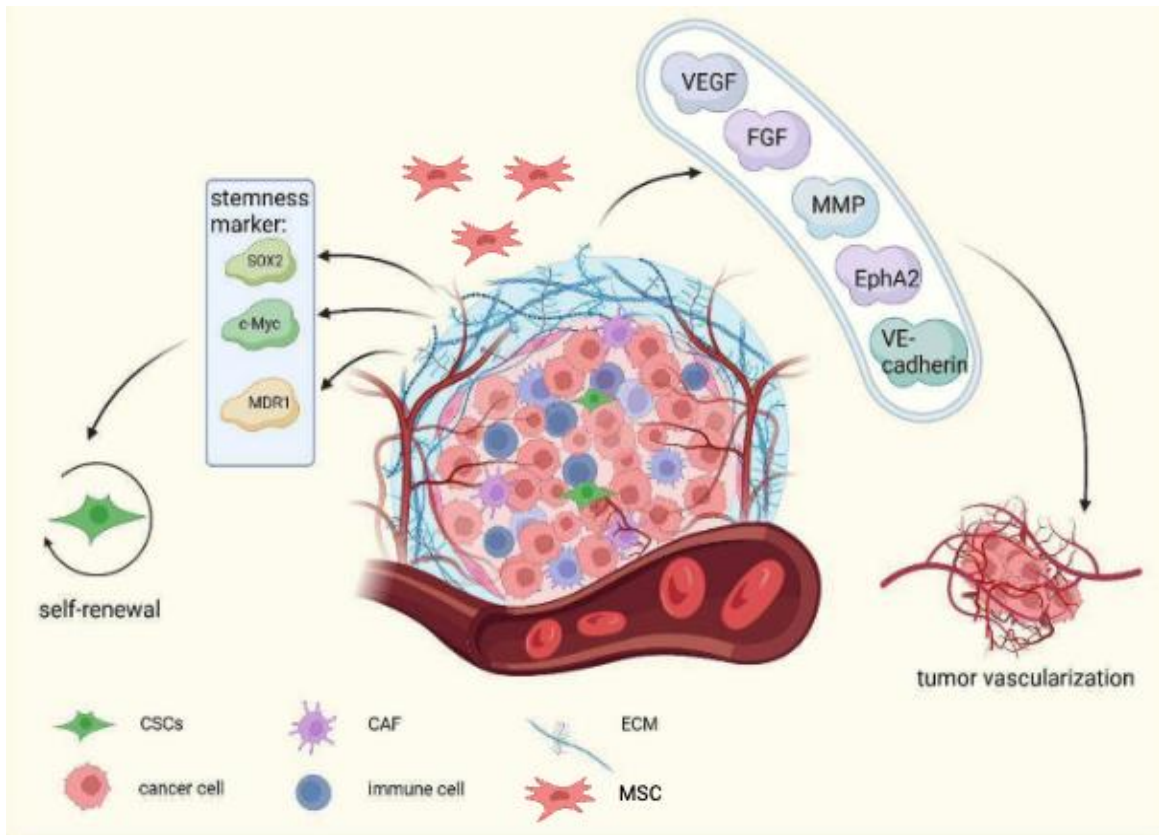


Figure 1.14. Influence des MSC et du microenvironnement tumoral sur la vascularisation tumorale. Les MSC et le microenvironnement stimulent l'expression de marqueurs spécifiques chez les cellules souches cancéreuses favorisant leur auto-renouvellement. Parallèlement, il sécrète des facteurs pro-angiogéniques qui soutiennent la néo-vascularisation tumorale. Cette figure illustre les interactions entre le microenvironnement tumoral (TME), la matrice extracellulaire (ECM), les fibroblastes associés au cancer (CAFs), les cellules souches cancéreuses (CSCs) et le développement du réseau vasculaire tumoral de type VM.

(Adapté de Li, *et al.* 2025)

1.4 Les processus cellulaires et moléculaires du mimétisme vasculogénique

1.4.1 Hippo/YAP/TEAD: survie cellulaire et résistance aux traitements

La voie signalétique Hippo est essentielle dans la régulation de la prolifération cellulaire, l'apoptose et le maintien de l'homéostasie tissulaire. Les principaux effecteurs de cette voie, Yes-associated protein (YAP) et Transcriptional co-activator with PDZ-binding motif (TAZ) agissent en tant que coactivateurs transcriptionnels se liant aux facteurs de transcription TEA Domain (TEAD) (Lange *et al.*, 2015). L'implication de cette voie dans les GBM et le VM suscite un intérêt croissant car le dysfonctionnement des différents acteurs de cette voie a été associé à la plasticité cellulaire accrue et à la résistance aux traitements dans diverses pathologies. YAP et TAZ sont fréquemment hyperactivés dans les tumeurs agressives, contribuant à leur capacité d'adaptation et leur potentiel invasif. L'activation de YAP/TAZ favorise l'expression des gènes CTGF et CYR61 impliqués dans la migration cellulaire et la transition vers un état pseudo-endothélial. Cette reprogrammation pourrait aider les cellules tumorales à former des structures tubulaires vasculaires et à s'intégrer fonctionnellement aux réseaux sanguins dans un environnement hostile (Ferrand *et al.*, 2022).

Dans le contexte du VM, l'activation de YAP a été associée à une augmentation de l'expression de marqueurs vasculaires atypiques tels que VE-Cadhérine et CD31, habituellement typiques des cellules endothéliales. Toutefois, les GBM adoptant ce phénotype conservent leurs caractéristiques tumorales, leur conférant une résistance importante aux thérapies ciblant l'angiogenèse classique. Compte tenu de ce rôle central de la progression tumorale, la voie Hippo représente une cible thérapeutique prometteuse. Des inhibiteurs spécifiques de YAP/TAZ-TEAD, tels que le verteporfin, ont montré une capacité à bloquer la formation des structures vasculaires tumorales en empêchant la transcription des gènes pro-survie et pro-invasion (Wei *et al.*, 2017). Des composés actuellement en développement tels que le GNE7883, le VT107 et l'IAG933 ont montré une efficacité *in vitro* en inhibant la migration cellulaire et la formation de structures VM dans les lignées de GBM.

Une meilleure compréhension des mécanismes de plasticité cellulaire des GBM médiée par la voie Hippo, représentée à la figure 1.15, pourrait ouvrir la voie à des stratégies combinées intégrant des inhibiteurs de YAP avec des traitements standards du GBM afin de contourner les résistances et améliorer l'efficacité des thérapies existantes.

1.4.2 JAK/STAT: médiateur clé de la signalisation cellulaire

Outre la voie Hippo, d'autres cascades de signalisation illustrent également comment les cellules cancéreuses arrivent à s'adapter aux stress environnementaux et aux traitements standards. Parmi elles, la voie Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription (JAK/STAT) est bien documentée pour son rôle clé dans la prolifération, la survie et la différenciation cellulaire. Dans le GBM, cette voie est associée à l'inflammation tumorale, à la communication avec le microenvironnement tumoral ainsi qu'à la promotion de phénotypes de résistance (Wang *et al.*, 2025). L'activation aberrante de JAK/STAT contribue également à l'évasion immunitaire, rendant cette cascade intéressante dans la compréhension des mécanismes d'initiation et de maintien du VM. Son activation est souvent déclenchée par des cytokines pro-inflammatoires telles que les interleukines IL-6, l'IL-10 et les colony-stimulating factors (CSF), des facteurs stimulant la production et la fonction des cellules myéloïdes, souvent détournés dans le contexte tumoral pour favoriser un environnement protumoral et immunosuppresseur. L'activation transcriptionnelle de JAK/STAT via l'axe cytokines joue un rôle central dans la mise en place d'un environnement immunosuppresseur et protumoral favorable au VM (Sansone *et al.*, 2012).

La voie JAK/STAT impacte différents facteurs de transcription majeurs qui favorisent eux-mêmes l'invasion, la survie et l'adaptation métabolique des cellules tumorales. (Figure 1.16) (Dodington *et al.*, 2017). Parmi les effecteurs documentés, on retrouve SNAIL et FOXC2, gènes clés dans l'EMT et le VM. En effet, SNAIL peut être activé par STAT3 induisant alors l'inhibition de gènes épithéliaux et favorisant l'expression des marqueurs mésenchymateux tels que vimentine et N-cadhérine. Dans un contexte de GBM par exemple, cette plasticité pourrait permettre aux cellules tumorales d'acquérir un phénotype migratoire important leur permettant d'infiltrer le cerveau et y former une vasculature de type VM. Dans les GBM, la surexpression de SNAIL est associée à un pronostic défavorable (Xu *et al.*, 2023). Des études ont montré que les cellules tumorales exprimant des niveaux élevés de STAT3 et de SNAIL résistaient mieux aux agents cytotoxiques en raison d'une augmentation des capacités de survie sous stress hypoxique (Selvendiran K *et al.*, 2009, Liu *et al.*, 2011).

Le facteur FOXC2 est également critique; il a été associé au développement de cellules initiatrices de tumeurs, résistantes aux thérapies conventionnelles. L'interaction entre SNAIL et FOXC2 a été associée à une transition cellulaire vers un état hautement plastique et agressif, caractéristique des GBM. Bien que ces corrélations aient été observées entre l'activation de la voie JAK/STAT et FOXC2, leur impact sur des processus tels que le VM n'ont été que très peu abordés et restent sujets à investigation (Hargadon *et al.*, 2023). Finalement, Ribosomal Protein SA, également connu sous le nom du récepteur à la laminine 37/67

kDa (RPSA) est un facteur impliqué dans l'adhésion cellulaire et la signalisation tumorale. Lorsqu'activé par STAT3, RPSA interagit avec la MEC favorisant ainsi une invasion cellulaire accrue. RPSA joue son rôle dans l'initiation du VM en interagissant avec les laminines, protéines de la membrane basale vasculaire, pour permettre aux cellules tumorales de mimer l'organisation des vaisseaux sanguins. L'activation de RPSA via JAK/STAT semble être une voie intéressante dans la compréhension de la résistance aux traitements via la modulation des voies de survie intracellulaires (El Khoury *et al.*, 2021).

L'enrichissement des connaissances sur les rôles et interconnexions entre les facteurs de transcriptions tels que SNAIL1 et FOXC2, la voie JAK/STAT et le VM, pourrait offrir d'importantes perspectives sur les mécanismes de résistance aux thérapies conventionnelles. En comprenant mieux la manière dont ces éléments interagissent pour favoriser l'adaptation tumorale, il serait possible d'identifier des cibles thérapeutiques innovantes et limitant la plasticité tumorale.

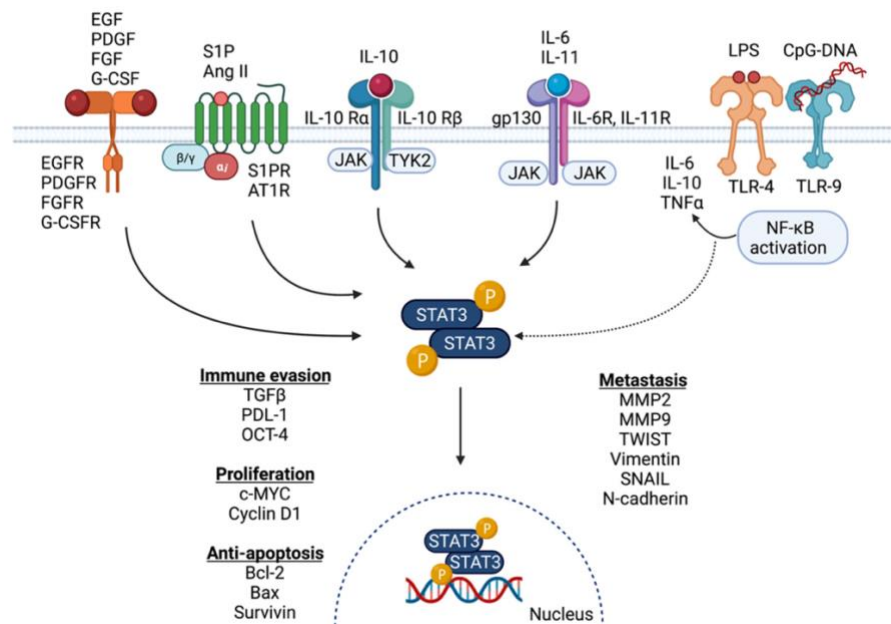


Figure 1.16. Voies d'activation de STAT3, partenaires de signalisation et gènes cibles dans le cancer. L'IL-6 ou l'IL-11 se lie à un complexe hexamérique constitué de leur récepteur spécifique et de la sous-unité gp130, entraînant le recrutement et l'activation des kinases JAK. STAT3 est alors phosphorylé, dimérise et migre dans un noyau où il active, en synergie avec NF-κB et GLI1, la transcription de gènes importants dans la prolifération, l'évasion immunitaire, les métastases et la résistance à l'apoptose.

(Adapté de To *et al.*, 2022)

Tableau 1.12. Facteurs de transcription induits ou associés à l'activation de la voie JAK/STAT dans les tumeurs solides.

Facteur de transcription	Fonction principale	Lien avec STAT3
MYC	Prolifération, métabolisme, croissance cellulaire	Cible directe de STAT3
BCL2	Anti-apoptose	Cible directe de STAT3
MCL1	Anti-apoptose	Cible directe
Cyclin D1 (CCND1)	Cycle cellulaire (G1/S)	Induite par STAT3
VEGF	Angiogenèse	Transcription induite via STAT3
Survivin (BIRC5)	Résistance à l'apoptose	Cible transcriptionnelle
SOCS3	Inhibiteur de rétrocontrôle de STAT3	Cible classique
MMP9	Dégradation de la matrice extracellulaire	Régulation directe/indirecte
SNAI1	Transition épithélio-mésenchymateuse (EMT), plasticité cellulaire	Associé à l'activation de STAT3 (indirect)
FOXC2	Invasion, métastase, EMT	Corrélié à STAT3 dans certains cancers

Ce tableau résume les principaux facteurs de transcription régulés ou associés à l'activation de la voie JAK/STAT3 dans la tumorigénèse. Les cibles directes de STAT3 sont bien décrites dans la littérature. Toutefois, certains facteurs comme SNAI1 et FOXC2, bien que non directement activés par STAT3 sont fortement associés à son activation dans le contexte du VM. Ces facteurs de transcription sont importants dans les modèles de tumeurs agressives comme le GBM.

1.4.3 Voies signalétiques complémentaires; Wnt, Notch, Sortiline

Des voies signalétiques complémentaires suscitent un intérêt croissant dans la compréhension de la plasticité cellulaire, de l'adaptation au stress et du VM. La voie de signalisation Wnt/ β -caténine, impliquée dans la régulation de la transition phénotypique et l'acquisition d'un phénotype souche, favorise l'expression de gènes pro-angiogéniques et pro-VM (Xu *et al.*, 2016). Parallèlement, la signalisation Notch, cruciale pour la différenciation vasculaire et le maintien des niches tumorales, interagit avec d'autres voies

pour favoriser un équilibre dynamique entre les cellules tumorales et leur microenvironnement (Allenspach *et al.*, 2002). Dans le contexte du VM, cette voie contribuerait à la résistance aux thérapies conventionnelles (Benjakul *et al.*, 2022).

Enfin, la voie de la sortiline (SORT1) émerge comme un acteur clé de la régulation intracellulaire dans les tumeurs solides. Connue pour son rôle dans le trafic de protéines au sein du système endo-lysosomal, SORT1 est désormais reconnue comme un modulateur de la plasticité tumorale. Dans divers cancers, notamment les carcinomes mammaires et pancréatiques, elle est associée à la régulation de voies pro-invasives et pro-angiogéniques, incluant PI3K/AKT, ERK1/2, et la signalisation neurotrophique. Il a été démontré que la surexpression de SORT1 dans les tumeurs agressives est corrélée à une augmentation de la migration, de l'invasion et à une résistance accrue à certaines chimiothérapies (Roselli *et al.*, 2015). Plus récemment, son implication dans le remodelage de la matrice extracellulaire et la régulation de gènes pro-vasculaires a été suggérée. Cette activité pourrait découler de sa capacité à interagir avec des ligands comme proNGF ou neurotensine, ainsi qu'à induire la transcription de gènes associés à la survie et à l'angiogenèse tumorale. Ainsi, cette protéine représente une cible émergente d'intérêt thérapeutique dans les cancers solides où la plasticité phénotypique et la néovascularisation alternative constituent des enjeux majeurs (Charfi *et al.*, 2021).

Bien que ces voies soient encore aux prémices de l'étude dans le cadre du VM, leur rôle potentiel dans la régulation de la plasticité tumorale et de la résistance aux thérapies en fait des cibles prometteuses pour contrer l'adaptabilité des tumeurs agressives, et ce, tout particulièrement dans un environnement hypoxique.

1.4.4 Hypoxie et reprogrammation métabolique

L'acquisition du phénotype vasculogénique par certaines cellules tumorales repose sur une plasticité cellulaire complexe en adaptation à des conditions extrêmes de leur microenvironnement. Parmi les facteurs principaux influençant ces processus, l'hypoxie et la reprogrammation métabolique jouent un rôle central. En effet, les tumeurs solides, comme dans la situation des glioblastomes, présentent des régions fortement hypoxiques dues à un réseau vasculaire dysfonctionnel et une prolifération rapide des cellules tumorales. La privation d'oxygène dans un contexte tumoral conduit à une importante cascade d'adaptation cellulaire et métabolique et constitue un signal puissant pour l'initiation de l'angiogenèse et du mimétisme vasculogénique (Wei *et al.*, 2021).

La signalisation hypoxique repose principalement sur la stabilisation du facteur de transcription HIF-1 α , qui médie une série de réponses visant à assurer la survie cellulaire en conditions de stress. HIF-1 α , module l'expression de nombreux gènes impliqués dans l'angiogenèse (VEGF) mais également dans le métabolisme (GLUT1, LDHA), la migration (SNAIL, ZEB1) et l'invasion tumorale vers des niches métastatiques (MMP9, MMP14) (Gonzalez-Avila G *et al.*, 2023).

Un des mécanismes sous-jacents à cette plasticité est la reprogrammation métabolique par laquelle les cellules tumorales modifient leur utilisation des substrats énergétiques afin de s'adapter aux fluctuations de leur environnement. Sous hypoxie, les cellules passent d'un état oxydatif, où elles dépendent des mitochondries, à une glycolyse accrue. Ce phénomène s'appelle l'effet Warburg et favorise l'acidification du microenvironnement tumoral et ultimement la résistance au stress métabolique (Bartons R *et* Caro J., 2007). Des altérations du métabolisme des lipides et de la glutamine ont également été rapportées comme des mécanismes favorisant la survie cellulaire en conditions hypoxiques.

De plus, en favorisant une communication paracrine avec les cellules stromales, l'hypoxie participe à l'immunosuppression locale, à l'activation des fibroblastes associés aux tumeurs et à la résistance aux traitements ciblant les voies métaboliques classiques. La compréhension approfondie de l'hypoxie et de la reprogrammation métabolique qui s'en tire, doivent être considérés comme des facteurs intégrateurs de la progression tumorale et du développement du VM. La recherche a révélé que l'hypoxie favorise l'émergence de structures de type VM et a permis de mettre en lumière la nécessité de repenser des stratégies anti-angiogéniques classiques afin d'explorer de nouvelles approches ciblant la dynamique adaptative des cellules tumorales via des thérapies combinatoires plus efficaces (Fu *et al.*, 2021).

Les principales cibles transcriptionnelles activées par HIF-1 α et HIF-2 α dans ce contexte sont résumées au Tableau 1.13. Ces gènes régulent des processus clés renforçant le lien entre l'hypoxie, la plasticité cellulaire et la progression néovasculaire. À l'avenir, une meilleure intégration de toutes ces connaissances pourrait aboutir au contournement de la résistance aux traitements dans le contexte de tumeurs solides agressives comme les GBM.

Tableau 1.13. Principaux gènes régulés par HIF-1 α et HIF-2 α et leurs fonctions.

Target gene	Gene product (protein)	Function	HIF-1 α	HIF-2 α
SLC2A1	GLUT1	Glucose transport	+	+
PLIN2	ADRP	Lipid metabolism	+	+
CA12	CAXII	pH homeostasis	+	+
FLG	Filaggrin	Cytoskeletal structure	+	+
IL6	IL6	Immune cytokine	+	+
ADM	Adrenomedullin	Angiogenesis	+	+
VEGFA	VEGFA	Angiogenesis	+	+
BNIP3	BNIP3	Autophagy and apoptosis	+	-
HK1	hexokinase 1	Glycolysis	+	-
HK2	hexokinase 2	Glycolysis	+	-
PFK	Phosphofructokinase	Glycolysis	+	-
ALDOA	ALDA	Glycolysis	+	-
PGK1	PGK1	Glycolysis	+	-
LDHA	LDHA	Glycolysis	+	-
NOS2	iNOS	Nitric oxide production	+	-
ABL2	ARG	Inhibitor of nitric oxide production	-	+
EPO	erythropoietin	Erythropoiesis	-	+
POU5F1	OCT4	Stem cell identity	-	+
SCGB3A1	secretoglobin 3A1	Cytokine inhibiting growth?	-	+
TGFA	TGF α	Growth factor	-	+
CCND1	cyclin D1	Cell cycle progression	-	+
DLL4	DLL4	NOTCH signaling and endothelial cells branching	-	+
ANGPT2	angiopoietin 2	Blood vessel remodeling	-	+
EDN1	endothelin 1	Maintaining vascular tone, comitogenic activity	+	+
EGLN3	PHD3	Cellular oxygen sensing, HIF α hydroxylation	+	+
EGLN1	PHD2	Cellular oxygen sensing, hydroxylation of HIF	+	NR
TF	transferrin	Iron transporter, stimulating cell proliferation	+	+
TGF β 3	TGF β 3	Proliferation, differentiation	+	+
FLT1	VEGFR1	Angiogenesis	+	+

Ce tableau présente une sélection des gènes cibles majeurs des facteurs de transcription HIF-1 α et HIF-2 α dans un contexte tumoral. Ces gènes sont impliqués dans différents processus clés de l'adaptation hypoxique, notamment l'angiogenèse, le métabolisme glycolytique, la survie cellulaire et l'invasion tumorale. La redondance et la complémentarité entre les deux isoformes de HIF soulignent leur rôle central dans la progression tumorale dans les environnements déplétés d'oxygène comme le microenvironnement des GBM.

(Adapté de Jochmanova *et al.* 2013)

1.4.5 Approches pharmacologiques

L'évolution des stratégies pharmacologiques contre le VM et la plasticité tumorale repose sur une approche intégrative combinant l'inhibition des voies de signalisation oncogéniques, la reprogrammation métabolique et la modulation du microenvironnement tumoral. Les stratégies actuelles ne se limitent plus

aux thérapies anti-angiogéniques classiques mais explorent des combinaisons intégrant différents effecteurs clés des voies de signalisation YAP/TAZ, JAK/STAT Wnt et Notch.

Une approche prometteuse repose sur l'inhibition de YAP/TAZ via des inhibiteurs de TEAD tels que le VT3989, qui a récemment montré une capacité à bloquer la transcription de gènes pro-survie freinant ainsi le développement du VM (Fu *et al.*, 2024). D'autre part, la voie JAK/STAT représente une autre cible d'intérêt pour les inhibiteurs de JAK1/2 comme le ruxolitinib ou des anticorps dirigés contre les cytokines IL-6 ou CSF-3. En parallèle, des approches ciblant le métabolisme tumoral sont en plein essor. L'hypoxie et la glycolyse accrue des cellules cancéreuses conduisent à l'exploration d'inhibiteurs de HIF-1 α , tels que le PX-478, ainsi que des bloqueurs de transporteurs du glucose, qui pourraient aider à limiter la reprogrammation métabolique (Huo *et al.*, 2025).

Les thérapies combinatoires représentent une voie de recherche majeure en associant des inhibiteurs classiques de VEGF avec des agents modulant l'environnement tumoral, tels que la lysyl oxydase (LOX) ou des inhibiteurs de CXCR4 (Wang *et al.*, 2016). Enfin, l'émergence des nanomédicaments et des thérapies ciblées par ARNi permettrait de cibler plus spécifiquement des gènes cibles du VM et pourrait constituer une avancée majeure dans la lutte contre les tumeurs chimiorésistantes. L'intégration des connaissances nouvelles sur les biomarqueurs prédictifs sera essentielle pour optimiser ces nouvelles stratégies thérapeutiques. Les principaux agents pharmacologiques ayant été testés pour le VM sont présentés au tableau 1.14.

Tableau 1.14. Agents pharmacologiques ciblant le VM.

Therapeutic agents	Molecular target or function	Effect on VM
Bevacizumab (Avastin)	VEGF	no effect
PARP inhibition	VE-cadherin	inhibition
Thalidomide (Thalomid)	TNF α ; ROS producer	inhibition
TNP-470 (AGM-1470)	TK inhibition	no effect
Endostatin (rhEndostatin, Endostar)	integrin signaling	no effect
Rapamycin (Rapamune)	mTOR, VEGF	inhibition
Curcumin	EPHA2, PI3K, MMPs	inhibition
Isoxanthohumol	TGF- β signaling	inhibition
Vadimezan (ASA404, AS1404, DMXAA)	MAPK, VE-cadherin	inhibition
Resveratrol	VEGF-R1, VEGF-R2	inhibition
Ginsenoside Rg3	VE-cadherin/MMPs/EPHA2	inhibition

Ce tableau résume les principaux agents thérapeutiques testés pour leur effet sur le VM dans divers modèles tumoraux. Il met en évidence leurs cibles moléculaires et leur efficacité sur la formation des structures pseudo-vasculaires tumorales.

(Adapté de Delgado-Bellido *et al.*, 2017)

1.5 Projet de recherche

1.5.1 Problématique

Le VM constitue un processus alternatif à l'angiogenèse par lequel les cellules tumorales acquièrent la capacité de former des structures capillaires vasculaires indépendantes de l'endothélium vasculaire classique, contribuant ainsi à la progression tumorale et à la résistance aux thérapies anti-angiogéniques. Dans le GBM, un cancer cérébral hautement agressif, cette stratégie d'adaptation est associée à des mécanismes complexes impliquant des voies signalétiques ainsi qu'une régulation transcriptionnelle encore trop peu documentées. L'identification et la caractérisation de ces voies et effecteurs clés sont cruciales dans la compréhension des mécanismes de chimiorésistance et de plasticité tumorale. Par ailleurs, l'influence des MSC sur ce phénomène par des mécanismes paracrines, immunomodulateurs et métaboliques mérite d'être approfondie. Dans ce contexte, il est essentiel de caractériser les interactions moléculaires et transcriptionnelles entre certaines voies de signalisation majeures afin d'évaluer des stratégies thérapeutiques émergentes capables d'inhiber le VM et d'améliorer l'efficacité des traitements actuels contre le GBM.

1.5.2 Hypothèse de travail

Le VM constitue une stratégie adaptative majeure des cellules de GBM leur permettant de contourner l'angiogenèse classique et de résister aux traitements anti-angiogéniques. Dans ce contexte, les MSC pourraient, sous certaines conditions du microenvironnement tumoral, favoriser ce processus par des mécanismes paracrines, métaboliques et immunomodulateurs encore inexplorés.

Nous émettons une première hypothèse que la plasticité des MSC, lorsqu'elles sont exposées à une matrice extracellulaire riche en signaux pro-angiogéniques, induit l'activation de la voie de signalisation JAK/STAT3, modulant ainsi l'expression de régulateurs transcriptionnels clés tels que SNAI1, FOXC2 et RPSA et favorisant la formation de structures pseudo-vasculaires.

Dans un second temps, nous posons l'hypothèse que dans les cellules de GBM exposées à des conditions mimant le microenvironnement tumoral telles qu'une hypoxie, une stimulation par des cytokines pro-inflammatoires, l'activation de la voie Hippo et la translocation nucléaire de YAP1 induisent un programme

transcriptionnel pro-angiogénique et pro-survie permettant la formation du VM. Parmi les gènes cibles majeurs activés par le complexe YAP/TEAD, CYR61 et CTGF sont particulièrement pertinents, car ils appartiennent à la famille CCN de protéines matricielles sécrétées. Ces facteurs sont bien documentés pour leur rôle dans le remodelage matriciel, la stimulation de la migration et de l'invasion et l'induction de programmes pseudo-endothéliaux facilitant la formation de structures tubulaires. Ainsi, le lien entre YAP/TEAD et Cyr61/CTGF constitue un axe fonctionnel cohérent expliquant comment des signaux du microenvironnement tumoral peuvent déclencher le développement du VM, et ce, même en l'absence de marqueurs endothéliaux classiques.

Enfin, nous proposons que le complexe EGFR/SORT1 joue un rôle central dans la régulation du VM et de la chimiorésistance. Il est plausible que SORT1 module la translocation nucléaire d'EGFR et active des voies de signalisation pro-survie, influençant ainsi la signature moléculaire de résistance aux traitements. Ce mécanisme ferait de SORT1 un acteur clé de l'agressivité tumorale des GBM.

1.5.3 Objectifs

L'objectif général de ce travail de recherche est de documenter les mécanismes cellulaires et moléculaires du VM dans le GBM en mettant l'accent sur le rôle de voies de signalisation clés, notamment les voies JAK/STAT, Hippo/YAP et Sortiline/EGFR. Une attention particulière est portée à la contribution des MSC au remodelage vasculaire tumoral afin de mieux comprendre comment la plasticité cellulaire, le microenvironnement tumoral et certaines régulations transcriptionnelles coopèrent pour favoriser le VM dans les tumeurs cérébrales agressives.

Objectif #1: Déterminer comment l'activation de la voie JAK/STAT3, en réponse à des signaux du microenvironnement tumoral riches en cytokines, régule l'expression des facteurs transcriptionnels SNAIL, FOXC2 et RPSA et participe à l'induction du VM dans un modèle non-tumoral *in vitro* de MSC.

Objectif #2: Caractériser l'implication de la voie de signalisation Hippo et de son effecteur transcriptionnel YAP1 dans l'induction du VM dans les cellules de GBM, en identifiant les gènes transcriptionnels activés tout en évaluant le potentiel thérapeutique d'inhibiteurs pharmacologiques cliniquement pertinents ciblant cette voie.

Objectif #3: Évaluer le rôle du complexe EGFR/SORT1 dans la régulation du VM et de la chimiorésistance dans le GBM, en analysant comment SORT1 module l'expression d'EGFR, la signalisation pro-survie, la signature moléculaire associées aux cellules souches cancéreuses et la résistance aux chimiothérapies.

CHAPITRE 2

ARTICLE 1

Transcriptional regulation of *CYR61* and *CTGF* by LM98, a synthetic YAP-TEAD inhibitor that targets *in vitro* vasculogenic mimicry in glioblastoma cells

Article publié dans la revue scientifique *Anticancer Drugs*

Roy ME, Veilleux C, Paquin A, Gagnon A, Annabi B. Transcriptional regulation of CYR61 and CTGF by LM98: a synthetic YAP-TEAD inhibitor that targets *in-vitro* vasculogenic mimicry in glioblastoma cells. *Anticancer Drugs*. 2024 Sep 1;35(8):709-719. doi: 10.1097/CAD.0000000000001627. Epub 2024 Jun 18. PMID: 38900643; PMCID: PMC11305628.

Contributions des co-auteurs:

Roy : Conceptualisation, curation des données, analyses formelles, expérimentations, méthodologie, rédaction du manuscrit, révision et édition.

Veilleux : Curation des données, expérimentations, révision et édition du manuscrit.

Paquin : Expérimentations, méthodologie, révision et édition du manuscrit.

Gagnon : Analyses formelles, financement, supervision, rédaction du manuscrit, révision et édition.

Annabi : Conceptualisation, analyses formelles, supervision, financement, rédaction du manuscrit, révision et édition.

Tous les auteurs ont lu et approuvé la version finale du manuscrit.

Transcriptional regulation of *CYR61* and *CTGF* by LM98, a synthetic YAP-TEAD inhibitor that targets *in vitro* vasculogenic mimicry in glioblastoma cells

Marie-Eve Roy¹, Carolane Veilleux¹, Alexis Paquin², Alexandre Gagnon², and Borhane Annabi^{1*}

¹*Laboratoire d'Oncologie Moléculaire and* ²*Laboratoire de Chimie Organique et Médicinale, Département de Chimie, Université du Québec à Montréal, Montreal, QC, Canada, H3C 3P8*

Running title: YAP/TEAD inhibitors target vasculogenic mimicry

** To whom correspondence and reprint requests should be directed*

Laboratoire d'Oncologie Moléculaire

Université du Québec à Montréal

C.P. 8888, Succ. Centre-ville

Montréal, Québec

CANADA

H3C 3P8

Phone: (514) 987-3000 ext. 7610

E-mail: annabi.borhane@uqam.ca

2.1 Résumé

Le glioblastome (GBM) est une tumeur hautement angiogénique du système nerveux central qui présente une résistance marquée aux thérapies anti-angiogéniques conventionnelles, en partie en raison de l'activation d'un mécanisme alternatif à l'angiogenèse connu sous le nom de mimétisme vasculogénique (VM). Étroitement associé au GBM, le dérèglement de la voie de signalisation Hippo entraîne la surexpression du complexe transcriptionnel YAP/TEAD ainsi que de plusieurs effecteurs en aval impliqués dans la résistance aux traitements. À ce jour, peu d'études ont exploré l'intersection potentielle entre le VM et la voie Hippo dans le phénotype chimiorésistant du GBM. Cette étude vise à caractériser les profils d'expression des régulateurs de la voie Hippo dans des échantillons cliniquement annotés de GBM et à évaluer leur implication dans le VM *in vitro*. Elle cherche également à déterminer le potentiel thérapeutique du ciblage pharmacologique de cette voie de signalisation. Une analyse *in silico* des niveaux d'expression transcriptionnelle des membres de la voie Hippo (YAP1, TEAD1, AXL, NF2, CTGF et CYR61) dans des tissus de gliomes de bas grade (LGG) et de GBM a été réalisée à l'aide de la plateforme GEPIA. L'expression génique a été analysée par RT-qPCR dans les lignées cellulaires humaines de cancer cérébral U87, U118, U138 et U251, ainsi que dans des matrices de cDNA de tumeurs cérébrales cliniquement annotées. Des répressions géniques transitoires ont été effectuées à l'aide de siARN spécifiques. Le VM a été évalué sur une matrice de Cultrex, et les structures capillaires tridimensionnelles ont été analysées à l'aide du logiciel Wimasis. Les niveaux d'expression des transcrits CYR61 et CTGF étaient significativement augmentés dans les tissus de GBM et davantage induits lors de l'évaluation du VM *in vitro*. Le silençage de CYR61 et de CTGF, ainsi que le traitement par un inhibiteur de petite molécule de TEAD, le LM98 dérivé de l'acide flufénamique, ont conduit à une inhibition marquée du VM. De plus, la répression génique des facteurs de transcription SNAIL et FOXC2 a également altéré le VM et réduit les niveaux d'expression de CYR61 et CTGF. Le ciblage pharmacologique de la voie Hippo permet d'inhiber le mimétisme vasculogénique *in vitro*. L'élucidation des interactions entre la voie Hippo et le VM pourrait ouvrir la voie à de nouvelles stratégies thérapeutiques innovantes dans le traitement du glioblastome.

Mots-clés : Chimiorésistance, Voie Hippo, Glioblastome, Mimétisme vasculogénique, YAP/TEAD

2.2 Abstract

BACKGROUND: Glioblastoma (GBM) is a highly angiogenic malignancy of the central nervous system that resists standard anti-angiogenic therapy, in part because of an alternative process to angiogenesis termed vasculogenic mimicry (VM). Intricately linked to GBM, dysregulation of the Hippo signaling pathway leads to overexpression of YAP/TEAD and several downstream effectors involved in therapy resistance. Little is known on whether VM and the Hippo pathway intersect in the GBM chemoresistance phenotype. **OBJECTIVE:** This study seeks to investigate the expression patterns of Hippo pathway regulators within clinically annotated GBM samples, examining their involvement *in vitro* regarding VM. Additionally, it aims to assess the potential for pharmacological targeting of this pathway. **METHODS:** *In silico* analysis of the Hippo signaling members *YAP1*, *TEAD1*, *AXL*, *NF2*, *CTGF*, and *CYR61* transcript levels in low-grade glioblastoma (LGG) and GBM tumor tissues was done by GEPIA. Gene expression was analyzed by RT-qPCR from human U87, U118, U138, and U251 brain cancer cell lines and in clinically annotated brain tumor cDNA arrays. Transient gene silencing was performed with specific siRNA. VM was assessed using a Cultrex matrix, and 3D capillary-like structures analyzed with Wimasis. **RESULTS:** *CYR61* and *CTGF* transcripts levels were elevated in GBM tissues and were further induced when *in vitro* VM was assessed. Silencing of *CYR61* and *CTGF*, or treatment with a small-molecule TEAD inhibitor LM98 derived from flufenamic acid, inhibited VM. Silencing of *SNAIL* and *FOXC2* also altered VM and reduced *CYR61/CTGF* levels. **CONCLUSION:** Pharmacological targeting of the Hippo pathway inhibits *in vitro* VM. Unraveling the connections between the Hippo pathway and VM may pave the way for innovative therapeutic strategies.

Key words: Chemoresistance, Hippo pathway, Glioblastoma, Vasculogenic mimicry, YAP/TEAD

2.3 Introduction

Glioblastomas (GBM) are, according to the Genetic and Rare Diseases (GARD) information center from the National Institutes of Health (USA), rare aggressive and malignant grade IV brain tumors that originate from the glial cells of the brain [1]. It is the most common and deadly malignant brain tumor in adults, with a median survival of less than 15 months [2]. Several drugs have been granted an orphan drug designation by the FDA or EMA for the treatment of GBM, such as azeliragon, bevacizumab, and FLAG-003 [3, 4]. However, most of them have not been approved for marketing or have shown limited efficacy in clinical trials. Furthermore, overcoming immunotolerance, stimulating robust tumor antigen responses, and countering the immunosuppressive microenvironment are critical for curative GBM immunotherapy [5, 6]. Therefore, there still is a high unmet need for new therapeutic strategies for GBM patients, and for a better understanding of the immunosuppressive pathways involved.

Our team has recently developed various molecules that target the Hippo pathway involved in the immunosuppressive nature of GBM tumors [7-9]. This signalling pathway consists of a kinase cascade that inhibits the nuclear translocation of YAP/TAZ, which are transcriptional co-activators that promote cell growth and survival [10]. Deregulation of the Hippo pathway in GBM leads to increased YAP/TAZ activity and resistance to chemotherapy and immunotherapy [11]. Given its role in glioma progression and chemoresistance as well as metastasis in several cancers, the Hippo pathway holds promise as a therapeutic target, particularly for high-grade gliomas like GBM [12, 13]. The Hippo pathway also interacts with other signalling pathways, such as Wnt, Notch, and EGFR, which are also implicated in GBM development and progression [14]. Concomitantly, our very own previous investigation, which led us to unravel novel pharmacological approaches using new synthetic compounds, may further potentially target Hippo-associated pathways.

The regulation of vasculogenic mimicry (VM), a process in which tumor cells form vascular-like structures to supply blood for tumor growth and metastasis, is associated with poor clinical outcomes and resistance to anti-angiogenesis therapies in many cancers, including GBM [15]. The molecular mechanisms underlying VM formation are complex and not fully understood, but some studies have suggested that the Hippo pathway may play a key role in this process [16, 17]. For example, RNA m6A methylation, a common mRNA modification that regulates gene expression, has been shown to promote VM formation in hepatocellular carcinoma via the Hippo pathway [18]. Another study demonstrated that hypoxia, a common feature of the solid tumors microenvironment, induces VM formation in GBM cells through the activation of the Hippo pathway [19]. In fact, hypoxia increases the expression and nuclear localization of YAP, which

subsequently upregulates the expression of VM-related genes, such as *VEGFR1*, *VEGFR2*, and *VE-cadherin*, enhancing the ability of GBM cells to form VM networks [20].

Numerous signalling pathways have been studied in gliomas, including the Hippo pathway in particular, due to the high expression of its effectors YAP/TAZ, which correlate with the grade of malignancy, reaching maximal levels in GBM [21]. Patients with TAZ overexpressing tumors exhibit a poor prognosis, and in cell models, TAZ promotes tumor progression, while its knockdown prevents proliferation, tumorigenicity and invasion of glioma cells [22]. The deregulation of the Hippo pathway represents a mechanism that further leads to multidrug resistance in GBM cell lines [12]. Accordingly, a reduction of YAP/TAZ nuclear levels leads to down-regulation of downstream gene targets of the Hippo pathway.

The Hippo pathway may therefore represent a critical regulator of VM formation in GBM. Here, we assessed the pharmacological properties of three TEAD binders that target the Hippo pathway to reduce the expression of its downstream effectors CTGF, CYR61, AXL and NF2. We further questioned whether such approach would help circumvent VM-mediated chemoresistance in rare brain cancer disease.

2.4. Materials and methods

2.4.1. Materials

Sodium dodecyl sulfate (SDS) and bovine serum albumin (BSA) were purchased from Sigma-Aldrich Corp (St Louis, MO, USA). Cell culture media EMEM was from Wisent (320-005 CL). Electrophoresis reagents were purchased from Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA). The HyGLO™ Chemiluminescent HRP (horseradish peroxidase) Antibody Detection Reagents were from Denville Scientific Inc (Metuchen, NJ, USA). Micro bicinchoninic acid (BCA) protein assay reagents were from Pierce (Micro BCA™ Protein Assay Kit; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The polyclonal antibodies against Snail (3879S) as well as the monoclonal antibody against GAPDH (D4C6R) were from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA). The monoclonal antibody against Fibrillarin (NB300-269) was purchased from Novus Biologicals. HRP-conjugated donkey anti-rabbit and anti-mouse immunoglobulin (Ig) G secondary antibodies were from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA, USA).

2.4.2. Cell culture and capillary-like structure formation assay

The human U87 (HTB-14), U118 (HTB-15), U138 (HTB-16), and U251 glioblastoma cell lines were from American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). They were all maintained in Eagle's Minimum Essential Medium (Wisent, 320-006CL) containing 10% (v/v) calf serum (HyClone Laboratories, SH30541.03), 2 mM glutamine, 1 mM sodium pyruvate (Sigma-Aldrich Canada, P2256), 100 units/mL penicillin and 100 mg/mL streptomycin (Wisent, 250-202-EL). Cells were incubated at 37°C with 5% CO₂. VM was assessed *in vitro* using Cultrex (3432-010-01, R&D Systems, Inc.; Toronto, ON) to monitor 3D capillary-like structures formation [23]. In brief, each well of a 96-well plate was pre-coated with 50 µl of Cultrex. Cell suspension in culture media (2×10⁴ cells/100 µl) was then seeded on top of polymerized Cultrex. Tested compounds (HC258, LM41, LM98) were added to the cell culture media at a 10 µM concentration and incubated at 37°C in a CO₂ incubator. Pictures were taken over time using a digital camera coupled to a phase-contrast inverted microscope. Mean loop area: For each loop, the area (number of pixels) enclosed by it is considered as its area. The mean loop area is the arithmetic mean of all loop areas. Mean loop perimeter: For each loop, the pixels that belong to its edge are considered its border or perimeter. The mean loop perimeter is the arithmetic mean of all loop perimeters. The number of loops and area covered upon tube branching formed by the cells were quantified using either the Wimasis analysis software (Cordoba, Spain) or the ImageJ software [24].

2.4.3. Total RNA isolation, cDNA synthesis, and real-time quantitative PCR

Total RNA was extracted from cell monolayers using 1 mL of TriZol reagent for a maximum of 3×10^6 cells as recommended by the manufacturer (Life Technologies, Gaithersburg, MD). For cDNA synthesis, 1-2 μ g of total RNA was reverse-transcribed using a high-capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) or, in the case of the gene array, a R2 First Strand kit (QIAGEN, Valencia, CA). The cDNA was stored at -80°C prior to PCR. Gene expression was quantified by real-time quantitative PCR using iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA). DNA amplification was carried out using an Iqycler iQ5 (Bio-Rad) and product detection was performed by measuring the binding of the fluorescent dye SYBR Green I to double-stranded DNA. The following primer sets were from QIAGEN: FOXC2 (Hs_FOXC2_1_SG, QT00220871), SNAIL (Hs_SNAIL_1_SG, QT00010010), YAP1 (Hs_YAP1_1_SG, QT00080822), TEAD1 (Hs_TEAD1_1_SG, QT00000721), CTGF (Hs_CTGF_1_SG, QT00052899), CYR61 (Hs_CYR61_1_SG, QT00003451), AXL (Hs_AXL_1_SG, QT00067725), NF2 (Hs_NF2_va.1_SG, QT01004934), GAPDH (Hs_GAPDH_1_SG, QT00079247) and Peptidylprolyl Isomerase A (PPIA) (Hs_PPIA_4_SG, QT01866137). The relative quantities of target gene mRNA were normalized against internal housekeeping genes PPIA and GAPDH. The RNA was measured by following a ΔC_T method employing an amplification plot (fluorescence signal vs. cycle number). The difference (ΔC_T) between the mean values in the triplicate samples of the target gene and the housekeeping genes was calculated with the CFX manager Software version 2.1 (Bio-Rad) and the relative quantified value (RQV) was expressed as $2^{-\Delta C_T}$.

2.4.4. In silico analysis of transcripts levels in clinical glioblastoma and low-grade glioma tissues

A Gene Expression Profiling Interactive Analysis (GEPIA) web server was used to analyze the RNA sequencing expression data of glioblastoma tumors (GBM, $n = 163$) vs. healthy tissue ($n = 207$), and of low-grade glioma (LGG, $n = 518$) vs. healthy tissue ($n = 207$) from the TCGA and the normal brain tissue in Genotype-Tissue Expression (GTEx) databases [25]. GEPIA provides customizable functions such as tumor/normal differential expression analysis, profiling according to cancer types or pathological stages, patient survival analysis, similar gene detection, correlation analysis, and dimensionality reduction analysis (<http://gepia.cancer-pku.cn/detail.php>, accessed on January 5th, 2024). One-way ANOVA was used for differential analysis of gene expression, using disease states (GBM, LGG, or normal) as variables for the box plots.

2.4.5. TissueScan cDNA arrays of grades I-IV brain tumor tissues

TissueScan™ cancer and normal tissue cDNA arrays were purchased from OriGene (Rockville, MD), covering 43 clinical samples of the four stages of brain cancer as well as normal tissues, and were used to assess *TEAD1*, *YAP1*, *CYR61* and *CTGF* gene expression levels according to the manufacturer's recommendations. Tissue cDNAs in each array were synthesized from high-quality total RNAs of pathologist-verified tissues, normalized and validated with β -actin in two sequential qPCR analyses, and accompanied by clinical information for 18 World Health Organization (WHO) defined grade I, 11 WHO grade II, 10 WHO grade III, and 2 WHO grade IV brain tumors.

2.4.6. Transfection method and RNA interference

For gene silencing experiments, U87 glioblastoma cells were transiently transfected with siRNA sequences using Lipofectamine-2000 transfection reagent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Gene silencing was performed using 20 nM siRNA against *CTGF* (FlexiTube siRNA, SI00029673), *CYR61* (FlexiTube siRNA, SI03028655), *SNAIL* (FlexiTube siRNA, SI00083398), *FOXC2* (FlexiTube siRNA, SI03090423), or scrambled sequences (AllStar Negative Control siRNA, 1027281). The above small interfering RNA and mismatch siRNA were all synthesized by QIAGEN and annealed to form duplexes. Gene silencing efficacy was assessed by RT-qPCR as described above.

2.4.7. Real-time cell migration assay

Experiments were carried out using the Real-Time Cell Analyser (RTCA) Dual-Plate (DP) Instrument and the xCELLigence system (Roche Diagnostics, QC), following the instructions of the supplier. U87 cells were treated with vehicle (1% DMSO) or 10 μ M LM98. 2.5×10^4 cells per well were seeded in a CIM-plate 16 (Roche Diagnostics) and incubated at 37°C under a humidified atmosphere containing 5% CO₂ for 24 hours. Prior to cell seeding, the underside of each well in the upper chamber was coated with 0.15% gelatin in PBS and incubated for 1 hour at 37°C. The lower chamber wells were filled with serum-free medium. After 30 min of adhesion, cell migration was monitored every 5 min for 6 hours. The impedance value was measured by the RTCA DP Instrument and expressed as an arbitrary unit called the Cell Index. Each experiment was performed in quadruplicate wells.

2.4.8. Protein-protein interaction

The associative relationships of YAP/TEAD and of downstream effectors were retrieved from the STRING v11 database (<https://www.string-db.org/>) to identify and build protein-protein interaction networks [26], with a confidence score setting of 0.4, and the maximum number of interactions to show was no more than 10.

2.4.9. Nuclear extraction

Cell monolayers were first lysed with a cytoplasmic buffer and then with a nuclear buffer according to the manufacturer's instructions (Invent Biotechnologies, SC-003). In the case of cells cultured on Cultrex, they were first detached from the matrix using a non-enzymatic Cultrex organoid harvesting and dissociation solution (3700-100-01, R&D Systems, Toronto, ON).

2.4.10. Western blot

Cells and nuclear fractions, isolated as described above, were lysed in a buffer containing 1 mM each of sodium fluoride (NaF) and sodium orthovanadate (Na_3VO_4). Proteins (10-20 μg) were then separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). Next, proteins were electro-transferred to low-fluorescence polyvinylidene difluoride membranes and blocked for 1 hour at room temperature with 5% nonfat dry milk in Tris-buffered saline (150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5) containing 0.3% Tween-20 (TBST; Bioshop, TWN510-500). Membranes were washed in TBST and incubated overnight with the appropriate primary antibodies (1/1,000 dilution) in TBST containing 3% BSA and 0.1% sodium azide (Sigma-Aldrich) at 4°C and on a shaker. After three washes with TBST, the membranes were incubated for 1 hour with horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit or anti-mouse IgG at 1/2,500 dilutions in TBST containing 5% nonfat dry milk. Immunoreactive material was visualized by ECL.

2.4.11. Statistical data analysis

Data and error bars were expressed as mean $\pm$ standard error of the mean (SEM) of three or more independent experiments unless otherwise stated. Hypothesis testing was conducted using the Kruskal-Wallis test followed by a Dunn Tukey's post-test (data with more than three groups) or a Mann-Whitney test (two-group comparisons). Probability values of less than 0.05 (*) were considered significant and

denoted in the figures. All statistical analyses were performed using the GraphPad Prism 7 software (San Diego, CA, USA).

2.5.1. Results

2.5.1. High transcripts expression of the Hippo signaling pathway mediators in clinically annotated glioblastoma tissues.

Transcript levels from 518 clinically annotated low-grade glioma (LGG) and 163 glioblastoma (GBM) tissues were retrieved from the TCGA and the normal brain tissue in Genotype-Tissue Expression (GTEx) databases and compared to 207 healthy tissues. *YAPI* and *TEAD1* transcript levels were found to be increased in GBM tissues (Fig.2.1A) and this was indicative of a potential increase in their downstream effectors. When assessed, *CYR61*, *CTGF*, and *AXL* transcripts were effectively increased whereas *NF2* remained unchanged (Fig.2.1B). Interestingly, only *TEAD1* and *CTGF* transcripts were found induced in LGG. This observation confirms the activation of the Hippo pathway and downstream signaling intermediates in GBM.

2.5.2. Human glioblastoma cell line models and GBM clinical samples recapitulate the high expression levels of *CYR61* and *CTGF* transcripts.

The expression of the Hippo signaling pathway members was assessed *in vitro* in four different human GBM cell line models namely U87, U118, U138, and U251, along with several of their downstream effectors using RT-qPCR. Total RNA was extracted from cell monolayers, cDNA generated, and the presence of a single amplicon validated for all of them. For the sake of clarity, only amplicons from U87 GBM cells are shown here (Fig.2.2A). Collectively, basal *CYR61* and *CTGF* transcript levels were found to be significantly increased whereas they remained low for all the other genes tested (Fig.2.2B). Lower expressions, however, do not preclude that they could still be higher than their normal healthy tissues. Cancer and normal tissue cDNA arrays, covering 43 clinical samples of the four stages of pathologist-verified brain cancer tissues as well as normal tissues, were screened to assess *TEAD1*, *YAPI*, *CYR61* and *CTGF* gene expression levels by qPCR. Tissue arrays further confirmed the differentially increased tendencies for *TEAD1*, *CTGF* and *CYR61* expression in tumor tissues (Fig.2.2C, red boxes) when compared to their healthy tissue (Fig.2.2C, grey boxes). *YAPI* was not found to vary between the healthy and tumor tissues.

2.5.3. Increased *CYR61* and *CTGF* transcriptional regulation in U87 glioblastoma cells upon *in vitro* VM. Four different human GBM cell line models were next tested for their capacity to form *in vitro* VM. U118, U138, U251, and U87 GBM cells were seeded either on plastic as 2D monolayers or on Cultrex, as described in the Methods section, to generate 3D structures. Defined 3D capillary-like structures were formed with U87 cells, whereas U251, U118 and U138 cells were either too proliferative or did not form structures within our experimental conditions (Fig.2.3A). When total RNA was extracted from U87 cell cultures and processed for gene analysis by RT-qPCR, *CTGF* and *CYR61* were found induced upon VM when compared to 2D monolayers (Fig.2.3B). VM kinetic was also performed using U87 cells, and 3D structures found to mature upon 10 to 24 hours (Fig.2.3C), with increasing VM parameters assessed using Wimasis which included total tube length, branching, and loops (Fig.2.3D).

2.5.4. SiRNA-mediated repression of *CYR61* and *CTGF* inhibits U87 glioblastoma cells VM.

To assess the impact of *CTGF* and *CYR61* on VM, transient gene silencing was performed to specifically repress both genes and this was validated by qPCR (Fig.2.4A). Cells were next seeded on top of Cultrex and 3D structures found to be significantly altered as compared to control cells (siScrambled, Fig.2.4B). VM parameters of tube length, branching points, and loops were accordingly reduced (Fig.2.4C).

2.5.5. Protein-protein interaction network predicts YAP-TEAD inter-relationship with downstream biomarkers involved the Hippo pathway and in epithelial-to-mesenchymal transition during U87 capillary-like structure formation.

A protein-protein interaction (PPI) network of YAP-TEAD was constructed using the STRING database (<https://string-db.org/>) and was used to predict and analyze potential YAP-TEAD interactors. Indirect target proteins were retrieved from STRING as described in the Methods section. The network predicted YAP/TEAD inter-relationship with biomarkers involved in epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) such as *FOXC2* and *Snail* (Fig.2.5A). Upon U87 capillary-like structure formation, total RNA was extracted from triplicate samples and 3D vs 2D culture conditions compared the gene expression modulation using RT-qPCR as described in the Methods section. *FOXC2* and *SNAIL* gene expression levels were found increased in 3D structures (Fig.2.5B).

2.5.6. Silencing of *SNAIL* or *FOXC2* alters the U87 capillary-like structure formation.

U87 glioblastoma cell monolayers were transiently transfected with either a scrambled sequence (Fig.2.6A, white bars), a siRNA directed against *SNAIL* (Fig.2.6A, grey bars), or against *FOXC2* (Fig.2.6A, black bars). Total RNA was next extracted, and gene silencing efficiency validated using RT-qPCR. Transient gene silencing of *SNAIL* or *FOXC2* effectively reduced *CTGF* and *CYR61* gene expression. When the

respective transfected cells were seeded on top of Cultrex 3D, capillary-like structures generated upon 24 hours were found reduced when *SNAIL* and *FOXC2* were silenced. This suggests that *CTGF* and *CYR61* exert a regulatory function in VM.

2.5.7. Hippo pathway pharmacological targeting alters U87 capillary-like structure formation and nuclear expression of SNAIL.

Recent pharmacological inhibitors of the Hippo signaling pathway were tested for their capacity to target VM. These included HC258, LM41, and LM98 molecules (Fig.2.7A) [7-9]. VM was found to be inhibited only by LM98 (Fig.2.7B) as it reduced tube length, branching points, and loops (Fig.2.7C, black bars). Interestingly, LM98 was able to reduce *CTGF*, *CYR61*, *FOXC2*, and *SNAIL* transcript levels from 3D cultures (Fig.2.7D), as well as chemotaxis assessed by real-time xCELLigence (Fig.2.7E). When nuclear fractionation was assessed upon VM in basal conditions, Snail was significantly found to translocate within the nuclear fraction (Fig.2.7F, upper panel). LM98 treatment significantly reduced such Snail translocation. Fibrillarin expression in the nucleus and GAPDH expression in the cytosolic fraction validate the fractionation procedure.

2.6. Discussion

Therapeutic targeting strategies of the YAP/TEAD transcriptional complex have recently emerged as it is responsible for the expression of genes that regulate cancer cell growth, and proliferation [27]. For instance, the recent design, synthesis, and biological evaluation of LM98, a flufenamic acid (FA) analogue with strong affinity to TEAD and a capacity to inhibit its autopalmitoylation, was able to reduce the YAP/TEAD transcriptional activity [9]. Interestingly, LM98's capacity to reduce the *CTGF* and *CYR61* transcripts levels was also correlated to the inhibition of MDA-MB-231 breast cancer cell migration and proliferation through the arrest of the cell cycle [9]. Taken together, developing strategies to block the formation of the YAP/TEAD transcription complex therefore appeared as a plausible initial pharmacological approach to abolish the oncogenic function of YAP [28]. In addition, silencing of most YAP-inducible genes and attenuation of YAP-induced overgrowth in TEAD knockdown further confirmed the validity of the Hippo pathway as a target for drug discovery [29]. While we report herein that transcripts levels of *CTGF* and *CYR61* downstream effectors of the Hippo pathway were increased in clinically annotated human GBM samples, and significantly induced upon *in vitro* VM in the U87 grade IV GBM-derived brain cancer cell model, the impact of new small molecules targeting the Hippo pathway remains to be assessed.

Several TEAD inhibitors, among which LM98, a reversible TEAD inhibitor that originates from the fusion of FA and palmitic acid (PA), were previously reported by us to alter breast cancer cells migration [7-9]. Here, only LM98 appeared to specifically inhibit *in vitro* VM in U87 GBM cells. In fact, HC258, a covalent acrylamide TEAD inhibitor that also reduced gene expression and cell migration [8], as well as LM41, a FA-derived TEAD inhibitor obtained through the replacement of its trifluoromethyl group by aryl rings [7], were tested alongside LM98, but found ineffective to inhibit *in vitro* VM in our experimental settings. HC258 is derived from FA and possesses an oxopentyl chain that mimics a molecule of PA as well as an acrylamide that reacts covalently with TEAD's cysteine. While such derivative appeared to alter YAP/TEAD mediated transcriptional activity, the differential structure-to-function impact of those molecules on *in vitro* VM suggests that specific and more complex interplay links the Hippo pathway to ECM recognition processes that regulate VM, and this warrants further molecular investigation.

The proto-oncogenic nature of YAP comes from its interaction with TEAD leading to the activation of genes that confer chemoresistance and metastasis-associated traits to transformed cells [30]. In GBM, the overexpression of the YAP/TAZ-TEAD complex induces cell resistance to Temozolomide treatment by up-regulation of the Hippo pathway downstream target genes [12]. Interestingly, *CTGF* and *CYR61* genes were found upregulated through TGF- β 1-dependent activation of Smad/ERK signaling [31], an event that

triggers the expression and nuclear translocation of Snail upon EMT in GBM by TGF- β 1 [32, 33], and which is induced upon *in vitro* VM herein. Accordingly, we demonstrated that LM98 inhibited both *SNAIL* transcript levels and Snail translocation to the nucleus, and that specific transient siRNA-mediated repression of *SNAIL* abolished *in vitro* VM. TGF β signaling pathway regulates two distinct aspects of VM formation involving the maintenance of the undifferentiated embryonic state of stem cells via EMT, and the induction of tubular formation through modulation of the tumor microenvironment [15]. High expression of Snail appeared to link VM to TGF- β 1 treatment in ovarian cancer cells, and this was efficiently repressed by diet-derived gallated catechins [34]. In fact, targeting VM by phytochemicals is envisioned as a potential opportunity for cancer therapy [35]. This further lay foundation for the potential repurposing of molecules such as verteporfin, an anti-tumor drug in the treatment of pancreatic cancer by targeting the Hippo pathway which was recently found to also inhibit *in vitro* VM [36].

2.7. Conclusion

Recent advancements in medicinal chemistry such as the development of LM98, a potent TEAD inhibitor, has demonstrated promising results in inhibiting YAP/TEAD transcriptional activity, altering *in vitro* VM, and reducing cancer cell migration. Our study highlights the potential of Hippo pathway targeting in cancer therapy and pave the way for future investigation into its underlying mechanisms. Several drugs have been developed for the treatment of GBM and have been granted the designation of orphan drug by the FDA or EMA. However, many of these drugs have not been approved for marketing or have shown limited efficacy during clinical trials primarily due to their inability to target the chemoresistance phenotype of these rare brain cancers. Therefore, there is a high unmet need for new therapeutic strategies for GBM patients. Our current study therefore aimed to explore the preclinical pharmacological impact of new small-molecule YAP/TEAD inhibitors against VM processes. As VM can be induced by numerous factors in GBM, such as hypoxia, inflammation, growth factors, and extracellular matrix components, it can also vary depending on the tumor microenvironment and stage. Hence, diagnosing VM and treating VM-related processes in GBM is a considerable challenge. Our current innovative medicinal chemistry strategy may therefore offer new opportunities for improving the prognosis and quality of life of GBM patients.

FIGURES

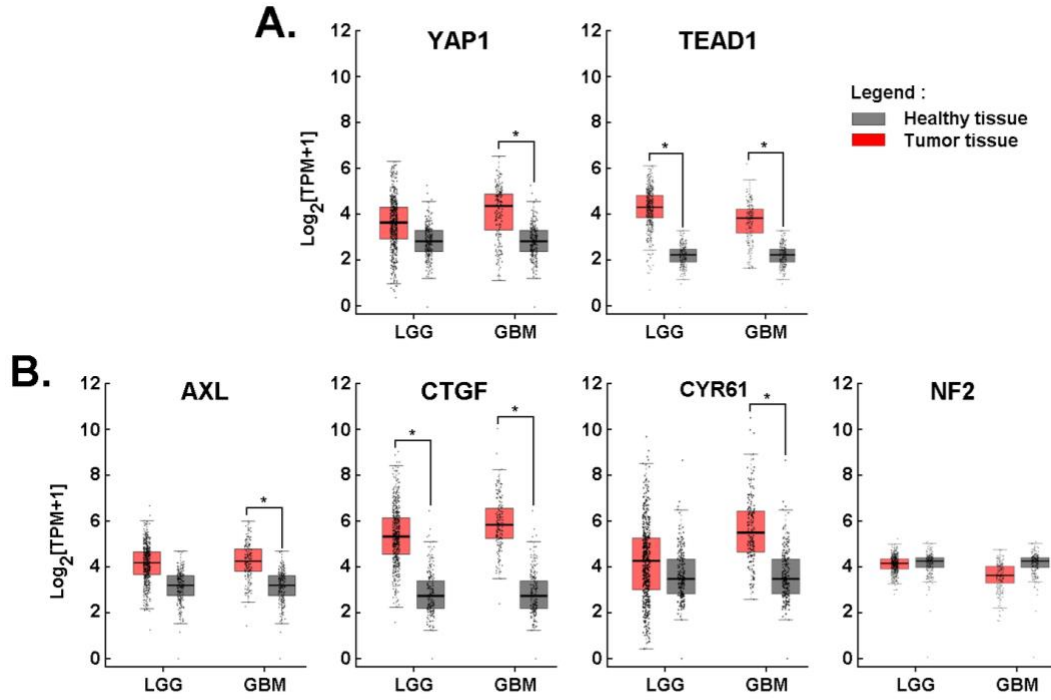


Figure 2.1. Increased gene expression of YAP1, TEAD1 and downstream effectors AXL, CTGF and CYR61 in clinically annotated glioblastoma tumor tissues. *In silico* analysis of transcript levels was performed using RNA extracted from clinical samples from glioblastoma (GBM) and low-grade glioma (LGG) (red boxes) and compared to healthy tissue (grey boxes), (*p < 0.05).

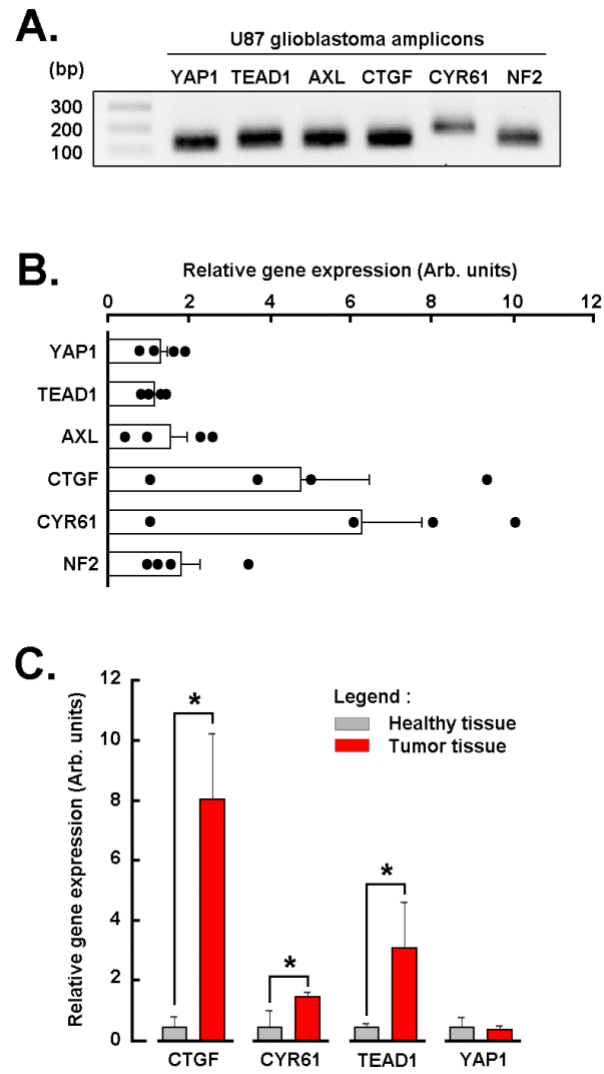


Figure 2.2. Expression profiles of YAP1, TEAD1, AXL, CTGF, CYR61, and NF2 in four human glioblastoma cell lines, and in cDNA tissue arrays. Total RNA was extracted from four different human glioblastoma cell lines (U87, U118, U251, and U138). The gene expression level for *YAP1*, *TEAD1*, *AXL*, *CTGF*, *CYR61* and *NF2* was analyzed and compared by RT-qPCR. **A)** Primers validation and single amplicon products were confirmed using agarose gel electrophoresis for the U-87 cell line. **B)** The gene expression levels of the six selected genes were analyzed and quantified by qPCR as described in the Methods section. Triplicates from a representative quantification, out of three independent experiments, is shown. **C)** Cancer tissues (red boxes) and normal tissues (grey boxes) cDNA arrays covering 43 clinical samples of the pooled four stages of pathologist-verified brain cancer tissues as well as normal tissues were screened to assess *TEAD1*, *YAP1*, *CYR61* and *CTGF* gene expression levels by qPCR.

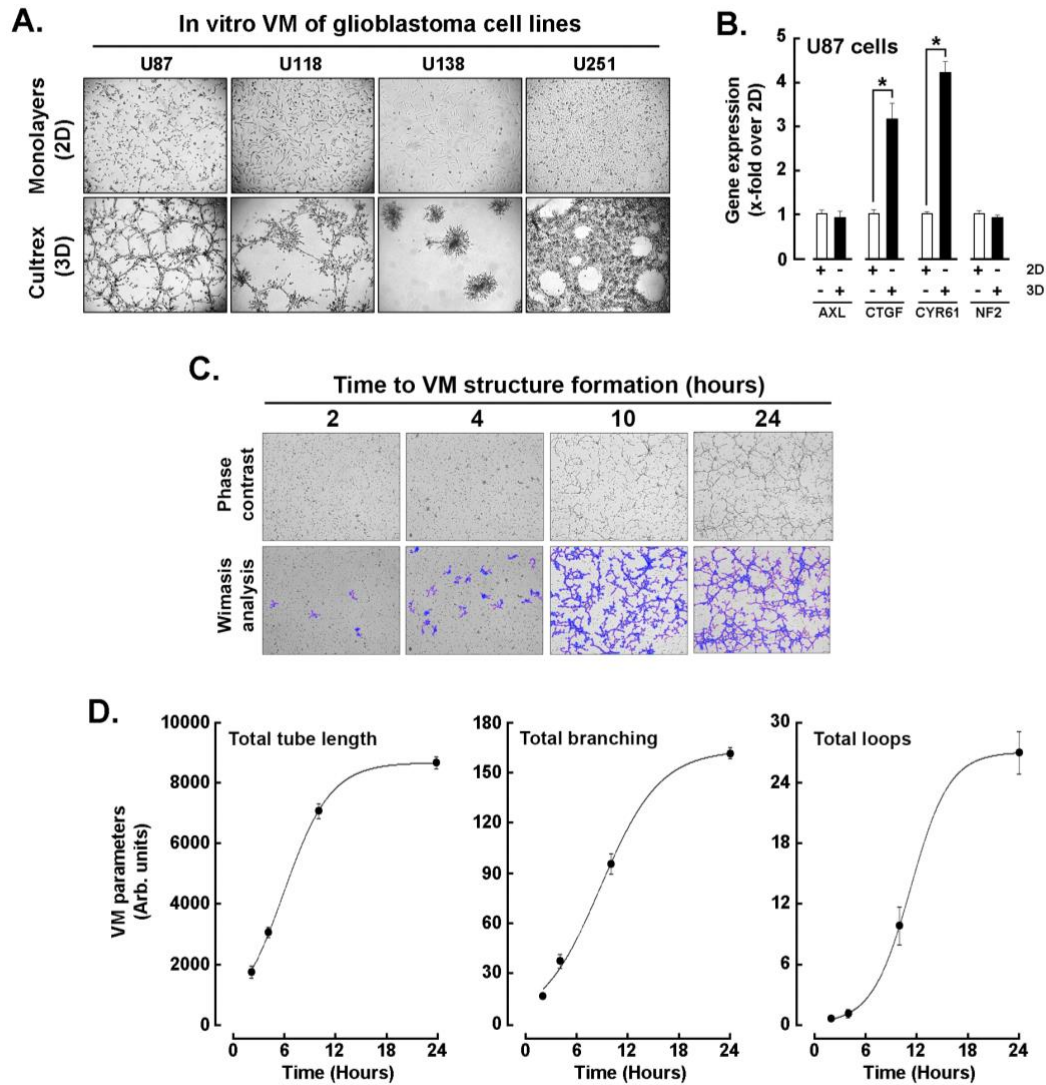


Figure 2.3. *In vitro* human glioblastoma cell lines, capillary-like structure formation on Cultrex. Cells were trypsinized and seeded on top of Cultrex to generate 3D capillary-like structures as described in the Methods section. **A)** Representative phase contrast pictures were taken to monitor structure formation at 24 hours in U87, U118, U138 and U251, 4x magnification. **B)** *CYR61* and *CTGF* levels are induced in *in vitro* VM of human U87 glioblastoma cell line. Total RNA was extracted either from cells cultured on Cultrex (black bars) or cells cultured as 2D adherent monolayers (white bars). RT-qPCR analysis was next used to study the expression of the Hippo pathway downstream effectors. **C)** Representative phase contrast pictures were taken (upper panels), and Wimasis analysis of the structures represented in blue (lower panels). **D)** VM parameters were extracted from the Wimasis analysis of C) and representative quantification provided for total tube length, total branching, or total loops.

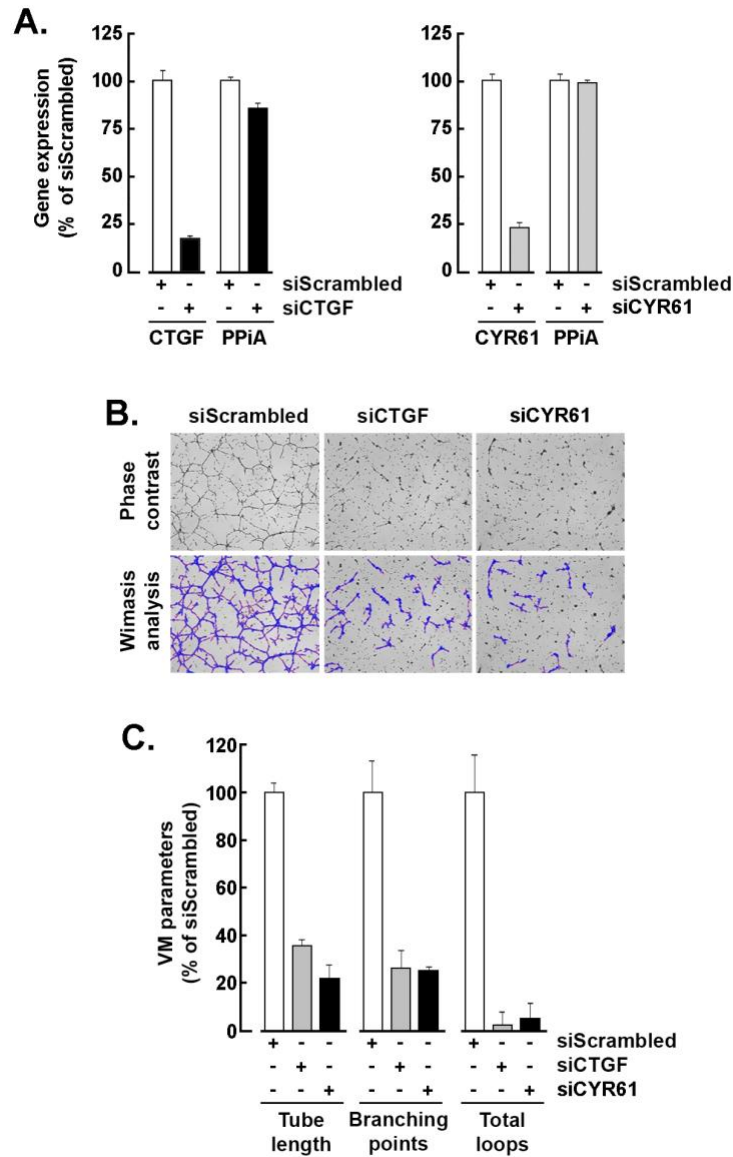


Figure 2.4. Silencing of CTGF or CYR61 alters the U87 capillary-like structure formation. **A)** U87 glioblastoma cell monolayers were transiently transfected with a scrambled sequence (siScrambled) or a siRNA directed against *CTGF* (siCTGF) or *CYR61* (siCYR61). Total RNA was then extracted, and gene silencing efficiency validated using RT-qPCR. Gene levels were normalized on GAPDH expression. **B)** Transfected U87 cells were seeded on top of Cultrex, and 3D capillary-like structures generated for 24 hours. Representative phase contrast pictures were taken (upper panels) and Wimasis analysis (lower panels) performed. **C)** VM parameters were extracted from the Wimasis analysis of B) and representative quantification provided for total tube length, total branching points or total loops.

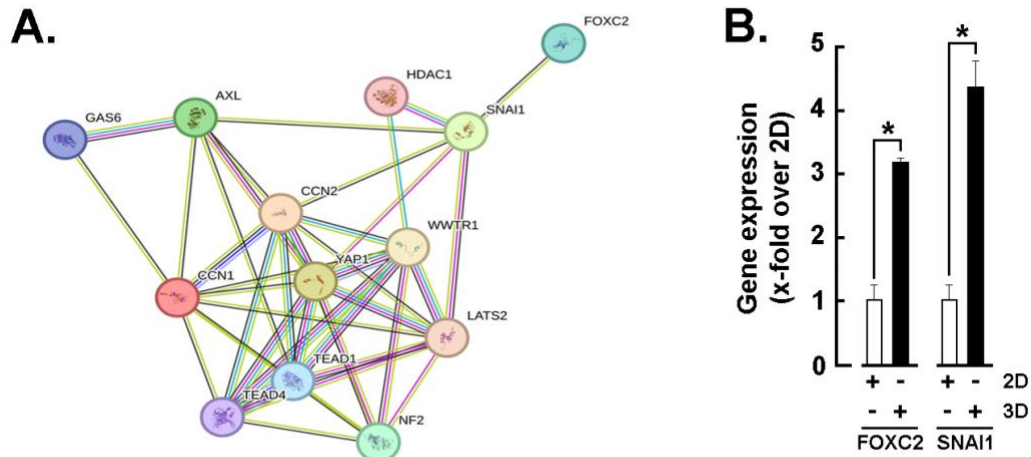


Figure 2.5. Transcriptomic analysis reveals that SNAI1 and FOXC2 expression levels are induced in U87 capillary-like structure formation. **A)** Indirect target proteins of YAP1 were retrieved from STRING as described in the Methods section. **B)** Human U87 glioblastoma cells were seeded as either 2D monolayers (2D, white bars) or as 3D capillary-like structures on top of Cultrex (3D, black bars) for 24 hours. Total RNA was extracted from triplicate samples for each condition, and gene expression modulation for two of the predicted targets (FOXC2 and Snail) was assessed by RT-qPCR as described in the Methods section.

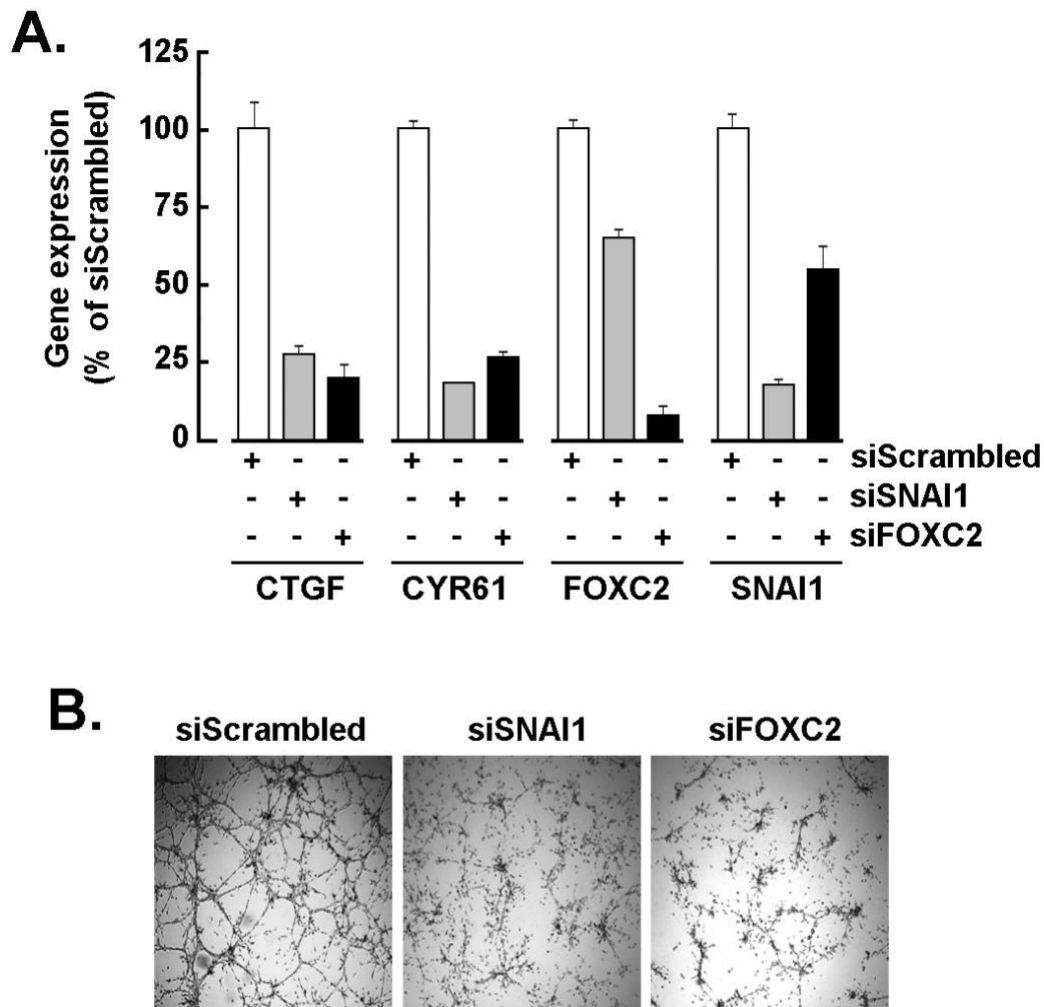


Figure 2.6. Silencing of SNAI1 or FOXC2 alters the U87 capillary-like structure formation. **A)** U87 glioblastoma cell monolayers were transiently transfected with a scrambled sequence (siScrambled, white bars) or siRNA directed against *SNAI1* (siSNAI1, grey bars) or *FOXC2* (siFOXC2, black bars). Total RNA was then extracted, and gene silencing efficiency validated using RT-qPCR. **B)** Transfected U87 cells were seeded on top of Cultrex and 3D capillary-like structures generated for 24 hours. Representative phase contrast pictures were taken.

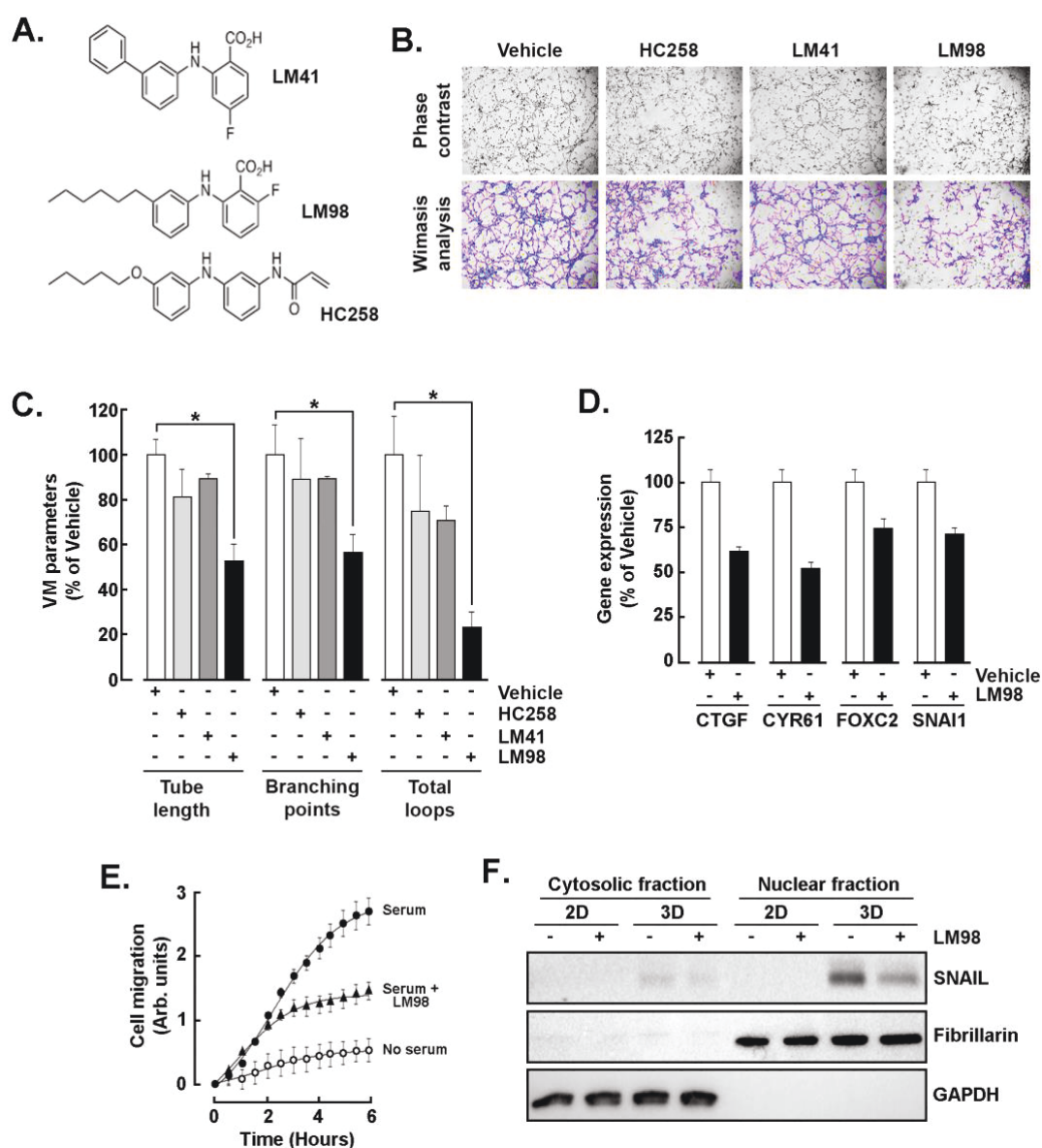


Figure 2.7. Hippo pathway pharmacological targeting alters U87 capillary-like structure formation and nuclear expression of SNAIL. **A)** Chemical structure of the tested TEAD inhibitors. **B)** Human U87 glioblastoma cells were seeded on top of Cultrex and 3D capillary-like structures generated for 24 hours in the absence (Vehicle) or presence of 10 μ M Hippo inhibitors HC258, LM41 and LM98, respectively. Representative phase contrast pictures were taken (upper panels) and Wimsis analysis (lower panels) performed. **C)** VM parameters were extracted from the Wimsis analysis of **B)** and representative quantification provided for total tube length, branching points or total loops. **D)** Effect of compound LM98 on *CTGF*, *CYR61*, *FOXC2*, *SNAIL* gene expression was assessed by RT-qPCR as described in the Methods

section. LM98-treated (black bars) or non-treated (white bars) U87 glioblastoma cells were seeded as 3D capillary-like structures on top of Cultrex for 24 hours. Total RNA was extracted from triplicate samples for each condition. **E)** Real-time cell migration assessed using the xCELLigence as described in the Methods section. **F)** Nuclear fractionation protocol was performed from 2D or 3D U87 treated or not with LM98. Total proteins were extracted and representative blots for SNAIL, Fibrillarin and GAPDH are presented. Western blotting of nuclear Fibrillarin enrichment and undetectable contamination from cytosolic GAPDH.

CHAPITRE 3

ARTICLE 2

***In vitro* biomaterial priming of human mesenchymal stromal/stem cells: Implication of the Src/JAK/STAT3 pathway in vasculogenic mimicry**

Article publié dans la revue scientifique *Scientific Reports*

Roy ME, Veilleux C, Annabi B. In vitro biomaterial priming of human mesenchymal stromal/stem cells : implication of the Src/JAK/STAT3 pathway in vasculogenic mimicry. Sci Rep. 2024 Sep 13;14(1):21444. doi: 10.1038/s41598-024-72862-6. PMID: 39271790; PMCID: PMC11399305.

Contributions des co-auteurs:

Roy : Conceptualisation, curation des données, analyses formelles, expérimentations, méthodologie, rédaction du manuscrit, révision et édition.

Veilleux : Curation des données, expérimentations, révision et édition du manuscrit.

Annabi : Conceptualisation, analyses formelles, supervision, financement, rédaction du manuscrit, révision et édition.

Tous les auteurs ont lu et approuvé la version finale du manuscrit.

***In vitro* biomaterial priming of human mesenchymal stromal/stem cells: Implication of the Src/JAK/STAT3 pathway in vasculogenic mimicry**

Marie-Eve Roy¹, Carolane Veilleux¹, and Borhane Annabi^{1*}

¹Laboratoire d'Oncologie Moléculaire, Département de Chimie and CERMO-FC, Université du Québec à Montréal, Montreal, QC, Canada, H3C 3J7

Running title: Mesenchymal stromal cells vasculogenic mimicry

** To whom correspondence and reprint requests should be directed*

Laboratoire d'Oncologie Moléculaire

Université du Québec à Montréal

C.P. 8888, Succ. Centre-ville

Montréal, Québec

CANADA

H3C 3P8

Phone: (514) 987-3000 ext. 7610

E-mail: annabi.borhane@uqam.ca

3.1. Résumé

Les cellules stromales/souches mésenchymateuses (MSC) jouent un rôle central dans la promotion de la néovascularisation, un processus essentiel à la cicatrisation des tissus. Elles sont couramment utilisées comme source autologue de cellules progénitrices dans diverses approches thérapeutiques fondées sur les cellules souches. Toutefois, leur différenciation incomplète vers un phénotype endothélial remet en question leur implication dans un mécanisme alternatif à l'angiogenèse, à savoir le mimétisme vasculogénique (VM), ainsi que les événements de signalisation responsables de leur « priming » *in vitro* vers des structures de type capillaire. Des MSC humaines ont été cultivées sur une matrice Cultrex afin de reproduire un phénotype de VM *in vitro*. L'ARN total a été extrait et l'expression différentielle des gènes a été évaluée par RNA-seq et RT-qPCR. Des répressions géniques transitoires ont été réalisés à l'aide de siARN spécifiques. Les effets pharmacologiques des inhibiteurs AG490 et Tofacitinib (JAK/STAT3) ainsi que de PP2 (Src) sur les structures de VM ont été analysés à l'aide du logiciel Wimsis. La formation de structures de VM *in vitro* s'est produite en moins de 4 heures et a été inhibée par les inhibiteurs de la voie JAK/STAT3 (AG490 et Tofacitinib) ainsi que par l'inhibiteur de Src, PP2. L'analyse transcriptomique par RNA-seq a identifié STAT3 comme un nœud central de signalisation contribuant au VM, lorsque les transcrits issus des structures capillaires ont été comparés à ceux de cultures en monocouche. L'augmentation concomitante des niveaux de transcrits IL6, IL1B, CSF1, CSF2, STAT3, FOXC2, RPSA, FN1 et SNAI1 suggère l'acquisition d'un phénotype combinant des caractéristiques angiogéniques, inflammatoires et de transition épithélio-mésenchymateuse dans les cultures de VM. L'augmentation de l'expression protéique de STAT3, FOXC2, RPSA, fibronectine et Snail a été confirmée au cours du VM. La répression génique de STAT3 et de RPSA a aboli la formation du VM *in vitro*. Le priming *in vitro* des MSC vers des structures de mimétisme vasculogénique requiert l'activation de la voie de signalisation Src/JAK/STAT3. Ces données moléculaires suggèrent qu'un processus de pseudo-vascularisation médié par les MSC, cliniquement exploitable, pourrait soutenir temporairement des greffons par le VM, permettant ainsi à la vascularisation de l'hôte d'infiltrer et de remodeler progressivement les tissus lésés.

Mots-clés : Cellules stromales/souches mésenchymateuses, Mimétisme vasculogénique, STAT3, RPSA, Inflammation, Angiogenèse, Régénération tissulaire

3.2. Abstract

Mesenchymal stromal/stem cells (MSC) play a crucial role in promoting neovascularization, which is essential for wound healing. They are commonly utilized as an autologous source of progenitor cells in various stem cell-based therapies. However, incomplete MSC differentiation towards a vascular endothelial cell phenotype questions their involvement in an alternative process to angiogenesis, namely vasculogenic mimicry (VM), and the signal transducing events that regulate their *in vitro* priming into capillary-like structures. Here, human MSC were primed on top of Cultrex matrix to recapitulate an *in vitro* phenotype of VM. Total RNA was extracted, and differential gene expression assessed through RNA-Seq analysis and RT-qPCR. Transient gene silencing was achieved using specific siRNA. AG490, Tofacitinib, and PP2 pharmacological effects on VM structures were analyzed using the Wimsys software. *In vitro* VM occurred within 4 hours and was prevented by the JAK/STAT3 inhibitors AG490 and Tofacitinib, as well as by the Src inhibitor PP2. RNA-Seq highlighted STAT3 as a signaling hub contributing to VM when transcripts from capillary-like structures were compared to those from cell monolayers. Concomitant increases in *IL6*, *IL1b*, *CSF1*, *CSF2*, *STAT3*, *FOXC2*, *RPSA*, *FNI*, and *SNAIL* transcript levels suggest the acquisition of a combined angiogenic, inflammatory and epithelial-to-mesenchymal transition phenotype in VM cultures. Increases in STAT3, FOXC2, RPSA, Fibronectin, and Snail protein expression were confirmed during VM. *STAT3* and *RPSA* gene silencing abrogated *in vitro* VM. In conclusion, *In vitro* priming of MSC into VM structures requires Src/JAK/STAT3 signaling. This molecular evidence indicates that a clinically viable MSC-mediated pseudo-vasculature process could temporarily support grafts through VM, allowing time for the host vasculature to infiltrate and remodel the injured tissues.

Key words: Mesenchymal stromal/stem cells, Vasculogenic mimicry, STAT3, RPSA, Inflammation, Angiogenesis, Tissue regeneration

3.3. Introduction

Mesenchymal stromal/stem cells (MSC) are a subset of adult multipotent precursors, known for their therapeutic properties in regenerative medicine [1]. Such properties are mainly sustained through paracrine response to a variety of biologically active molecules including a wide range of soluble protein factors composed of growth factors, cytokines, and vesicular components that transfer proteins and genetic material to modulate the host microenvironment [2, 3]. After their mobilization and tissue engraftment, MSC-derived secretome then appears to mediate the different steps of the angiogenic process, inducing endothelial cell functions *in vitro* and promoting angiogenesis *in vivo* [4]. As a result, MSC have been widely explored as a promising cell-based therapy in diseases caused by insufficient angiogenesis [5, 6].

Recent emerging pathophysiological evidence, on the other hand, suggest that MSC may exert a significant role in the occurrence and development of solid tumors through tumor immunosuppressive processes [7]. Whether MSC differentiate into vascular endothelial cells or adopt any angiogenic or proinflammatory phenotypes within the hypoxic solid tumor microenvironment remains poorly understood. The lack of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) expression in MSC further questions the potential capacity of MSC to differentiate towards an endothelial cell phenotype [8]. Interestingly, clear differences between MSC and endothelial cells in their ability to form capillary-like networks and express endothelial markers have been reported [9]. In contrast to endothelial cells, which more strongly express vascular markers such as VE-cadherin and vWF, MSC are rather more capable of migrating through matrices and establishing networks, a feature more typical of stromal than endothelial populations [10] prompting for different mechanisms to occur in MSC-mediated neovascularization processes. Alternative to angiogenesis, vasculogenic mimicry (VM) processes within tumor xenografts has been reported through cancer cells' ability to, in part, attract MSC within primary solid tumors [11], where their pro-angiogenic secretome is believed to contribute to tumour neovascularization [12-14].

VM has been described in PECAM-1-negative, but VE-cadherin-positive cells, and to be highly dependent on matrix metalloproteinase (MMP)-2 production [15-17]. VM is a unique process originally reported to occur within dense tumors to overcome hypoxic stress by creating tumor-lined pseudo-vasculature, and was first evidenced by the demonstration that non-endothelialized microvessels were capable of transporting blood without clotting [18]. With regards to tissue engineering strategies, VM represents a neovascularization process where a single stromal-type population may be driven by matrix cues and hypoxic stress towards capillary-like structures [19, 20]. Although these non-endothelialized networks are

leakier and less efficient than normal vasculature, they however appear functional enough to facilitate blood transport [21].

With regards to therapeutic neovascularization, endothelial-like networks may provide a clinically feasible pseudo-vasculature for temporarily sustaining grafts until the host vasculature is able to infiltrate and remodel tissue. The fact that fibroblasts can match endothelial-like MSC behavior suggests that this mechanism of tubulogenesis may be shared amongst other cells of stromal lineage [22, 23]. However, stromal tubulogenesis in non-diseased adult biology lacks documentation. If VM-mediated capillary-like structure formation is, in fact, a latent but inducible stromal function, MSC priming has therefore the potential to open up new cell sources as therapeutically valuable for neovascularization strategies.

3.4. Results

3.4.1. In vitro mesenchymal stem/stromal cells capillary-like structure formation kinetic on Cultrex

Mesenchymal stromal/stem cells (MSC) *in vitro* VM capacity to form capillary-like structures in time was first assessed, as representative phase contrast pictures were taken every hour for up to 4 hours upon seeding on top of Cultrex (Fig.3.1A, upper panels). Pictures were digitized for Wimasis analysis (Fig.3.1A, lower panels), and mean loop area (Fig.3.1B, left) as well as mean loop perimeter (Fig.3.1B, right) respectively quantified from a representative experiment. Altogether, increases in mean loop area and perimeter, and maturation of the structures were found to occur with time confirming the capacity of MSC to generate *in vitro* VM. The paracrine regulation impact of the growth factors or extracellular matrix (ECM) proteins composing Cultrex was next assessed. Soluble factors were depleted from Cultrex, cells plated on top of either complete or growth factors-depleted Cultrex, and VM structures digitized (Fig.3.1C). We found that branching points, loops, and tubes parameters were all reduced when cells adhered to growth factors-depleted Cultrex suggesting that, in addition and beyond ECM protein interaction, VM structures further require to respond to growth factors cues (Fig.3.1D) and may require further in-depth investigation in line with the nature of the cell surface actors involved in the recognition of ECM proteins. The nature of the potential signaling events involved was next investigated.

3.4.2. Transcriptomic analysis reveals the JAK/STAT signaling pathway as a hub in MSC 3D capillary-like structures

RNA-Seq analysis was next used to decipher the molecular signature of human MSC cultured as capillary-like structures and compared to that of cell monolayers to identify signaling pathways which could trigger transcriptional regulation induced by VM. Total RNA was extracted from samples for each condition, and gene expression modulation was assessed through RNA-Seq. Network graph shows enriched pathways and their respective differentially expressed genes (DEGs) in cells cultured on Cultrex versus cells cultured as cell monolayers (Fig.3.2A). Upregulated and downregulated genes are color-coded in green and red, respectively. KEGG pathways enrichment analysis of DEGs with an absolute fold change (FC) > 2 and adjusted *p*-value < 0.001 in each experimental condition is shown (Fig.3.2B). Among the several pathways identified, the JAK/STAT signaling pathway was the most induced, followed respectively by the Wnt, TGF- β , and prolactin pathways.

3.4.3. Protein-protein interaction network predicts STAT3 interrelationship with downstream biomarkers involved in epithelial-to-mesenchymal transition during MSC capillary-like structure formation

A protein-protein interaction (PPI) network of STAT3 was constructed by using the STRING database (<https://string-db.org/>) and was used to predict and analyze potential STAT3 interactors. Indirect target proteins of STAT3 were retrieved from STRING and predicted STAT3 interrelationship with biomarkers involved in EMT and inflammation during MSC capillary-like structure formation. These included IL6, IL1B, CSF-1 to 3, FOXC2, FN1, and SNAIL (Fig.3.3A). To confirm those interrelationships, MSC were seeded as either monolayers (Plastic, white bars) or as capillary-like structures formed upon 4 hours on top of Cultrex (Cultrex, black bars). Total RNA was extracted from triplicate samples for each condition, and gene expression modulation was assessed by RT-qPCR as described in the Methods section. In addition to *STAT3*, increases in EMT markers encoding Fibronectin (*FN1*) and Snail (*SNAIL*) were observed along with predicted FOXC2, an important nuclear factor recently reported to promote VM in ovarian cancer [24] (Fig.3.3B). Immunoblotting was further performed using protein lysates isolated from 2D and 3D cultures, and confirmed the increases in Fibronectin, Snail, STAT3, and FOXC2 at the protein level (Fig.3.3C).

3.4.4. Pharmacological targeting and transient STAT3 gene silencing abrogate MSC capillary-like structure formation, and inhibit the acquisition of an EMT inflammatory molecular signature

STAT3-mediated transcriptional regulation upon VM was next further assessed in relation to EMT and pro-inflammatory molecular signatures. Pharmacological approaches were used to target STAT3, and the impact on MSC capillary-like structures assessed in the absence (Vehicle) or presence of JAK2/STAT3 inhibitor AG490, JAK1 and JAK3 inhibitor Tofacitinib, or Src inhibitor PP2. Representative phase contrast pictures show that VM structures were altered by these inhibitors (Fig.4A). Next, translocation of STAT3 within the nucleus was assessed in order to document any STAT3-mediated transcriptional activity. Nuclear fractionation was performed as described in the Methods section, and enrichment of the nuclear biomarker Fibrillarin observed with virtually no contamination from cytoplasmic GAPDH (Fig.3.4B). Interestingly, significant increases of nuclear FOXC2 and SNAIL were observed within 3D structures, along with increased STAT3 and its phosphorylated form (Fig.3.4C). These increases were abrogated upon AG490 treatment suggesting that STAT3 phosphorylation was a prerequisite for these events to occur.

In addition to the above pharmacological approach, transient gene silencing of STAT3 (siSTAT3) was performed as described in the Methods section and cell lysates assessed for STAT3 and GAPDH protein expression. Immunoblotting confirmed the efficient STAT3 protein knock-down (Fig.3.5A), and this resulted in altered capillary-like structures in comparison to control cells which were transfected with a

scrambled siRNA sequence (siScrambled; Fig.3.5B). Among the cellular processes required for VM structure formation, intrinsic cell migration was found reduced in conditions where STAT3 was repressed (Fig.3.5C, closed circles). This observation supports the signal transducing role of STAT3 in cell migration for VM to occur as reported in other cancer cell models [25-27]. Finally, transfected MSC were harvested from either cell monolayers (Plastic, white bars) or from capillary-like structures (Cultrex, black bars). Total RNA was extracted from triplicate samples for each condition, and gene expression modulation assessed by RT-qPCR as described in the Methods section. Interestingly, results demonstrate increased expression of a pro-inflammatory molecular signature as reflected by high *IL6*, *IL1b*, *FOXC2*, *CSF1*, and *CSF2* gene expression in siScrambled-transfected cells (Fig.3.5D, siScrambled, black bars). In contrast, upon STAT3 transient silencing, the above observed increases were significantly prevented in response to VM cultures cues (Fig.3.5D, siSTAT3, black bars).

3.4.5. A role for the 37-kDa laminin receptor precursor/67-kDa laminin receptor (RPSA) in MSC capillary-like structure formation

Considering the induced Snail expression upon VM and the signaling crosstalk recently reported to link Snail to RPSA [28], we further tested whether RPSA was regulated upon VM. MSC were cultured as capillary-like structures, total RNA and cell lysates isolated to find that RPSA was induced at both the protein (Fig.3.6A) and gene levels (Fig.3.6B). We next assessed the transcriptional control *STAT3* or *FOXC2* potentially exerted on *SNAIL* and *RPSA* gene expression. We found that only *STAT3* silencing prevented *SNAIL* and *RPSA* to be induced upon VM, whereas *FOXC2* silencing did not affect either genes expression (Fig.3.6B). Altogether, this suggests that a role for RPSA in VM may be transcriptionally regulated downstream from Snail. Interestingly, transient repressing of RPSA lead to decreased protein expression (Fig.3.6C) and to reduced capillary-like structures formation (Fig.3.6D, upper panels). This was further supported upon pharmacological inhibition of RPSA function with NSC47924 [29] (Fig.3.6D, lower panels).

3.5. Discussion

Given MSC are easily expandable *ex vivo*, enhancement strategies, including genetic manipulation, pre-activation, and modification of culture methods, have been investigated to generate highly functional MSC with improved therapeutic efficacy [30]. Here, we highlight a Src/JAK/STAT3 signaling hub as crucial for VM and for MSC priming upon capillary-like structure formation. Pre-activating MSC upon VM formation mimics their natural tissue engraftment microenvironment *in vivo* and provides enhanced cell-cell and cell-ECM interactions. This could significantly improve their future biological behaviour including proliferation, immune regulation, and committed differentiation [31].

As demonstrated here, STAT3 signalling appears crucial for MSC migration, capillary-like structure formation, and transcriptional regulation of EMT, inflammatory, and angiogenic biomarkers upon VM. Accordingly, MSC mobilization and priming within their perivascular/vascular location is thought to regulate vascular function, as well as new blood vessel formation [32-34]. While no single marker currently defines native MSC *in vivo*, their phenotype appears however mainly determined through the specific microenvironment location where they engraft and promote tissue regeneration/repair. MSC can regulate different processes including inflammation and angiogenesis, the production of ECM, and the regeneration of functional cells through cell differentiation. Not surprisingly, those MSC therapeutic properties have recently supported their need for cell priming in regenerative medicine [6, 35], in part through their angiogenic properties [36-38].

STAT3 repression further appeared to downregulate VM-induced 37/67 kDa laminin receptor (RPSA) expression highlighting a new signaling crosstalk linking capillary-like structure formation to RPSA, a molecule that acts as a key player in tumorigenesis, affecting cell growth, adhesion, migration, invasion and cell death processes. Noteworthy, roles of the cellular prion protein (PrP^C) and RPSA interaction in cancer biology have recently emerged [39]. In addition, hypoxia preconditioning was found to enhance MSC survival and their angiogenic properties, potentially through induced up-regulation of PrP^C which, in turn, enhanced MSC proliferation via PrP^C-dependent JAK2/STAT3 activation [40]. In line with such evidence, vascular progenitors derived from murine MSC were avidly recruited within hypoxic solid tumors xenografts [11], and hypoxia found to trigger adaptive metabolic mechanisms [41, 42] and to accelerate capillary-like structure formation [43]. Interestingly, homing of MSC towards the hypoxic solid tumor microenvironment *in vivo* was reported to correlate with IL6-mediated STAT3 activation of survival pathways which facilitated tumor progression [44]. In line with the induced STAT3 expression observed upon VM, prosurvival STAT3 activation was found to prevent MSC apoptosis and to improve infarct repair

[45]. Whether PrP^C is regulated in VM remains to be explored, although PrP^C has high binding affinity for RPSA [39, 46]. Elucidation of the role played by PrP^C/RPSA interaction in regulating VM may represent a very promising avenue to gain insight into tissue regeneration processes and potentially solid tumor development.

STAT3 is recognized as a critical transcription factor in angiogenesis through, in part, protein stabilisation of HIF-1 α [47]. Accordingly, STAT3 deficiency resulted in decreased MSC production of VEGF [48]. Such STAT3 involvement was also found to play a role in maintaining the self-renewal properties of cancer stem cells [49], where VEGF-mediated angiogenesis was further reported to link EMT-induced cancer stemness to tumor initiation [50]. Here, we demonstrate that expression of EMT biomarkers Snail, Fibronectin, and RPSA was induced at both the gene and protein levels in VM cultures. More importantly, STAT3 repression or pharmacological inhibition prevented their expression and correlated with decreased VM. In support, phosphorylation of STAT3 was found to promote VM by inducing EMT in colorectal cancer [25]. Finally, selective JAK/STAT3 signalling was reported in the regulation of CSF-2 and CSF-3 in Concanavalin-A-activated MSC [51, 52] confirming that transcriptional up-regulation of CSF-2 and CSF-3 in activated MSC may contribute to their immunomodulatory and proangiogenic phenotype.

The mechanistic parallels and signal transducing pathways between MSC capillary-like structure formation and cancer cells VM bring a novel perspective towards understanding their use in therapy and tissue regeneration. In cancer, VM is often associated with the classical EMT process where epithelial cells exhibit increased migration without complete loss of cell-cell adhesion and polarity [53]. Here, we better defined the molecular signature associated with 3D structure formation by MSC, and highlighted the importance that STAT3 signaling crosstalk provides in the regulation of the pro-inflammatory/angiogenic/EMT phenotype associated to VM (Fig.7). Interestingly, regulation of pathophysiological and tissue regenerative functions of MSC were recently found mediated via the Wnt signaling pathway [54]. STAT3 plays a role in tissue regeneration by MSC, and it has been suggested that STAT3 activation or inactivation can modulate MSC trophic effects [55]. In addition, our transcriptomic screen further supports the fact that both the response to, and production of TGF- β , an inducer of the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) process, by MSC may regulate their VM capacity as well as immunomodulatory and angiogenic molecular signature [56].

In conclusion, the present study reveals that ECM cues that trigger *in vitro* VM appear to involve a crucial role for Src/JAK/STAT3 signaling in priming MSC to generate capillary-like structures. With regards to therapeutic neovascularization, it is tempting to hypothesize that, upon mobilization and engraftment to the

injured tissues, circulating MSC primed into capillary-like networks will support a clinically feasible pseudo-vasculature to temporarily sustain grafts through VM, until the host vasculature is able to infiltrate and remodel the injured tissues. Furthermore, an inflammatory/angiogenic/EMT molecular signature associated to MSC VM also supports their role in promoting angiogenesis.

3.6. Methods

3.6.1. Reagents

Micro bicinchoninic acid (BCA) protein assay reagents were from Pierce (Micro BCA™ Protein Assay Kit; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The polyclonal antibodies against STAT3 (12640S), Snail (3879S), FOXC2 (12974S), and Fibronectin (30903S), as well as the monoclonal antibody against GAPDH (D4C6R) were all from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA). The antibodies against 37-kDa laminin receptor precursor/67-kDa laminin receptor (RPSA, Ab133645) and β -Actin were from Abcam (Cambridge, UK). HRP-conjugated donkey anti-rabbit and anti-mouse immunoglobulin (Ig) G secondary antibodies were from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA, USA). The JAK family tyrosine kinase inhibitor Tofacitinib (CP-690550) and NSC47924 were from Cedarlane (Burlington, ON), while AG490 was from Calbiochem (La Jolla, CA). All other reagents were from Sigma-Aldrich Corp (St-Louis, MO, USA).

3.6.2. Cell culture and capillary-like structure formation assay

Human bone marrow-derived mesenchymal stromal/stem cells (MSC) were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). Cell culture media was from Life Technologies Corp (Carlsbad, CA, USA). Cells were plated in high glucose AMEM supplemented with 10% FBS and 50 units/mL penicillin/streptomycin and cultured in a humidified incubator at 37°C with 5% CO₂. MSC were kept subconfluent and expanded in number over 10 passages by a 1:2 split on a weekly basis. VM was assessed *in vitro* using Cultrex (3432-010-01, R&D Systems) to monitor capillary-like structures formation [43]. In brief, each well of a 96-well plate was pre-coated with 50 μ l of Cultrex. MSC suspension in culture media (10⁴ cells/100 μ l) was then seeded on top of polymerized Cultrex. Tested compounds were added to the cell culture media and incubated at 37°C in a CO₂ incubator. Pictures were taken over time using a digital camera coupled to a phase-contrast inverted microscope. Mean loop area: For each loop, the area (number of pixels) enclosed by it is considered as its area. The mean loop area is the arithmetic mean of all loop areas. Mean loop perimeter: For each loop, the pixels that belong to its edge are considered its border or perimeter. The mean loop perimeter is the arithmetic mean of all loop perimeters. The number of loops

and area covered upon tube branching formed by the cells were quantified using either the Wimasis analysis software (<https://www.wimasis.com>; Cordoba, Spain) or the ImageJ software (<https://imagej.net>) [57].

3.6.3. Total RNA isolation, cDNA synthesis, and real-time quantitative PCR

Total RNA was extracted from cell monolayers using 1 mL of TriZol reagent for a maximum of 3×10^6 cells as recommended by the manufacturer (Life Technologies, Gaithersburg, MD). For cDNA synthesis, 2 μ g of total RNA was reverse-transcribed using a high-capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The cDNA was stored at -20°C prior to PCR. Gene expression was quantified by real-time quantitative PCR using iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA). DNA amplification was carried out using an Icyler iQ5 (Bio-Rad) and product detection was performed by measuring the binding of the fluorescent dye SYBR Green I to double-stranded DNA. The following primer sets were from QIAGEN: FOXC2 (Hs_FOXC2_1_SG, QT00220871), IL1b (Hs_IL1B_1_SG, QT00021385), IL6 (Hs_IL6_1_SG, QT00083720), STAT3 (Hs_STAT3_1_SG, QT00068754) SNAI1 (Hs_SNAI1_SG, QT00010010), Fibronectin (Hs_FN1_1_SG, QT00038024), CSF-1 (Hs_CSF1_1_SG, QT00035224), CSF-2 (Hs_CSF2_1_SG, QT00000896), RPSA (Hs_RPSA_1_SG, QT00044310), GAPDH (Hs_GAPDH_1_SG, QT00079247) and Peptidylprolyl Isomerase A (PPIA) (Hs_PPIA_4_SG, QT01866137). The relative quantities of target gene mRNA were normalized against internal housekeeping genes PPIA and GAPDH. The RNA was measured by following a ΔC_T method employing an amplification plot (fluorescence signal vs. cycle number). The difference (ΔC_T) between the mean values in the triplicate samples of the target gene and the housekeeping genes was calculated with the CFX manager Software version 2.1 (Bio-Rad) and the relative quantified value (RQV) was expressed as $2^{-\Delta\text{C}_\text{T}}$. Single amplicons and appropriate melting curves were indicative of specific qPCR conditions and efficacy (not shown).

3.6.4. Transfection method and RNA interference

For gene silencing experiments, MSC were transiently transfected with siRNA sequences using Lipofectamine-2000 transfection reagent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Gene silencing was performed using 20 nM siRNA against RPSA (Hs_RPSA_1 siRNA, SI03045371), STAT3 (Hs_STAT3_7 siRNA, SI02662338), or scrambled sequences (AllStar Negative Control siRNA, 1027281). The above small interfering RNA and mismatch siRNA were all synthesized by QIAGEN and annealed to form duplexes. Gene silencing efficacy was assessed by RT-qPCR as described above.

3.6.5. Total RNA library preparation

Total RNA library preparation was conducted as previously described by us [58]. In brief, 500 ng of total RNA was extracted from MSC cultures for library preparation. RNA quality was assessed with the Bioanalyzer RNA 6000 Nano assay on the 2100 Bioanalyzer system (Agilent technologies, Mississauga, ON), ensuring all samples had an RNA integrity number (RIN) above eight. The KAPA mRNA-Seq HyperPrep kit (KAPA, Cat no. KK8581) was used for library preparation. Ligation was performed with Illumina dual-index UMI, and 10 PCR cycles to amplify cDNA libraries. Libraries were quantified by QuBit and BioAnalyzer DNA1000. All libraries were diluted to 10 nM and normalized by qPCR using the KAPA library quantification kit (KAPA; Cat no. KK4973). Finally, libraries were pooled to equimolar concentrations, and three biological replicates were generated.

3.6.6. RNA sequencing

High RNA quality was confirmed as previously described [58]. The samples were then sequenced at the Genomics Core Facility of the Institute for Research in Immunology and Cancer (IRIC, Montreal, QC).

3.6.7. Reads alignment and differential expression analysis

Reads were aligned and sorted by coordinates to the human genome build 38 (GRCh38.p13) with version 37 of Gencode gene annotations, using the STAR aligner (STAR_2.7.1a) [59, 60]. Quantification of genes was performed during alignment by STAR. Differentially expressed genes among groups were identified using the R packages DESeq2 (v 1.30.1) [61]. After analysis, only genes with adjusted p -values (adjp) < 0.05 , and log2 fold change (FC) ≥ 1.0 were considered significant. Hierarchical clustering of differentially expressed genes was used to represent the results (R package ggplot2) and heatmaps generated [62]. For all statistical analyses, differences were considered statistically significant if the adjp value calculated by Student's t -test with Bonferroni correction were < 0.05 .

3.6.8. Gene set enrichment analysis

The gene set enrichment analysis (GSEA) was done as described previously [58] and performed with the GSEA software version 4.2.3 (<https://www.gsea-msigdb.org>) [63] with the complete set of normalized input values, using the Hallmark, canonical pathway gene sets (chemical and genetic perturbations, BioCarta, Reactome, and Kegg), and Gene Ontology (GO) gene sets (Biological process). Molecular Signatures Database (MSig-DB; <https://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/collections.jsp>), version 7.5.1 was applied to genes modulated in 3D differentiated MSC compared to 2D cells (values (adjp) < 0.05 , and

$\log_2 \text{FC} \geq 1.0$ were considered as significant) to generate a signature list of the top modulated genes from the following Curated gene sets and Gene Ontology. Software used for the analysis of data during this project included GraphPad Prism and R (version >3.4). For all statistical analyses, differences were considered statistically significant if the adjp value calculated by Student's t-test with Bonferroni correction were <0.05 .

3.6.9. Data preparation

The associative relationships of STAT3 were retrieved from STRING v11 database (<https://string-db.org>) [64], with a confidence score setting of 0.4, and the maximum number of interactions to show was no more than 10.

3.6.10. Nuclear extraction

Nuclear extraction was performed as described by us previously [65]. Briefly, cell monolayers were first lysed with a cytoplasmic buffer and then with a nuclear buffer according to the manufacturer's instructions (Invent Biotechnologies, SC-003). In the case of the cells cultured on Cultrex, they were first detached from the matrix using a non-enzymatic Cultrex organoid harvesting and dissociation solution (3700-100-01) from R&D Systems (Toronto, ON).

3.6.11. Western blot

Electrophoresis reagents origin, total cell lysis procedure, SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), electro transfer to low-fluorescence polyvinylidene difluoride membranes, and immunodetection were conducted as described in detail previously [66]. Immunoreactive material was visualized by enhanced chemiluminescence (ECL).

3.6.12. Real-time cell migration assay

Real-time cell migration assays were conducted as described in detail by us previously using the Real-Time Cell Analyser (RTCA) Dual-Plate (DP) instrument and the xCELLigence system (Roche Diagnostics, QC) [66]. MSC were transfected with 2 nM siRNAs (siScrambled and siSTAT3) as described above. After transfection, 25,000 cells per well were seeded in a CIM-plate 16 (Roche Diagnostics) and incubated at 37°C under a humidified atmosphere containing 5% CO₂ for 24 hours. Cell migration was monitored every 2 hours for 20 hours. The impedance value was measured by the RTCA DP Instrument and expressed as an arbitrary unit called the Cell Index. Each experiment was performed in quadruplicate wells.

3.5.13. Statistical data analysis

All statistical analyses were conducted using the GraphPad Prism 7 software (<https://www.graphpad.com>; San Diego, CA). Data and error bars are presented as the mean $\pm$ standard error of the mean (SEM) from three or more independent experiments, unless otherwise specified. Hypothesis testing was performed using the Mann-Whitney test (two group comparisons). Probability values of less than 0.05 (*) or 0.01 (**) were considered significant.

FIGURES

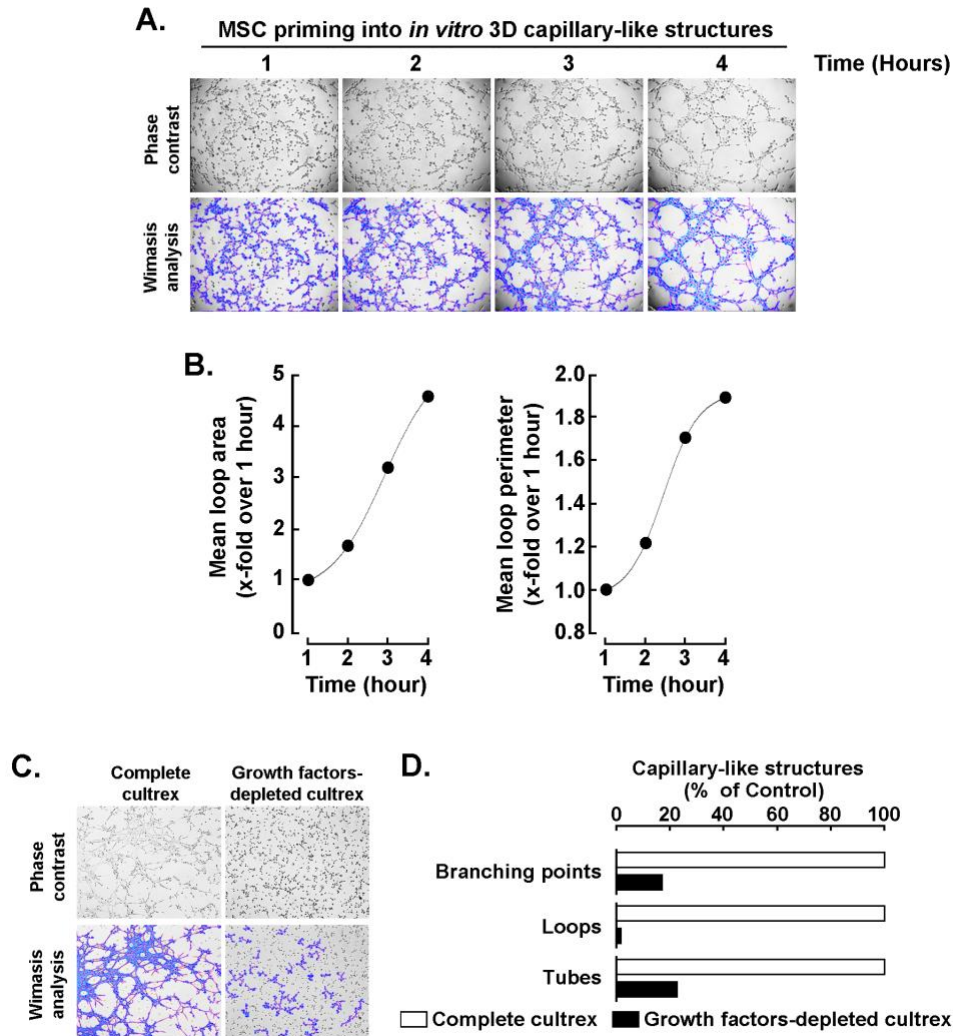


Figure 3.1. *In vitro* mesenchymal stem/stromal cells capillary-like structure formation on Cultrex. Mesenchymal stem/stromal cells (MSC) monolayers were trypsinized and seeded on top of Cultrex to generate capillary-like structures as described in the Methods section. **A)** Representative phase contrast pictures were taken (upper panels), and WIMASIS analysis of the structures represented in blue (lower panels). **B)** Capillary-like structures were quantified using WIMASIS and representative quantification provided for mean loop area (left panel) and mean loop perimeter (right panel) presented. **C)** MSC were seeded on top of complete Cultrex or on Cultrex that was depleted from soluble factors as described in the Methods section, and representative phase contrast pictures taken (upper panels) and WIMASIS analysis of the structures represented in blue (lower panels). **D)** VM parameters were extracted from the WIMASIS analysis of C), and data expressed as percent of the value obtained on complete Cultrex. All experiments were performed in triplicates from different MSC passages.

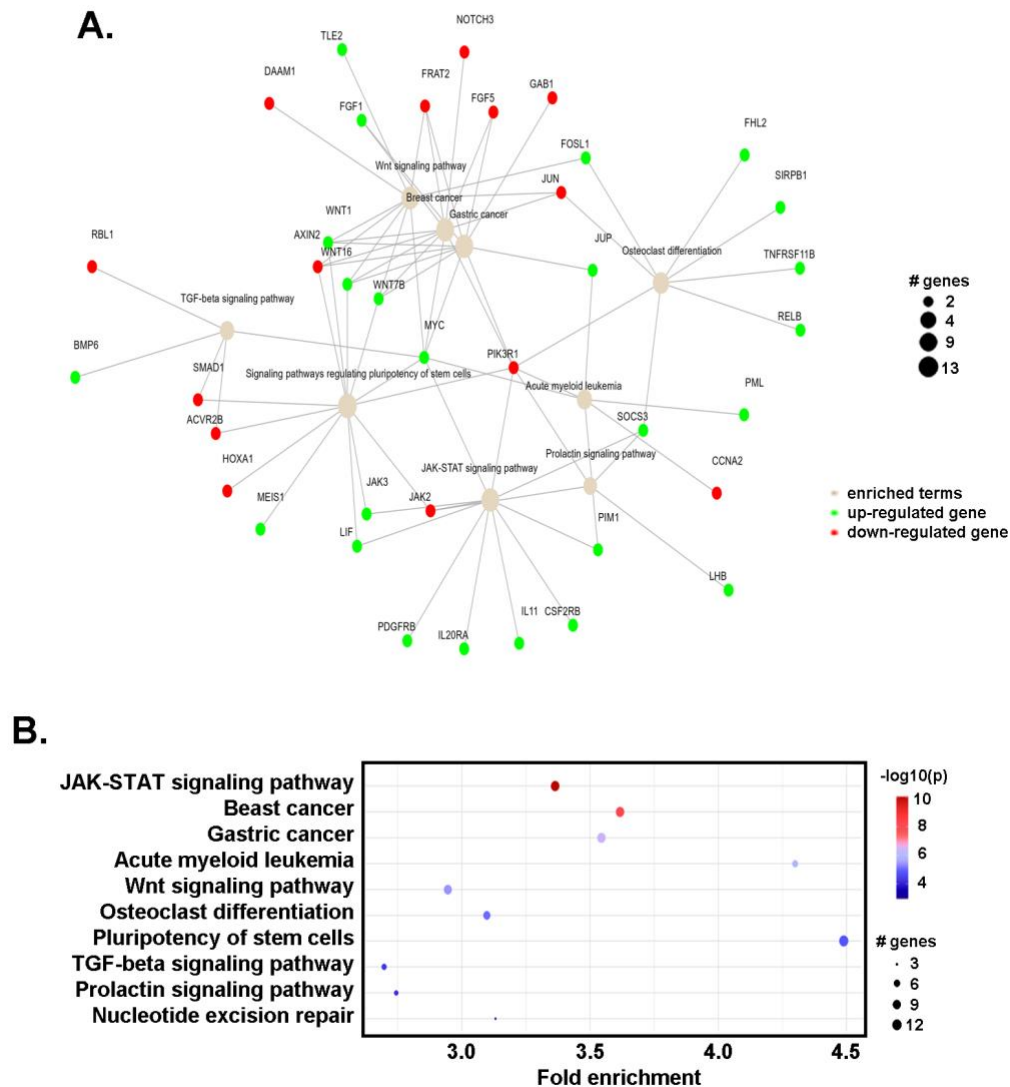


Figure 3.2. Transcriptomic analysis reveals JAK/STAT signaling pathway as a hub in MSC capillary-like structure formation. Human mesenchymal stem/stromal cells (MSC) were seeded as either cell monolayers or as capillary-like structures on top of Cultrex for 4 hours. Total RNA was extracted from triplicate samples for each condition, and gene expression modulation was assessed through RNA-Seq analysis as described in the Methods section. **A)** Network graph showing enriched pathways and their respective differentially expressed genes (DEGs) in cells cultured on Cultrex versus cells cultured as monolayers. Upregulated and downregulated genes are color-coded in green and red, respectively. **B)** KEGG pathways enrichment analysis of DEGs with an absolute fold change (FC) > 2 and adjusted *p*-value < 0.001 in each experimental condition [68-70]. Data was analyzed on triplicate samples from a representative experiment.

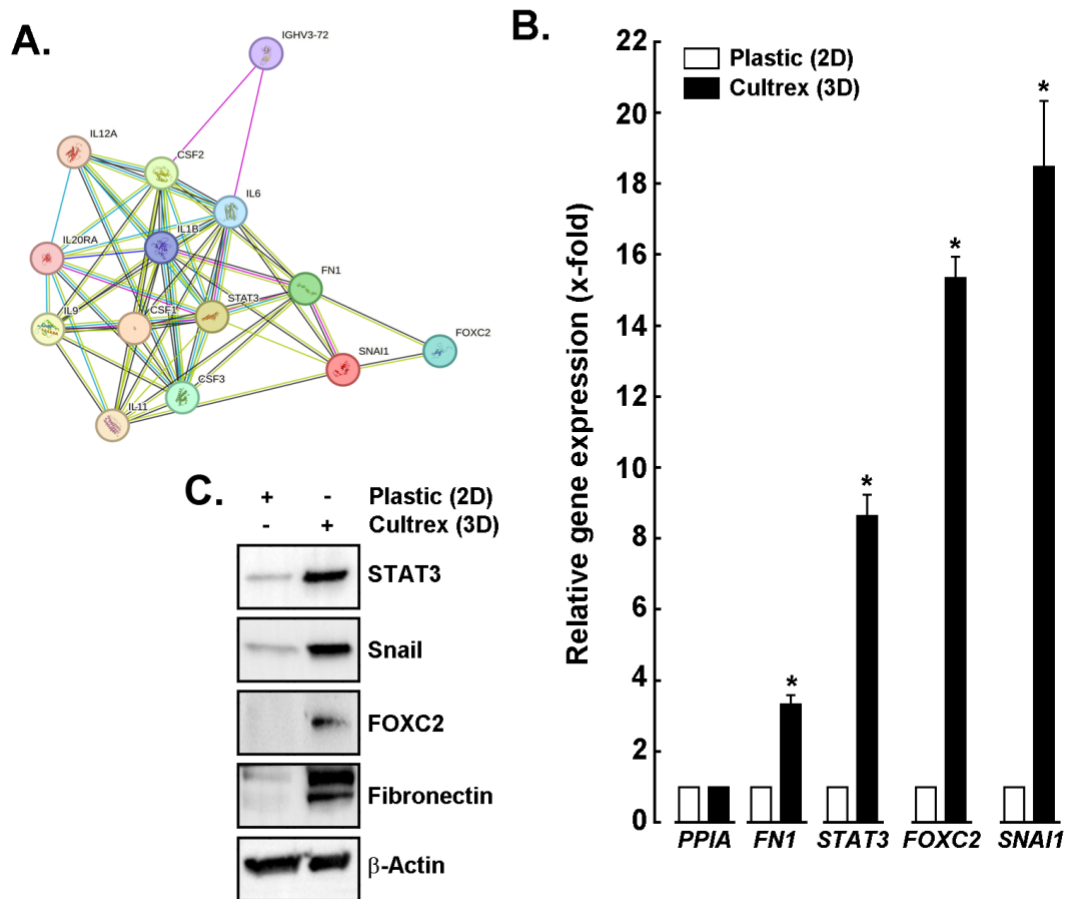


Figure 3.3. Transcriptomic analysis reveals JAK/STAT signaling pathway as a hub in MSC capillary-like structure formation. **A)** Indirect target proteins of STAT3 were retrieved from STRING as described in the Methods section. **B)** Human mesenchymal stem/stromal cells (MSC) were seeded as either monolayers (Plastic, white bars) or as capillary-like structures on top of Cultrex (Cultrex, black bars) for 4 hours. Total RNA was extracted from triplicate samples for each condition, and gene expression modulation was assessed by RT-qPCR as described in the Methods section. **C)** Lysates were isolated from monolayers and from VM cultures, and used to perform immunoblotting analysis of the indicated biomarkers at the protein level. Cropped blots are presented for the sake of clarity and conciseness of data presentation. Uncropped full-length blots are presented in the Supplementary data section, as Supplementary Figure S3C. Protein data are representative from two distinct experiments. RT-qPCR data originates from triplicate sample analysis.

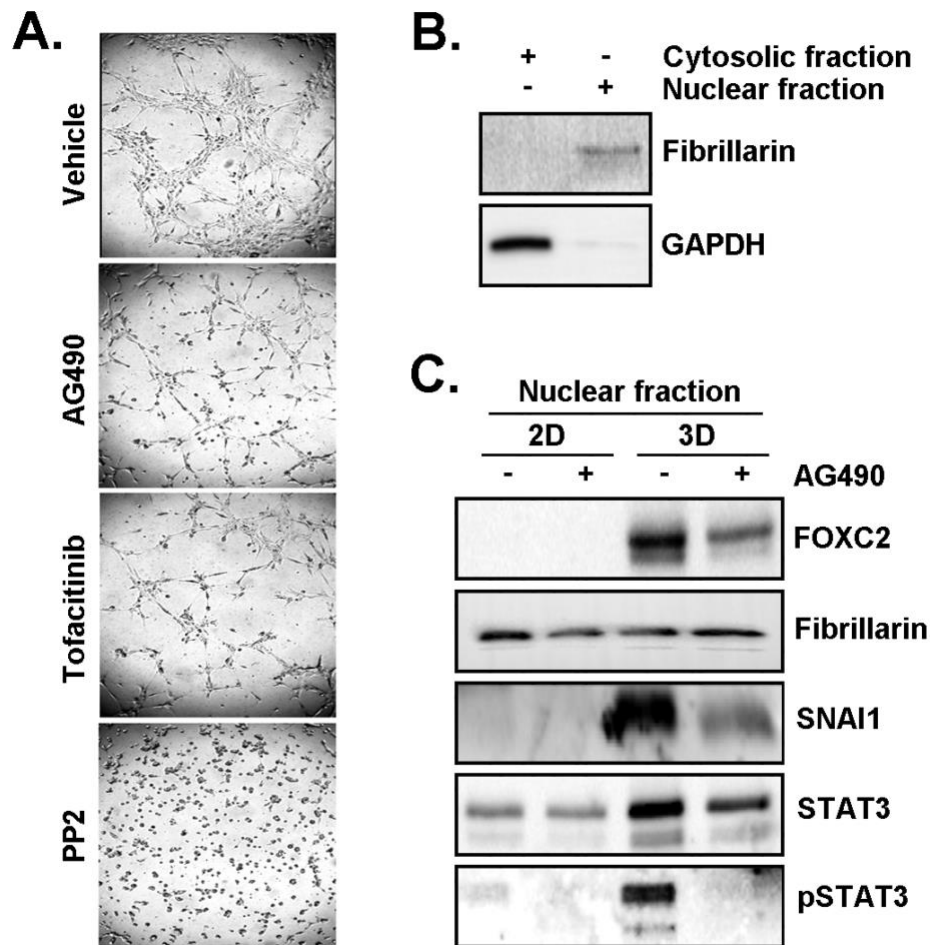


Figure 3.4. STAT3 pharmacological targeting alters MSC capillary-like structure formation and nuclear expression of FOXC2 and SNAIL. **A)** Human mesenchymal stem/stromal cells (MSC) were seeded on top of Cultrex and capillary-like structures generated for 4 hours in the absence (Vehicle) or presence of 10 μ M JAK/STAT3 inhibitors AG490 and Tofacitinib, or Src inhibitor PP2 respectively. Representative phase contrast pictures were taken. **B)** Nuclear fractionation protocol was performed to validate by Western blotting nuclear Fibrillarin enrichment and enriched cytosolic GAPDH. **C)** Nuclear fractionation was performed from MSC monolayers or from capillary-like structures treated or not with AG490. Total proteins were extracted and representative blots for FOXC2, Fibrillarin, SNAIL, STAT3, and phosphoSTAT3 are presented. Protein data are representative from three distinct experiments. Cropped blots are presented for the sake of clarity and conciseness of data presentation. Uncropped full-length blots are presented in the Supplementary data section, as Supplementary Figure S4B and S4C.

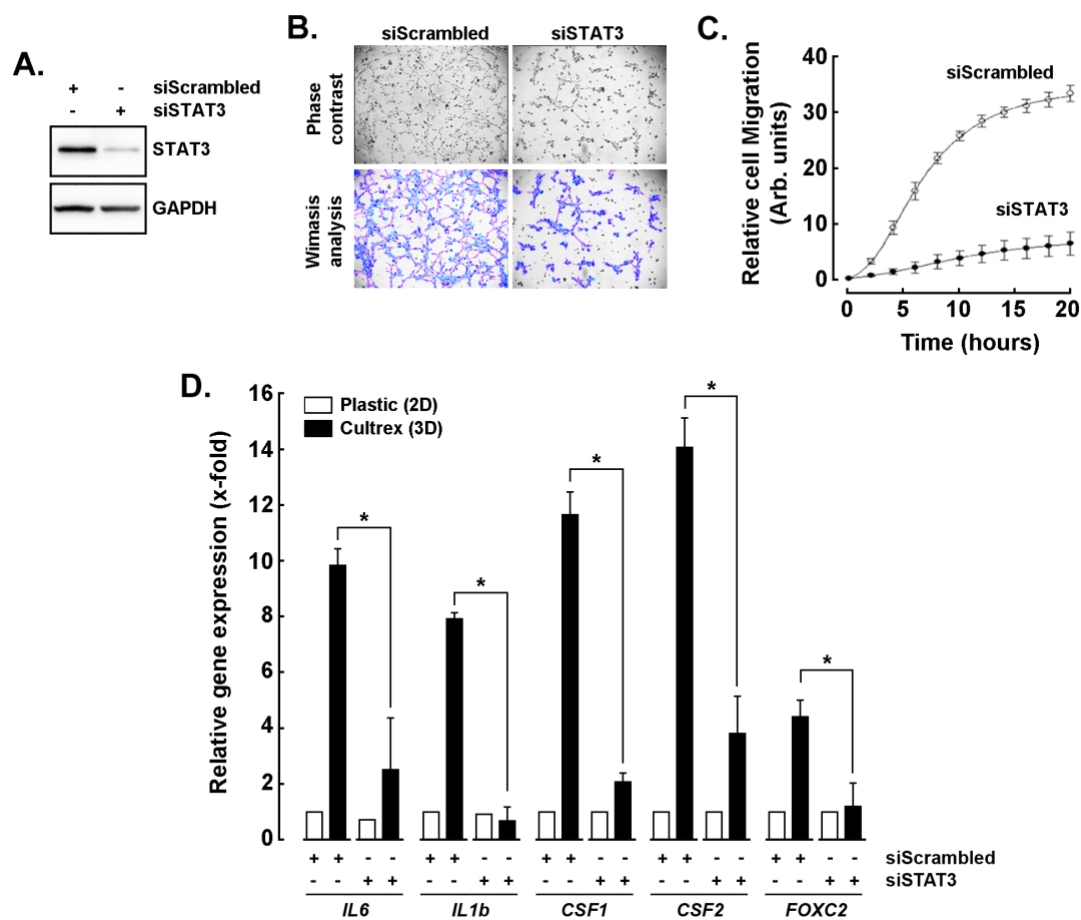


Figure 3.5. STAT3 gene silencing alters MSC capillary-like structure formation, cell chemotaxis, and acquisition of an inflammatory phenotype. **A)** Gene silencing of STAT3 (siSTAT3) was performed in human mesenchymal stem/stromal cells (MSC) as described in the Methods section. Control cells were transfected with a scrambled siRNA sequence (siScrambled). Cell lysates were assessed for GAPDH and STAT3 protein expression. Cropped blots are presented for the sake of clarity and conciseness of data presentation. Uncropped full-length blots are presented in the Supplementary data section, as Supplementary Figure S5A. **B)** Transfected MSC were seeded on top of Cultrex and 3D capillary-like structures generated for 4 hours. Representative phase contrast pictures were taken (upper panels) and WIMASIS analysis (lower panels) performed, or **C)** real-time cell migration assessed using the xCELLigence as described in the Methods section. **D)** Transfected MSC were seeded as either monolayers (Plastic, white bars) or as capillary-like structures on top of Cultrex (Cultrex, black bars) for 4 hours. Total RNA was extracted from triplicate samples for each condition, and gene expression modulation was assessed by RT-qPCR as described in the Methods section. Protein and VM data are representative from two distinct experiments. RT-qPCR data were analyzed from triplicate samples.

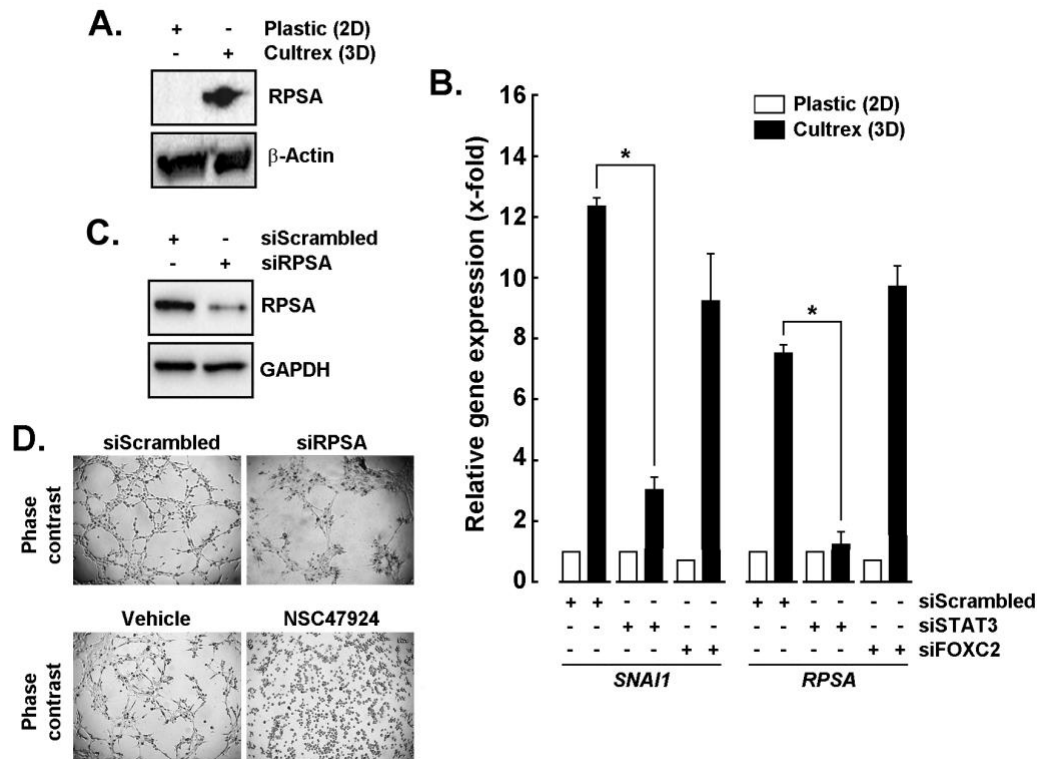


Figure 3.6. A role for the 37-kDa laminin receptor precursor/67-kDa laminin receptor (RPSA) in MSC 3D capillary-like structure formation. Human mesenchymal stem/stromal cells (MSC) were seeded as either monolayers or as capillary-like structures on top of Cultrex for 4 hours. Cell lysates and total RNA were extracted from each condition. **A)** Immunoblotting was performed to detect RPSA protein levels. **B)** RT-qPCR was performed to assess gene expression in cells cultured as capillary-like structures (Black bars) vs monolayers (Open bars) upon transient gene silencing of either STAT3 (siSTAT3) or FOXC2 (siFOXC2) as described in the Methods section. **C)** Cell lysates were assessed to confirm transient gene silencing of RPSA (siRPSA) at the protein level, and representative capillary-like structures phase-contrast pictures taken in **D)** transfected cells (upper panels), or cells treated with a pharmacological RPSA inhibitor (lower panels). Cropped blots are presented for the sake of clarity and conciseness of data presentation. Protein and VM data are representative from two distinct experiments. RT-qPCR data were analyzed from triplicate samples. Uncropped full-length blots are presented in the Supplementary data section, as Supplementary Figure S6A and S6C.

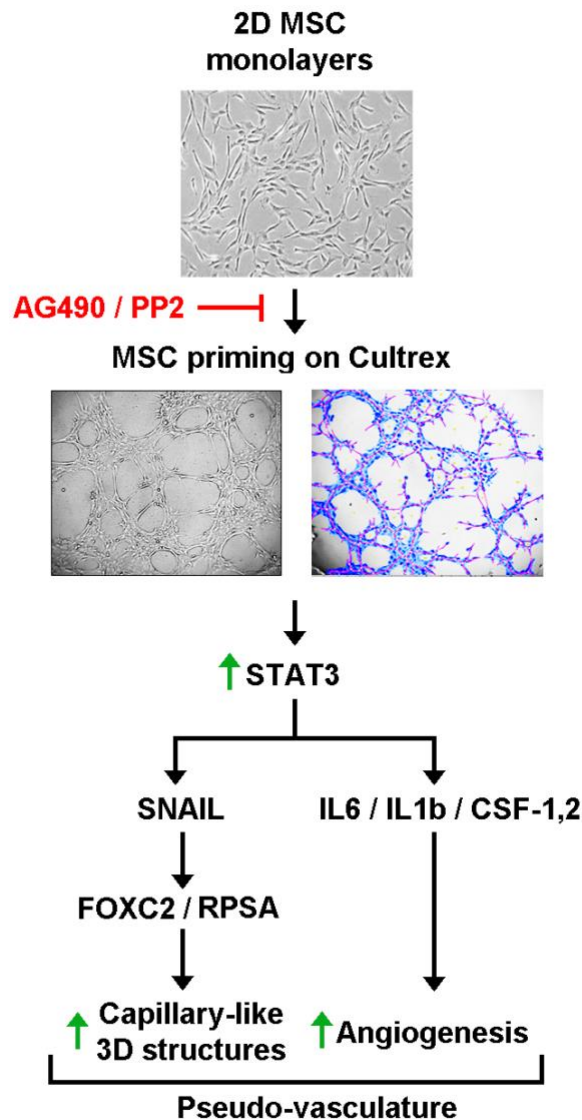


Figure 3.7. Scheme summarizing the STAT3 signaling hub and regulatory impact on capillary-like structure formation, and on the acquisition of an angiogenic, inflammatory, and EMT phenotype. MSC monolayers can recapitulate *in vitro* VM when cultured on Cultrex. Capillary-like structures can be inhibited in the presence of AG490 and PP2, respectively JAK/STAT3 and Src inhibitors. MSC priming on Cultrex triggers STAT3 expression which, in turn, can regulate the acquisition of an EMT phenotype (increased SNAIL, FOXC2, and RPSA), as well as an angiogenic/inflammatory molecular signature (increased IL6/IL1b/CSF-1, -2). Collectively, this phenotype may form pseudo-vasculature and sustain early pro-angiogenic processes physiologically.

CHAPITRE 4

ARTICLE 3

A role for the Hippo/YAP1 pathway in the regulation of in vitro vasculogenic mimicry in glioblastoma cells

Article publié dans la revue scientifique *Journal of Cellular and Molecular Medicine*

Roy ME, Elimam R, Zgheib A, Annabi B. A Role for the Hippo/YAP1 Pathway in the Regulation of In Vitro Vasculogenic Mimicry in Glioblastoma Cells. J Cell Mol Med. 2024 Dec;28(24):e70304. doi: 10.1111/jcmm.70304. PMID: 39718433; PMCID: PMC11667753.

Contributions des co-auteurs:

Roy : Conceptualisation, curation des données, analyses formelles, expérimentations, méthodologie, rédaction du manuscrit, révision et édition.

Elimam : Curation des données, expérimentations, révision et édition du manuscrit.

Zgheib : Expérimentations, méthodologie, révision et édition du manuscrit.

Annabi : Conceptualisation, analyses formelles, supervision, financement, rédaction du manuscrit, révision et édition

Tous les auteurs ont lu et approuvé la version finale du manuscrit.

A role for the Hippo/YAP1 pathway in the regulation of *in vitro* vasculogenic mimicry in glioblastoma cells

Marie-Eve Roy, Rahil Elimam, Alain Zgheib, and Borhane Annabi*

*Laboratoire d'Oncologie Moléculaire, Département de Chimie, Université du Québec à Montréal,
Montreal, QC, Canada, H3C 3P8*

Running title: YAP/TEAD inhibitors target vasculogenic mimicry

** To whom correspondence and reprint requests should be directed*

Laboratoire d'Oncologie Moléculaire

Université du Québec à Montréal

C.P. 8888, Succ. Centre-ville

Montréal, Québec

CANADA

H3C 3P8

Phone: (514) 987-3000 ext. 7610

E-mail: annabi.borhane@uqam.ca

4.1 Résumé

La voie de signalisation Hippo joue un rôle tumorigène dans le glioblastome (GBM), une tumeur hautement angiogénique, tandis que la capacité des inhibiteurs cliniquement pertinents de cette voie à cibler les mécanismes adaptatifs impliqués dans la chimiorésistance du GBM demeure encore peu documentée. L'impact moléculaire de ces inhibiteurs a été évalué ici *in vitro* sur un processus alternatif à l'angiogenèse tumorale, le mimétisme vasculogénique (VM), à l'aide de modèles cellulaires dérivés de GBM. Une analyse *in silico* des niveaux d'expression transcriptionnelle des effecteurs en aval de la voie Hippo (YAP1, TAZ et TEAD1) dans des tissus de gliomes de bas grade (LGG) et de GBM a été réalisée à l'aide de la plateforme GEPIA. Les effets de trois inhibiteurs de la voie Hippo (GNE7883, VT107 et IAG933) ont été évalués sur la migration cellulaire et la formation de VM *in vitro* dans les lignées U87 et U251 cultivées sur matrice Cultrex. L'expression génique et protéique de YAP1 a été analysée lors du VM, ainsi que sa translocation nucléaire. La répression génique transitoire de YAP1 par siARN a permis d'évaluer son rôle fonctionnel dans la migration, le VM et la régulation transcriptionnelle de CTGF et CYR61. Les niveaux de transcrits de TAZ ne différaient pas entre les tissus sains et tumoraux analysés. En revanche, les transcrits de YAP1 étaient significativement augmentés dans les tissus de GBM, tandis que TEAD1 était surexprimé à la fois dans les LGG et les GBM. Les trois inhibiteurs de la voie Hippo testés ont significativement inhibé la migration des cellules U87 et U251 ainsi que la formation du VM *in vitro*. L'expression génique et protéique de YAP1 était induite lors du VM, tandis que sa translocation nucléaire était bloquée par les inhibiteurs de la voie Hippo. Le silençage de YAP1 a entraîné une inhibition de la migration cellulaire, de la formation du VM ainsi qu'une diminution de la transcription de CTGF et de CYR61. Le ciblage du mimétisme vasculogénique par des inhibiteurs de la voie Hippo représente une approche prometteuse pour contourner la chimiorésistance du glioblastome et pourrait constituer un complément thérapeutique efficace aux traitements actuels des tumeurs cérébrales.

Mots-clés : Chimiorésistance, Glioblastome, Voie Hippo, Mimétisme vasculogénique, YAP/TEAD

4.2 Abstract

The Hippo pathway plays a tumorigenic role in highly angiogenic glioblastoma (GBM), whereas little is known about clinically relevant Hippo pathway inhibitors capacity to target adaptive mechanisms involved in GBM chemoresistance. Their molecular impact was investigated here *in vitro* against an alternative process to tumor angiogenesis termed vasculogenic mimicry (VM) in GBM-derived cell models. *In silico* analysis of the downstream Hippo signaling members *YAP1*, *TAZ*, and *TEAD1* transcript levels in low-grade glioblastoma (LGG) and GBM tumor tissues was performed by using GEPIA. *TAZ* transcript levels did not differ between the healthy and tumor tissues data analyzed. In contrast, *YAP1* transcript levels were elevated in GBM tissues, whereas *TEAD1* levels were high in both LGG and GBM. All three Hippo pathway inhibitors tested, GNE7883, VT107, and IAG933 inhibited U87 and U251 cell migration and *in vitro* VM as assessed on Cultrex matrix. *YAP1* gene and protein expression were induced upon VM, and its translocation to the nucleus was inhibited by the Hippo pathway inhibitors tested. SiRNA-mediated transient silencing of *YAP1* repressed cell migration, VM formation and *CTGF* and *Cyr61* transcription. In conclusion, targeting of VM using Hippo pathway inhibitors could help circumvent GBM chemoresistance and effectively complement other brain cancer treatments.

Key words: Chemoresistance, Glioblastoma, Hippo pathway, Vasculogenic mimicry, YAP/TEAD

4.3. Introduction

The Hippo pathway is a key growth control pathway, which downstream effectors YAP (Yes-associated protein) and TAZ (transcriptional coactivator with PDZ-binding motif), are frequently activated in cancers driving cell proliferation and tumor survival.¹⁻⁴ Based on the premise that sustained interactions between YAP/TAZ and TEADs (transcriptional enhanced associate domain) are central to their transcriptional activities, recently discovered potent small-molecule inhibitors which allosterically block the interactions between YAP/TAZ and all human TEAD paralogs through binding to their TEAD lipid pocket were developed and clinical trials initiated.⁵ While Hippo pathway dysregulation is associated with various cancers,^{6,7} impact of its specific targeting in highly invasive and angiogenic brain tumors such as glioblastomas (GBM) remains poorly understood. Pharmacological targeting of the chemoresistance phenotype associated to GBM further becomes highly relevant to also circumvent the molecular mechanisms associated with cancer treatment resistance.^{8,9}

Recent studies have shown promising results in designing anticancer therapeutic strategies to target the Hippo pathway.¹⁰ As such, preclinical studies suggest that these approaches can restore normal pathway function and suppress tumor development.¹¹ While the effectiveness of drugs targeting the Hippo pathway is currently being evaluated in clinical trials, overactivation of YAP/TAZ was found to contribute to uncontrolled cell growth and tumor progression in GBM,¹²⁻¹⁴ leading to therapy resistance through, in part, the maintenance of the cancer stem cell population.¹⁵ This further contributed to the immunosuppressive environment of GBM, making it difficult for the immune system to target and destroy cancer cells.¹⁶

Vasculogenic mimicry (VM), a process believed to involve glioma stem-like cells to generate vascular-like structures that supply blood for tumor growth and metastasis,¹⁷ is associated with poor clinical outcomes and resistance to anti-angiogenesis therapies in various cancers, including GBM.¹⁸ The molecular mechanisms underlying VM formation are complex and not fully understood, but recent evidence suggests that the Hippo pathway may play a key role in this process.^{19,20} In particular, YAP1 has been inferred to promote VM formation, migration, and invasion in hepatocellular carcinoma.¹⁹ This evidence makes the Hippo pathway a potential target for anti-tumor and anti-metastasis therapies for inhibiting VM in GBM.

Several drugs have been granted an orphan drug designation by the U.S. Food and Drug Administration (FDA) and the European Medicines Agency (EMA) for the treatment of GBM.²¹⁻²³ Yet, there remains a high unmet need for new therapeutic strategies for GBM patients.²⁴ Recently, development of LM98, a small-molecule TEAD inhibitor derived from flufenamic acid was shown to reduce *Cyr61* and *CTGF*

transcription, and led to the inhibition of triple-negative breast cancer-derived MDA-MB-231 cell migration and to cell cycling arrest in the S phase.²⁵ Interestingly, *Cyr61* and *CTGF* basal transcript levels were found elevated in GBM tissues and were further upregulated when *in vitro* VM was monitored in U87 GBM cells.²⁶ Consequently, specific silencing of *Cyr61* and *CTGF* or treatment with LM98 impaired *in vitro* VM.²⁶ Concomitantly, development of LM41, AF2112, and HC258, the latter being a covalent acrylamide TEAD inhibitor, also strongly reduced the expression of *CTGF*, *Cyr61*, *Axl* and *NF2*.^{27,28} Given its role in tumor progression and chemoresistance, as well as metastasis in several cancers, therapeutic targeting of the Hippo pathway-regulated VM may therefore hold promise against high-grade GBM.^{12,14}

In this study, we assessed the *in vitro* pharmacological properties of three clinically relevant TEAD binders that target the Hippo pathway to determine at the molecular level if they can circumvent VM-mediated chemoresistance mechanisms in human GBM-derived cell models. These inhibitors included GNE7883, a potent, reversible, allosteric inhibitor of the YAP1-TEAD interaction,⁵ IAG933 that is currently in phase I clinical study in patients with mesothelioma, NF2/LATS1/LATS2-mutated tumors and tumors with functional YAP1/TAZ fusions,^{11,29} and VT107 currently being studied in clinical trials for its potential to inhibit TEAD auto-palmitoylation in mesothelioma.³⁰

4.4. Materials

Sodium dodecyl sulfate (SDS) and bovine serum albumin (BSA) were purchased from Sigma-Aldrich Corp (St Louis, MO, USA). Cell culture media EMEM was from Wisent (320-005 CL). Electrophoresis reagents were purchased from Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA). The HyGLO™ Chemiluminescent HRP (horseradish peroxidase) Antibody Detection Reagents were from Denville Scientific Inc (Metuchen, NJ, USA). Micro bicinchoninic acid (BCA) protein assay reagents were from Pierce (Micro BCA™ Protein Assay Kit; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The monoclonal antibodies against GAPDH (D4C6R) and YAP1 (1A12) were from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA). The monoclonal antibody against Fibrillarin (NB300-269) was purchased from Novus Biologicals (Toronto, ON). HRP-conjugated donkey anti-rabbit and anti-mouse immunoglobulin (Ig) G secondary antibodies were from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA, USA).

4.5. Methods

4.5.1. Cell culture and capillary-like structure formation assay

The human U87 (HTB-14), U118 (HTB-15), U138 (HTB-16), and U251 glioblastoma cell lines were from American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). They were all maintained in Eagle's Minimum Essential Medium (Wisent, 320-006CL) containing 10% (v/v) calf serum (HyClone Laboratories, SH30541.03), 2 mM glutamine, 1 mM sodium pyruvate (Sigma-Aldrich Canada, P2256), 100 units/mL penicillin and 100 mg/mL streptomycin (Wisent, 250-202-EL). Cells were incubated at 37°C with 5% CO₂. VM was assessed *in vitro* using Cultrex (3432-010-01, R&D Systems, Inc.; Toronto, ON) to monitor 3D capillary-like structures formation.³¹ In brief, each well of a 96-well plate was pre-coated with 50 µl of Cultrex. Cell suspension in culture media (2×10⁴ cells/100 µl) was then seeded on top of polymerized Cultrex. Tested Hippo pathway inhibitors, IAG933, VT107, and GNE7883 were obtained from Chemietek (Indianapolis, IN, USA) and were added to the cell culture media at a 1 µM concentration and incubated at 37°C in a CO₂ incubator. Pictures were taken over time using a digital camera coupled to a phase-contrast inverted microscope. Mean loop area: For each loop, the area (number of pixels) enclosed by it is considered as its area. The mean loop area is the arithmetic mean of all loop areas. Mean loop perimeter: For each loop, the pixels that belong to its edge are considered its border or perimeter. The mean loop perimeter is the arithmetic mean of all loop perimeters. The number of loops and area covered upon tube branching formed by the cells were quantified using either the Wimasis analysis software (Cordoba, Spain) or the ImageJ software.³²

4.5.2. Total RNA isolation, cDNA synthesis, and real-time quantitative PCR

Total RNA was extracted from cell monolayers using 1 mL of TriZol reagent for a maximum of 3×10^6 cells as recommended by the manufacturer (Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA). For cDNA synthesis, 1-2 μg of total RNA was reverse-transcribed using a high-capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) or, in the case of the gene array, a R2 First Strand kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA). The cDNA was stored at -80°C prior to PCR. Gene expression was quantified by real-time quantitative PCR using iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). DNA amplification was carried out using an Iqycler iQ5 (Bio-Rad) and product detection was performed by measuring the binding of the fluorescent dye SYBR Green I to double-stranded DNA. The following primer sets were from QIAGEN: YAP1 (Hs_YAP1_1_SG, QT00080822), TEAD1 (Hs_TEAD1_1_SG, QT00000721), CTGF (Hs_CTGF_1_SG, QT00052899), CYR61 (Hs_CYR61_1_SG, QT00003451), GAPDH (Hs_GAPDH_1_SG, QT00079247) and Peptidylprolyl Isomerase A (PPIA; Hs_PPIA_4_SG, QT01866137). The relative quantities of target gene mRNA were normalized against internal housekeeping genes PPIA and GAPDH. The RNA was measured by following a ΔC_T method employing an amplification plot (fluorescence signal vs. cycle number). The difference (ΔC_T) between the mean values in the triplicate samples of the target gene and the housekeeping genes was calculated with the CFX manager Software version 2.1 and the relative quantified value (RQV) was expressed as $2^{-\Delta\text{C}_\text{T}}$.

4.5.3. In silico analysis of TAZ, YAP1 and TEAD1 transcripts levels in clinical glioblastoma and low-grade glioma tissues

A Gene Expression Profiling Interactive Analysis (GEPIA) web server was used to analyze the RNA sequencing expression data of glioblastoma tumors (GBM, $n = 163$) vs. healthy tissue ($n = 207$), and of low-grade glioma (LGG, $n = 518$) vs. healthy tissue ($n = 207$) from The Cancer Genome Atlas (TCGA) and the normal brain tissue in Genotype-Tissue Expression (GTEx) databases.³³ GEPIA provides customizable functions such as tumor/normal differential expression analysis, profiling according to cancer types or pathological stages, patient survival analysis, similar gene detection, correlation analysis, and dimensionality reduction analysis (<http://gepia.cancer-pku.cn/detail.php>, accessed on August 30th, 2024). One-way ANOVA was used for differential analysis of gene expression using disease states (LGG, GBM) or healthy tissues as variables for the box plots.

4.5.4. Transfection method and RNA interference

For gene silencing experiments, U87 and U251 glioblastoma cells were transiently transfected with siRNA sequences using Lipofectamine-2000 transfection reagent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Gene silencing was performed using 20 nM siRNA against *YAPI* (FlexiTube siRNA, SI02662954), or scrambled sequences (AllStar Negative Control siRNA, 1027281). The above small interfering RNA and mismatch siRNA were all synthesized by QIAGEN and annealed to form duplexes. Gene silencing efficacy was assessed by RT-qPCR as described above.

4.5.5. Real-time cell migration assay

Experiments were carried out using the Real-Time Cell Analyser (RTCA) Dual-Plate (DP) Instrument and the xCELLigence system (Roche Diagnostics, Laval, QC), following the instructions of the supplier. Cells were treated with vehicle (1% DMSO) or 10 μ M of the tested Hippo pathway inhibitors. 2.5×10^4 cells per well were seeded in a CIM-plate 16 and incubated at 37°C under a humidified atmosphere containing 5% CO₂ for 24 hours. Prior to cell seeding, the underside of each well in the upper chamber was coated with 0.15% gelatin in PBS and incubated for 1 hour at 37°C. The lower chamber wells were filled with either serum-free medium or serum-enriched medium. After 30 min of adhesion, cell migration was monitored every 5 min for 2 hours. The impedance value was measured by the RTCA DP Instrument and expressed as an arbitrary unit called the Cell Index. Each experiment was performed in quadruplicate wells.

4.5.6. Nuclear extraction

Cell monolayers were first lysed with a cytoplasmic buffer and then with a nuclear buffer according to the manufacturer's instructions (Invent Biotechnologies, SC-003). In the case of cells cultured on Cultrex, they were first detached from the matrix using a non-enzymatic Cultrex organoid harvesting and dissociation solution (3700-100-01, R&D Systems, Toronto, ON).

4.5.7. Western blot

Cytosolic and nuclear fractions were isolated as described above. Total cell lysis was performed in a buffer containing 1 mM each of sodium fluoride (NaF) and sodium orthovanadate (Na₃VO₄). Proteins (10-20 μ g) were then separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). Next, proteins were electro-transferred to low-fluorescence polyvinylidene difluoride membranes and blocked for 1 hour at room temperature with 5% nonfat dry milk in Tris-buffered saline (150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5) containing 0.3% Tween-20 (TBST; Bioshop, TWN510-500). Membranes were washed in TBST and

incubated overnight with the appropriate primary antibodies (1/1,000 dilution) in TBST containing 3% BSA and 0.1% sodium azide (Sigma-Aldrich) at 4°C and on a shaker. After three washes with TBST, the membranes were incubated for 1 hour with horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit or anti-mouse IgG at 1/2,500 dilutions in TBST containing 5% nonfat dry milk. Immunoreactive material was visualized by ECL.

4.5.8. Statistical data analysis

Data and error bars were expressed as mean $\pm$ standard error of the mean (SEM) of three or more independent experiments unless otherwise stated. Hypothesis testing was conducted using the Kruskal-Wallis test followed by a Dunn Tukey's post-test (data with more than three groups) or a Mann-Whitney test (two-group comparisons). Probability values of less than 0.05 (*) were considered significant and denoted in the figures. All statistical analyses were performed using the GraphPad Prism 7 software (San Diego, CA, USA).

4.6. Results

4.6.1. Gene expression profiles of TAZ, YAP1 and TEAD1 in four human glioblastoma cell lines and in clinically annotated glioblastoma tumor tissues.

TAZ, YAP1 and TEAD1 are key players in the Hippo signaling pathway in GBM where their expression and activation complex activates the transcription of genes involved in cell proliferation and survival.³⁴ YAP1 overexpression in GBM has additionally been linked to enhanced autophagy and lead to chemoresistance.³⁵ Here, transcript levels from 518 clinically annotated low-grade glioma (LGG) and 163 GBM tissues were retrieved from the TCGA and from the normal brain tissue in GTEx databases and compared to 207 healthy tissues. *YAP1* and *TEAD1* transcript levels were effectively found increased in GBM tissues, whereas those of *TAZ* remained unchanged between the healthy and tumor tissues data analyzed (Fig.4.1A). Increases in *YAP1* and *TEAD1* were reported previously to also correlate with increased levels of *Cyr61*, *CTGF*, and *Axl*.²⁶ Interestingly, *YAP1* increases appeared specific to GBM whereas *TEAD1* was found increased in less invasive LGG as well, making it a less specific biomarker to distinguish between LGG and GBM. This observation therefore suggests a specific role for YAP1 in the more aggressive stage that GBM represent. *YAP1* and *TEAD1* gene expression profile was validated by a single amplicon amplification (not shown) and quantified by RT-qPCR in four different human GBM-derived cell line models, namely the U87, U118, U138, and U251 cells (Fig.4.1B). YAP1 was further found to be significantly expressed at the protein level in these four cell lines and coherent with gene expression (Fig.4.1C).

4.6.2. Hippo pathway clinical inhibitors alter the chemotactic cell migration of human U87 and U251 glioblastoma cells.

Recent evidence has shown that targeting the YAP-TEAD interaction can be a promising therapeutic strategy for GBM.³⁶ Here, clinically relevant Hippo pathway pharmacological inhibitors IAG933, GNE7883, and VT107 (Fig.2B) were screened against four different human GBM-derived cell line models. Real-time cell migration shows that serum-mediated chemotaxis (Fig.4.2A, closed circle) was required to monitor significant migration in U87 and U251 cells, whereas in the absence of serum very low chemotaxis was observed (Fig.4.2A, open circle). Intriguingly, virtually no response to serum was observed in U118 and U138 cells. When U87 and U251 cells were treated with any of the three Hippo pathway inhibitors, a significantly reduced relative cell migration was observed ranging from 25-40% inhibition (Fig.4.2C). Given their migration profile and response to Hippo pathway inhibition, these two cell line models were next further investigated for their involvement in *in vitro* VM.

4.6.3. Hippo pathway clinical inhibitors alter *in vitro* vasculogenic mimicry of human U87 glioblastoma cells.

VM is particularly notable in GBM and is associated with poor prognosis.^{18,37} Such process represents a significant challenge in GBM treatment as tumor cells form vessel-like structures that facilitate blood supply independently of endothelial cells.³⁸ Clinical targeting of VM implies that one aims at circumventing the hypoxic tumor's ability to sustain itself and resist anti-angiogenic therapies, which target traditional blood vessel formation. Given that targeted Hippo pathway treatments inhibited U87 and U251 cell migration, *in vitro* VM was next assessed. U87 cells were seeded on top of Cultrex and 3D capillary-like structures formed as described in the Methods section (Fig.4.3A, upper panels). Increasing concentrations of GNE7883 and IAG933 were found to alter VM structures with IC₅₀ values ranging from 0.04-0.1 μ M in line with previously reported data (Fig.4.3B). VT107, within that time frame, did not alter VM structures and required over 48 hours to exert its anti-VM inhibitory effect (not shown). Along with their ability to inhibit chemotactic cell migration, the tested Hippo pathway inhibitors also altered VM structures in the U251 GBM-derived cell line model (not shown).

4.6.4. *In vitro* VM triggers nuclear YAP1 expression in U87 and U251 glioblastoma cells and is inhibited by Hippo pathway pharmacological targeting.

Recent evidence established the utility of anti-YAP/TAZ therapy in mouse models of metastatic melanoma whereby inhibition of VM appeared to prolong survival of mice with melanoma brain metastases.³⁹ How *in vitro* VM-mediated capillary-like structure formation modulated YAP1 expression and transcriptional activity was next addressed. U87 and U251 GBM cells were therefore seeded either as monolayers (2D) or on top of Cultrex (3D) to generate capillary-like structures. Subcellular fractionation was performed to isolate the cytosol and nuclear fractions from 2D or 3D cells. Nuclear YAP1 expression was found to significantly increase upon formation of VM in both of the cell lines tested (Fig.4.4A). When cytosolic and nuclear fractions were isolated from U87 GBM cells seeded on Cultrex and treated with either vehicle or the indicated Hippo pathway inhibitors, nuclear YAP1 expression was reduced (Fig.4.4B). Finally, transcript levels of two of the Hippo pathway downstream effectors *CTGF* and *Cyr61* previously reported to be induced upon *in vitro* VM²⁶ were assessed in U87 cells. *CTGF* and *Cyr61* were effectively found induced upon capillary-like structure formation, and such induction prevented by GNE7883 (Fig.4.4C). Collectively, this evidence suggests that nuclear YAP1 correlated with *in vitro* VM and contributed to the anti-Hippo pathway pharmacological inhibition of VM through, in part, reduced transcriptional regulation of downstream effectors involved in 3D capillary-like structure formation. The direct impact of YAP1 on

VM was next addressed.

4.6.5. Silencing of YAP1 alters in vitro VM and cell migration in U87 and U251 glioblastoma cells.

To assess the direct impact of YAP1 on VM, transient gene silencing was performed to specifically repress YAP1 and this was validated by immunoblotting at the protein level in both U87 and U251 cells (Fig.4.5A). Cells were next seeded on top of Cultrex and 3D structures found to be significantly altered as compared to control cells (siScrambled, Fig.4.5B). Transfected U87 and U251 cells were further assessed for real-time chemotactic cell migration in response to serum. YAP1 repression was found to significantly inhibit chemotaxis in both cell models (Fig.4.5C). This observation provides evidence as to the direct impact of YAP1 on cell migration and ultimately supports its role on VM when Hippo pathway inhibitors prevent its nuclear expression. Finally, YAP1-mediated transcriptional regulation of *CTGF* and *Cyr61* gene expression was explored by RT-qPCR in U87 cells. Specific siRNA-mediated repression of *YAP1* was confirmed (Fig.4.5D), and this abrogated the induction of *CTGF* and *Cyr61* upon capillary-like structure formation (Fig.4.5E).

4.7. Discussion

YAP1 involvement in the progression of LGG into secondary GBM and acquisition of an aggressive brain tumor phenotype is increasingly recognized.^{40,41} As such, YAP1 overexpression was found to induce invasion and migration in GBM cells and was related to poor prognosis.⁴² A knockdown of YAP1 was further found to inhibit tumor growth.^{43,44} Along with the YAP/TAZ oncogenic transcriptional role, elevated levels of TAZ were linked to the promotion of a Temozolomide-resistance phenotype in human glioma cells.⁴⁵ Importantly, a growing body of literature also implicates YAP/TAZ activation in resistance to targeted therapies, chemotherapy, radiation, and immunotherapies.⁴⁶ Implication of the Hippo/YAP1 signaling pathway in resistance to chemotherapy was highlighted in GBM as well as in osteosarcoma where it increased resistance to drugs like methotrexate and doxorubicin.^{12,47}

Given that *TAZ* levels did not differ between the healthy and tumor tissues data analyzed, and that *TEAD1* could not discriminate between LGG and GBM tissues, we chose here to specifically assess the importance of the Hippo/YAP1 signaling in the highest aggressive type of brain cancer that GBM represent and where *in silico* analysis of YAP1 revealed significant and specific increases in clinically annotated GBM tissues. Key points highlighting such importance support the fact that Hippo pathway dysregulation leads to increased YAP/TAZ activity in GBM.^{2,14,48} While the Hippo pathway further interacts with other signaling pathways, such as Wnt/ β -catenin and Notch, this crosstalk can further enhance GBM resistance to therapy.¹² The Hippo pathway also influences the tumor microenvironment, including interactions with immune cells and their influence on VM.^{49,50} Accordingly, the presence of VM can affect the infiltration of immune cells into the tumor through upregulation of immune checkpoints, such as CD28, CD86, BTLA, and CD40LG, which can inhibit the immune response.⁵¹ Any strategies that can target the Hippo pathway involvement that lead to tumor immune escape may therefore circumvent chemoresistance and improve the effectiveness of other treatments.³⁵

We further highlighted a new role for the transcription factor YAP1 in the regulation of *in vitro* VM in GBM, a crucial process related to chemoresistance. YAP1 regulates a variety of genes involved in cell proliferation, survival, and differentiation, including *CTGF*, which plays a role in cell adhesion, migration, and proliferation, as well as *Cyr61*, which is associated with cell adhesion and angiogenesis. Additionally, YAP1 interacts with various transcription factors and signaling pathways, such as the TAZ and TEAD transcription factors family, to regulate these genes.⁵² The YAP-TEAD protein-protein interaction mediates YAP oncogenic functions downstream of the Hippo pathway and these, now, include regulation of VM processes. The consequences of a direct pharmacological disruption of the interface between YAP and

TEADs by clinically relevant Hippo pathway inhibitors are here evidenced *in vitro* in several GBM cell models. Lastly, transient silencing of YAP1 (this study) or of YAP-inducible genes,²⁶ as well as reduced GBM cell migration upon transient silencing of YAP, further confirms the validity of the Hippo pathway as a target for drug discovery. Our data further give support to those demonstrating that TAZ knockdown reduced SNB19 human glioma cell migration, possibly through impaired interaction with YAP1.⁵³

While Hippo pathway inhibitors currently hold promise in cancer treatment, several limitations and challenges remain associated with their use against GBM. As evidenced here from the cellular screen performed and differential response from four different established human GBM cell models, these will definitely include GBM tumor heterogeneity as this can affect how different tumors will respond to Hippo pathway inhibitors, making it challenging to develop a one-size-fits-all treatment.² Recent advances in medicinal chemistry lead to potent Hippo pathway inhibitors and has demonstrated promising results in inhibiting YAP/TEAD transcriptional activity, altering *in vitro* VM, and reducing cancer cell migration.²⁵⁻²⁸ However, there still is also evidence that targeting the Hippo pathway can lead to adaptive resistance mechanisms.³⁰ Effective delivery of the Hippo pathway inhibitors to the tumor site, while minimizing exposure to healthy tissues, also remains a significant challenge. This is particularly important for brain tumors like GBM, where the blood-brain barrier can impede drug delivery.⁵⁴ Better molecular understanding of the Hippo pathway in GBM will therefore lead to more effective future treatments and better outcomes for patients suffering from this challenging to treat cancer.

4.8. Conclusion

Our study underscores the potential of targeting the Hippo pathway as a novel approach in cancer therapy, opening the door to further exploration of its role in VM-mediated chemoresistance. Despite several drugs have been developed for the treatment of GBM, many of them have failed to secure approval or had shown limited efficacy during clinical trials largely due to their inability to target the chemoresistance phenotype of these rare brain cancers. Therefore, there is a high unmet need for new therapeutic strategies for GBM patients. Our findings reveal new pharmacological properties of clinically relevant small-molecule YAP/TEAD inhibitors against VM processes. As VM can be triggered by numerous factors in GBM, such as hypoxia, inflammation, growth factors, and extracellular matrix components, it is also highly dependent on the tumor microenvironment and stage progression. Hence, treating VM-related processes in GBM and other solid tumors with high VM activity presents a promising strategy to overcome such considerable challenge.

FIGURES

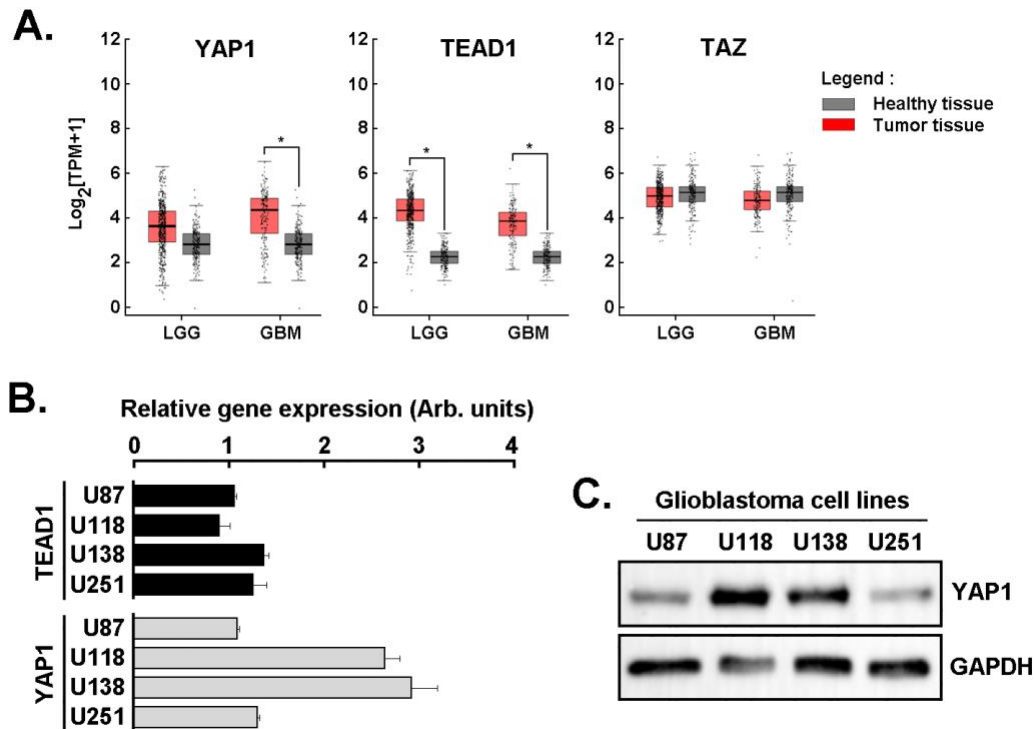


Figure 4.1. Gene expression profiles of TAZ, YAP1 and TEAD1 in four human glioblastoma cell lines and in clinically annotated glioblastoma tumor tissues. **A)** *In silico* analysis of *TAZ*, *TEAD1* and *YAP1* transcript levels was performed using RNA extracted from clinical samples from glioblastoma (GBM, $n = 163$) and low-grade glioma (LGG, $n = 518$) (red boxes) and compared to healthy tissue ($n = 207$; grey boxes), ($*p < 0.05$). **B)** Total RNA was extracted from four different human glioblastoma cell lines (U87, U118, U251, and U138) and relative gene expression profiles for *YAP1* and *TEAD1* determined by RT-qPCR as described in the Methods section. **C)** A representative immunoblot from two independent cell passages, of YAP1 protein expression was performed from lysates of the four indicated GBM cell lines. GAPDH expression was assessed as a loading control.

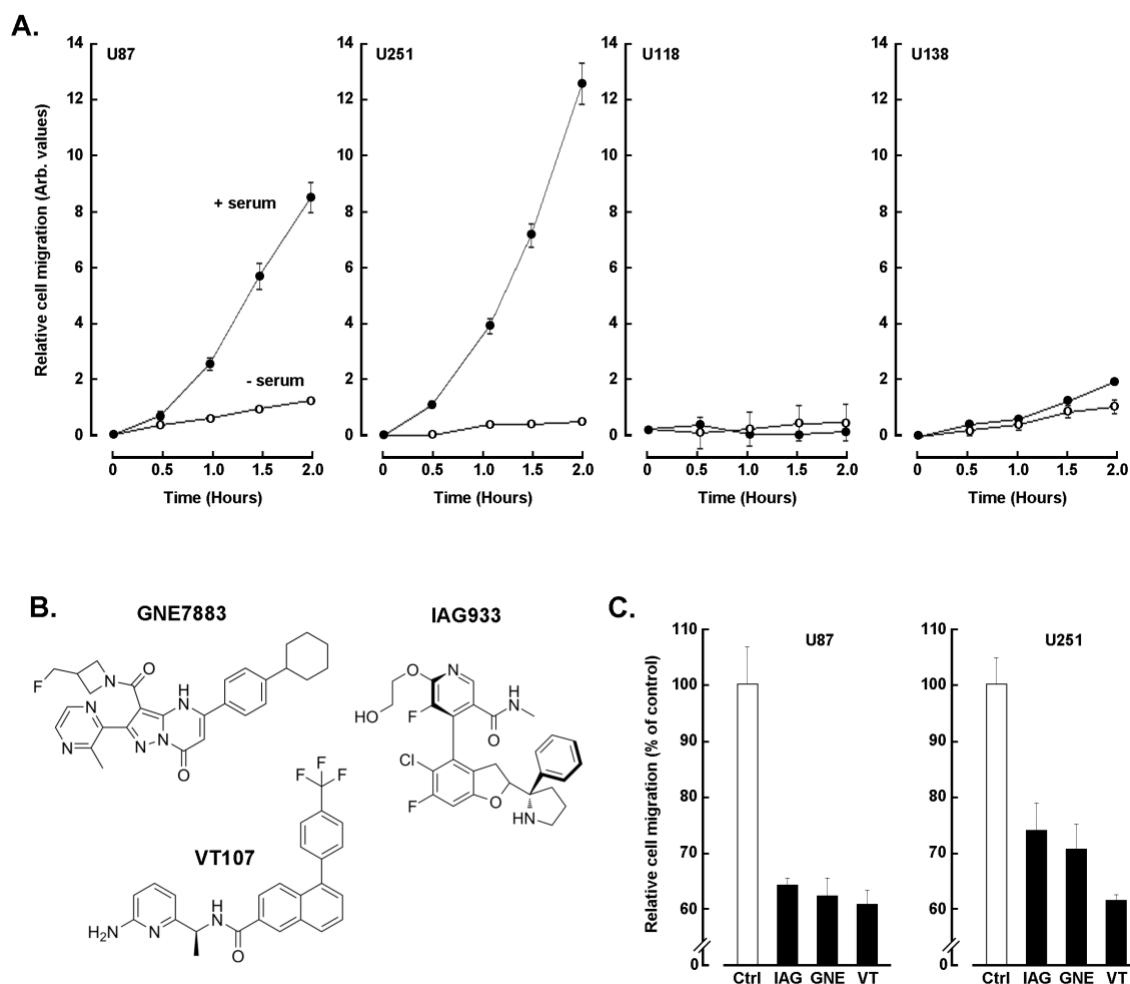


Figure 4.2. Hippo pathway clinical inhibitors alter the chemotactic cell migration of human U87 and U251 glioblastoma cells. **A)** Real-time cell chemotactic migration was monitored for 2 hours for the four human glioblastoma cell lines indicated in the absence (open circle) or presence (closed circle) of serum. **B)** Chemical structures of the three Hippo pathway clinical inhibitors tested, IAG933, GNE7883, and VT107. **C)** Real-time cell chemotactic migration in response to serum was monitored in U87 and U251 glioblastoma cell lines for 2 hours in the absence (control, white bar) or presence of 10 μ M of the Hippo pathway inhibitors indicated (black bars).

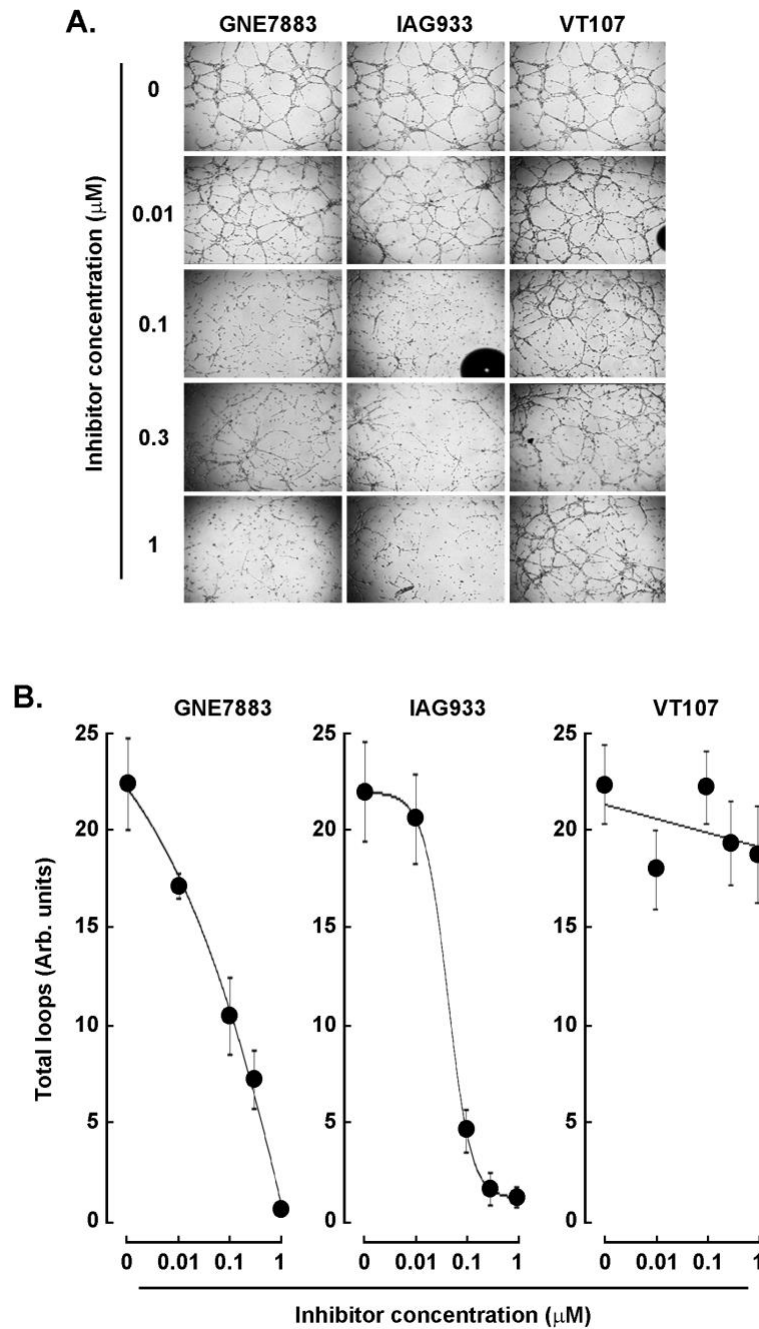


Figure 4.3. Hippo pathway clinical inhibitors alter *in vitro* vasculogenic mimicry of human U87 glioblastoma cells. U87 glioblastoma cells were trypsinized and seeded on top of Cultrex to generate 3D capillary-like structures as described in the Methods section. **A)** Representative phase contrast pictures were taken to monitor structure formation at 24 hours in the presence of the indicated concentrations of GNE7883, IAG933, and VT107, 4x magnification. **B)** Total loops parameters were extracted from the Wimasis analysis of A) and quantification provided from a representative experiment performed in

triplicate.

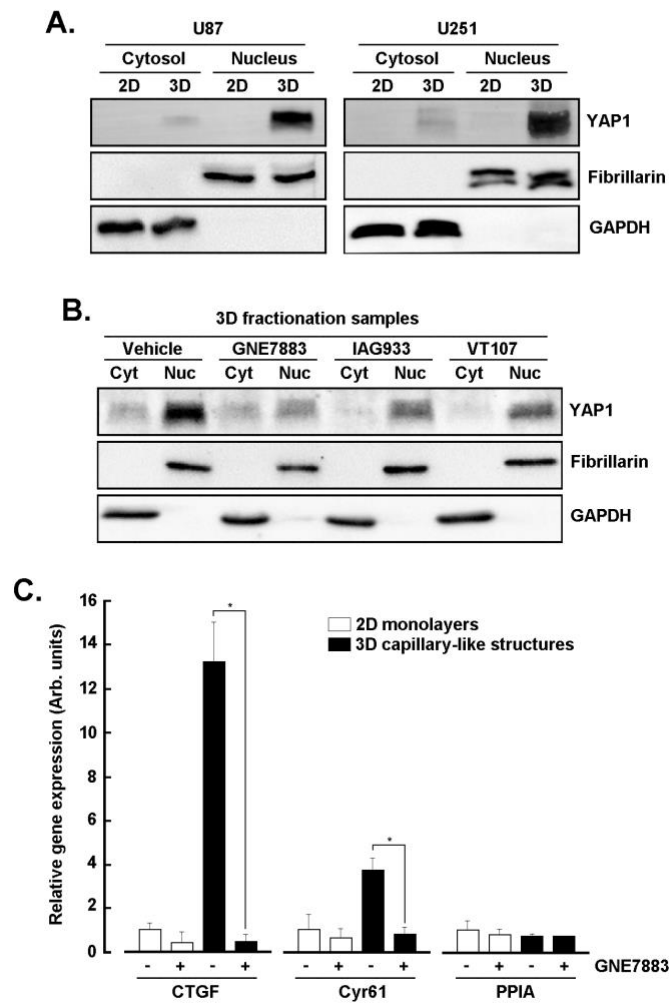


Figure 4.4. *In vitro* VM triggers nuclear YAP1 expression in U87 and U251 glioblastoma cells and is inhibited by Hippo pathway pharmacological targeting. **A)** Human U87 and U251 glioblastoma cells were seeded either as monolayers (2D) or on top of Cultrex (3D) to generate capillary-like structures. Subcellular fractionation was performed to isolate the cytosol and nuclear fractions from 2D or 3D cells. Representative blots for YAP1, Fibrillarin and GAPDH are presented from three independent fractionations. **B)** Cytosolic (Cyt) and nuclear (Nuc) fractions were isolated from U87 glioblastoma cells seeded on Cultrex and treated with either vehicle or 10 μ M of the indicated Hippo pathway inhibitors for 24 hours. Representative blots for YAP1 and Fibrillarin are presented from two independent fractionations. **C)** Total RNA was extracted from U87 cells cultured as in A). RT-qPCR was performed and relative gene expression of *CTGF*, *Cyr61*, and *PPIA* normalized over *GAPDH*. Data presented are representative triplicates from two independent experiments.

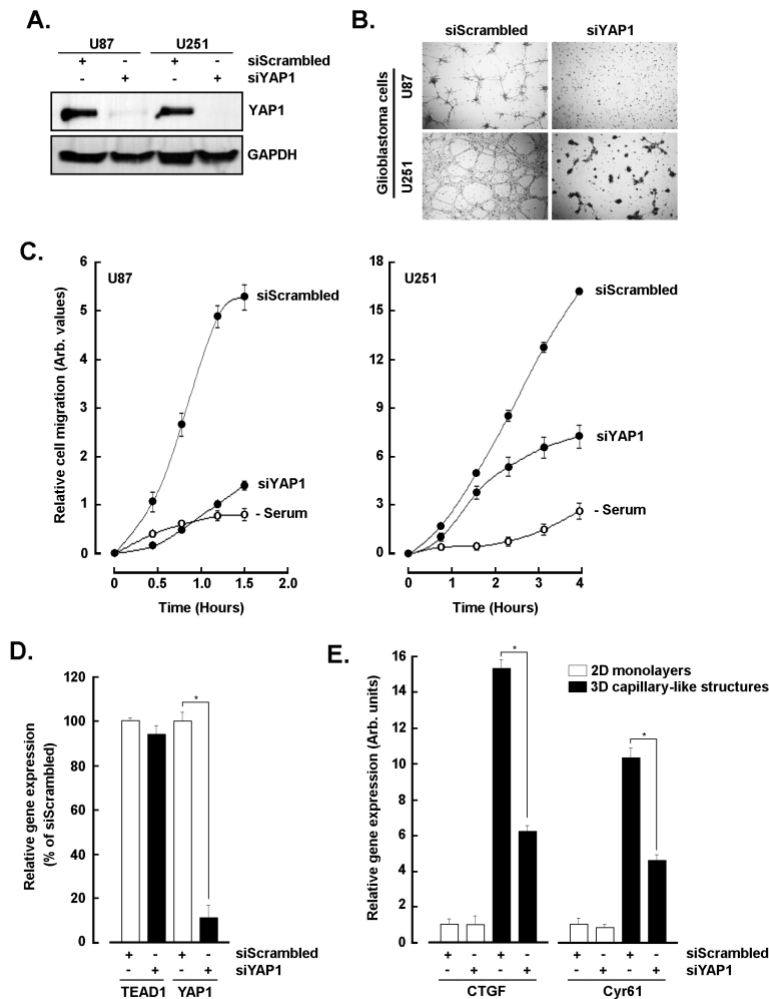


Figure 4.5. Silencing of YAP1 alters in vitro VM and cell migration in U87 and U251 glioblastoma cells. **A)** Transient siRNA-mediated gene silencing of YAP1 (siYAP1) or of a non-specific scrambled sequence (siScrambled) was performed in U87 and U251 glioblastoma cells. Total protein lysates were isolated, and representative immunoblots of YAP1 and GAPDH presented out of three independent experiments. **B)** Transfected U87 and U251 glioblastoma cells were seeded on top of Cultrex and 3D capillary-like structures generated for 24 hours. Representative phase contrast pictures were taken. **C)** Transfected U87 and U251 glioblastoma cells were further assessed for real-time cell migration using the xCELLigence system in response to serum (closed circles) in U87 (left panel) and U251 (right panel). Absence of serum was performed to assess cell migration under no chemotactic cues (open circles, - Serum). **D)** Total RNA was extracted from U87 cells monolayers upon transient gene repression of *YAP1* and validated by RT-qPCR. **E)** Total RNA was extracted from U87 cells cultured as in B). RT-qPCR was performed and relative gene expression of *CTGF*, *Cyr61* assessed by RT-qPCR. All RT-qPCR data presented are representative triplicates from two independent experiments.

CHAPITRE 5

ARTICLE 4

A SORT1/EGFR molecular interplay as a prognostic biomarker in glioblastoma vasculogenic mimicry: implications in the transcriptional regulation of cancer stemness and drug resistance

Article publié dans la revue scientifique BMC Cancer

Roy ME, Zgheib A, Eliopoulos N, & Annabi B. (2025) A SORT1/EGFR molecular interplay as a prognostic biomarker in glioblastoma vasculogenic mimicry: implications in the transcriptional regulation of cancer stemness and drug resistance *BMC Cancer* doi: 10.1186/s12885-025-14789-3. PMID: 40835914; PMCID: PMC12369051.

Contributions des co-auteurs:

Roy : Conceptualisation, curation des données, analyses formelles, expérimentations, méthodologie, rédaction, révision et édition du manuscrit

Zgheib : Expérimentations, méthodologie, révision et édition du manuscrit.

Eliopoulos : Analyses formelles, révision et édition du manuscrit

Annabi : Conceptualisation, analyses formelles, supervision, financement, rédaction révision et édition du manuscrit

Tous les auteurs ont lu et approuvé la version finale du manuscrit.

A SORT1/EGFR molecular interplay as a prognostic biomarker in glioblastoma vasculogenic mimicry: implications in the transcriptional regulation of cancer stemness and drug resistance

Marie-Eve Roy¹, Alain Zgheib¹, Nicoletta Eliopoulos² and Borhane Annabi^{1*}

¹*Laboratoire d'Oncologie Moléculaire, Département de Chimie, Université du Québec à Montréal, Montreal, QC, Canada, H3C 3P8 and* ²*Lady Davis Institute for Medical Research, SMBD-Jewish General Hospital, and Department of Surgery, McGill University, Montreal, QC, Canada, H3T 1E2*

Running title: EGFR/SORT1 complex regulates vasculogenic mimicry

** To whom correspondence and reprint requests should be directed*

Laboratoire d'Oncologie Moléculaire

Université du Québec à Montréal

C.P. 8888, Succ. Centre-ville

Montréal, Québec

CANADA

H3C 3P8

Phone: (514) 987-3000 ext. 7610

E-mail: annabi.borhane@uqam.ca

5.1 Résumé

Le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR) joue un rôle majeur dans le mimétisme vasculogénique (VM), un processus par lequel des cellules cancéreuses au sein de tumeurs solides hypoxiques forment des structures pseudo-vasculaires indépendamment des cellules endothéliales. Principalement attribué aux cellules souches cancéreuses (CSC), le VM est fortement associé à la chimiorésistance et à un pronostic défavorable dans le glioblastome (GBM). Le trafic intracellulaire d'EGFR à partir de la membrane plasmique est en partie régulé par la sortiline (SORT1), une glycoprotéine transmembranaire de type I impliquée dans le tri des récepteurs. Il a par ailleurs été rapporté qu'EGFR et SORT1 peuvent également être localisés au sein des exosomes. La présente étude vise à déterminer si l'interaction fonctionnelle EGFR/SORT1 influence le VM *in vitro* dans des modèles cellulaires humains dérivés de GBM. Une analyse *in silico* a été réalisée afin de comparer les niveaux d'expression transcriptionnelle entre des tissus cérébraux sains et des tissus de GBM. Des matrices de cDNA et des analyses par RT-qPCR ont été utilisées pour évaluer l'expression génique dans les lignées cellulaires U87, U118, U138 et U251. L'expression protéique a été analysée par immunobuvardage. Le VM tridimensionnel *in vitro* a été évalué sur matrice Cultrex, tandis que la migration chimiotactique en temps réel a été mesurée à l'aide du système xCELLigence. Des répressions géniques transitoires ont été réalisés à l'aide de siARN spécifiques. Des niveaux accrus d'EGFR, ainsi que des marqueurs exosomaux de la famille des tétraspanines (CD9, CD63 et CD81), ont été observés dans les tissus de GBM. Les analyses de prédiction d'interactions protéiques ont identifié EGFR comme un nœud central reliant SORT1 aux marqueurs exosomaux. Une augmentation de l'expression génique et protéique de SORT1 a été observée dans les lignées cellulaires humaines de GBM de stade IV (U87, U118 et U251). Ces observations étaient cohérentes avec les analyses de matrices de cDNA cliniquement annotées, montrant des niveaux de SORT1 plus élevés dans les échantillons de GBM de stades III–IV comparativement aux stades I–II. L'inhibition pharmacologique de la fonction de SORT1 par l'AF38469, ainsi que la répression transitoire de SORT1 par siARN, ont aboli la migration chimiotactique et réduit la formation du VM *in vitro* dans les cellules U87 et U251. De plus, la répression de SORT1 a empêché l'induction de l'expression génique et protéique d'EGFR lors du VM *in vitro* et a réduit les signatures moléculaires associées à la chimiorésistance (ABCB1, ABCB5) et aux CSC (PROM1/CD133, SOX2). Ces résultats mettent en évidence l'interaction complexe de l'axe EGFR/SORT1 dans la régulation du mimétisme vasculogénique et dans le contrôle transcriptionnel des signatures moléculaires de chimiorésistance et de cellules souches cancéreuses associées au VM dans le GBM. Ces données ouvrent la voie à de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblant le complexe EGFR/SORT1 dans le glioblastome.

Mots-clés : Cellules souches cancéreuses, Chimiorésistance, Glioblastome, Complexe EGFR/SORT1, Mimétisme vasculogénique

5.2 Abstract

The epidermal growth factor receptor (EGFR) plays a significant role in vasculogenic mimicry (VM), a process by which cancer cells within hypoxic solid tumors form blood vessel-like structures independent of endothelial cells. Mostly attributed to cancer stem cells (CSC), VM is strongly associated with chemoresistance and poor prognosis in glioblastomas (GBMs). The trafficking of EGFR from the plasma membrane is part regulated by Sortilin (SORT1), a type I membrane glycoprotein with receptor sorting functions. Notably, EGFR and SORT1 have been reported to also localize within exosomes. This study questions whether the EGFR/SORT1 interplay impacts *in vitro* VM in human GBM-derived cell models. *In silico* analysis was used to compare GBM to healthy brain tissue transcripts levels. cDNA arrays and RT-qPCR were performed to assess transcript levels in U87, U118, U138 and U251 GBM cells. Immunoblotting was used to assess protein expression levels. *In vitro* 3D VM was performed on Cultrex, while real-time chemotaxis was measured using the xCELLigence system. Transient gene silencing was achieved using sequence-specific siRNA. Increased levels of *EGFR*, along with tetraspanins exosomal markers *CD9*, *CD63*, and *CD81* were observed in GBM. Interaction predictions further identified EGFR as a central hub linking SORT1 to exosomal markers. Elevated SORT1 protein and gene expression were found in human stage IV GBM-derived U87, U118 and U251 cell lines. This was consistent with cDNA array analyses from clinically annotated GBM demonstrating higher *SORT1* levels in stage III-IV compared to stage I-II samples. Pharmacological inhibition of SORT1 function by AF38469 or siRNA-mediated transient silencing of SORT1 abrogated chemotactic cell migration and reduced *in vitro* VM formation in U87 and U251 GBM cells. SORT1 silencing prevented EGFR gene and protein expression upon *in vitro* VM, as well as reduced chemoresistance (ABCB1, ABCB5) and CSC (PROM1/CD133, SOX2) molecular signature. These findings underscore the complex interplay of the EGFR/SORT1 axis in regulating VM and in driving to the transcriptional regulation of chemoresistance and CSC molecular signature of GBM associated with VM. These insights could inspire novel therapeutic strategies targeting the EGFR/SORT1 complex in GBM.

Key words: Cancer stem cells, Chemoresistance, Glioblastoma, EGFR/SORT1 complex, Vasculogenic mimicry.

5.3. Introduction

Glioblastomas (GBMs) are the most aggressive and lethal primary tumor in adults, with a median survival of only 12-15 months despite maximal standard-of-care therapies. Resistance to conventional treatments, a highly heterogeneous tumor microenvironment, and often-inevitable tumor recurrence remain the most significant clinical challenges (Fu et al., 2025; White et al., 2024). GBMs are highly hypoxic and angiogenic tumors which can sustain nutrient supply through alternative vascularization mechanisms such as vasculogenic mimicry (VM), a phenomenon where highly plastic tumor cells form perfusable vessel-like structures without endothelial involvement (El-Hallani et al., 2010; Maddison et al., 2023). This process complements tumor angiogenesis and is strongly associated with tumor aggressiveness, hypoxia adaptation, metabolic reprogramming and poor clinical outcome (Emami Nejad et al., 2021).

Among the key molecular regulators of VM, the epidermal growth factor receptor (EGFR) has emerged as a central effector (Delgado-Bellido et al., 2017; Mao et al., 2015). EGFR is frequently amplified, mutated or overexpressed in GBM and drives tumor progression through activation of different signaling pathways that promote proliferation, survival and invasion (Ghisai et al., 2025). Interestingly, EGFR exhibits nuclear localization and is trafficked via endocytic and vesicular routes, suggesting a broader regulatory network involving intracellular transport and sorting mechanisms. EGFR has also been linked to the regulation of VM, but the underlying mechanisms remain incompletely documented (Yuan et al., 2023). These observations suggest that the intracellular trafficking and localization of EGFR, particularly its nuclear translocation, may influence transcriptional programs that drive VM and lead to therapy resistance.

Recent evidence have identified the involvement of Sortilin (SORT1), a sorting receptor involved in protein sorting and trafficking, as a potential regulator of EGFR dynamics (Li et al., 2018). SORT1 has been shown to mediate the internalization and intracellular routing of membrane-bound receptors and is overexpressed in several aggressive cancers (Roselli et al., 2015; Farahani et al., 2019; Gao et al., 2020; Blondy et al., 2021). The consequence of SORT1 overexpression has been observed to localize within exosomes, further suggesting a potential role in vesicle-mediated intercellular communication during GBM progression (Wilson et al., 2016). Based on these observations, we hypothesized that the EGFR/SORT1 interplay may therefore function as a master sensor-effector axis in regulating VM in GBM.

Using *in silico* transcriptomic analysis, we demonstrate that EGFR and exosomal markers are significantly upregulated in GBM tissues while SORT1 expression is selectively increased in high-grade tumors. *In vitro* functional assays, pharmacological and genetic approaches reveal that functional inhibition or silencing of

SORT1 disrupts VM formation, impairs GBM cell migration, and reduces EGFR expression along with molecular signatures associated with chemoresistance and cancer stem cells (CSC) phenotypes. Silencing EGFR recapitulates these effects, confirming the functional interdependence of SORT1 and EGFR in VM regulation. Altogether, our findings uncover a novel regulatory mechanism where SORT1 modulates EGFR expression, and consequently the VM capacity of GBM cells. This offers new insights into the molecular hub of chemoresistance and therapeutic escape in GBM. Targeting this axis may represent a promising therapeutic avenue to disrupt VM-associated resistance in GBM patients.

5.4. Materials and Methods

5.4.1. Materials

Sodium dodecyl sulfate (SDS) and bovine serum albumin (BSA) were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) for cell culture was sourced from Wisent (catalog #320-005 CL). Electrophoresis reagents were purchased from Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA). HyGLO™ Chemiluminescent HRP Antibody Detection Reagents were supplied by Denville Scientific Inc. (Metuchen, NJ, USA). Protein quantification was performed using the micro BCA™ Protein Assay Kit from Pierce (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The monoclonal anti-GAPDH antibody (D4C6R, 97166) and the polyclonal anti-EGFR antibody (D38B1) were acquired from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA). The anti-SORT1-ECD antibody was obtained from BD Transduction Laboratories™ (#612100), while the anti-SORT1-ICD antibody was sourced from Abcam (#16640). HRP-conjugated donkey anti-rabbit and anti-mouse IgG secondary antibodies were purchased from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA, USA).

5.4.2. Cell culture

Human glioblastoma (GBM) cell lines U87 (HTB-14), U118 (HTB-15), U138 (HTB-16), and U251 were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). Cells were cultured in Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM; Wisent, 320-006CL) supplemented with 10% (v/v) calf serum (HyClone Laboratories, SH30541.03), 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate (Sigma-Aldrich Canada, P2256), 100 U/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin (Wisent, 250-202-EL). Cultures were maintained at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂.

5.4.3. In vitro vasculogenic mimicry assay

Vasculogenic mimicry (VM) was assessed in vitro using Cultrex® Basement Membrane Extract (R&D Systems, 3432-010-01; Toronto, ON, Canada) to evaluate the formation of 3D capillary-like structures. Briefly, 96-well plates were pre-coated with 50 µL of Cultrex and incubated to allow polymerization. Cells (2×10^4 per well) were suspended in culture medium and seeded onto the polymerized matrix in a final volume of 100 µL. 3D capillary-like structure formation was monitored over time using a phase-contrast inverted microscope equipped with a digital camera.

5.4.4. Capillary-like structures image analysis

Quantification of *in vitro* VM structures was performed using either Wimasis Image Analysis software (Cordoba, Spain) or ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA) as previously described.

5.4.5. RNA isolation, cDNA synthesis, and quantitative real-time PCR

Total RNA was isolated from cell monolayers using 1 mL of TRIzol™ reagent (Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA) per 3×10^6 cells, following the manufacturer's protocol. For cDNA synthesis, 1–2 µg of total RNA was reverse-transcribed using either the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) or the R2 First Strand Kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA) for gene array applications. Synthesized cDNA was stored at -80°C until further use. Quantitative real-time PCR (qPCR) was performed using iQ™ SYBR® Green Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) on an iCycler iQ5 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). Amplification was monitored by SYBR Green I fluorescence binding to double-stranded DNA. The following primer sets were obtained from QIAGEN: GAPDH (Hs_GAPDH_1_SG, QT00079247), PPIA (Hs_PPIA_4_SG, QT01866137), SORT1 (Hs_SORT1_1_SG, QT0007331), SORCS1 (Hs_SORCS1_1_SG, QT00024290), SORCS2 (Hs_SORCS2_1_SG, QT00083104), SORCS3 (Hs_SORCS3_1_SG, QT00048965), SORL1 (Hs_SORL1_1_SG, QT00046830), CD133 (Hs_PROM1_1_SG, QT00075586), EGFR (Hs_EGFR_1_SG, QT00085701), ABCB1 (Hs_ABCB1_1_SG, QT00081928), ABCB5 (Hs_ABCB5_1_SG, QT00049448), and SOX2 (Hs_SOX2_1_SG, QT00237601). Gene expression levels were normalized to the housekeeping genes GAPDH and PPIA. Relative quantification was performed using the ΔCT method. The ΔCT value was calculated as the difference between the mean CT of the target gene and the mean CT of the reference genes from triplicate samples. Relative expression levels were expressed as $2^{-\Delta\text{CT}}$ using CFX Manager Software version 2.1 (Bio-Rad).

5.4.6. Human cancer stem cell/drug resistance profiler PCR arrays

Premade RT2 Profiler PCR arrays for Human Cancer Stem Cells (PAHS-176Z) and for Drug Resistance (PAHS-004Z) were purchased from QIAGEN and were used following the manufacturer's instructions. Briefly, the genomic DNA was eliminated before reverse-transcribing 0.5 µg of total RNA using the RT2 First Strand Kit (QIAGEN, 330404). Each plate was used to assess one cDNA sample prepared with the RT2 SYBR Green qPCR Mastermix (QIAGEN, 330502). The real-time PCR system used was CFX (Bio-Rad). The relative expression analysis of 84 genes as well as controls was done through the GeneGlobe analysis center, a website provided by QIAGEN (<https://geneglobe.qiagen.com/us/analyze>), using the standard fold change $2^{-\Delta\Delta CQ}$ method. Ct values were normalized using the geometric mean of internal housekeeping genes present on the array. Analysis was performed using the $\Delta\Delta C_t$ method, with fold-change threshold set at ± 2.0 and p-value < 0.05 considered significant. Based on the overall number of genes and modulation profile, the fold regulation used in the figures for upregulated genes was cutoff > 2 , and for downregulated genes cutoff < -2 .

5.4.7. *In silico* analysis of SORT1 transcript levels in clinical glioblastoma and low-grade glioma tissues.

Transcriptomic data for SORT1 expression in glioblastoma (GBM) and low-grade glioma (LGG) were analyzed using the Gene Expression Profiling Interactive Analysis (GEPIA) web server (<http://gepia.cancer-pku.cn/detail.php>; accessed November 18, 2024). GEPIA integrates RNA sequencing data from The Cancer Genome Atlas (TCGA) and the Genotype-Tissue Expression (GTEx) project, enabling comparative analysis between tumors and normal tissues. For this study, SORT1 expression was compared between GBM samples (n = 163) and normal brain tissues (n = 207), as well as between LGG samples (n = 518) and normal tissues. GEPIA's differential expression analysis tool was used to generate box plots, with one-way ANOVA applied to assess statistical significance across disease states (GBM, LGG, and normal tissue). GEPIA also offers additional functionalities including survival analysis, correlation analysis, and dimensionality reduction, which were available for further exploration.

5.4.8. Transfection and RNA interference

Transient transfection for gene silencing was performed in U87 and U251 glioblastoma (GBM) cell lines using Lipofectamine™ 2000 transfection reagent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), according to the manufacturer's instructions. Cells were transfected with 1–20 nM small interfering RNA (siRNA) targeting either SORT1 (Hs_SORT_5 FlexiTube siRNA, SI03115168) or EGFR (Hs_EGFR_5 FlexiTube siRNA, SI00300104). A non-targeting scrambled siRNA (AllStars Negative Control siRNA, 1027281) was used as a control. All siRNA duplexes, including mismatch controls, were synthesized and

annealed by QIAGEN (Valencia, CA, USA). The efficiency of gene silencing was evaluated by quantitative reverse transcription PCR (RT-qPCR) as described above.

5.4.9. Real-time cell migration assay

Cell migration was assessed using the xCELLigence Real-Time Cell Analyzer (RTCA) Dual-Plate (DP) Instrument (Roche Diagnostics, Laval, QC, Canada), following the manufacturer's protocol. U87 or U251 cells were treated with vehicle control (DMSO) or varying concentrations of the SORT1 inhibitor AF38469. Prior to seeding, the underside of each well in the upper chamber of a CIM-Plate 16 was coated with 0.15% gelatin in PBS and incubated for 1 h at 37 °C. A total of 2.5×10^4 cells per well were seeded into the upper chamber and incubated at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. The lower chamber was filled with either serum-free or serum-enriched medium to establish a chemotactic gradient. After a 30-minute adhesion period, cell migration was monitored in real time for 2 h, with impedance measurements recorded every 5 min. Impedance values, expressed as the Cell Index, reflect the number of cells that migrated through the membrane. All experiments were performed in quadruplicate wells to ensure reproducibility.

5.4.10. Western blot analysis

Total protein lysates were prepared using a lysis buffer supplemented with 1 mM sodium fluoride (NaF) and 1 mM sodium orthovanadate (Na₃VO₄) as phosphatase inhibitors. Protein concentrations were determined, and 10–20 µg of total protein per sample was resolved by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Proteins were then transferred onto polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes. Membranes were blocked for 1 h at room temperature in Tris-buffered saline containing 0.3% Tween-20 (TBST; 150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5; Bioshop, TWN510-500) and 5% nonfat dry milk. After blocking, membranes were washed with TBST and incubated overnight at 4 °C with primary antibodies (1:1,000 dilution) in TBST supplemented with 3% bovine serum albumin (BSA) and 0.1% sodium azide (Sigma-Aldrich), with gentle agitation. Following three washes in TBST, membranes were incubated for 1 h at room temperature with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies (anti-rabbit or anti-mouse IgG; 1:2,500 dilution) in TBST containing 5% nonfat dry milk. Immunoreactive bands were visualized using enhanced chemiluminescence (ECL) detection.

5.4.11. Statistical analysis

All data are presented as the mean $\pm$ standard error of the mean (SEM) from at least three independent experiments, unless otherwise specified. Statistical comparisons were performed using non-parametric tests. For comparisons involving more than two groups, the Kruskal-Wallis test was applied, followed by Dunn's multiple comparisons post hoc test. For two-group comparisons, the Mann-Whitney U test was used. A p-value of less than 0.05 (*) was considered statistically significant and is indicated in the figures. All statistical analyses were conducted using GraphPad Prism version 7 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

5.5. Results

5.5.1. Increased gene expression of EGFR and tetraspanins markers CD9, CD63 and CD81 in glioblastoma tumor tissues.

Transcript levels of *EGFR*, *SORT1*, *NTRK2* and exosomal tetraspanins biomarkers *CD9*, *CD63* and *CD81* were retrieved from clinically annotated glioblastoma (GBM) datasets (n=163) and compared to healthy brain tissues (n=207). *In silico* analyses revealed that *EGFR*, *CD9*, *CD63* and *CD81* were significantly upregulated in GBM tissues (Figure 5.1A). Expression of *SORT1* and *NTRK2*, both suggested to encode proteins that localize within exosomes, was however not different between both tissues possibly due to tumor tissue cell heterogeneity. STRING protein-protein interaction analysis interestingly confirmed *EGFR* as a central node connecting exosomal biomarkers to *SORT1*, and *NTRK2* (Trk-B) suggesting its role in vesicle-mediated intercellular communication and GBM progression (Figure 5.1B). While the primary aim was to link a transcriptional signature phenotype to exosome-associated biomarkers, further exosome characterization would provide additional validation and mechanistic insight. Nevertheless, the inherently correlative *in silico* analyses that we observe were validated in U87-derived exosomes (not shown). These analyses provide a valuable systems-level perspective and help prioritize candidate pathways for future mechanistic validation. *SORT1* expression not statistically different between tumor and normal tissues at the bulk level could be attributed to tumor heterogeneity across GBM subtypes and cellular compartments, including its enrichment in specific tumor cell populations such as GBM stem-like cells (GSC), which may not be captured in bulk tissue comparisons. In contrast, *EGFR* is frequently amplified and overexpressed in a broader subset of GBM cases, leading to more consistent elevation at the population level. Therefore, the differential interpretive approach may reflect the distinct biological and genomic contexts of these genes.

5.5.2. SORT1 expression is upregulated in grade IV glioma cell lines and tumor tissues.

The expression profile of *SORT1*, and its receptor family members (*SORCS1*, *SORCS2*, *SORCS3*, *SORL1*) was assessed across four human grade IV-derived glioma cell lines (U87, U118, U138, and U251). RT-qPCR analysis demonstrated elevated *SORT1* expression in the four cell lines tested (Figure 5.2A), with lower or variable expression levels for related receptors (Supplemental Figure 5.10.). Immunoblotting confirmed SORT1 and EGFR protein expression in these cell lines (Figure 5.2B). Clinical cDNA arrays covering 43 pathologist-verified brain tumor samples showed that *SORT1* gene expression was significantly higher in stage III-IV tumors (red box) compared to stage I-II tumors (green box) (Figure 5.2C, $p < 0.05$). While transcriptional analyses and tumor grade-specific associations were intended as exploratory observations rather than definitive clinical correlations, we nevertheless attempted to validate these findings using publicly available TCGA patient-derived datasets. The expression patterns of *SORT1/EGFR* genes were found to increase across WHO glioma grades II, III, and IV as shown from the violin plots (Figure 5.2D), and statistical significance found to support the trends observed in our experimental data (Figure 5.2E). This strengthens the translational relevance of our findings.

5.5.3. *In vitro* vasculogenic mimicry of glioblastoma cells.

The ability of GBM cells to form *in vitro* VM was tested using a commercial Cultrex basement membrane extract. Among the tested cell lines, U87 and U251 were able to form capillary-like structures, while U118 and U138 cells were less efficient under the same conditions (not shown). Using U87 cells, three different cell densities (5,000, 10,000 and 20,000 cells per well) were tested to optimize and monitor structure formation for up to 10 h (Figure 5.3A). VM parameters, including total tube length, branching points and total tubes increased progressively over 10 h (Figure 5.3B), as quantified by Wimasis analysis (Figure 5.3C).

5.5.4. Silencing of SORT1 disrupts VM in glioblastoma cells.

To evaluate the functional role of SORT1 in VM, transient siRNA-mediated silencing of *SORT1* was performed in U87 and U251 cells. SORT1 gene expression levels were validated by RT-qPCR, which confirmed a significant reduction in *SORT1* transcripts (Figure 5.4A). Immunoblotting further revealed decreased SORT1 (using antibodies recognizing either the extracellular or the intracellular domains) and EGFR protein expressions in siSORT1-transfected cells (Figure 5.4B). EGFR decrease upon SORT1 silencing was also validated in U251 cells (Supplemental Figure 5.11). VM formation was impaired in siSORT1-transfected cells (Figure 5.4C) with reduced total loops and loop areas in a dose-dependent manner, as quantified by Wimasis analysis (Figure 5.4D). We did not include a scrambled siRNA control because prior VM optimization experiments have consistently shown that the scrambled sequence used in

our system did not elicit any measurable effects. We also note that the observed effects of siSORT1 on VM were robust and consistent across multiple assays, further supporting the specificity of the response.

5.5.5. Pharmacological inhibition of SORT1 reduces glioblastoma cell migration.

The effects of the SORT1 functional inhibitor AF38469 on glioblastoma cell migration were assessed using the xCELLigence system. A screen was first attempted with U87 cells treated with increasing concentrations of AF38469 and which exhibited a dose-dependent inhibition of cell migration in response to serum stimulation (Figure 5A). IC₅₀ values of AF38469 were further extracted from the inhibition curves for U87 and U251 cells and found to be in the low μ M range (0.32–1.75 μ M) confirming the pharmacological efficacy in reducing cell migration (Figure 5B). Similarly, siRNA-mediated silencing of SORT1 significantly reduced cell migration under serum-induced chemotactic conditions in U87 and U251 cells (Figure 5C). AF38469-mediated SORT1 functional inhibition was also found to alter dose-dependently VM formation albeit at low nM concentrations (1.06–1.45 nM) suggesting that SORT1 functions may be more sensitive to pharmacological targeting than the subsequent cell chemotaxis (Supplemental Figure 5.12).

5.5.6. SORT1 silencing alters EGFR expression.

To investigate the regulatory relationship between SORT1 and EGFR, lysates from U87 cells transfected with siSORT1 were analyzed for EGFR protein expression. Immunoblotting revealed a reduction in EGFR protein levels in 10-20 nM siSORT1 transfected cells (Figure 5.6A). Densitometric analysis further showed a significant decrease in both SORT1 and EGFR protein expression at these concentrations highlighting a dose-dependent regulatory relationship between the two proteins (Figure 5.6B). It is important to note that the relationship between gene knockdown efficiency and phenotypic response is not always linear. While SORT1 protein levels may appear substantially reduced at lower doses, residual expression or functional activity may still be sufficient to partially sustain VM. The dose-dependent reduction in VM observed in Fig. 5.4D likely reflects a threshold effect, where incremental decreases in SORT1 expression progressively impair VM capacity until a critical level is reached. Additionally, differences in assay sensitivity and timing between Figures 5.4D and 5.6A may contribute to this apparent discrepancy. Figure 5.6A reflects endpoint protein levels, while Figure 5.4D captures a dynamic, functional phenotype that may be influenced by cumulative effects over time.

5.5.7. Impact of SORT1 and EGFR gene silencing upon the transcriptomic drug resistance and cancer stem cells signature of VM in U87 glioblastoma cells.

To monitor the impact of SORT1 or EGFR silencing upon VM, transient siRNA-mediated gene silencing of SORT1 or EGFR was performed in U87 glioblastoma cells and total RNA extracted upon 3D VM and RT-qPCR performed using a RT² gene array. Expression was compared to 2D U87 cell monolayers. The gene expression profiles of 84 drug resistance genes are represented (Figure 5.7A, upper/lower panel in black). The impact of SORT1 silencing (Figure 5.7A, upper panel, red), and of EGFR silencing (Figure 5.7A, lower panel, green) is shown. The extent of gene inhibition of the respective silencing of SORT1 or EGFR is further presented (Figure 5.7B) and shows a tendency for genes to share common inhibitory profiles in response to either silencing. A protein-protein interaction profiling is represented with the top 15 genes inhibited both upon EGFR and SORT1 silencing and confirms their inter-relationship in the drug resistance phenotype (Figure 5.7C). Similarly, an approach to screen for the acquisition of a CSC molecular signature was performed where the respective silencing of either SORT1 (Figure 5.8A, upper panel) or EGFR (Figure 5.8A, lower panel) reduced the up- or down-regulation profiles of genes upon VM. Inhibitory correlation confirms that similar genes are regulated by both SORT1 and EGFR (Figure 5.8B), and that they are part of a coherent CSC phenotypic inter-relationship (Figure 5.8C). In the future, RNA-seq would offer a comprehensive and unbiased approach to the transcriptomic profiling we performed herein and could reveal additional pathways and targets regulated by SORT1. Finally, a validation of drug resistance and CSC gene expression upon VM in siSORT1-transfected U87 glioblastoma cells confirms several of the genes identified from the screen performed above (*SORT1*, *ABCB1*, *ABCB5*, *PROM1*, and *SOX2*). Transient siRNA-mediated gene silencing of SORT1 was performed at two concentrations (1 and 20 nM) and RT-qPCR performed to assess the indicated genes upon VM (3D, black bars) or monolayers (2D, white bars) (Figure 5.9A and 5.9B). Additional functional validation should help confirm the biological relevance of these gene expression changes. Given the scope and focus of the current study, we prioritized transcriptomic profiling to identify key regulatory patterns and generate hypotheses for future mechanistic exploration.

5.6. Discussion

SORT1 is involved in various cellular processes, including intracellular trafficking and signaling regulation (Mitok et al., 2022) and it is suggested to contribute to the acquisition of chemoresistance in GBM (Marsland et al., 2023). Such resistance to therapeutic stress is a common feature of the tumor's adaptive capacity, enabling the cancer cells to evade apoptosis in order to survive under treatment conditions. SORT1 may also influence chemoresistance by modulating key signaling pathways and trafficking of membrane receptors such as EGFR, which promote cell survival and proliferation, counteracting the effects of chemotherapy. Ultimately, the combined regulation of chemoresistance and CSC phenotypes could collectively affect the tumor microenvironment as SORT1's role in cellular communication might further enable GBM cells adapt to and thrive in hostile conditions triggered by treatment. Here, we addressed an intricate role of SORT1/EGFR interplay emphasizing their contribution to GBM therapy resistance, in part through VM, and highlighting their potential as therapeutic targets. Given no endothelial cells or co-culture systems was used herein, the vascular-like structures observed were formed exclusively by GBM cells, consistent with established in vitro models of VM. The experimental context of our study, lacking any endothelial cell input, supports the interpretation that these structures are tumor cell derived.

The basis of the EGFR and SORT1 functional interaction in GBM lies in their converging roles in promoting tumor progression and resistance to therapy. As EGFR is frequently altered in GBM (Li et al., 2023), driving oncogenic signaling that supports tumor growth, survival, and resistance to treatments (Zahonero et al., 2014), we demonstrated here for the first time that SORT1 could alter EGFR expression at both transcriptional and translational levels. Such molecular interplay was further proved to significantly impact the capacity to perform VM, a process closely linked to chemoresistance and especially to CSC phenotype (Luo et al., 2020). Molecular evidence has shown that EGFR plays a significant role in regulating CSC markers expression, thereby contributing to tumor initiation, progression, and resistance to therapy (Uribe et al., 2021). Notably EGFR activation has been linked to upregulation of stemness genes such as SOX2, OCT4, and NANOG (Abhold et al., 2012; Rybak et al., 2013). These markers are crucial for maintaining the self-renewal and tumorigenic potential of CSC. Studies have also demonstrated that EGFR activation enhances the ability of cancer cells to form tumorspheres, a characteristic feature of CSC (Álvarez-Teijeiro et al., 2018). This process is accompanied by increased expression of CSC markers like CD44 and BMI-1 (Chen et al., 2017). In addition, EGFR-driven CSC exhibit resistance to conventional therapies, including chemotherapy and radiotherapy (Carnero et al., 2016). Interestingly, while the GBM cell lines used in our study do not harbor EGFR amplification, which is a common feature in a subset of primary GBM tumors, one can conclude that our findings regarding EGFR do not solely dependent on

amplification status but rather focus on its expression dynamics and potentiation regulation by SORT1. EGFR signaling can be active and biologically relevant even in the absence of gene amplification, particularly through ligand-mediated activation or post-transcriptional regulation. Our data suggest that SORT1 may influence EGFR-related pathways through such mechanisms, which are still clinically relevant. Future studies using EGFR-amplified models (e.g., patient-derived xenografts or primary cultures) will be essential to further validate and extend these findings. To provide more direct mechanistic evidence that would further strengthen the proposed relationship between SORT1 and EGFR trafficking, co-immunoprecipitation, proximity ligation assay, or trafficking studies could be pursued in future work.

Our study is the first to demonstrate that the SORT1/EGFR interplay orchestrates the parallel transcriptional regulation of both CSC-related phenotype (CD133/PROM1, SOX2, CD44, ABCB5) and chemoresistance-associated phenotype (BCL2, ABCB1, ABCG2, HIF1A). Supporting our results, previous studies have reported that CD133 + GBM stem-like cells are capable of initiating VM *in vivo* (Chiao et al., 2011). Together, these findings highlight the critical role of EGFR regulation in modulating CSC features that drive VM and suggest that targeting the SORT1/EGFR interplay could be a promising strategy to counteract CSC-driven tumor progression and treatment resistance in GBM. Validation of CSC properties will further require functional assays such as sphere formation, limiting dilution, or tumor initiation studies. Here, we used PROM1/CD133 and SOX2 as established molecular biomarkers to infer stem-like characteristics, based on their well-documented association with GBM stem-like cells in the literature. While we did not perform functional CSC assays in this study, our intention was to highlight transcriptional trends suggestive of a stem-like phenotype rather than to definitively classify cells as CSCs. Future studies will also be needed to functionally validate the CSC potential of these populations. Direct mechanistic experiments including EGFR promoter reporter assays, mRNA stability assays, and rescue assays should provide valuable future confirmation of the interaction between SORT1 and EGFR, and a better understanding of the SORT1/EGFR axis.

SORT1-mediated mechanisms, particularly their role in the regulation of extracellular vesicle secretion, have been associated with therapy resistance and with the expansion of CSC populations (Yamamoto et al., 2022). In addition, SORT1's role in secretion-induced progranulin pathways has been shown to promote CSC expansion in breast cancer (Rhost et al., 2018). As molecular evidence also supports a role for SORT1 in CSC biology through the increased expression of CSC markers such as CD133 (Ahn et al., 2024; Gao et al., 2022), we further demonstrate a link between SORT1 expression and VM, suggesting that SORT1 contributes to GBM plasticity and CSC-driven vascularization. Interestingly, EGFR has also been found to locate in exosomes secreted by cancer cells. These EGFR-containing exosomes can play a crucial role in

tumor progression, metastasis and drug resistance (Wilson et al., 2014). For instance, studies have shown that exosomes derived from EGFR-mutated lung cancer cells carry EGFR, which enhances tumor growth and therapy resistance (Jouida et al., 2021; Rao et al., 2023). Exosomal wild-type EGFR has also been shown to be transferred between cells, contributing to acquired resistance against targeted therapies like osimertinib in non-small cell lung cancer (Wu et al., 2021). These findings underscore the potential of both exosomal EGFR as well as SORT1 as biomarkers for early cancer detection and prognosis.

The role of extracellular vesicles and biomimetic nanoplateforms in targeting GBM via the EGFR axis could become an important emerging area that aligns directly with our findings. A recent study by Cheng et al. demonstrates how engineered extracellular vesicles targeting EGFR-positive GBM provide a novel and safe delivery strategy for overcoming therapy resistance (Cheng et al., 2025). This work reinforces the therapeutic relevance of the EGFR axis and supports the current proposition that vesicle-mediated communication and receptor trafficking are promising therapeutic avenues.

While our findings suggest that exosome-mediated regulation may be involved in these phenotypes, we did not directly isolate or characterize exosomes in this study. This decision was based on the scope of our investigation, which focused on transcriptional profiling and *in vitro* functional assays to uncover key regulatory mechanisms. Direct exosome isolation, characterization (e.g., nanoparticle tracking analysis, Western blot for exosomal markers), and functional assays (e.g., exosome transfer experiments) will become important future directions. By identifying SORT1- and EGFR-associated transcriptional signatures and functional outcomes, our study provides a foundation for future investigations in the role of exosomes in GBM progression. We believe these findings may help guide more targeted mechanistic studies, including those focused on extracellular vesicle biology. From a therapeutic standpoint, targeting SORT1 has shown promise. Studies have demonstrated that either silencing SORT1 or delivering peptide-drug conjugates directed against SORT1 can inhibit CSC-associated VM and circumvent drug resistance (Charfi et al., 2021). Collectively, these observations position SORT1 not only as a marker of CSC-driven progression and resistance, but also as a viable therapeutic target in GBM and potentially other aggressive SORT1-positive cancers.

5.7. Conclusion

Although the direct interactions between EGFR and SORT1 have been inferred but not fully characterized, emerging evidence suggests that their pathways may converge to drive tumor aggressiveness. SORT1 is involved in the turnover of EGFR at the plasma membrane, and its expression was reported to increase in EGFR-overexpressing tumors and in patients with *EGFR* amplification (Al-Akhrass et al., 2017). The impact of SORT1 silencing on VM inhibition therefore reconciles with the fact that downregulation of SORT1 affects EGFR internalization. EGFR activation can influence downstream pathways that SORT1 might also regulate, such as those involved in cell survival and proliferation. Accordingly, SORT1 expression in tumors potentially represents a useful predictive marker of patient outcome. Both EGFR and SORT1 are associated with mechanisms that enable GBM cells to evade the effects of chemotherapy and targeted therapies. Further research is required to clarify how the EGFR/SORT1 interplay impacts the cancer cell transcriptional reprogramming, and whether targeting the EGFR/SORT1 axis may represent a novel therapeutic avenue to overcome resistance and improve clinical outcomes in GBM patients. In terms of limitations, while we acknowledge the importance of *in vivo* validation to further substantiate the clinical relevance of our *in vitro* findings, such experiments would fall outside the scope of our current molecular study. Nonetheless, we are convinced that our findings provide a strong foundation for future *in vivo* investigations, and we hope they will serve as a valuable reference for subsequent translational research.

FIGURES

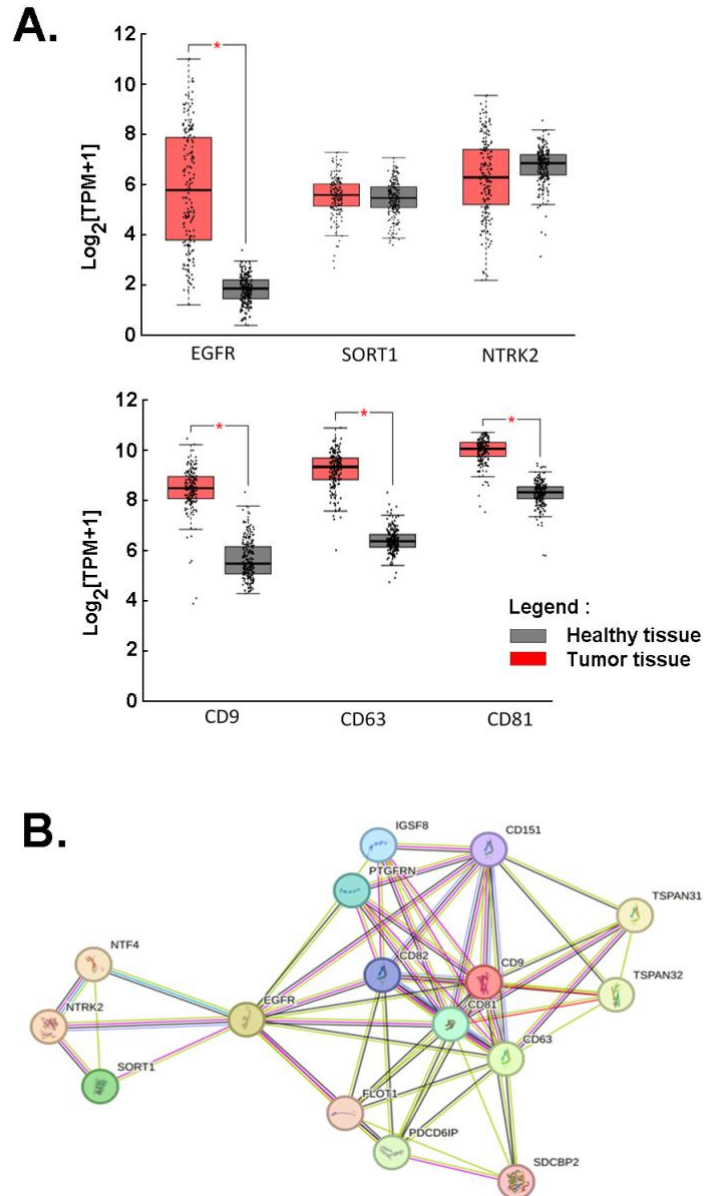


Figure 5.1. Increased gene expression of EGFR and exosomal markers CD9, CD63 and CD81 in clinically annotated glioblastoma tumor tissues. **(A)** *In silico* analysis of transcript levels was performed using total RNA extracted from glioblastoma clinical samples (n = 163; red boxes) and compared to healthy tissues (n = 207; grey boxes), (**p* < 0.05). **(B)** Indirect target proteins of *EGFR* were retrieved from STRING as described in the Methods section.

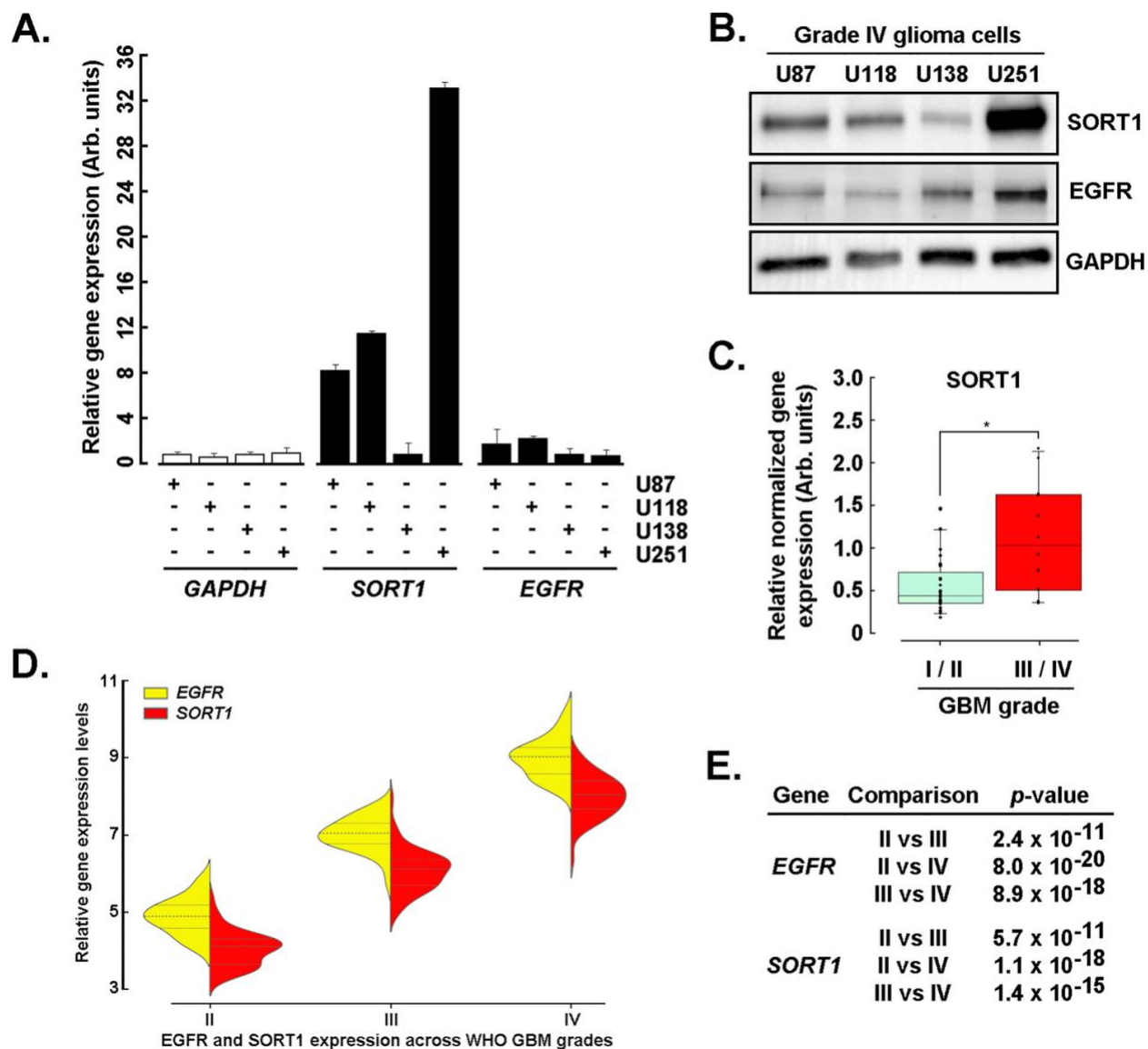


Figure 5.2. Expression profile of SORT1 and EGFR in grade IV glioma cell lines and tissues. **(A)** Total RNA was extracted from the indicated four different human grade IV glioma cell lines. The gene expression levels of SORT1 and EGFR were assessed using RT-qPCR. **(B)** Total protein lysates were isolated from the four glioblastoma cell lines, and representative immunoblots of SORT1, EGFR, and GAPDH are presented from three independent experiments. **(C)** A cancer tissue cDNA array covering 43 clinical samples of pathologist-verified brain cancer tissues was analyzed for SORT1 gene expression by qPCR for stages I and II (green box) and for stages III and IV (red box). (* $p < 0.05$). **(D)** Violin plots displaying the distribution of EGFR and SORT1 expression levels across WHO glioma grades (II, III, IV) based on TCGA-like data reveal a clear and **(E)** statistically significant increase in expression with advancing tumor grade. Inner lines represent the quartiles of each distribution.

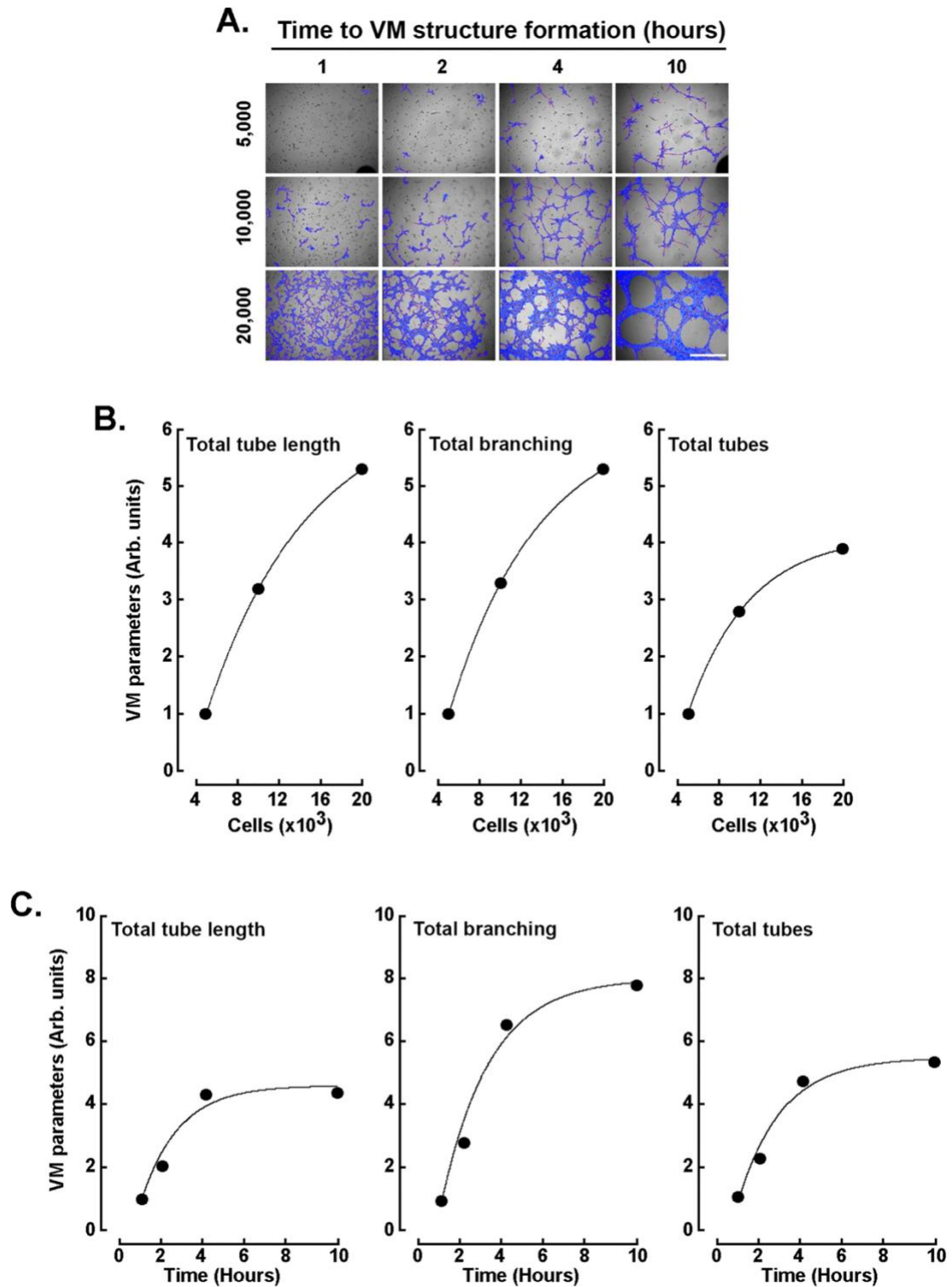


Figure 5.3. *In vitro* human analysis of the U87 human glioblastoma cell line's capacity to form capillary-like structures on Cultrex. Cells were trypsinized and seeded on top of Cultrex to generate three-dimensional capillary-like structures as described in Methods section. (A) Representative phase-contrast

images were captured and Wimasis analysis (represented in blue) on the structures was performed. Three different cell densities were used and structure formation monitored for up to 10 hours. Scale bar = 1000 μm . **(B)** VM parameters were extracted from the Wimasis analysis of (A) and representative quantification provided for total tube length, total branching and total tubes as a function of cell density. **(C)** VM parameters were extracted from the Wimasis analysis of (A), with representative quantification provided for total tube length, total branching and total tubes as a function of time during structure formation.

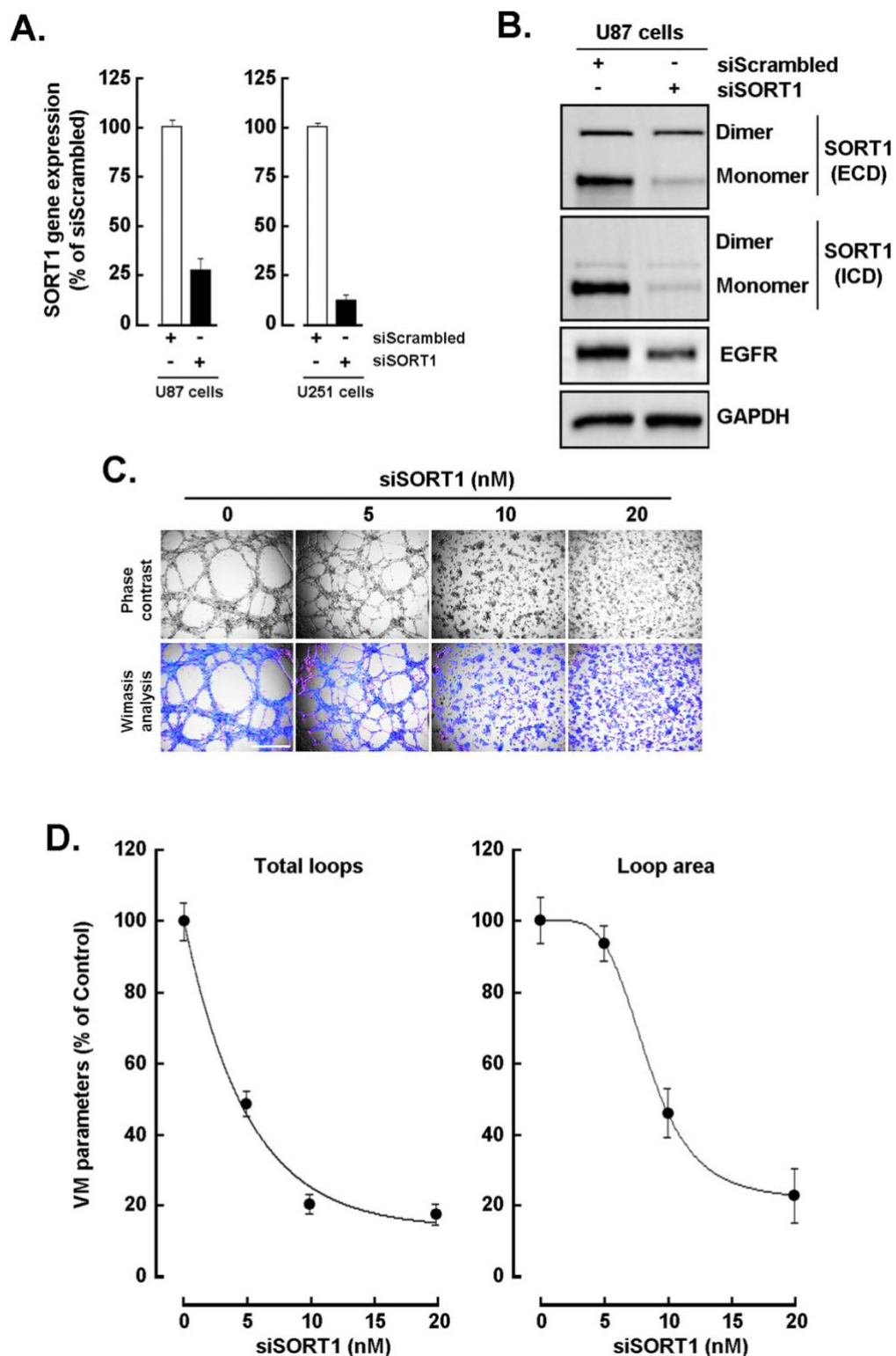


Figure 5.4. Silencing of SORT1 alters *in vitro* VM in glioblastoma cells. **(A)** Transient gene silencing was performed using 20 nM siRNA for *SORT1* (siSORT1) silencing or a non-specific scrambled sequence (siScrambled) in U87 and U251 glioblastoma cells and confirmed by RT-qPCR. **(B)** Total protein lysates

were isolated from the two transfected glioblastoma cell lines, and representative immunoblots of SORT1 (anti-ECD, Ab recognizing the extracellular domain of SORT1 and anti-ICD, Ab recognizing the intracellular domain of SORT1), EGFR, and GAPDH are presented from three independent experiments. **(C)** U87 cells were transfected with the indicated siRNA concentrations, trypsinized, and seeded on top of Cultrex to monitor three-dimensional capillary-like structure formation as described in the Methods section. Representative phase-contrast images were captured at 24 hours (upper panels), and Wimasis analysis (lower panels) was performed on the structures. **(D)** VM parameters were extracted from the Wimasis analysis of (C), with representative quantification provided for total loops, and loop areas as a function of the indicated siSORT1 concentrations.

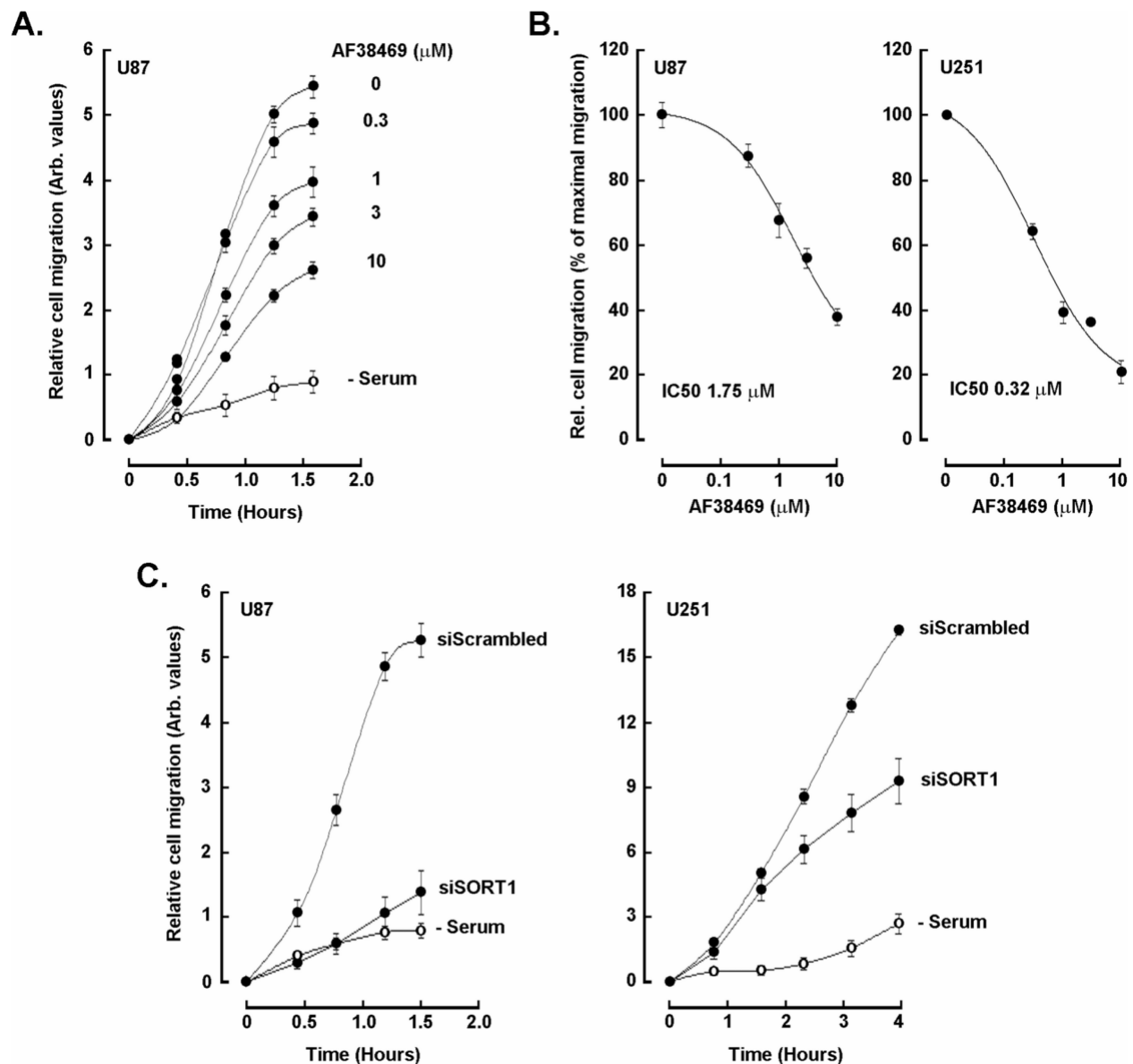


Figure 5.5. Pharmacological targeting of Sortilin function inhibits U87 and U251 glioblastoma cell migration. **(A)** U87 glioblastoma cells were trypsinized and resuspended in the indicated concentrations of Sortilin functional inhibitor AF38469. Treated cells were then assessed for real-time migration using the xCELLigence system in response to serum (closed circles). The absence of serum was performed to assess basal cell migration under no chemotactic cues (open circles). **(B)** IC_{50} values from the respective cell migration were extracted from (A) for U87 and U251 glioblastoma cells at the indicated AF38469 concentrations. **(C)** Transient siRNA-mediated gene silencing of *SORT1* (siSORT1) or a non-specific scrambled sequence (siScrambled) was performed in U87 and U251 glioblastoma cells. Transfected cells were further assessed for real-time cell migration using the xCELLigence system in response to serum (closed circles) in U87 (left panel) and U251 (right panel) cells

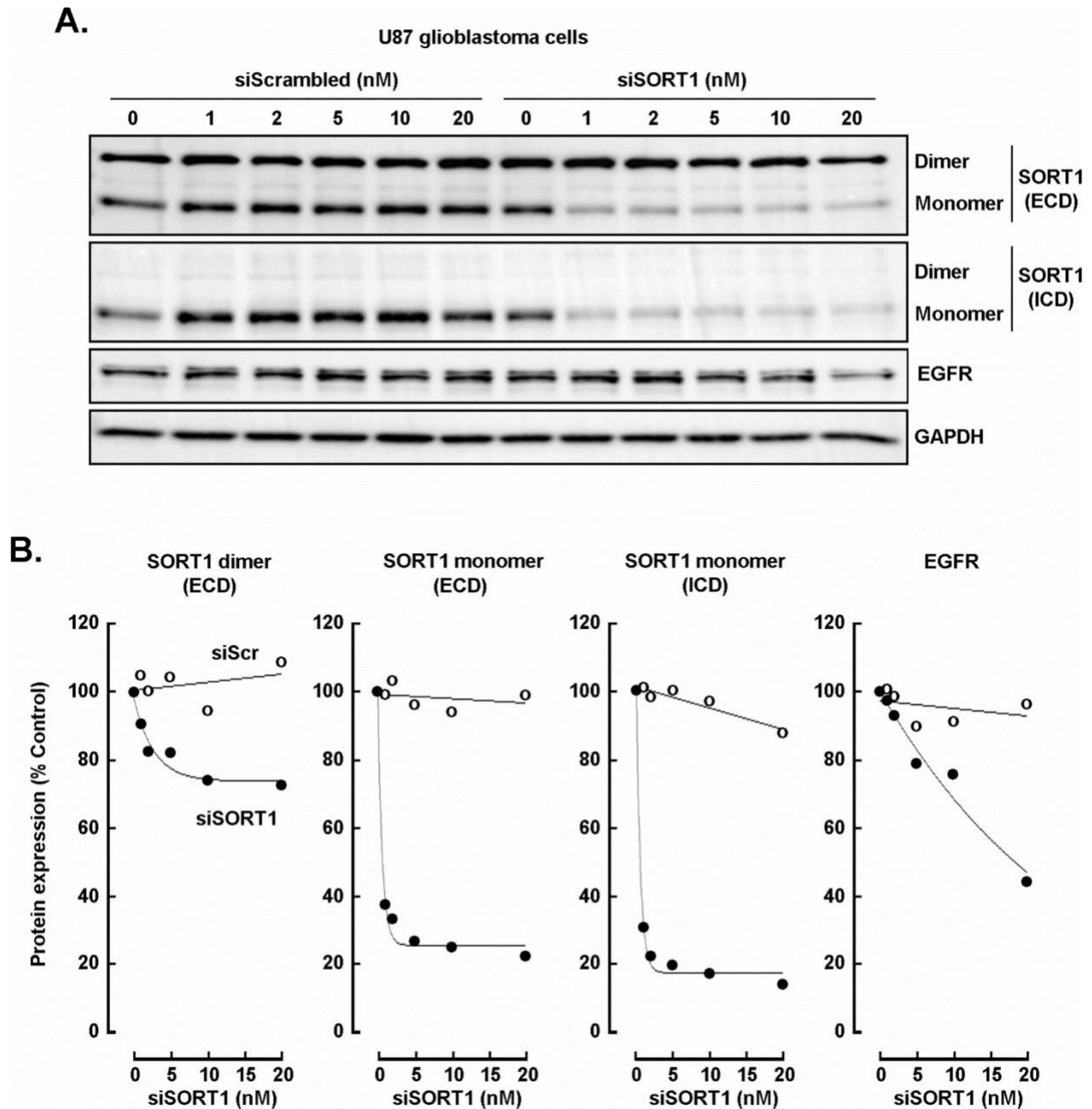


Figure 5.6. SORT1 expression levels impact EGFR expression in U87 glioblastoma cells. **(A)** Transient siRNA-mediated gene silencing was performed with increasing concentrations of siSORT1 or a non-specific scrambled sequence (siScrambled) was performed in U87 glioblastoma cells. Total protein lysates were isolated from the transfected cells, and representative immunoblots of SORT1 (anti-ECD and anti-ICD), EGFR, and GAPDH are presented. **(B)** A representative densitometry quantification of protein expression of (A) was performed using the ImageJ software for SORT1 (anti-ECD and anti-ICD) dimer and monomer forms as well as for EGFR and is presented as a function of siSORT1 concentrations.

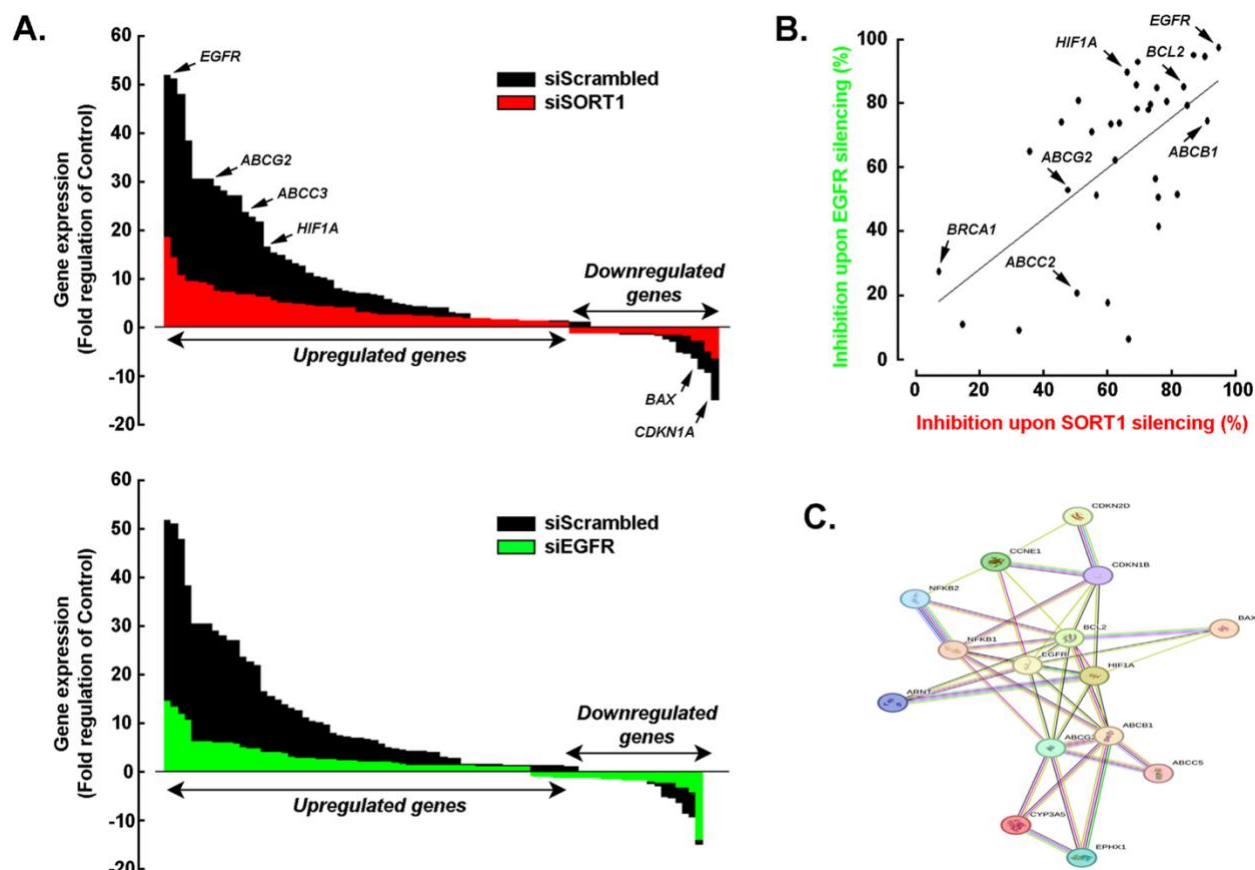


Figure 5.7. Impact of SORT1 and EGFR gene silencing upon the transcriptomic drug resistance signature of VM in U87 glioblastoma cells. Transient siRNA-mediated gene silencing of (A) SORT1 (red plot, upper panel) or EGFR (green plot, lower panel) was performed in U87 glioblastoma cells and total RNA extracted upon VM and RT-qPCR performed a RT² gene array. Expression was compared to their respective U87 cell monolayers. The gene expression profiles of 84 drug resistance genes are represented. (B) The extent of gene inhibition of the respective silencing of SORT1 or EGFR is presented. (C) A protein-protein interaction profiling is represented with the top 15 genes inhibited both upon EGFR and SORT1 silencing.

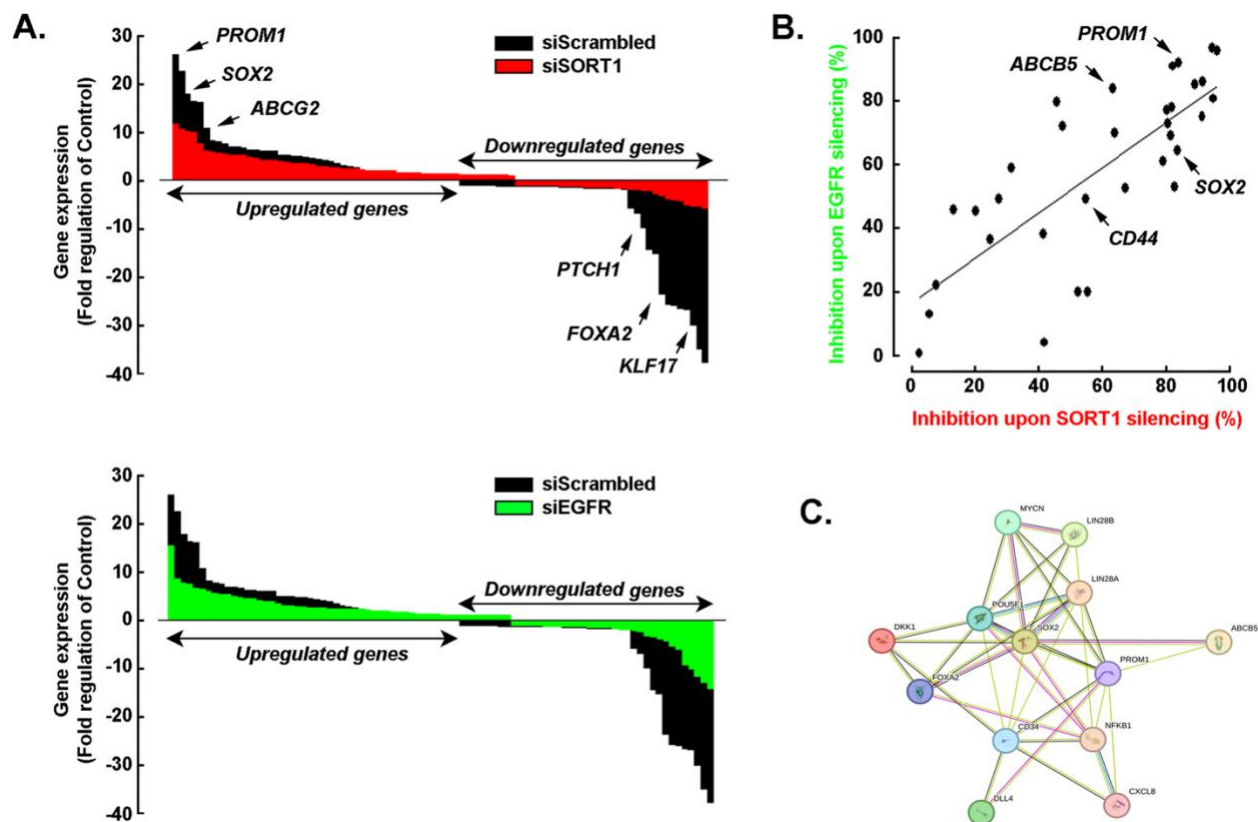


Figure 5.8. Impact of SORT1 and EGFR gene silencing upon the transcriptomic cancer stem cells signature of VM in U87 glioblastoma cells. Transient siRNA-mediated gene silencing of (A) SORT1 (red plot, upper panel) or EGFR (green plot, lower panel) was performed in U87 glioblastoma cells and total RNA extracted upon VM and RT-qPCR performed a RT² gene array. Expression was compared to their respective U87 cell monolayers. The gene expression profiles of 84 drug resistance genes are represented. (B) The extent of gene inhibition of the respective silencing of SORT1 or EGFR is presented. (C) A protein-protein interaction profiling is represented with the top 15 genes inhibited both upon EGFR and SORT1 silencing.

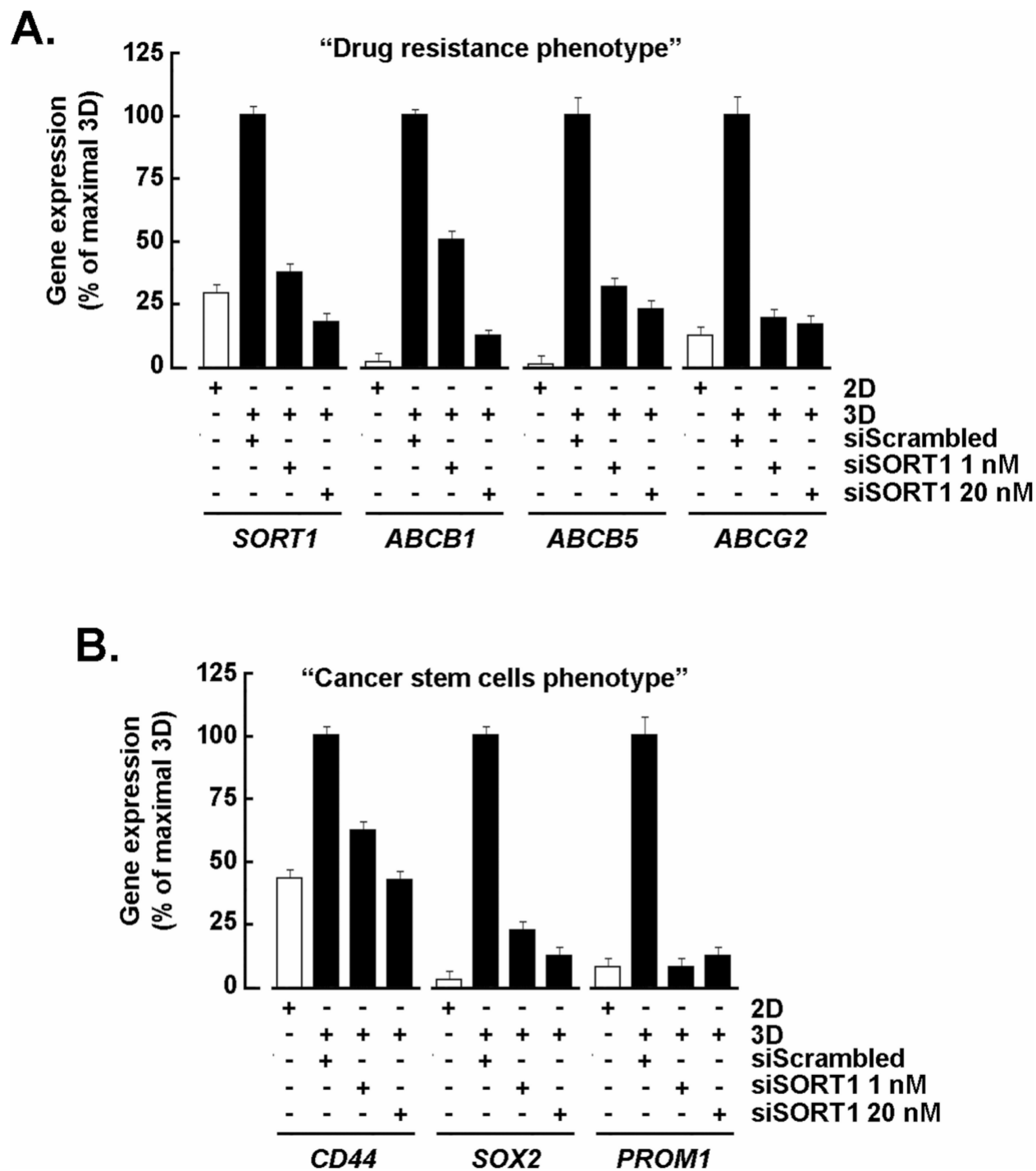


Figure 5.9. RT-qPCR validation of drug resistance and cancer stem cells gene expression upon VM in siSORT1 -transfected U87 glioblastoma cells. Transient siRNA-mediated gene silencing of SORT1 was performed at two concentrations (1 and 20 nM) in U87 glioblastoma cells and total RNA extracted upon VM and RT-qPCR performed to assess the indicated genes upon VM (3D, black bars) or monolayers (2D, white bars) in (A) drug resistance phenotype, and (B) cancer stem cells phenotype.

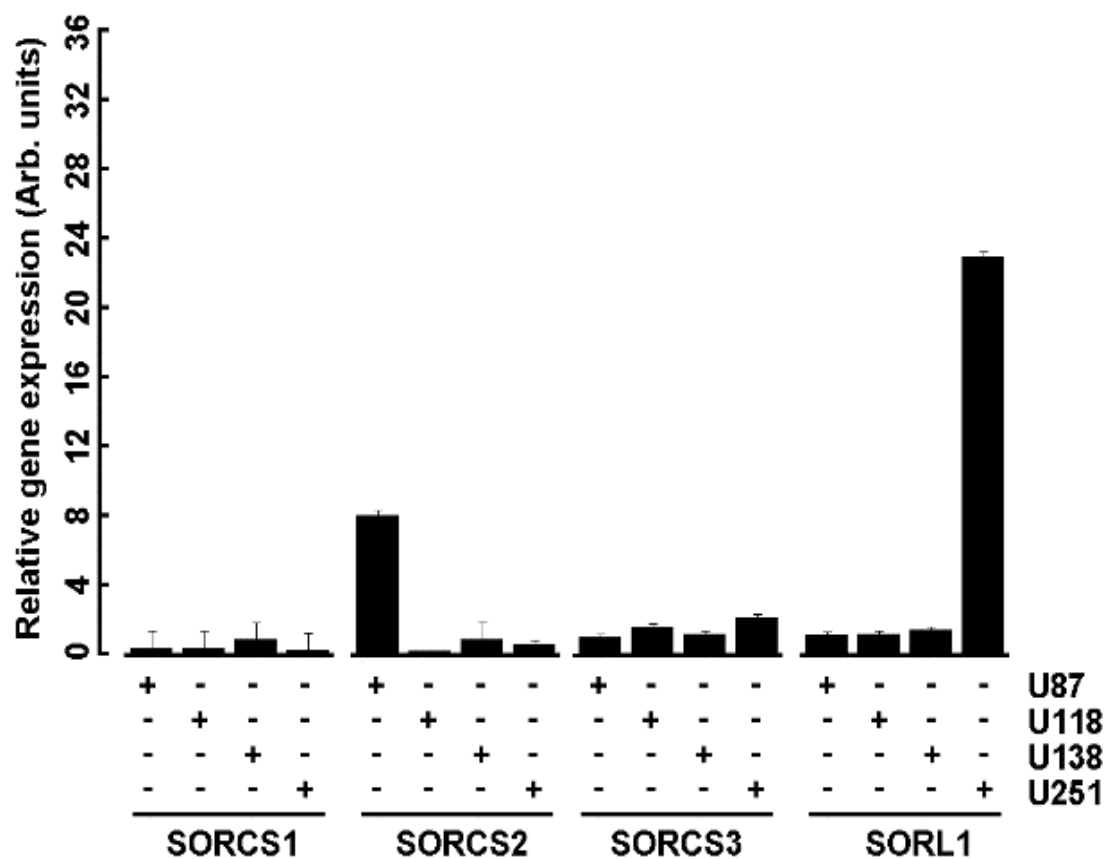


Figure supplémentaire 5.10. Expression profile of SORCS1, SORCS2, SORCS2, and SORL1 transcripts in glioblastoma cell lines and tissues. Total RNA was extracted from the indicated four different human glioblastoma cell lines. The gene expression levels of SORCS1, SORCS2, SORCS2, and SORL1 were assessed using RT-qPCR.

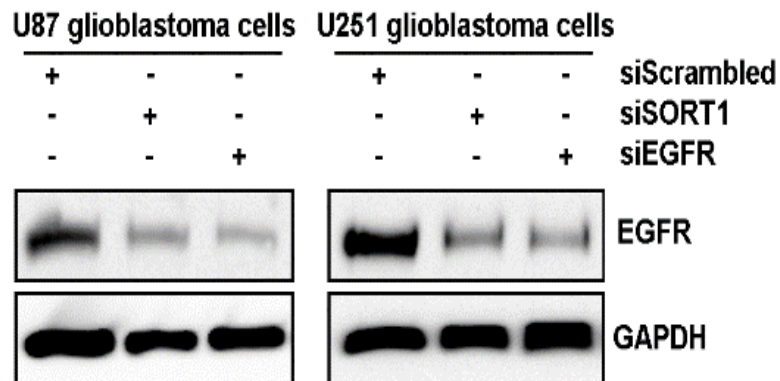


Figure supplementaire 5.11. Silencing of SORT1 or EGFR alters EGFR in U87 and U251 glioblastoma cells. Transient gene silencing was performed using 20 nM siRNA for SORT1 (siSORT1) or for EGFR (siEGFR) silencing or a non-specific scrambled sequence (siScrambled) in U87 and U251 glioblastoma cells. Total protein lysates were isolated from transfected cells, and representative immunoblots of EGFR and GAPDH expression are presented from three independent experiments.

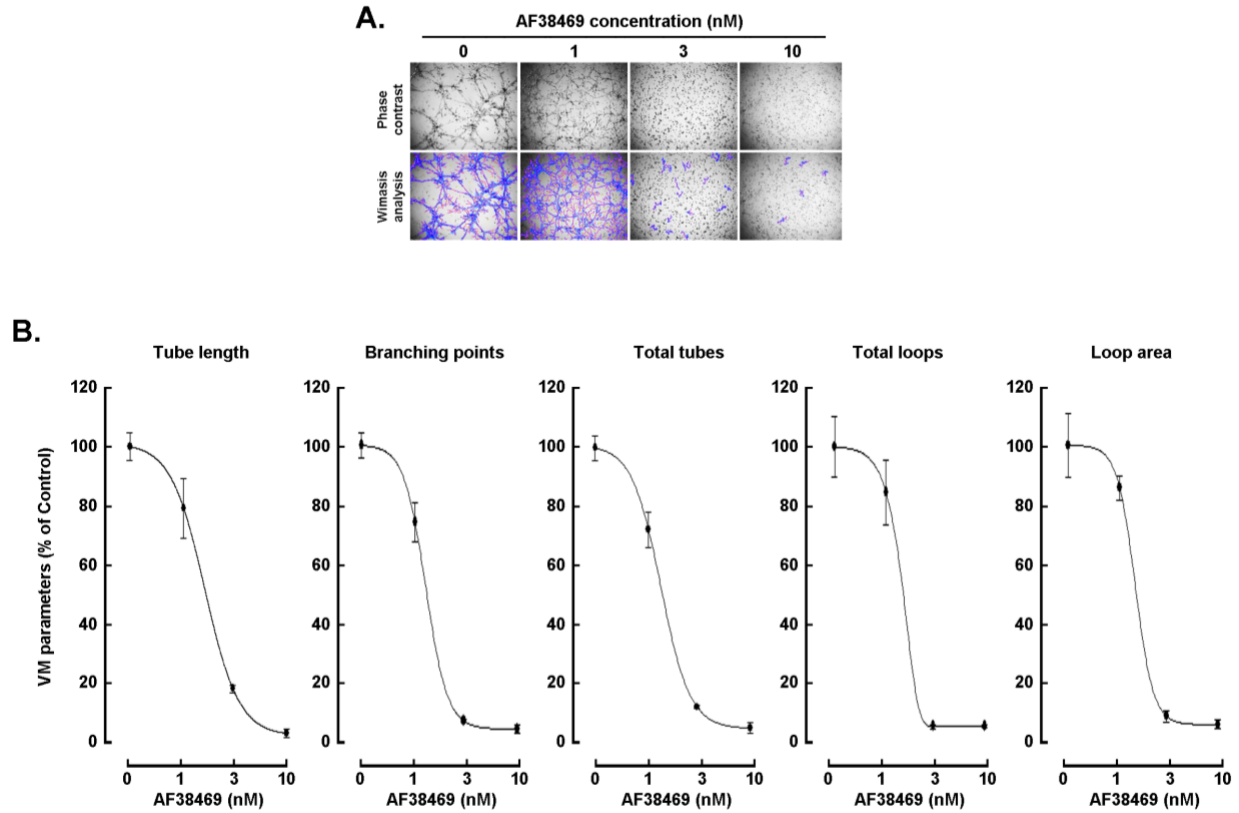


Figure supplementaire 5.12. Pharmacological targeting of Sortilin function inhibits VM in U87 glioblastoma cells. (A) U87 glioblastoma cells were trypsinized and resuspended in the indicated concentrations of Sortilin functional inhibitor AF38469. U87 cells were next seeded on top of Cultrex to monitor three-dimensional capillary-like structure formation as described in the Methods section. Representative phase-contrast images were captured at 24 hours (upper panels), and Wimasis analysis (lower panels) was performed on the structures. (B) VM parameters were extracted from the Wimasis analysis of (A), with representative quantification provided as a function of the indicated AF38469 concentrations.

CHAPITRE 6

DISCUSSION GÉNÉRALE

Le GBM est l'un des cancers les plus redoutables en termes de traitement en raison de son agressivité, de son hétérogénéité intratumorale et de sa capacité à contourner les stratégies thérapeutiques. Malgré une prise en charge multimodale, le pronostic reste extrêmement limité, notamment en raison de la présence de populations cellulaires hautement plastiques capables d'échapper aux mécanismes de contrôle thérapeutique (Costantini *et al.*, 2025). Parmi les mécanismes d'adaptation identifiés, le VM émerge comme une stratégie clé par laquelle les cellules tumorales assurent leur survie et leur expansion via la formation de structures de type capillaires indépendantes des cellules endothéliales (Beylerli *et al.*, 2025).

Cette thèse s'inscrit dans un contexte où l'identification de nouveaux mécanismes moléculaires du VM et la compréhension de leur régulation contextuelle dans le GBM constitue une priorité de recherche. En effet, le VM est associé à une hypoxie persistante, une chimiorésistance accrue et une progression tumorale rapide, en faisant un marqueur d'agressivité clinique. Afin d'éclairer les bases moléculaires de ce processus, ce travail a exploré l'implication de plusieurs axes de signalisation clés, JAK/STAT3, Hippo/YAP/TEAD, EGFR/SORT1 ainsi que le rôle des MSC dans l'induction et la régulation du VM.

Les résultats obtenus suggèrent que ces voies ne fonctionnent pas indépendamment, mais s'intègrent dans un réseau complexe d'interactions permettant aux cellules tumorales d'adapter leur comportement en réponse à un environnement hostile. Le microenvironnement tumoral, en particulier sous conditions d'hypoxie et de remodelage matriciel, active des programmes transcriptionnels spécifiques qui soutiennent la transition vers un phénotype vasculogénique. Cette plasticité s'accompagne d'une modulation du métabolisme énergétique, d'une résistance accrue à l'apoptose et d'un renforcement des interactions cellule-matrice, conférant un avantage de viabilité considérable aux sous-populations capables de VM.

Les résultats présentés mettent en lumière le rôle multifactoriel des MSC, la convergence des voies signalétiques pro-survie, et les implications biologiques et cliniques du VM dans les GBM.

6.1 Synthèse intégrative des principaux résultats

Les articles présentés ont permis de mettre en avant trois axes moléculaires majeurs impliqués dans la régulation du VM. Dans un premier temps, l'étude du rôle des MSC a révélé que leur culture sur une matrice extracellulaire tridimensionnelle induit une réorganisation tubulaire de type VM. Cette observation suggère que dans un microenvironnement tumoral permissif, les MSC peuvent adopter un phénotype distinct via des signaux paracrines et des adaptations transcriptionnelles spécifiques.

L'analyse transcriptomique a mis en évidence une activation de la voie JAK/STAT3 corrélée à l'augmentation de l'expression des régulateurs SNAI1, FOXC2 et RPSA. Si les deux premiers sont classiquement associés à l'EMT et la plasticité cellulaire, RPSA apparaît particulièrement intéressant en raison de son double rôle comme protéine ribosomale et médiateur extra-ribosomal impliqué dans la liaison à la laminine, l'adhésion cellulaire, la migration tumorale et la signalisation pro-survie. Dans le contexte du GBM, son expression accrue pourrait renforcer les interactions cellule-matrice et faciliter l'acquisition d'un phénotype pseudo-endothélial propice au VM (Pesepane *et al.*, 2017; Gresseau *et al.*, 2024). Cette activation est accompagnée d'une modulation significative d'IL6 et d'IL1b ainsi que des CSF1 et CSF2, établissant un lien direct entre la signalisation inflammatoire et le programme vasculogénique. Nos résultats suggèrent que RPSA pourrait agir comme un relais entre l'activation inflammatoire (JAK/STAT3) et la mise en place de programmes favorisant l'invasion et le remodelage vasculaire tumoral. De plus, l'inhibition pharmacologique et génétique de STAT3 s'accompagne d'une diminution de l'expression de RPSA, ce qui laisse entrevoir que son ciblage combiné pourrait renforcer l'effet anti-VM des inhibiteurs de STAT3.

Sur le plan pharmacologique, l'utilisation d'un inhibiteur de JAK2, l'AG490, a permis de bloquer l'activation de STAT3 entraînant une réduction importante de la formation du VM *in vitro*. De façon complémentaire, la transfection des MSC avec un siRNA ciblant STAT3 a reproduit ce phénotype inhibiteur, confirmant que cette voie est essentielle au déclenchement du VM dans les MSC. Ces résultats soulignent l'importance d'une régulation fine de la voie JAK/STAT3 dans les MSC, suggérant que son ciblage pourrait représenter une stratégie pertinente pour limiter la participation stromale au remodelage vasculaire tumoral. Ces approches ont permis d'égaleement identifier des marqueurs moléculaires régulés en aval, soit RPSA, dont l'inhibition pourrait renforcer l'effet anti-VM des inhibiteurs de JAK/STAT3. L'ensemble des résultats de cette première étude, positionne les MSC comme des acteurs dynamiques du VM et justifie l'exploration de combinaisons thérapeutiques plus ciblées vers les voies de signalisation inflammatoires associées à la plasticité cellulaire.

Dans un second volet, deux études complémentaires menées sur les lignées cellulaires de GBM, notamment U87 et U251, ont mises en évidence l'implication directe de la voie Hippo via YAP1 et TEAD1, dans la régulation transcriptionnelle de gènes pro-VM tels que CTGF et CYR61. Ces marqueurs, associés à la migration et au remodelage matriciel, étaient positivement corrélés à la formation des structures de type VM. L'analyse d'échantillons de tissus cliniques a confirmé la surexpression de YAP1 et de ses cibles transcriptionnelles dans les tumeurs cérébrales de grade IV par rapport aux tissus cérébraux sains et aux gliomes de plus bas grade, positionnant ces facteurs comme biomarqueurs potentiels du phénotype vasculogénique tumoral.

Par ailleurs, l'inhibition pharmacologique de l'interaction YAP/TEAD par des composés expérimentaux ou cliniquement pertinents a entraîné une réduction significative de la formation de structures capillaires VM *in vitro* et du phénotype migratoire, consolidant l'intérêt thérapeutique de cette voie. De plus, l'interférence avec les régulateurs de la TEM tels que SNAI1 et FOXC2 a confirmé leur rôle central dans la mise en place d'un programme vasculogénique coordonné.

Finalement, une dernière étude a permis d'identifier un nouvel axe de signalisation centré sur l'interaction entre le récepteur EGFR et la protéine SORT1. Cette dernière, connue pour ses fonctions dans le trafic cellulaire et le tri des récepteurs, a récemment suscité l'intérêt en oncologie pour son rôle potentiel dans la plasticité tumorale et la signalisation pro-survie. Nos résultats démontrent que SORT1 affecte la localisation subcellulaire d'EGFR, en particulier sa translocation nucléaire lors de la formation du VM *in vitro* dans les lignées de GBM.

L'inhibition pharmacologique de SORT1 à l'aide de l'AF38469, ou son inhibition génique par siRNA, entraîne une réduction marquée de la migration cellulaire, une réduction de l'expression nucléaire d'EGFR ainsi que l'inhibition de la formation du VM. De manière intéressante, la suppression de SORT1 induit une diminution de l'expression transcriptionnelle d'EGFR tout en altérant la signature moléculaire associée à une chimiorésistance accrue, soulignant la complexité de cette régulation.

Des études antérieures dans d'autres modèles tumoraux tels que dans le carcinome hépatocellulaire, le cancer du poumon à non petites cellules (NSCLC), ou encore dans les cancers hormono-dépendants tels que les cancers du sein, de l'ovaire ou de l'endomètre ont déjà suggéré une implication de SORT1 dans l'angiogenèse tumorale et dans des processus de type vasculaires (Ahn *et al.*, 2024; Lin *et al.*, 2025; Bertrand *et al.*, 2024). Par exemple, sa colocalisation avec des récepteurs à fonction pro-angiogénique ou

son implication dans le trafic de protéines comme le VEGFR2 ou TrkB suggère qu'elle pourrait jouer un rôle plus large dans la régulation de la plasticité cellulaire. Ces données, associées aux nôtres, pourraient positionner SORT1 comme un intégrateur du signal vasculogénique et un potentiel marqueur du phénotype invasif des GBM.

Ces résultats pourraient renforcer l'idée que le complexe EGFR/SORT1 représente une cible thérapeutique inexploitée, capable de réguler à la fois la signalisation pro-survie, la migration cellulaire et la capacité des cellules tumorales à former un réseau pseudo-vasculaire indépendant de l'endothélium.

Dans l'ensemble, ces trois études ont démontré que le VM est un phénomène multiforme, régulé par des voies de signalisation distinctes mais interconnectées. Le VM est un état cellulaire hautement plastique, adaptatif et cliniquement pertinent à étudier. Ces résultats soutiennent une approche thérapeutique combinatoire ciblant différenciellement les voies de signalisation décrites, le métabolisme et l'interaction avec le microenvironnement pour surmonter les résistances dans le traitement du GBM.

6.2 Implications biologiques et cliniques

La présence de structures de type VM a été directement corrélée à un pronostic défavorable dans plusieurs types de cancers différents, notamment les mélanomes, les carcinomes mammaires triple négatifs et les GBM (Alemu *et al.*, 2025). L'implication du VM dans la résistance aux traitements anti-angiogéniques et sa corrélation avec la récurrence tumorale en font une cible biologique hautement pertinente dans la prise en charge des patients.

Du point de vue clinique, l'identification du VM comme mécanisme adaptatif impose un changement de paradigme dans les stratégies thérapeutiques. Les inhibiteurs du VEGF tels que le bévacizumab ont montré une efficacité transitoire dans le GBM et la persistance voire l'induction du VM en réponse à ce type de traitements pourrait expliquer l'échec à long terme de ces approches (Liu *et al.*, 2025). Des études cliniques récentes ont démontré que la présence de structures VM dans les biopsies tumorales est associée à une survie globale réduite et à une moindre réponse aux agents anti-angiogéniques (Shapkina *et al.*, 2025). Par conséquent, le développement d'inhibiteurs du VM pourrait représenter une avancée majeure.

Les résultats présentés dans cette thèse montrent que l'intervention pharmacologique ciblée aux voies JAK/STAT3, Hippo et EGFR/SORT1 permet non seulement de limiter la formation de structures VM *in*

vitro mais aussi de moduler des signatures moléculaires associées à la chimiorésistance et à l'invasion cellulaire. Ainsi, cibler le VM pourrait contribuer à restaurer la sensibilité tumorale aux chimiothérapies conventionnelles ou aux thérapies ciblées, en désorganisant le réseau vasculaire non-endothélial assurant une perfusion de la tumeur (Wu *et al.*, 2025).

Du point de vue biologique, ces voies de signalisation sont toutes impliquées dans la plasticité cellulaire, la survie et le remodelage du microenvironnement. Par exemple, la voie YAP/TEAD agit sur les gènes pro-survie, les régulateurs de la migration cellulaire et les effecteurs de la MEC comme CTGF. De son côté, la voie JAK/STAT, permet la communication étroite avec les cellules immunitaires et stromales, suggérant que le ciblage du VM pourrait avoir des effets indirects sur l'immunosuppression locale.

Enfin, les implications translationnelles sont nombreuses, les inhibiteurs de STAT3, comme le napabucasin, les inhibiteurs de YAP/TEAD tels que l'IAG933 et le verteporfine ou encore les modulateurs de SORT1 tels que l'AF38469 sont des options actuellement en essais dans différents contextes oncologiques. Le napabucasin a été évalué dans plusieurs essais cliniques notamment pour les cancers coloréctaux, pancréatiques et du poumon. Des essais de phase II sont en cours, notamment en association avec le pembrolizumab (Kawazoe *et al.*, 2020). L'IAG933 est également actuellement en phase I pour des tumeurs solides, telles que le mésothéliome, ayant des altérations dans la voie Hippo (Novartis, 2025). L'intérêt de ces inhibiteurs pour le traitement des GBMs en thérapie combinatoire ciblant le VM pourrait améliorer le contrôle tumoral. Toutefois, une meilleure caractérisation des patients via des biomarqueurs VM-spécifiques serait crucial pour permettre de personnaliser les traitements et de sélectionner les profils les plus à risques d'échecs aux approches classiques anti-angiogéniques.

6.3 Contributions au domaine de recherche

Ces résultats apportent quelques contributions originales et significatives au domaine de la recherche en oncologie, et particulièrement à la compréhension des mécanismes adaptatifs dans les GBM. Premièrement, elle documente pour la première fois de façon intégrée le rôle de trois voies de signalisation majeures dans l'induction du VM, un processus fortement associé à l'agressivité tumorale et la chimiorésistance.

Deuxièmement, ces recherches mettent en lumière le rôle fonctionnel des MSC comme contributeurs actifs à la structuration vasculaire alternative. En caractérisant leur capacité à induire un processus de vascularisation alternatif. En caractérisant leur capacité à initier un phénotype vasculogénique via

l'activation de STAT3 et l'expression de régulateurs transcriptionnels clés, cette étude propose un nouveau modèle de coopération entre les MSC et le microenvironnement tumoral.

Troisièmement, la démonstration du rôle de SORT1 dans le trafic intracellulaire de EGFR, et sa régulation du phénotype VM ouvre un nouveau champ d'investigation sur les mécanismes de signalisation intracellulaire et de résistance thérapeutique dans les GBM. Cet aspect positionne ce modèle comme une cible thérapeutique originale et peu explorée dans les tumeurs solides.

L'ensemble des résultats présentés combine des approches tridimensionnelles de culture cellulaire, des outils transcriptomiques *in silico* et *in vitro*, des inhibiteurs pharmacologiques innovants et des analyses sur des tissus tumoraux humains. Ces approches intégrées ont permis de valider des mécanismes biologiques complexes dans des conditions le plus proches possibles du microenvironnement tumoral *in vivo*. Cette thèse contribue à élargir les modèles actuellement connus de la progression tumorale et ciblait à redéfinir les cibles thérapeutiques potentielles dans les tumeurs cérébrales hautement agressives.

6.4 Perspectives et limites

Bien que la pertinence des mécanismes identifiés ait été établie, certaines limites doivent être prises en considération et ouvrent la voie à des recherches complémentaires. Tout d'abord, bien que les résultats obtenus *in vitro* aient permis de documenter avec précision les voies impliquées dans le VM, leur validation dans des modèles *in vivo* reste une étape cruciale à la validité des résultats. L'utilisation de modèles murins de GBM, reproduisant mieux le microenvironnement cérébral et la barrière hémato-encéphalique, permettrait de confirmer le rôle fonctionnel de la voie EGFR/SORT1, l'efficacité des inhibiteurs ciblant STAT3 et YAP/TEAD dans un contexte physiologique et immunologique complexe. Ces approches permettraient de mieux évaluer la toxicité, la biodisponibilité et les effets systémiques de tous les inhibiteurs testés.

L'intégration de modèles organoïdes dérivés de patients pourrait également permettre l'avancée significative de l'étude du VM. Ces modèles conservent l'hétérogénéité cellulaire et génétique des tumeurs primaires et permettent aux chercheurs de tester des combinaisons thérapeutiques de manière représentative des possibilités cliniques. Leur utilisation pourrait permettre de stratifier les patients en fonction de leur profil VM et ainsi adapter les stratégies ciblées en conséquence.

Un autre champ d'investigation prometteur repose sur l'étude des exosomes, vecteurs clés de la communication intercellulaire dans le microenvironnement tumoral. Des études ont mis en évidence la colocalisation de SORT1 et EGFR dans les exosomes, et leur rôle potentiel dans le transfert du phénotype vasculogénique aux cellules voisines mérite d'être exploré (Wilson *et al.*, 2014; Ghaemimanesh *et al.*, 2021). Le profilage moléculaire des exosomes, par séquençage ARN (RNA-seq) pourrait permettre l'identification de nouveaux biomarqueurs prédictifs du VM et des cibles thérapeutiques encore non documentées.

Par ailleurs, il serait pertinent d'intégrer une dimension immuno-oncologique à ces travaux. La voie JAK/STAT3 est directement impliquée dans la régulation des cytokines pro-inflammatoires et l'induction d'un microenvironnement immunosuppresseur. L'étude de modèles syngéniques ou humanisés, intégrant les interactions avec les cellules immunitaires, permettrait de mieux comprendre les effets du ciblage du VM sur l'évasion immunitaire et la réponse aux immunothérapies.

Enfin, l'exploitation extensive de banques de données transcriptomiques publiques (TCGA, CGGA, Ivy GAP) offrirait une validation complémentaire des signatures moléculaires associées au VM (YAP1, CTGF, CYR61, RPSA, SORT1). Ces analyses *in silico*, combinées à des approches bio-informatiques de prédiction clinique, pourraient contribuer à affiner la stratification des patients et soutenir le développement de biomarqueurs translationnels.

En résumé, les prochaines étapes consisteraient à valider les résultats dans des modèles *in vivo* plus complexes, à approfondir l'étude des vésicules extracellulaires et à intégrer une composante immunologique, le tout en tirant parti des ressources bio-informatiques publiques disponibles. Ces approches complémentaires renforceront la portée translationnelle des résultats et permettront de progresser vers une médecine de précision ciblant le VM dans le GBM.

CONCLUSION

Ce travail a permis de mettre en lumière les fondements moléculaires d'un processus adaptatif majeur dans les GBM, le VM. En explorant trois voies de signalisation centrales, JAK/STAT3, Hippo/YAP/TEAD et EGFR/SORT1, ce projet a révélé des mécanismes complexes par lesquels les cellules tumorales et stromales coopèrent pour adopter des phénotypes pseudo-vasculaires et chimiorésistants favorisant l'agressivité, l'évasion thérapeutique et la survie en contexte hypoxique.

Les données générées ont pu démontrer que l'activation de différents programmes transcriptionnels par des signaux inflammatoires permet aux cellules de GBM ou aux MSC de remodeler leur microenvironnement, de migrer et de résister aux traitements anti-angiogénique. L'identification de SORT1 comme modulateur clé de la chimiorésistance des GBM ajoute une nouvelle compréhension du VM.

Ces résultats renforcent la pertinence d'un ciblage moléculaire précis au VM et soulignent l'intérêt d'intégrer la détection des structures de VM comme d'un paramètre pronostique important dans les GBM. Ils ouvrent également la voie à des stratégies cliniques innovantes basées sur la co-inhibition du VM comme stratégie complémentaire aux traitements standards actuels. En conclusion, cette recherche contribue à repositionner les priorités thérapeutiques dans le développement de thérapies ciblées dans les cancers solides hautement agressifs en s'attaquant aux mécanismes adaptatifs fondamentaux de chimiorésistance.

RÉFÉRENCES

- Abhold EL, Kiang A, Rahimy E, Kuo SZ, Wang-Rodriguez J, Lopez JP, Blair KJ, Yu MA, Haas M, Brumund KT, Altuna X, Patel A, Weisman RA, Ongkeko WM. EGFR kinase promotes acquisition of stem cell-like properties: a potential therapeutic target in head and neck squamous cell carcinoma stem cells. *PLoS One*. 2012;7(2):e32459. doi: 10.1371/journal.pone.0032459. Epub 2012 Feb 27. PMID: 22384257; PMCID: PMC3288103.
- Agosti E, Zeppieri M, De Maria L, Tedeschi C, Fontanella MM, Panciani PP, et al. Glioblastoma immunotherapy: A systematic review of the present strategies and prospects for advancements. *Int J Mol Sci*. 2023; 24(20):15037.
- Agudo J, Aguirre-Ghiso JA, Bhatia M, Chodosh LA, Correia AL, Klein CA. Targeting cancer cell dormancy. *Nat Rev Cancer*. 2024 Feb;24(2):97-104. doi: 10.1038/s41568-023-00642-x. Epub 2023 Dec 7. PMID: 38062251; PMCID: PMC11038906.
- Ahn HR, Kim S, Baek GO, Yoon MG, Kang M, Ng JT, Go Y, Lim SB, Yoon JH, Jeong JY, Han JE, Kim SS, Cheong JY, Eun JW, Cho HJ. Effect of Sortilin1 on promoting angiogenesis and systemic metastasis in hepatocellular carcinoma via the Notch signaling pathway and CD133. *Cell Death Dis*. 2024 Aug 29;15(8):634. doi: 10.1038/s41419-024-07016-7. PMID: 39209807; PMCID: PMC11362463.
- Alemu BK, Tommasi S, Hulin JA, Meyers J, Mangoni AA. Current knowledge on the mechanisms underpinning vasculogenic mimicry in triple negative breast cancer and the emerging role of nitric oxide. *Biomed Pharmacother*. 2025 May;186:118013. doi: 10.1016/j.biopha.2025.118013. Epub 2025 Mar 26. PMID: 40147105.
- Allenspach EJ, Maillard I, Aster JC, Pear WS. Notch signaling in cancer. *Cancer Biol Ther*. 2002 Sep-Oct;1(5):466-76. doi: 10.4161/cbt.1.5.159. PMID: 12496471.
- Álvarez-Teijeiro S, García-Inclán C, Villaronga MÁ, Casado P, Hermida-Prado F, Granda-Díaz R, Rodrigo JP, Calvo F, Del-Río-Ibáñez N, Gandarillas A, Morís F, Hermsen M, Cutillas P, García-Pedrero JM. Factors Secreted by Cancer-Associated Fibroblasts that Sustain Cancer Stem Properties in Head and Neck Squamous Carcinoma Cells as Potential Therapeutic Targets. *Cancers (Basel)*. 2018 Sep 17;10(9):334. doi: 10.3390/cancers10090334. PMID: 30227608; PMCID: PMC6162704.
- Annabi B, Lee YT, Turcotte S, Naud E, Desrosiers RR, Champagne M, Eliopoulos N, Galipeau J, Béliveau R. Hypoxia promotes murine bone-marrow-derived stromal cell migration and tube formation. *Stem Cells*. 2003;21(3):337-47.
- Annabi B, Naud E, Lee YT, Eliopoulos N, Galipeau J. Vascular progenitors derived from murine bone marrow stromal cells are regulated by fibroblast growth factor and are avidly recruited by vascularizing tumors. *J Cell Biochem*. 2004;91(6):1146-58.
- Annabi B, Zgheib A, Annabi B. Cavin-2 Functions as a Suppressive Regulator in TNF-induced Mesenchymal Stromal Cell Inflammation and Angiogenic Phenotypes. *Int J Stem Cells*. 2017 May 30;10(1):103-113. doi: 10.15283/ijsc16032. PMID: 28024316; PMCID: PMC5488782.

- Arita, H., Matsushita, Y., Machida, R. et al. TERT promoter mutation confers favorable prognosis regardless of 1p/19q status in adult diffuse gliomas with IDH1/2 mutations. *acta neuropathol commun* 8, 201 (2020). <https://doi.org/10.1186/s40478-020-01078-2>
- Arita, H., Yamasaki, K., Matsushita, Y. et al. A combination of TERT promoter mutation and MGMT methylation status predicts clinically relevant subgroups of newly diagnosed glioblastomas. *acta neuropathol commun* 4, 79 (2016). <https://doi.org/10.1186/s40478-016-0351-2>
- Arvanitis CD, Ferraro GB, Jain RK. The blood-brain barrier and blood-tumour barrier in brain tumours and metastases. *Nat Rev Cancer*. 2020 Jan;20(1):26-41. doi: 10.1038/s41568-019-0205-x. Epub 2019 Oct 10. PMID: 31601988; PMCID: PMC8246629.
- Au P, Tam J, Fukumura D, Jain RK. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells facilitate engineering of long-lasting functional vasculature. *Blood*. 2008;111(9):4551-8.
- Avgerinos KI, Spyrou N, Mantzoros CS, Dalamaga M. Obesity and cancer risk: Emerging biological mechanisms and perspectives. *Metabolism*. 2019 Mar;92:121-135. doi: 10.1016/j.metabol.2018.11.001. Epub 2018 Nov 13. PMID: 30445141.
- Ayala-Cuellar AP, Kang JH, Jeung EB, Choi KC. Roles of mesenchymal stem cells in tissue regeneration and immunomodulation. *Biomol Ther (Seoul)*. 2019;27(1):25-33.
- Bangarh R, Saini RV, Saini AK, Singh T, Joshi H, Ramniwas S, Shahwan M, Tuli HS. Dynamics of epithelial-mesenchymal plasticity driving cancer drug resistance. *Cancer Pathog Ther*. 2024 Jul 6;3(2):120-128. doi: 10.1016/j.cpt.2024.07.002. PMID: 40182126; PMCID: PMC11963173.
- Barry ER, Simov V, Valtingoer I, Venier O. Recent therapeutic approaches to modulate the Hippo pathway in oncology and regenerative medicine. *Cells*. 2021;10(10):2715.
- Bartrons R, Caro J. Hypoxia, glucose metabolism and the Warburg's effect. *J Bioenerg Biomembr*. 2007 Jun;39(3):223-9. doi: 10.1007/s10863-007-9080-3. PMID: 17661163.
- Belghali MY, Ba-M Hamed S, Admou B, Brahimi M, Khouchani M. Caractéristiques épidémiologiques, cliniques, thérapeutiques et évolutives des patients atteints de glioblastome cérébral: série de cas pris en charge au centre d'oncohématologie du Centre Hospitalier Universitaire Mohammed VI de Marrakech en 2016 et 2017 [Epidemiological, clinical, therapeutic and evolutionary features of patients with glioblastoma: series of cases managed in the Department of Hematology-Oncology at the Mohammed VI University Hospital Center in Marrakech in 2016 and 2017]. *Pan Afr Med J*. 2021 Jul 8;39:191. French. doi: 10.11604/pamj.2021.39.191.28298. PMID: 34603572; PMCID: PMC8464204.
- Benjakul N, Prakobphol N, Tangshewinsirikul C, Dulyaphat W, Svasti J, Charnngaew K, Kangsamaksin T. Notch signaling regulates vasculogenic mimicry and promotes cell morphogenesis and the epithelial-to-mesenchymal transition in pancreatic ductal adenocarcinoma. *PLoS One*. 2022 Dec 22;17(12):e0279001. doi: 10.1371/journal.pone.0279001. PMID: 36548277; PMCID: PMC9779037.
- Bertrand N, Mougél R, Riley G, Bruand M, Gauchotte G, Agopiantz M. Neurotensin and Its Involvement in Female Hormone-Sensitive Cancers. *Int J Mol Sci*. 2024 Oct 30;25(21):11648. doi: 10.3390/ijms252111648. PMID: 39519199; PMCID: PMC11546766.
- Beylerli O, Gareev I, Musaev E, Ilyasova T, Roumiantsev S, Chekhonin V. Angiogenesis and Resistance Mechanisms in Glioblastoma: Targeting Alternative Vascularization Pathways to Overcome

- Therapy Resistance. *Curr Pharm Des.* 2025 Jul 22. doi: 10.2174/0113816128367551250703122830. Epub ahead of print. PMID: 40698688.
- Bhat KP, Salazar KL, Balasubramaniyan V, Wani K, Heathcock L, Hollingsworth F, James JD, et al. The transcriptional coactivator TAZ regulates mesenchymal differentiation in malignant glioma. *Genes Dev.* 2011; 25(24):2594-2609.
- Blondy S., Talbot H., Saada S., Christou N., Battu S., Pannequin J., Jauberteau M., Lalloué F., Verdier M., Mathonnet M., et al. Overexpression of sortilin is associated with 5-FU resistance and poor prognosis in colorectal cancer. *J. Cell. Mol. Med.* 2021;25:47–60. doi: 10.1111/jcmm.15752. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
- Bou-Gharios, J., Noël, G. & Burckel, H. Preclinical and clinical advances to overcome hypoxia in glioblastoma multiforme. *Cell Death Dis* 15, 503 (2024). <https://doi.org/10.1038/s41419-024-06904-2>
- Bray F, Laversanne M, Weiderpass E, Soerjomataram I. The ever-increasing importance of cancer as a leading cause of premature death worldwide. *Cancer.* 2021 Aug 15;127(16):3029-3030. doi: 10.1002/cncr.33587. Epub 2021 Jun 4. PMID: 34086348.
- Bray, F., Laversanne, M., Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Soerjomataram, I., & Jemal, A. (2024). Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 74(3), 229–263. <https://doi.org/10.3322/caac.21834>
- Bronckaers A, Hilken P, Martens W, Gervois P, Ratajczak J, Struys T, Lambrechts I. Mesenchymal stem/stromal cells as a pharmacological and therapeutic approach to accelerate angiogenesis. *Pharmacol Ther.* 2014;143(2):181-96.
- Carnero A, Garcia-Mayea Y, Mir C, Lorente J, Rubio IT, LLeonart ME. The cancer stem-cell signaling network and resistance to therapy. *Cancer Treat Rev.* 2016 Sep;49:25-36. doi: 10.1016/j.ctrv.2016.07.001. Epub 2016 Jul 9. PMID: 27434881.
- Casati G, Giunti L, Iorio AL, Marturano A, Galli L, Sardi I. Hippo pathway in regulating drug resistance of glioblastoma. *Int J Mol Sci.* 2021; 22(24):13431.
- Casati G, Giunti L, Iorio AL, Marturano A, Galli L, Sardi I. Hippo pathway in regulating drug resistance of glioblastoma. *Int J Mol Sci.* 2021;22(24):13431.
- Castellan M, Guarnieri A, Fujimura A, Zanconato F, Battilana G, Panciera T, Sladitschek HL, Contessotto P, Citron A, Grilli A, Romano O, Biciato S, Fassan M, Porcù E, Rosato A, Cordenonsi M, Piccolo S. Single-cell analyses reveal YAP/TAZ as regulators of stemness and cell plasticity in Glioblastoma. *Nat Cancer.* 2021;2(2):174-188.
- Chang HA, Ou Yang RZ, Su JM, Nguyen TMH, Sung JM, Tang MJ, Chiu WT. YAP nuclear translocation induced by HIF-1 α prevents DNA damage under hypoxic conditions. *Cell Death Discov.* 2023; 9(1):385.
- Charfi C, Demeule M, Currie JC, Larocque A, Zgheib A, Danalache BA, Ouanouki A, Béliveau R, Marsolais C, Annabi B. New Peptide-Drug Conjugates for Precise Targeting of SORT1-Mediated Vasculogenic Mimicry in the Tumor Microenvironment of TNBC-Derived MDA-MB-231 Breast and Ovarian ES-2 Clear Cell Carcinoma Cells. *Front Oncol.* 2021 Oct 22;11:760787. doi: 10.3389/fonc.2021.760787. PMID: 34751242; PMCID: PMC8571021.

- Chen D, Wu M, Li Y, Chang I, Yuan Q, Ekimyan-Salvo M, Deng P, Yu B, Yu Y, Dong J, Szymanski JM, Ramadoss S, Li J, Wang CY. Targeting BMI1+ Cancer Stem Cells Overcomes Chemoresistance and Inhibits Metastases in Squamous Cell Carcinoma. *Cell Stem Cell*. 2017 May 4;20(5):621-634.e6. doi: 10.1016/j.stem.2017.02.003. Epub 2017 Mar 9. PMID: 28285905; PMCID: PMC5419860.
- Chen S, Zhou Y, Chen Y, Gu J. fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics*. 2018;34(17):i884-i890.
- Chen Y, Han H, Seo G, Vargas RE, Yang B, Chuc K, Zhao H, Wang W. Systematic analysis of the Hippo pathway organization and oncogenic alteration in evolution. *Sci Rep*. 2020;10(1):3173.
- Cheuk Lun Ethan Wong, Mei Yee Karrie Kiang, Ka Kit Gilberto Leung. Targeting hippo signaling pathway to overcome chemoresistance in glioblastoma. In: Proceedings of the American Association for Cancer Research Annual Meeting 2024; Part 1 (Regular Abstracts); 2024 Apr 5-10; San Diego, CA. Philadelphia (PA): AACR; Cancer Res 2024;84(6_Suppl): Abstract nr 7207.
- Chiang SP, Cabrera RM, Segall JE. Tumor cell intravasation. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2016 Jul 1;311(1):C1-C14. doi: 10.1152/ajpcell.00238.2015. Epub 2016 Apr 13. PMID: 27076614; PMCID: PMC4967137.
- Costantini S, Di Gennaro E, Fanelli G, Bagnara P, Argenziano C, Maccanico C, Paggi MG, Budillon A, Abbruzzese C. Glioblastoma metabolomics: uncovering biomarkers for diagnosis, prognosis and targeted therapy. *J Exp Clin Cancer Res*. 2025 Aug 7;44(1):230. doi: 10.1186/s13046-025-03497-2. PMID: 40775789; PMCID: PMC12330079.
- Crisan M. Transition of mesenchymal stem/stromal cells to endothelial cells. *Stem Cell Res Ther*. 2013;4(4):95.
- Crunkhorn S. New route to targeting the Hippo pathway. *Nat Rev Drug Discov*. 2021;20(5):344.
- Cunningham R, Hansen CG. The Hippo pathway in cancer: YAP/TAZ and TEAD as therapeutic targets in cancer. *Clin Sci (Lond)*. 2022; 136(3):197-222.
- D'Aprile S, Denaro S, Gervasi A, Vicario N, Parenti R. Targeting metabolic reprogramming in glioblastoma as a new strategy to overcome therapy resistance. *Front Cell Dev Biol*. 2025 Feb 26;13:1535073. doi: 10.3389/fcell.2025.1535073. PMID: 40078366; PMCID: PMC11897528.
- Dagogo-Jack I, Shaw AT. Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies. *Nat Rev Clin Oncol*. 2018 Feb;15(2):81-94. doi: 10.1038/nrclinonc.2017.166. Epub 2017 Nov 8. PMID: 29115304.
- De Araújo Farias V, Carrillo-Gálvez AB, Martín F, Anderson P. TGF- β and mesenchymal stromal cells in regenerative medicine, autoimmunity and cancer. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2018;43:25-37.
- Deb VK, Chauhan N, Jain U. Deciphering TGF- β 1's role in drug resistance and leveraging plant bioactives for cancer therapy. *Eur J Pharmacol*. 2025 Feb 5;988:177218. doi: 10.1016/j.ejphar.2024.177218. Epub 2024 Dec 24. PMID: 39722325.
- Debnath S, Mukherjee A, Saha D, Dash J, Chatterjee TK. Poly-L-Lysine inhibits VEGF and c-Myc mediated tumor-angiogenesis and induces apoptosis in 2D and 3D tumor microenvironment of both MDA-MB-231 and B16F10 induced mice model. *Int J Biol Macromol*. 2021 Jul 31;183:528-548. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.04.109. Epub 2021 Apr 21. PMID: 33892042.

- Deepak KGK, Vempati R, Nagaraju GP, Dasari VR, S N, Rao DN, Malla RR. Tumor microenvironment: Challenges and opportunities in targeting metastasis of triple negative breast cancer. *Pharmacol Res.* 2020 Mar;153:104683. doi: 10.1016/j.phrs.2020.104683. Epub 2020 Feb 9. PMID: 32050092.
- Delgado-Bellido D, Serrano-Saenz S, Fernández-Cortés M, Oliver FJ. Vasculogenic mimicry signaling revisited: focus on non-vascular VE-cadherin. *Mol Cancer.* 2017 Mar 21;16(1):65. doi: 10.1186/s12943-017-0631-x. PMID: 28320399; PMCID: PMC5359927.
- Delgado-Bellido D, Zamudio-Martínez E, Fernández-Cortés M, Herrera-Campos AB, Olmedo-Pelayo J, Perez CJ, Expósito J, de Álava E, Amaral AT, Valle FO, Diaz AG, Oliver FJ. VE-Cadherin modulates β -catenin/TCF-4 to enhance Vasculogenic Mimicry. *Cell Death Dis.* 2023 Feb 17;14(2):135. doi: 10.1038/s41419-023-05666-7. PMID: 36797281; PMCID: PMC9935922.
- Dey A, Varelas X, Guan KL. Targeting the Hippo pathway in cancer, fibrosis, wound healing and regenerative medicine. *Nat Rev Drug Discov.* 2020; 19(7):480-494.
- Dey A, Varelas X, Guan KL. Targeting the Hippo pathway in cancer, fibrosis, wound healing and regenerative medicine. *Nat Rev Drug Discov.* 2020;19(7):480-494.
- Di Nunno V, Franceschi E, Tosoni A, Di Battista M, Gatto L, Lamperini C, et al. Treatment of recurrent glioblastoma: state-of-the-art and future perspectives. *Expert Rev Anticancer Ther* 2020; 20(9):785-795.
- Dicke J, Hero L, Kuhl S, Görtz L, Goldbrunner R, Timmer M. Higher YAP1 levels are associated with shorter survival of patients with low grade astrocytoma. *Anticancer Res.* 2024;44(7):3005-3011.
- Dinareello A, Betto RM, Diamante L, Tesoriere A, Ghirardo R, Cioccarelli C, Meneghetti G, Peron M, Laquatra C, Tiso N, Martello G, Argenton F. STAT3 and HIF1 α cooperatively mediate the transcriptional and physiological responses to hypoxia. *Cell Death Discov.* 2023;9(1):226.
- Dixit P, Djafer-Cherif I, Shah S, Drabik K, Traulsen A, Waclaw B. A quantitative characterization of the heterogeneous response of glioblastoma U-87 MG cell line to temozolomide. *Sci Rep.* 2025 May 8;15(1):16017. doi: 10.1038/s41598-025-99426-6. PMID: 40341226.
- Djediai S, Gonzalez Suarez N, El Cheikh-Hussein L, Rodriguez Torres S, Gresseau L, Dhayne S, et al. MT1-MMP Cooperates with TGF- β Receptor-Mediated Signaling to Trigger SNAIL and Induce Epithelial-to-Mesenchymal-like Transition in U87 Glioblastoma Cells. *Int J Mol Sci.* 2021; 22(23):13006.
- Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, Batut P, Chaisson M, Gingeras TR. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics.* 2013;29(1):15-21.
- Dodington DW, Desai HR, Woo M. JAK/STAT - Emerging Players in Metabolism. *Trends Endocrinol Metab.* 2018 Jan;29(1):55-65. doi: 10.1016/j.tem.2017.11.001. Epub 2017 Nov 27. PMID: 29191719.
- Dudley AC, Griffioen AW. Pathological angiogenesis: mechanisms and therapeutic strategies. *Angiogenesis.* 2023 Aug;26(3):313-347. doi: 10.1007/s10456-023-09876-7. Epub 2023 Apr 15. PMID: 37060495; PMCID: PMC10105163.

- El Khoury W, Nasr Z. Deregulation of ribosomal proteins in human cancers. *Biosci Rep*. 2021 Dec 22;41(12):BSR20211577. doi: 10.1042/BSR20211577. PMID: 34873618; PMCID: PMC8685657.
- Emami Nejad A, Najafgholian S, Rostami A, Sistani A, Shojaeifar S, Esparvarinha M, et al. The role of hypoxia in the tumor microenvironment and development of cancer stem cell: a novel approach to developing treatment. *Cancer Cell Int*. 2021; 21(1):62.
- Emami Nejad, A., Najafgholian, S., Rostami, A. et al. The role of hypoxia in the tumor microenvironment and development of cancer stem cell: a novel approach to developing treatment. *Cancer Cell Int* 21, 62 (2021). <https://doi.org/10.1186/s12935-020-01719-5>
- Evans CE, Iruela-Arispe ML, Zhao YY. Mechanisms of endothelial regeneration and vascular repair and their application to regenerative medicine. *Am J Pathol*. 2021;191(1):52-65.
- Fantozzi A, Gruber DC, Pisarsky L, Heck C, Kunita A, Yilmaz M, Meyer-Schaller N, Cornille K, Hopfer U, Bentires-Alj M, Christofori G. VEGF-mediated angiogenesis links EMT-induced cancer stemness to tumor initiation. *Cancer Res*. 2014;74(5):1566-75.
- Farahi L., Ghaemimanesh F., Milani S., Razavi S.M., Akhondi M.M., Rabbani H. Sortilin as a novel diagnostic and therapeutic biomarker in chronic lymphocytic leukemia. *Avicenna J. Med. Biotechnol*. 2019;11:270–276. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
- Ferrand N, Fert A, Morichon R, Radosevic-Robin N, Zaoui M, Sabbah M. WISP2/CCN5 Suppresses Vasculogenic Mimicry through Inhibition of YAP/TAZ Signaling in Breast Cancer Cells. *Cancers (Basel)*. 2022 Mar 14;14(6):1487. doi: 10.3390/cancers14061487. PMID: 35326638; PMCID: PMC8945957.
- Fnaiche A, alexis L, Suárez NG, Paquin A, Vu V, Li F, et al. Development of LM-41 and AF-2112, two flufenamic acid-derived TEAD inhibitors obtained through the replacement of the trifluoromethyl group by aryl rings. *Bioorg Med Chem Lett*. 2023; 95:129488.
- Fnaiche A, Chan HC, Paquin A, González Suárez N, Vu V, Li F, Allali-Hassani A, Cao MA, Szewczyk MM, Bolotokova A, Allemand F, Gelin M, Barsyte-Lovejoy D, Santhakumar V, Vedadi M, Guichou JF, Annabi B, Gagnon A. Development of HC-258, a covalent acrylamide TEAD inhibitor that reduces gene expression and cell migration. *ACS Med Chem Lett*. 2023;14(12):1746-1753.
- Fnaiche A, Chan HC, Paquin A, González Suárez N, Vu V, Li F, et al. Development of HC-258, a covalent acrylamide TEAD inhibitor that reduces gene expression and cell migration. *ACS Med Chem Lett*. 2023; 14(12):1746-1753.
- Fnaiche A, Mélin L, Suárez NG, Paquin A, Vu V, Li F, Allali-Hassani A, Bolotokova A, Allemand F, Gelin M, Cotellet P, Woo S, LaPlante SR, Barsyte-Lovejoy D, Santhakumar V, Vedadi M, Guichou JF, Annabi B, Gagnon A. Development of LM-41 and AF-2112, two flufenamic acid-derived TEAD inhibitors obtained through the replacement of the trifluoromethyl group by aryl rings. *Bioorg Med Chem Lett*. 2023;95:129488.
- Folberg R, Maniotis AJ. Vasculogenic mimicry. *APMIS*. 2004;112(7-8):508-25.
- Fournié, C. (2020). *Activité physique adaptée et cohérence cardiaque en soins de support : leurs effets sur la variabilité de la fréquence cardiaque et la qualité de vie en post-traitement d'une hémopathie maligne* [Thèse de doctorat, Université Toulouse III - Paul Sabatier].

- Fu F, Zhang Y, Shen H. [Advances in Targeted Therapy for Malignant Pleural Mesothelioma]. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi*. 2024 May 20;27(5):391-398. Chinese. doi: 10.3779/j.issn.1009-3419.2024.102.18. PMID: 38880927; PMCID: PMC11183316.
- Fu M, Hu Y, Lan T, Guan KL, Luo T, Luo M. The Hippo signalling pathway and its implications in human health and diseases. *Signal Transduct Target Ther*. 2022; 7(1):376. Erratum in: *Signal Transduct Target Ther*. 2024; 9(1):5.
- Fu M, Hu Y, Lan T, Guan KL, Luo T, Luo M. The Hippo signalling pathway and its implications in human health and diseases. *Signal Transduct Target Ther*. 2022;7(1):376. Erratum in: *Signal Transduct Target Ther*. 2024;9(1):5.
- Fu Z, Mowday AM, Smaill JB, Hermans IF, Patterson AV. Tumour Hypoxia-Mediated Immunosuppression: Mechanisms and Therapeutic Approaches to Improve Cancer Immunotherapy. *Cells*. 2021 Apr 24;10(5):1006. doi: 10.3390/cells10051006. PMID: 33923305; PMCID: PMC8146304.
- Fu, YC., Liang, SB., Luo, M. et al. Intratumoral heterogeneity and drug resistance in cancer. *Cancer Cell Int* 25, 103 (2025). <https://doi.org/10.1186/s12935-025-03734-w>
- Gao F., Griffin N., Faulkner S., Li X., King S.J., Jobling P., Denham J.W., Jiang C.C., Hondermarck H. The Membrane Protein Sortilin Can Be Targeted to Inhibit Pancreatic Cancer Cell Invasion. *Am. J. Pathol*. 2020;190:1931–1942. doi: 10.1016/j.ajpath.2020.05.018. [DOI] [PubMed] [Google Scholar]
- Gao Y, Li Y, Song Z, Jin Z, Li X, Yuan C. Sortilin 1 Promotes Hepatocellular Carcinoma Cell Proliferation and Migration by Regulating Immune Cell Infiltration. *J Oncol*. 2022 Jul 8;2022:6509028. doi: 10.1155/2022/6509028. PMID: 35847356; PMCID: PMC9286884.
- GARD (Genetic and Rare Diseases Information Center;)
- Gerstberger S, Jiang Q, Ganesh K. Metastasis. *Cell*. 2023 Apr 13;186(8):1564-1579. doi: 10.1016/j.cell.2023.03.003. PMID: 37059065; PMCID: PMC10511214.
- Ghaemimanesh F, Mehravar M, Milani S, Poursani EM, Saliminejad K. The multifaceted role of sortilin/neurotensin receptor 3 in human cancer development. *J Cell Physiol*. 2021 Sep;236(9):6271-6281. doi: 10.1002/jcp.30344. Epub 2021 Feb 26. PMID: 33634506.
- Ghajar CM, Kachgal S, Kniazeva E, Mori H, Costes SV, George SC, Putnam AJ. Mesenchymal cells stimulate capillary morphogenesis via distinct proteolytic mechanisms. *Exp Cell Res*. 2010;316(5):813-25.
- Gnao, K.P., Roy, M., Zgheib, A., Desjarlais, M., & Annabi, B. (2025). Evidence of a functional Smad2/3 signaling axis and TGF β -mediated autocrine transcriptional regulation of *in vitro* vasculogenic mimicry in mesenchymal stem/stromal cells. *Oncology Letters*, 30, 405. <https://doi.org/10.3892/ol.2025.15151>
- Gomez GA, Oksdath M, Brown MP, Ebert LM. New approaches to model glioblastoma in vitro using brain organoids: implications for precision oncology. *Transl Cancer Res*. 2019 Dec;8(Suppl 6):S606-S611. doi: 10.21037/tcr.2019.09.08. PMID: 35117142; PMCID: PMC8798484.
- Gonzalez Suarez N, Fernandez-Marrero Y, Hébert MPA, Roy ME, Boudreau LH, Annabi B. EGCG inhibits the inflammation and senescence inducing properties of MDA-MB-231 triple-negative

- breast cancer (TNBC) cells-derived extracellular vesicles in human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Cancer Cell Int.* 2023;23(1):240.
- Gonzalez-Avila G, Sommer B, Flores-Soto E, Aquino-Galvez A. Hypoxic Effects on Matrix Metalloproteinases' Expression in the Tumor Microenvironment and Therapeutic Perspectives. *Int J Mol Sci.* 2023 Nov 28;24(23):16887. doi: 10.3390/ijms242316887. PMID: 38069210; PMCID: PMC10707261.
- Goyal A, Afzal M, Goyal K, Ganesan S, Kumari M, Sunitha S, Dash A, Saini S, Rana M, Gupta G, Ali H, Wong LS, Kumarasamy V, Subramaniyan V. MSC-derived extracellular vesicles: Precision miRNA delivery for overcoming cancer therapy resistance. *Regen Ther.* 2025 Apr 1;29:303-318. doi: 10.1016/j.reth.2025.03.006. PMID: 40237010; PMCID: PMC11999318.
- Greaves M, Maley CC. Clonal evolution in cancer. *Nature.* 2012 Jan 18;481(7381):306-13. doi: 10.1038/nature10762. PMID: 22258609; PMCID: PMC3367003.
- Gresseau L, Roy ME, Duhamel S, Annabi B. A signaling crosstalk links SNAIL to the 37/67 kDa Laminin-1 Receptor Ribosomal Protein SA and regulates the acquisition of a cancer Stem cell molecular signature in U87 glioblastoma neurospheres. *Cancers (Basel).* 2022;14(23):5944.
- Gu Y, Huang Q, Wang Y, Wang H, Xiang Z, Xu Y, Wang X, Liu W, Wang A. The vasculogenic mimicry related signature predicts the prognosis and immunotherapy response in renal clear cell carcinoma. *BMC Cancer.* 2024;24(1):420.
- Gu Z, Eils R, Schlesner M. Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data. *Bioinformatics.* 2016;32(18):2847-9.
- Guo YD, Sun J, Zhao C, Han L, Yu CJ, Zhang HW. Comprehensive analysis and molecular map of Hippo signaling pathway in lower grade glioma: the perspective toward immune microenvironment and prognosis. *Front Oncol.* 2023;13:1198414.
- Hagenbeek TJ, Zbieg JR, Hafner M, Mroue R, Lacap JA, Sodir NM, Noland CL, Afghani S, Kishore A, Bhat KP, Yao X, Schmidt S, Clausen S, Steffek M, Lee W, Beroza P, Martin S, Lin E, Fong R, Di Lello P, Kubala MH, Yang MN, Lau JT, Chan E, Arrazate A, An L, Levy E, Lorenzo
- Haiaty S, Rashidi MR, Akbarzadeh M, Maroufi NF, Yousefi B, Nouri M. Targeting vasculogenic mimicry by phytochemicals: A potential opportunity for cancer therapy. *IUBMB Life.* 2020; 72(5):825-841.
- Han C, Sun B, Zhao X, Zhang Y, Gu Q, Liu F, Zhao N, Wu L. Phosphorylation of STAT3 promotes vasculogenic mimicry by inducing epithelial-to-mesenchymal transition in colorectal cancer. *Technol Cancer Res Treat.* 2017;16(6):1209-1219.
- Han X, Liao R, Li X, Zhang C, Huo S, Qin L, Xiong Y, He T, Xiao G, Zhang T. Mesenchymal stem cells in treating human diseases: molecular mechanisms and clinical studies. *Signal Transduct Target Ther.* 2025 Aug 22;10(1):262. doi: 10.1038/s41392-025-02313-9. PMID: 40841367; PMCID: PMC12371117.
- Han Y. Analysis of the role of the Hippo pathway in cancer. *J Transl Med.* 2019; 17(1):116.
- Han Y. Analysis of the role of the Hippo pathway in cancer. *J Transl Med.* 2019;17(1):116.

- Han YS, Lee JH, Yoon YM, Yun CW, Noh H, Lee SH. Hypoxia-induced expression of cellular prion protein improves the therapeutic potential of mesenchymal stem cells. *Cell Death Dis.* 2016;7(10):e2395.
- Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov.* 2022 Jan;12(1):31-46. doi: 10.1158/2159-8290.CD-21-1059. PMID: 35022204.
- Hargadon KM, Strong EW. The FOXC2 Transcription Factor: A Master Regulator of Chemoresistance in Cancer. *Technol Cancer Res Treat.* 2023 Jan-Dec;22:15330338231155284. doi: 10.1177/15330338231155284. PMID: 36740986; PMCID: PMC9903043.
- He PC, He C. m6 A RNA methylation: from mechanisms to therapeutic potential. *EMBO J.* 2021; 40(3):e105977.
- Hendrix MJ, Seftor EA, Hess AR, Seftor RE. Vasculogenic mimicry and tumour-cell plasticity: lessons from melanoma. *Nat Rev Cancer.* 2003 Jun;3(6):411-21. doi: 10.1038/nrc1092. PMID: 12778131.
- Hendrix MJ, Seftor EA, Meltzer PS, Gardner LM, Hess AR, Kirschmann DA, Schatteman GC, Seftor RE. Expression and functional significance of VE-cadherin in aggressive human melanoma cells: role in vasculogenic mimicry. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(14):8018-23.
- Hendrix MJ, Seftor EA, Seftor RE, Chao JT, Chien DS, Chu YW. Tumor cell vascular mimicry: Novel targeting opportunity in melanoma. *Pharmacol Ther.* 2016 Mar;159:83-92. doi: 10.1016/j.pharmthera.2016.01.006. Epub 2016 Jan 22. PMID: 26808163; PMCID: PMC4779708.
- Hernández de la Cruz ON, López-González JS, García-Vázquez R, Salinas-Vera YM, Muñoz-Lino MA, Aguilar-Cazares D, López-Camarillo C, Carlos-Reyes Á. Regulation Networks Driving Vasculogenic Mimicry in Solid Tumors. *Front Oncol.* 2020 Jan 14;9:1419. doi: 10.3389/fonc.2019.01419. PMID: 31993365; PMCID: PMC6970938.
- Hess AR, Seftor EA, Seftor RE, Hendrix MJ. Phosphoinositide 3-kinase regulates membrane Type 1-matrix metalloproteinase (MMP) and MMP-2 activity during melanoma cell vasculogenic mimicry. *Cancer Res.* 2003;63(16):4757-62.
- Himes BT, Geiger PA, Ayasoufi K, Bhargava AG, Brown DA, Parney IF. Immunosuppression in glioblastoma: Current understanding and therapeutic implications. *Front Oncol.* 2021; 11:770561.
- Huo Q, Wang W, Dai J, Yuan X, Yu D, Xu B, Chi Y, Li H, Pei XL, Zhu G, Zhang L. Hypoxia and HIF-1 inhibition enhance lentiviral transduction efficiency: a novel strategy for gene delivery optimization. *BMC Biotechnol.* 2025 May 10;25(1):34. doi: 10.1186/s12896-025-00969-3. PMID: 40346583.
- Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, Berlin J, Baron A, Griffing S, Holmgren E, Ferrara N, Fyfe G, Rogers B, Ross R, Kabbinavar F. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2004 Jun 3;350(23):2335-42. doi: 10.1056/NEJMoa032691. PMID: 15175435.
- Jia H, Chen X, Zhang L, Chen M. Cancer associated fibroblasts in cancer development and therapy. *J Hematol Oncol.* 2025 Mar 28;18(1):36. doi: 10.1186/s13045-025-01688-0. PMID: 40156055; PMCID: PMC11954198.

- Johann P, Lenz D, Ries M. The drug development pipeline for glioblastoma - A cross sectional assessment of the FDA orphan drug product designation database. *PLoS One*. 2021;16(7):e0252924.
- Ju FE, Huang BH, Wu H, Zou B, Chen SN, Sang XY, Liang WY, Liu ZX, Zhang ZX, Yang ZY, Liang YT, Liang YL, Liu H, Dong ZX, Liu XQ, Zheng LY, Zeng JC, Wang JH, Qi L, Zhang XD, Zheng Y, Li J. Integrative analysis of bulk and single-cell gene expression profiles to identify bone marrow mesenchymal cell heterogeneity and prognostic significance in multiple myeloma. *J Transl Med*. 2025 Jun 16;23(1):659. doi: 10.1186/s12967-025-06637-6. PMID: 40524208; PMCID: PMC12172380.
- Kachgal S, Putnam AJ. Mesenchymal stem cells from adipose and bone marrow promote angiogenesis via distinct cytokine and protease expression mechanisms. *Angiogenesis*. 2011;14(1):47-59.
- Kakiuchi-Kiyota S, Schutten MM, Zhong Y, Crawford JJ, Dey A. Safety considerations in the development of Hippo pathway inhibitors in cancers. *Front Cell Dev Biol*. 2019;7:156.
- Kale J, Kutuk O, Brito GC, Andrews TS, Leber B, Letai A, Andrews DW. Phosphorylation switches Bax from promoting to inhibiting apoptosis thereby increasing drug resistance. *EMBO Rep*. 2018 Sep;19(9):e45235. doi: 10.15252/embr.201745235. Epub 2018 Jul 9. PMID: 29987135; PMCID: PMC6123645.
- Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*. 2009;119(6):1420-8. Erratum in: *J Clin Invest*. 2010;120(5):1786.
- Kanehisa M, Furumichi M, Sato Y, Kawashima M, Ishiguro-Watanabe M. KEGG for taxonomy-based analysis of pathways and genomes. *Nucleic Acids Res*. 2023;51:D587-D592.
- Kanehisa M, Goto S. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Res*. 2000;28:27-30.
- Kanehisa M. Toward understanding the origin and evolution of cellular organisms. *Protein Sci*. 2019;28:1947-51.
- Kawazoe A, Kuboki Y, Shinozaki E, Hara H, Nishina T, Komatsu Y, Yuki S, Wakabayashi M, Nomura S, Sato A, Kuwata T, Kawazu M, Mano H, Togashi Y, Nishikawa H, Yoshino T. Multicenter Phase I/II Trial of Napabucasin and Pembrolizumab in Patients with Metastatic Colorectal Cancer (EPOC1503/SCOOP Trial). *Clin Cancer Res*. 2020 Nov 15;26(22):5887-5894. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-20-1803. Epub 2020 Jul 21. PMID: 32694160.
- Kirschmann DA, Seftor EA, Hardy KM, Seftor RE, Hendrix MJ. Molecular pathways: vasculogenic mimicry in tumor cells: diagnostic and therapeutic implications. *Clin Cancer Res*. 2012;18(10):2726-2732.
- Klaunig JE. Oxidative Stress and Cancer. *Curr Pharm Des*. 2018;24(40):4771-4778. doi: 10.2174/1381612825666190215121712. PMID: 30767733.
- La Mendola D, Trincavelli ML, Martini C. Angiogenesis in Disease. *Int J Mol Sci*. 2022 Sep 19;23(18):10962. doi: 10.3390/ijms231810962. PMID: 36142885; PMCID: PMC9503835.
- Lange AW, Sridharan A, Xu Y, Stripp BR, Perl AK, Whitsett JA. Hippo/Yap signaling controls epithelial progenitor cell proliferation and differentiation in the embryonic and adult lung. *J Mol Cell Biol*.

- 2015 Feb;7(1):35-47. doi: 10.1093/jmcb/mju046. Epub 2014 Dec 5. PMID: 25480985; PMCID: PMC4400400.
- Lapkina EZ, Esimbekova AR, Ruksha TG. Vaskulogennaya mimikriya [Vasculogenic mimicry]. *Arkh Patol.* 2023;85(6):62-69. Russian. doi: 10.17116/patol20238506162. PMID: 38010640.
- Lassen U, Mau-Sørensen M, Skovgaard Poulsen H. Orphan drugs in glioblastoma multiforme: a review, *Orphan Drugs: Research and Reviews* 2014; 4:83-91.
- Lassman AB, Wen PY, van den Bent MJ, Plotkin SR, Walenkamp AME, Green AL, Li K, Walker CJ, Chang H, Tamir S, Henegar L, Shen Y, Alvarez MJ, Califano A, Landesman Y, Kauffman MG, Shacham S, Mau-Sørensen M. A Phase II study of the efficacy and safety of oral Selinexor in recurrent glioblastoma. *Clin Cancer Res.* 2022;28(3):452-460.
- Le Rhun E, Gorlia T, Felsberg J, Jongen J, Maurage CA, Ducray F, Gramatzki D, Hau P, Chinot OL, Preusser M, Cartalat S, Roth P, van den Bent M, Furtner J, Collienne M, Reifenberger G, Weller M. Zotiraciclib (TG02) for newly diagnosed glioblastoma in the elderly or for recurrent glioblastoma: The EORTC 1608 STEAM trial. *Eur J Cancer.* 2024;198:113475. Erratum in: *Eur J Cancer.* 2024;204:114066.
- Lee EJ, Park HW, Jeon HJ, Kim HS, Chang MS. Potentiated therapeutic angiogenesis by primed human mesenchymal stem cells in a mouse model of hindlimb ischemia. *Regen Med.* 2013;8(3):283-93.
- Lewandowska AM, Rudzki M, Rudzki S, Lewandowski T, Laskowska B. Environmental risk factors for cancer – review paper. *Ann Agric Environ Med.* 2019;26(1):1-7. doi:10.26444/aaem/94299.
- Li GC, Zhang HW, Zhao QC, Sun LI, Yang JJ, Hong L, Feng F, Cai L. Mesenchymal stem cells promote tumor angiogenesis via the action of transforming growth factor β 1. *Oncol Lett.* 2016;11(2):1089-1094.
- Li M, Jiang Y, Hou Q, Zhao Y, Zhong L, Fu X. Potential pre-activation strategies for improving therapeutic efficacy of mesenchymal stem cells: current status and future prospects. *Stem Cell Res Ther.* 2022;13(1):146.
- Li PD, Wang XJ, Shan Q, Wu YH, Wang Z. Evaluation of TAZ expression and its effect on tumor invasion and metastasis in human glioma. *Asian Pac J Trop Med.* 2014;7(10):757-760.
- Li Q, Ma W, Li T. Sortilin as a new membrane inhibitor of EGFR trafficking for overcoming resistance to EGFR inhibitors in non-small cell lung cancer. *J Thorac Dis.* 2018 Sep;10(Suppl 26):S3186-S3191. doi: 10.21037/jtd.2018.08.25. PMID: 30430029; PMCID: PMC6186589.
- Li XP, Guo ZQ, Wang BF, Zhao M. EGFR alterations in glioblastoma play a role in antitumor immunity regulation. *Front Oncol.* 2023 Aug 4;13:1236246. doi: 10.3389/fonc.2023.1236246. PMID: 37601668; PMCID: PMC10436475.
- Li Y, Sun B, Zhao X, Wang X, Zhang D, Gu Q, Liu T. MMP-2 and MMP-13 affect vasculogenic mimicry formation in large cell lung cancer. *J Cell Mol Med.* 2017 Dec;21(12):3741-3751. doi: 10.1111/jcmm.13283. Epub 2017 Aug 2. PMID: 28766880; PMCID: PMC5706571.
- Limone A, Maggisano V, Sarnataro D, Bulotta S. Emerging roles of the cellular prion protein (PrP^C) and 37/67 kDa laminin receptor (RPSA) interaction in cancer biology. *Cell Mol Life Sci.* 2023;80(8):207.

- Lin D, Shen L, Luo M, Zhang K, Li J, Yang Q, Zhu F, Zhou D, Zheng S, Chen Y, Zhou J. Circulating tumor cells: biology and clinical significance. *Signal Transduct Target Ther*. 2021 Nov 22;6(1):404. doi: 10.1038/s41392-021-00817-8. PMID: 34803167; PMCID: PMC8606574.
- Lin X, Yan Z, Hai L, Niu Y, Wen JX, Zhu HZ, Yan C, Cha SN, Yan L, Zheng WQ, Zhang M, Hu ZD. Sortilin-1, Targeted by miR-146a, Regulates the Behavior of Non-Small Cell Lung Cancer. *Thorac Cancer*. 2025 Aug;16(15):e70129. doi: 10.1111/1759-7714.70129. PMID: 40781926; PMCID: PMC12334890.
- Liu D, Meng Z, Jin C, Chen F, Pu L, Wu Z, Zeng Q, Luo J, Wu W. Fibronectin Mediates Endothelial-to-Mesenchymal Transition in Retina Angiogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2025 Mar 3;66(3):10. doi: 10.1167/iovs.66.3.10. PMID: 40042877; PMCID: PMC11892531.
- Liu Q, Qiao L, Liang N, Xie J, Zhang J, Deng G, Luo H, Zhang J. The relationship between vasculogenic mimicry and epithelial-mesenchymal transitions. *J Cell Mol Med*. 2016 Sep;20(9):1761-9. doi: 10.1111/jcmm.12851. Epub 2016 Mar 29. PMID: 27027258; PMCID: PMC4988285.
- Liu PC, Kuo CY, Chen YW, Lin CF, Lin SC, Chang FC, Chen MT, Wu JC, Lee YY. Bevacizumab alternating chemotherapy for improving the survival of patients with recurrent high-grade glioma. *Neurooncol Adv*. 2025 Jul 18;7(1):vdaf157. doi: 10.1093/noajnl/vdaf157. PMID: 40746950; PMCID: PMC12311935.
- Liu S, Kumar SM, Martin JS, Yang R, Xu X. Snail1 mediates hypoxia-induced melanoma progression. *Am J Pathol*. 2011 Dec;179(6):3020-31. doi: 10.1016/j.ajpath.2011.08.038. Epub 2011 Oct 11. PMID: 21996677; PMCID: PMC3260799.
- Liu TJ, Sun BC, Zhao XL, Zhao XM, Sun T, Gu Q, Yao Z, Dong XY, Zhao N, Liu N. CD133+ cells with cancer stem cell characteristics associates with vasculogenic mimicry in triple-negative breast cancer. *Oncogene*. 2013 Jan 31;32(5):544-53. doi: 10.1038/onc.2012.85. Epub 2012 Apr 2. PMID: 22469978.
- Liu Z, Yee PP, Wei Y, Liu Z, Kawasaki YI, Li W. Differential YAP expression in glioma cells induces cell competition and promotes tumorigenesis. *J Cell Sci*. 2019;132(5):jcs225714.
- Lord-Dufour S, Copland IB, Levros LC Jr, Post M, Das A, Khosla C, Galipeau J, Rassart E, Annabi B. Evidence for transcriptional regulation of the glucose-6-phosphate transporter by HIF-1alpha: Targeting G6PT with mumbaistatin analogs in hypoxic mesenchymal stromal cells. *Stem Cells*. 2009;27(3):489-97.
- Lotfy A, AboQuella NM, Wang H. Mesenchymal stromal/stem cell (MSC)-derived exosomes in clinical trials. *Stem Cell Res Ther*. 2023 Apr 7;14(1):66. doi: 10.1186/s13287-023-03287-7. PMID: 37024925; PMCID: PMC10079493.
- Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol*. 2014;15(12):550.
- Lubarsky B, Krasnow MA. Tube morphogenesis: making and shaping biological tubes. *Cell*. 2003;112(1):19-28.
- Luo J, Zou H, Guo Y, Tong T, Chen Y, Xiao Y, et al. The oncogenic roles and clinical implications of YAP/TAZ in breast cancer. *Br J Cancer*. 2023; 128(9):1611-1624.

- Luo Q, Wang J, Zhao W, Peng Z, Liu X, Li B, Zhang H, Shan B, Zhang C, Duan C. Vasculogenic mimicry in carcinogenesis and clinical applications. *J Hematol Oncol.* 2020 Mar 14;13(1):19. doi: 10.1186/s13045-020-00858-6. PMID: 32169087; PMCID: PMC7071697.
- Lyu XJ, Zhou L, Jiang XM, Zheng D. Mesenchymal stem cell-derived lncRNAs NKILA contributes to stemness and chemoresistance by fatty acid oxidation in gastric cancer via miR-485-5p/STAT3. *World J Gastrointest Oncol.* 2025 Aug 15;17(8):105006. doi: 10.4251/wjgo.v17.i8.105006. PMID: 40837764; PMCID: PMC12362598.
- Maacha S, Sidahmed H, Jacob S, Gentilcore G, Calzone R, Grivel JC, Cugno C. Paracrine mechanisms of mesenchymal stromal cells in angiogenesis. *Stem Cells Int.* 2020;2020:4356359.
- Maddison K, Bowden NA, Graves MC, Tooney PA. Characteristics of vasculogenic mimicry and tumour to endothelial transdifferentiation in human glioblastoma: a systematic review. *BMC Cancer.* 2023;23(1):185.
- Maddison, K., Bowden, N.A., Graves, M.C. et al. Characteristics of vasculogenic mimicry and tumour to endothelial transdifferentiation in human glioblastoma: a systematic review. *BMC Cancer* 23, 185 (2023). <https://doi.org/10.1186/s12885-023-10659-y>
- Maniotis AJ, Folberg R, Hess A, Seftor EA, Gardner LM, Pe'er J, Trent JM, Meltzer PS, Hendrix MJ. Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry. *Am J Pathol.* 1999;155(3):739-52.
- Mao, Jm., Liu, J., Guo, G. et al. Glioblastoma vasculogenic mimicry: signaling pathways progression and potential anti-angiogenesis targets. *Biomark Res* 3, 8 (2015). <https://doi.org/10.1186/s40364-015-0034-3>
- Mariz S, Reese JH, Westermarck K, Greene L, Goto T, Hoshino T, et al. Worldwide collaboration for orphan drug designation. *Nat Rev Drug Discov* 2016; 15(6):440-441.
- Marques Dos Reis E, Vieira Berti F. Vasculogenic Mimicry-An Overview. *Methods Mol Biol.* 2022;2514:3-13. doi: 10.1007/978-1-0716-2403-6_1. PMID: 35771413.
- Marsland M, Dowdell A, Faulkner S, Gedye C, Lynam J, Griffin CP, Marsland J, Jiang CC, Hondermarck H. The Membrane Protein Sortilin Is a Potential Biomarker and Target for Glioblastoma. *Cancers (Basel).* 2023 Apr 27;15(9):2514. doi: 10.3390/cancers15092514. PMID: 37173980; PMCID: PMC10177035.
- Masliantsev K, Karayan-Tapon L, Guichet PO. Hippo signaling pathway in gliomas. *Cells.* 2021; 10(1):184.
- Masliantsev K, Karayan-Tapon L, Guichet PO. Hippo signaling pathway in gliomas. *Cells.* 2021;10(1):184.
- Melincovici CS, Boşca AB, Şuşman S, Mărginean M, Mişu C, Istrate M, Moldovan IM, Roman AL, Mişu CM. Vascular endothelial growth factor (VEGF) - key factor in normal and pathological angiogenesis. *Rom J Morphol Embryol.* 2018;59(2):455-467. PMID: 30173249.
- Merimi M, El-Majzoub R, Lagneaux L, Moussa Agha D, Bouhtit F, Meuleman N, Fahmi H, Lewalle P, Fayyad-Kazan M, Najar M. The therapeutic potential of mesenchymal stromal cells for regenerative medicine: Current knowledge and future understandings. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9:661532.

- Miceli V, Bulati M, Iannolo G, Zito G, Gallo A, Conaldi PG. Therapeutic properties of mesenchymal stromal/stem cells: The need of cell priming for cell-free therapies in regenerative medicine. *Int J Mol Sci.* 2021;22(2):763.
- Minev T, Balbuena S, Gill JM, Marincola FM, Kesari S, Lin F. Mesenchymal stem cells - the secret agents of cancer immunotherapy: Promises, challenges, and surprising twists. *Oncotarget.* 2024 Nov 22;15:793-805. doi: 10.18632/oncotarget.28672. PMID: 39576660; PMCID:PMC11584032.
- Mitok KA, Keller MP, Attie AD. Sorting through the extensive and confusing roles of sortilin in metabolic disease. *J Lipid Res.* 2022 Aug;63(8):100243. doi: 10.1016/j.jlr.2022.100243. Epub 2022 Jun 18. PMID: 35724703; PMCID: PMC9356209.
- MN, Lee HJ, Pham TH, Modrusan Z, Zang R, Chen YC, Kabza M, Ahmed M, Li J, Chang MT, Maddalo D, Evangelista M, Ye X, Crawford JJ, Dey A. An allosteric pan-TEAD inhibitor blocks oncogenic YAP/TAZ signaling and overcomes KRAS G12C inhibitor resistance. *Nat Cancer.* 2023;4(6):812-828.
- Mokhtari RB, Ashayeri N, Baghaie L, Sami M, Satari K, Baluch N, Bosykh DA, Szewczuk MR, Chakraborty S. The Hippo pathway effectors YAP/TAZ-TEAD oncoproteins as emerging therapeutic targets in the tumor microenvironment. *Cancers (Basel).* 2023;15(13):3468.
- Molaei A, Molaei E, Wallace Hayes A, Karimi G. FOXC1 and FOXC2 in Osteogenesis: Emerging Roles and Therapeutic Potential in Bone Regeneration and Remodeling. *Exp Cell Res.* 2025 Aug 21;114712. doi: 10.1016/j.yexcr.2025.114712. Epub ahead of print. PMID: 40849056.
- Muralikumar M, Manoj Jain S, Ganesan H, Duttaroy AK, Pathak S, Banerjee A. Current understanding of the mesenchymal stem cell-derived exosomes in cancer and aging. *Biotechnol Rep (Amst).* 2021 Jul 12;31:e00658. doi: 10.1016/j.btre.2021.e00658. PMID: 34377681; PMCID: PMC8327488.
- Musleh Ud Din S, Streit SG, Huynh BT, Hana C, Abraham AN, Hussein A. Therapeutic Targeting of Hypoxia-Inducible Factors in Cancer. *Int J Mol Sci.* 2024 Feb 8;25(4):2060. doi: 10.3390/ijms25042060. PMID: 38396737; PMCID: PMC10888675.
- Mélin L, Abdullayev S, Fnaiche A, Vu V, González Suárez N, Zeng H, et al. Development of LM98, a small-molecule TEAD inhibitor derived from flufenamic acid. *ChemMedChem.* 2021; 16(19):2982-3002.
- Mélin L, Abdullayev S, Fnaiche A, Vu V, González Suárez N, Zeng H, Szewczyk MM, Li F, Senisterra G, Allali-Hassani A, Chau I, Dong A, Woo S, Annabi B, Halabelian L, LaPlante SR, Vedadi M, Barsyte-Lovejoy D, Santhakumar V, Gagnon A. Development of LM98, a small-molecule TEAD inhibitor derived from flufenamic acid. *ChemMedChem.* 2021;16(19):2982-3002.
- Morel AP, Ouzounova M. Understanding cancer cell plasticity: EMT, respecialisation, and therapeutic opportunities. *EMBO Mol Med.* 2025 Aug 26. doi: 10.1038/s44321-025-00288-2. Epub ahead of print. PMID: 40859054.
- Nagle RB, Cress AE. Metastasis update: Human prostate carcinoma invasion via tubulogenesis. *Prostate Cancer.* 2011;2011:249290.
- Nasiri N, Haghdoost F, Habibi M, Fateh M, Gholami S, Tabaie SM. Stem Cell Perspective for Regenerative Wound Healing: from Biology toward Future Clinical Directions: A Review. *Cell J.* 2025 Feb 23;26(10):575-589. doi: 10.22074/cellj.2024.2034492.1613. PMID: 40007444.

- National Brain Tumor Society. (n.d.). About Glioblastoma – Glioblastoma Awareness Day. Retrieved [May 2025]
- Nghiem, E.; Friedman, B.; Srivastava, N.; Takchi, A.; Mohammadi, M.; Dedushi, D.; Edelmann, W.; Kuang, C.; Bteich, F. Emerging Strategies for Targeting Angiogenesis and the Tumor Microenvironment in Gastrointestinal Malignancies: A Comprehensive Review. *Pharmaceuticals* 2025, 18, 1160. <https://doi.org/10.3390/ph18081160>
- Nguyen CDK, Yi C. YAP/TAZ Signaling and resistance to cancer therapy. *Trends Cancer*. 2019;5(5):283-296.
- Nicolas J, Magli S, Rabbachin L, Sampaolesi S, Nicotra F, Russo L. 3D extracellular matrix mimics: Fundamental concepts and role of materials chemistry to influence stem cell fate. *Biomacromolecules*. 2020;21(6):1968-94.
- Nieto MA, Huang RY, Jackson RA, Thiery JP. EMT: 2016. *Cell*. 2016 Jun 30;166(1):21-45. doi: 10.1016/j.cell.2016.06.028. PMID: 27368099.
- Nishina H. Physiological and pathological roles of the Hippo-YAP/TAZ signaling pathway in liver formation, homeostasis, and tumorigenesis. *Cancer Sci*. 2022;113(6):1900-1908.
- Novartis. (2025, March 10). A Phase I Study of IAG933 in Patients With Advanced Mesothelioma and Other Solid Tumors (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04857372). Retrieved from <https://www.novartis.com/clinicaltrials/study/nct04857372>
- O'Connor MJ. Targeting the DNA Damage Response in Cancer. *Mol Cell*. 2015 Nov 19;60(4):547-60. doi: 10.1016/j.molcel.2015.10.040. PMID: 26590714.
- Ogiwara T, Sato A, Wakabayashi M, Nakamura K, Hanaoka Y, Hongo K, Hayashi Y. Real-time fluorescence-guided glioblastoma resection with 5-aminolevulinic acid using ORBEYE™. *J Clin Neurosci*. 2025 Apr 21;136:111276. doi: 10.1016/j.jocn.2025.111276. Epub ahead of print. PMID: 40262451.
- Osuka S, Van Meir EG. Overcoming therapeutic resistance in glioblastoma: the way forward. *J Clin Invest*. 2017;127(2):415-426.
- Ou A, Yung WKA, Majd N. Molecular mechanisms of treatment resistance in glioblastoma. *Int J Mol Sci*. 2020;22(1):351.
- Ouyang T, Meng W, Li M, Hong T, Zhang N. Recent advances of the Hippo/YAP signaling pathway in brain development and glioma. *Cell Mol Neurobiol*. 2020;40(4):495-510.
- Ouyang T, Meng W, Li M, Hong T, Zhang N. Recent advances of the Hippo/YAP signaling pathway in brain development and glioma. *Cell Mol Neurobiol*. 2020;40(4):495-510.
- Pandiar D, Smitha T, Krishnan RP. Vasculogenic mimicry. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2023 Jan-Mar;27(1):228-229. doi: 10.4103/jomfp.jomfp_532_22. Epub 2023 Mar 21. PMID: 37234296; PMCID: PMC10207198.
- Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P, Mankoo P, Carter H, Siu IM, Gallia GL, Olivi A, McLendon R, Rasheed BA, Keir S, Nikolskaya T, Nikolsky Y, Busam DA, Tekleab H, Diaz LA Jr, Hartigan J, Smith DR, Strausberg RL, Marie SK, Shinjo SM, Yan H, Riggins GJ, Bigner DD, Karchin R, Papadopoulos N, Parmigiani G, Vogelstein B, Velculescu VE, Kinzler

- KW. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science*. 2008;321(5897):1807-1812.
- Paul S, Xie S, Yao X, Dey A. Transcriptional regulation of the Hippo pathway: Current understanding and insights from single-cell technologies. *Cells*. 2022;11(14):2225.
- Paulis YW, Soetekouw PM, Verheul HM, Tjan-Heijnen VC, Griffioen AW. Signalling pathways in vasculogenic mimicry. *Biochim Biophys Acta*. 2010; 1806(1):18-28.
- Peinado H, Zhang H, Matei IR, Costa-Silva B, Hoshino A, Rodrigues G, Psaila B, Kaplan RN, Bromberg JF, Kang Y, Bissell MJ, Cox TR, Giaccia AJ, Erler JT, Hiratsuka S, Ghajar CM, Lyden D. Pre-metastatic niches: organ-specific homes for metastases. *Nat Rev Cancer*. 2017 May;17(5):302-317. doi: 10.1038/nrc.2017.6. Epub 2017 Mar 17. PMID: 28303905.
- Pesapane A, Di Giovanni C, Rossi FW, Alfano D, Formisano L, Ragno P, Selleri C, Montuori N, Lavecchia A. Discovery of new small molecules inhibiting 67 kDa laminin receptor interaction with laminin and cancer cell invasion. *Oncotarget*. 2015;6(20):18116-33.
- Pesapane A, Ragno P, Selleri C, Montuori N. Recent Advances in the Function of the 67 kDa Laminin Receptor and its Targeting for Personalized Therapy in Cancer. *Curr Pharm Des*. 2017;23(32):4745-4757. doi: 10.2174/1381612823666170710125332. PMID: 28699539.
- Pichardo-Rojas PS, Garcia-Torrico F, Espinosa-Cantú CB, Rodriguez-Elvir FA, la Fuente ACB, Hernandez-Garcia MS, Trippett JS, Morell A, Shah AH, Komotar RJ, Esquenazi Y. Current trends in reoperation for recurrent glioblastoma: a meta-analysis (2007-2023). *J Neurooncol*. 2025 May 2. doi: 10.1007/s11060-025-05058-1. Epub ahead of print. PMID: 40314867.
- Pitot HC. The molecular biology of carcinogenesis. *Cancer*. 1993 Aug 1;72(3 Suppl):962-70. doi: 10.1002/1097-0142(19930801)72:3+<962::aid-cnrc2820721303>3.0.co;2-h. PMID: 8334671.
- Pratt J, Haidara K, Annabi B. MT1-MMP expression levels and catalytic functions dictate LDL receptor-related protein-1 ligand internalization capacity in U87 glioblastoma cells. *Int J Mol Sci*. 2022;23(22):14214.
- Proulx-Bonneau S, Guezguez A, Annabi B. A concerted HIF-1 α /MT1-MMP signalling axis regulates the expression of the 3BP2 adaptor protein in hypoxic mesenchymal stromal cells. *PLoS One*. 2011;6(6):e21511.
- Provance OK, Oria VO, Tran TT, Caulfield JI, Zito CR, Aguirre-Ducler A, Schalper KA, Kluger HM, Jilaveanu LB. Vascular mimicry as a facilitator of melanoma brain metastasis. *Cell Mol Life Sci*. 2024;81(1):188.
- Pusztaszeri MP, Seelentag W, Bosman FT. Immunohistochemical expression of endothelial markers CD31, CD34, von Willebrand factor, and Fli-1 in normal human tissues. *J Histochem Cytochem*. 2006;54(4):385-95.
- Qiao K, Liu Y, Xu Z, Zhang H, Zhang H, Zhang C, Chang Z, Lu X, Li Z, Luo C, Liu Y, Yang C, Sun T. RNA m6A methylation promotes the formation of vasculogenic mimicry in hepatocellular carcinoma via Hippo pathway. *Angiogenesis*. 2021;24(1):83-96. Erratum in: *Angiogenesis*. 2023;26(1):197-199.

- Qiao K, Liu Y, Xu Z, Zhang H, Zhang H, Zhang C, et al. RNA m6A methylation promotes the formation of vasculogenic mimicry in hepatocellular carcinoma via Hippo pathway. *Angiogenesis*. 2021; 24(1):83-96. Erratum in: *Angiogenesis*. 2023; 26(1):197-199.
- Rahman R, Polley MC, Alder L, Brastianos PK, Anders CK, Tawbi HA, Mehta M, Wen PY, Geyer S, de Groot J, Zadeh G, Piantadosi S, Galanis E, Khasraw M. Current drug development and trial designs in neuro-oncology: report from the first American Society of Clinical Oncology and Society for Neuro-Oncology Clinical Trials Conference. *Lancet Oncol*. 2023;24(4):e161-e171.
- Ran Y, Han S, Gao D, Chen X, Liu C. Interference of FZD2 suppresses proliferation, vasculogenic mimicry and stemness in glioma cells via blocking the Notch/NFκB signaling pathway. *Exp Ther Med*. 2024 Jul 23;28(4):373. doi: 10.3892/etm.2024.12662. PMID: 39091630; PMCID: PMC11292164.
- Rattigan Y, Hsu JM, Mishra PJ, Glod J, Banerjee D. Interleukin 6 mediated recruitment of mesenchymal stem cells to the hypoxic tumor milieu. *Exp Cell Res*. 2010;316(20):3417-24.
- Recouvreux MS, Miao J, Gozo MC, Wu J, Walts AE, Karlan BY, Orsulic S. FOXC2 promotes vasculogenic mimicry in ovarian cancer. *Cancers (Basel)*. 2022;14(19):4851.
- Rhost S, Hughes É, Harrison H, Rafnsdottir S, Jacobsson H, Gregersson P, Magnusson Y, Fitzpatrick P, Andersson D, Berger K, Ståhlberg A, Landberg G. Sortilin inhibition limits secretion-induced progranulin-dependent breast cancer progression and cancer stem cell expansion. *Breast Cancer Res*. 2018 Nov 20;20(1):137. doi: 10.1186/s13058-018-1060-5. PMID: 30454027; PMCID: PMC6245804.
- Rodgers, L.T.; Villano, J.L.; Hartz, A.M.S.; Bauer, B. Glioblastoma Standard of Care: Effects on Tumor Evolution and Reverse Translation in Preclinical Models. *Cancers* 2024, 16, 2638.
- Roselli S, Pundavela J, Demont Y, Faulkner S, Keene S, Attia J, Jiang CC, Zhang XD, Walker MM, Hondermarck H. Sortilin is associated with breast cancer aggressiveness and contributes to tumor cell adhesion and invasion. *Oncotarget*. 2015 Apr 30;6(12):10473-86. doi: 10.18632/oncotarget.3401. PMID: 25871389; PMCID: PMC4496368.
- Roselli S., Pundavela J., Demont Y., Faulkner S., Keene S., Attia J., Jiang C.C., Zhang X.D., Walker M.M., Hondermarck H. Sortilin is associated with breast cancer aggressiveness and contributes to tumor cell adhesion and invasion. *Oncotarget*. 2015;6:10473–10486. doi: 10.18632/oncotarget.3401. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
- Roy ME, Veilleux C, Paquin A, Gagnon A, Annabi B. Transcriptional regulation of CYR61 and CTGF by LM98: a synthetic YAP-TEAD inhibitor that targets in-vitro vasculogenic mimicry in glioblastoma cells. *Anticancer Drugs*. 2024;35(8):709-719.
- Rybak AP, Tang D. SOX2 plays a critical role in EGFR-mediated self-renewal of human prostate cancer stem-like cells. *Cell Signal*. 2013 Dec;25(12):2734-42. doi: 10.1016/j.cellsig.2013.08.041. Epub 2013 Sep 13. PMID: 24036214.
- Rytlewski JA, Alejandra Aldon M, Lewis EW, Suggs LJ. Mechanisms of tubulogenesis and endothelial phenotype expression by MSCs. *Microvasc Res*. 2015 May;99:26-35. doi: 10.1016/j.mvr.2015.02.005. Epub 2015 Feb 21. PMID: 25711526; PMCID: PMC4426083.
- Rytlewski JA, Alejandra Aldon M, Lewis EW, Suggs LJ. Mechanisms of tubulogenesis and endothelial phenotype expression by MSCs. *Microvasc Res*. 2015;99:26-35.

- Salmaninejad A, Ilkhani K, Marzban H, Navashenaq JG, Rahimirad S, Radnia F, Yousefi M, Bahmanpour Z, Azhdari S, Sahebkar A. Genomic Instability in Cancer: Molecular Mechanisms and Therapeutic Potentials. *Curr Pharm Des.* 2021;27(28):3161-3169. doi: 10.2174/1381612827666210426100206. PMID: 33902409.
- Sansone P, Bromberg J. Targeting the interleukin-6/Jak/stat pathway in human malignancies. *J Clin Oncol.* 2012 Mar 20;30(9):1005-14. doi: 10.1200/JCO.2010.31.8907. Epub 2012 Feb 21. PMID: 22355058; PMCID: PMC3341105.
- Santoessa A Ghisai, Nastaran Barin, Levi van Hijfte, Kim Verhagen, Maurice de Wit, Martin J van den Bent, Youri Hoogstrate, Pim J French, Transcriptomic analysis of EGFR co-expression and activation in glioblastoma reveals associations with its ligands, *Neuro-Oncology Advances*, Volume 7, Issue 1, January-December 2025, vdae229, <https://doi.org/10.1093/noajnl/vdae229>
- Saunders JT, Holmes B, Benavides-Serrato A, Kumar S, Nishimura RN, Gera J. Targeting the YAP-TEAD interaction interface for therapeutic intervention in glioblastoma. *J Neurooncol.* 2021;152(2):217-231.
- Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods.* 2012; 9(7):671-675.
- Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods.* 2012;9(7):671-5.
- Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods.* 2012;9(7):671-675.
- Schulz M, Prinz M. Brain metastasis: From etiology to ecotypes. *Cancer Cell.* 2025 Apr 29;S1535-6108(25)00170-9. doi: 10.1016/j.ccell.2025.04.011. Epub ahead of print. PMID: 40345191.
- Selvendiran K, Bratasz A, Kuppusamy ML, Tazi MF, Rivera BK, Kuppusamy P. Hypoxia induces chemoresistance in ovarian cancer cells by activation of signal transducer and activator of transcription 3. *Int J Cancer.* 2009 Nov 1;125(9):2198-204. doi: 10.1002/ijc.24601. PMID: 19623660; PMCID: PMC2893222.
- Shapkina V, Shindyapin V, Burlov N, Prosekina E, Artemyeva A. Vasculogenic mimicry in non-small cell lung cancer: a systematic review. *Front Oncol.* 2025 Jul 25;15:1481726. doi: 10.3389/fonc.2025.1481726. PMID: 40786517; PMCID: PMC12331492.
- Sharma D, Zachary I, Jia H. Mechanisms of Acquired Resistance to Anti-VEGF Therapy for Neovascular Eye Diseases. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2023 May 1;64(5):28. doi: 10.1167/iovs.64.5.28. PMID: 37252731; PMCID: PMC10230445.
- Sharma P, Aaroe A, Liang J, Puduvalli VK. Tumor microenvironment in glioblastoma: Current and emerging concepts. *Neurooncol Adv.* 2023 Feb 23;5(1):vdad009. doi: 10.1093/noajnl/vdad009. PMID: 36968288; PMCID: PMC10034917.
- Sicard AA, Dao T, Suarez NG, Annabi B. Diet-derived gallated catechins prevent TGF- β -mediated epithelial-mesenchymal transition, cell migration and vasculogenic mimicry in chemosensitive ES-2 ovarian cancer cells. *Nutr Cancer.* 2021; 73(1):169-180.
- Siegel RL, Miller KD, Wagle NS, Jemal A. Cancer statistics, 2023. *CA Cancer J Clin.* 2023 Jan;73(1):17-48. doi: 10.3322/caac.21763. PMID: 36633525.

- Soufiane El Hallani, Blandine Boisselier, Florent Peglion, Audrey Rousseau, Carole Colin, Ahmed Idbaih, Yannick Marie, Karima Mokhtari, Jean-Léon Thomas, Anne Eichmann, Jean-Yves Delattre, Andrew J. Maniotis, Marc Sanson, A new alternative mechanism in glioblastoma vascularization: tubular vasculogenic mimicry, *Brain*, Volume 133, Issue 4, April 2010, Pages 973–982, <https://doi.org/10.1093/brain/awq044>
- Starska-Kowarska K. Role of Mesenchymal Stem/Stromal Cells in Head and Neck Cancer-Regulatory Mechanisms of Tumorigenic and Immune Activity, Chemotherapy Resistance, and Therapeutic Benefits of Stromal Cell-Based Pharmacological Strategies. *Cells*. 2024 Jul 28;13(15):1270. doi: 10.3390/cells13151270. PMID: 39120301; PMCID: PMC11311692.
- Starska-Kowarska K. Role of Mesenchymal Stem/Stromal Cells in Head and Neck Cancer-Regulatory Mechanisms of Tumorigenic and Immune Activity, Chemotherapy Resistance, and Therapeutic Benefits of Stromal Cell-Based Pharmacological Strategies. *Cells*. 2024 Jul 28;13(15):1270. doi: 10.3390/cells13151270. PMID: 39120301; PMCID: PMC11311692.
- Starska-Kowarska K. Role of Mesenchymal Stem/Stromal Cells in Head and Neck Cancer-Regulatory Mechanisms of Tumorigenic and Immune Activity, Chemotherapy Resistance, and Therapeutic Benefits of Stromal Cell-Based Pharmacological Strategies. *Cells*. 2024 Jul 28;13(15):1270. doi: 10.3390/cells13151270. PMID: 39120301; PMCID: PMC11311692.
- Stein C, Bardet AF, Roma G, Bergling S, Clay I, Ruchti A, Agarinis C, Schmelzle T, Bouwmeester T, Schübeler D, Bauer A. YAP1 exerts its transcriptional control via TEAD-mediated activation of enhancers. *PLoS Genet*. 2015;11(8):e1005465.
- Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, Paulovich A, Pomeroy SL, Golub TR, Lander ES, Mesirov JP. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(43):15545-50.
- Suhail Y, Cain MP, Vanaja K, Kurywchak PA, Levchenko A, Kalluri R, Kshitiz. Systems Biology of Cancer Metastasis. *Cell Syst*. 2019 Aug 28;9(2):109-127. doi: 10.1016/j.cels.2019.07.003. PMID: 31465728; PMCID: PMC6716621.
- Sun C, Dai X, Zhao D, Wang H, Rong X, Huang Q, Lan Q. Mesenchymal stem cells promote glioma neovascularization in vivo by fusing with cancer stem cells. *BMC Cancer*. 2019;19(1):1240.
- Sun X, Cai W, Li H, Gao C, Ma X, Guo Y, Fu D, Xiao D, Zhang Z, Wang Y, Yang S, Feng Y, Zhao T, Hao J. Endothelial-like cancer-associated fibroblasts facilitate pancreatic cancer metastasis via vasculogenic mimicry and paracrine signalling. *Gut*. 2025 Mar 23;gutjnl-2024-333638. doi: 10.1136/gutjnl-2024-333638. Epub ahead of print. PMID: 40122596.
- Szklarczyk D, Gable AL, Nastou KC, Lyon D, Kirsch R, Pyysalo S, Doncheva NT, Legeay M, Fang T, Bork P, Jensen LJ, von Mering C. The STRING database in 2021: customizable protein-protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets. *Nucleic Acids Res*. 2021;49(D1):D605-D612. Erratum in: *Nucleic Acids Res*. 2021;49(18):10800.
- Szklarczyk D, Gable AL, Nastou KC, Lyon D, Kirsch R, Pyysalo S, et al. The STRING database in 2021: customizable protein-protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets. *Nucleic Acids Res*. 2021; 49(D1):D605-D612. Erratum in: *Nucleic Acids Res*. 2021; 49(18):10800.

- Talukdar S, Emdad L, Das SK, Fisher PB. EGFR: An essential receptor tyrosine kinase-regulator of cancer stem cells. *Adv Cancer Res.* 2020;147:161-188. doi: 10.1016/bs.acr.2020.04.003. Epub 2020 Jun 15. PMID: 32593400.
- Tang TT, Konradi AW, Feng Y, Peng X, Ma M, Li J, Yu FX, Guan KL, Post L. Small molecule inhibitors of TEAD auto-palmitoylation selectively inhibit proliferation and tumor growth of NF2-deficient mesothelioma. *Mol Cancer Ther.* 2021;20(6):986-998.
- Tang Z, Li C, Kang B, Gao G, Li C, Zhang Z. GEPIA: a web server for cancer and normal gene expression profiling and interactive analyses. *Nucleic Acids Res.* 2017; 45(W1):W98-W102.
- Tang Z, Li C, Kang B, Gao G, Li C, Zhang Z. GEPIA: a web server for cancer and normal gene expression profiling and interactive analyses. *Nucleic Acids Res.* 2017;45(W1):W98-W102.
- Thalakiriyawa DS, Jayasooriya PR, Dissanayaka WL. Regenerative potential of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles. *Curr Mol Med.* 2022;22(2):98-119.
- Tian T, Li A, Lu H, Luo R, Zhang M, Li Z. TAZ promotes temozolomide resistance by upregulating MCL-1 in human glioma cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015;463(4):638-643.
- Tian Y, Fang J, Zeng F, Chen Y, Pei Y, Gu F, Ding C, Niu G, Gu B. The role of hypoxic mesenchymal stem cells in tumor immunity. *Int Immunopharmacol.* 2022;112:109172.
- Tianli, W., Li, S. & Zhang, R. Functional study of laminin subunit $\alpha 5$ in high-grade serous ovarian cancer. *J Ovarian Res* 18, 157 (2025). <https://doi.org/10.1186/s13048-025-01752-w>
- Torabidastgerdooei S, Roy ME, Annabi B. A molecular signature for the G6PC3/SLC37A2/SLC37A4 interactors in glioblastoma disease progression and in the acquisition of a brain cancer stem cell phenotype. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2023; 14:1265698.
- Torabidastgerdooei S, Roy ME, Annabi B. A molecular signature for the G6PC3/SLC37A2/SLC37A4 interactors in glioblastoma disease progression and in the acquisition of a brain cancer stem cell phenotype. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2023;14:1265698.
- Ulpiano C, da Silva CL, Monteiro GA. Mesenchymal stromal cells (MSCs): A promising tool for cell-based angiogenic therapy. *Curr Gene Ther.* 2021;21(5):382-405.
- Uribe ML, Marrocco I, Yarden Y. EGFR in Cancer: Signaling Mechanisms, Drugs, and Acquired Resistance. *Cancers (Basel).* 2021 Jun 1;13(11):2748. doi: 10.3390/cancers13112748. PMID: 34206026; PMCID: PMC8197917.
- Uthamacumaran A, Suarez NG, Baniré Diallo A, Annabi B. Computational methods for structure-to-function analysis of diet-derived catechins-mediated targeting of in vitro vasculogenic mimicry. *Cancer Inform.* 2021; 20:11769351211009229.
- Uthamacumaran A, Suarez NG, Baniré Diallo A, Annabi B. Computational methods for structure-to-function analysis of diet-derived catechins-mediated targeting of in vitro vasculogenic mimicry. *Cancer Inform.* 2021;20:11769351211009229.
- Van den Broeke A, Van Poucke M, Van Zeveren A, Peelman LJ. Ribosomal protein SA and its pseudogenes in ruminants: an extremely conserved gene family. *Czech Journal of Animal Science, Czech Academy of Agricultural Sciences,* 2013;58(2):79-90.

- Viallard C, Larrivée B. Tumor angiogenesis and vascular normalization: alternative therapeutic targets. *Angiogenesis*. 2017 Nov;20(4):409-426. doi: 10.1007/s10456-017-9562-9. Epub 2017 Jun 28. PMID: 28660302.
- Vitale I, et al. Apoptotic cell death in disease-Current understanding of the NCCD 2023. *Cell Death Differ*. 2023 May;30(5):1097-1154. doi: 10.1038/s41418-023-01153-w. Epub 2023 Apr 26. PMID: 37100955; PMCID: PMC10130819.
- Voskarides K, Giannopoulou N. The Role of TP53 in Adaptation and Evolution. *Cells*. 2023 Feb 3;12(3):512. doi: 10.3390/cells12030512. PMID: 36766853; PMCID: PMC9914165.
- Wang DY, Wu YN, Huang JQ, Wang W, Xu M, Jia JP, Han G, Mao BB, Bi WZ. Hippo/YAP signaling pathway is involved in osteosarcoma chemoresistance. *Chin J Cancer*. 2016;35:47.
- Wang J, Wang Y, Wang S, Cai J, Shi J, Sui X, Cao Y, Huang W, Chen X, Cai Z, Li H, Bardeesi AS, Zhang B, Liu M, Song W, Wang M, Xiang AP. Bone marrow-derived mesenchymal stem cell-secreted IL-8 promotes the angiogenesis and growth of colorectal cancer. *Oncotarget*. 2015;6(40):42825-37.
- Wang J, Xia W, Huang Y, Li H, Tang Y, Li Y, Yi B, Zhang Z, Yang J, Cao Z, Zhou J. A vasculogenic mimicry prognostic signature associated with immune signature in human gastric cancer. *Front Immunol*. 2022;13:1016612.
- Wang M, Zhang W, Crisostomo P, Markel T, Meldrum KK, Fu XY, Meldrum DR. STAT3 mediates bone marrow mesenchymal stem cell VEGF production. *J Mol Cell Cardiol*. 2007;42(6):1009-15.
- Wang S, Sun Z, Wang C, Zhang A, Zhang C, Hou S, Lin N, Li Q. The JAK1/STAT3 pathway mediates the effects of SERPINH1 on glioma EMT. *Int Immunopharmacol*. 2025 May 6;157:114731. doi: 10.1016/j.intimp.2025.114731. Epub ahead of print. PMID: 40334628.
- Wang TH, Hsia SM, Shieh TM. Lysyl Oxidase and the Tumor Microenvironment. *Int J Mol Sci*. 2016 Dec 29;18(1):62. doi: 10.3390/ijms18010062. PMID: 28036074; PMCID: PMC5297697.
- Wang Y, Pan P, Wang Z, Zhang Y, Xie P, Geng D, Jiang Y, Yu R, Zhou X. β -catenin-mediated YAP signaling promotes human glioma growth. *J Exp Clin Cancer Res*. 2017;36(1):136.
- Watt SM, Gullo F, van der Garde M, Markeson D, Camicia R, Khoo CP, Zwaginga JJ. The angiogenic properties of mesenchymal stem/stromal cells and their therapeutic potential. *Br Med Bull*. 2013;108(1):25-53.
- Wei H, Wang F, Wang Y, Li T, Xiu P, Zhong J, et al. Verteporfin suppresses cell survival, angiogenesis and vasculogenic mimicry of pancreatic ductal adenocarcinoma via disrupting the YAP-TEAD complex. *Cancer Sci*. 2017; 108(3):478-487.
- Wei H, Wang F, Wang Y, Li T, Xiu P, Zhong J, Sun X, Li J. Verteporfin suppresses cell survival, angiogenesis and vasculogenic mimicry of pancreatic ductal adenocarcinoma via disrupting the YAP-TEAD complex. *Cancer Sci*. 2017 Mar;108(3):478-487. doi: 10.1111/cas.13138. PMID: 28002618; PMCID: PMC5378285.
- Wei X, Chen Y, Jiang X, Peng M, Liu Y, Mo Y, Ren D, Hua Y, Yu B, Zhou Y, Liao Q, Wang H, Xiang B, Zhou M, Li X, Li G, Li Y, Xiong W, Zeng Z. Mechanisms of vasculogenic mimicry in hypoxic tumor microenvironments. *Mol Cancer*. 2021 Jan 4;20(1):7. doi: 10.1186/s12943-020-01288-1. PMID: 33397409; PMCID: PMC7784348.

- White, J., White, M.P.J., Wickremesekera, A. et al. The tumour microenvironment, treatment resistance and recurrence in glioblastoma. *J Transl Med* 22, 540 (2024). <https://doi.org/10.1186/s12967-024-05301-9>
- Wilson CM, Naves T, Al Akhrass H, Vincent F, Melloni B, Bonnaud F, Lalloué F, Jauberteau MO. A new role under sortilin's belt in cancer. *Commun Integr Biol*. 2016 Jan 11;9(1):e1130192. doi: 10.1080/19420889.2015.1130192. PMID: 27066187; PMCID: PMC4802778.
- Wong RS. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J Exp Clin Cancer Res*. 2011 Sep 26;30(1):87. doi: 10.1186/1756-9966-30-87. PMID: 21943236; PMCID: PMC3197541.
- Wong Y, Su ELM, Yeong CF, Holderbaum W, Yang C. Brain tumor classification using MRI images and deep learning techniques. *PLoS One*. 2025 May 9;20(5):e0322624. doi: 10.1371/journal.pone.0322624. PMID: 40344143.
- Wu KC, Chang YH, Ding DC, Lin SZ. Mesenchymal Stromal Cells for Aging Cartilage Regeneration: A Review. *Int J Mol Sci*. 2024 Nov 30;25(23):12911. doi: 10.3390/ijms252312911. PMID: 39684619; PMCID: PMC11641625.
- Wu S, Tang Q, Fang W, Sun Z, Zhang M, Liu E, Cao Y, Huang Y. Targeting stem-property and vasculogenic mimicry for sensitizing paclitaxel therapy of triple-negative breast cancer by biomimetic codelivery. *Acta Pharm Sin B*. 2025 Jun;15(6):3226-3242. doi: 10.1016/j.apsb.2025.04.006. Epub 2025 Apr 10. PMID: 40654354; PMCID: PMC12254866.
- Xie J, Tang JX, Li Y, Kong X, Wang W, Wu H. ATM activation is key in vasculogenic mimicry formation by glioma stem-like cells. *Biomed Environ Sci*. 2024;37(8):834-849.
- Xu Z, Robitaille AM, Berndt JD, Davidson KC, Fischer KA, Mathieu J, Potter JC, Ruohola-Baker H, Moon RT. Wnt/ β -catenin signaling promotes self-renewal and inhibits the primed state transition in naïve human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016 Oct 18;113(42):E6382-E6390. doi: 10.1073/pnas.1613849113. Epub 2016 Oct 3. PMID: 27698112; PMCID: PMC5081574.
- Xuan YT, Zhu Y, Wang OL, Cheng G, Elias H, Davani A, Yang Y, Girgis M, Vincent RJ, Hauptman J, Dawn B. STAT3 activation prevents mesenchymal stem cell apoptosis and improves infarct repair. *Circulation*. 2012;126(21S):A12591.
- Yamamoto T, Nakayama J, Yamamoto Y, Kuroda M, Hattori Y, Ochiya T. SORT1/LAMP2-mediated extracellular vesicle secretion and cell adhesion are linked to lenalidomide resistance in multiple myeloma. *Blood Adv*. 2022 Apr 26;6(8):2480-2495. doi: 10.1182/bloodadvances.2021005772. PMID: 34979567; PMCID: PMC9043942.
- Yang W, Li Z, Wang W, Wu J, Li J, Huang X, Zhang X, Ye X. Vasculogenic mimicry score identifies the prognosis and immune landscape of lung adenocarcinoma. *Front Genet*. 2023 Jun 7;14:1206141. doi: 10.3389/fgene.2023.1206141. PMID: 37351348; PMCID: PMC10282128.
- Yang Y, Li J, Lei W, Wang H, Ni Y, Liu Y, Yan H, Tian Y, Wang Z, Yang Z, Yang S, Yang Y, Wang Q. CXCL12-CXCR4/CXCR7 Axis in Cancer: from Mechanisms to Clinical Applications. *Int J Biol Sci*. 2023 Jun 26;19(11):3341-3359. doi: 10.7150/ijbs.82317. PMID: 37497001; PMCID: PMC10367567.

- Yizhak K, Aguet F, Kim J, Hess JM, Kübler K, Grimsby J, Frazer R, Zhang H, Haradhvala NJ, Rosebrock D, Livitz D, Li X, Arich-Landkof E, Shores N, Stewart C, Segrè AV, Branton PA, Polak P, Ardlie KG, Getz G. RNA sequence analysis reveals macroscopic somatic clonal expansion across normal tissues. *Science*. 2019 Jun 7;364(6444):eaaw0726. doi: 10.1126/science.aaw0726. PMID: 31171663; PMCID: PMC7350423.
- Yu, X., Li, W., Liu, H., Wang, X., Coarfa, C., Cheng, C., Yu, X., Zeng, Z., Cao, Y., Young, K. H., & Li, Y. (2023). PD-L1 translocation to the plasma membrane enables tumor immune evasion through MIB2 ubiquitination. *Journal of Clinical Investigation*, 133(3), e160456. <https://doi.org/10.1172/JCI160456>
- Yuan Y, Luo Y, Feng H, Deng R, Liang B, et al. EGFR-Regulated EMT is a Driver of Vasculogenic Mimicry in Nasopharyngeal Carcinoma. *J Oncology*. 2023; 3(1): 1076.
- Zahonero C, Sánchez-Gómez P. EGFR-dependent mechanisms in glioblastoma: towards a better therapeutic strategy. *Cell Mol Life Sci*. 2014 Sep;71(18):3465-88. doi: 10.1007/s00018-014-1608-1. Epub 2014 Mar 27. PMID: 24671641; PMCID: PMC11113227.
- Zeng H, Yang Z, Xu N, Liu B, Fu Z, Lian C, et al. Connective tissue growth factor promotes temozolomide resistance in glioblastoma through TGF- β 1-dependent activation of Smad/ERK signaling. *Cell Death Dis*. 2017; 8(6):e2885.
- Zgheib A, Lamy S, Annabi B. Epigallocatechin gallate targeting of membrane type 1 matrix metalloproteinase-mediated Src and Janus kinase/signal transducers and activators of transcription 3 signaling inhibits transcription of colony-stimulating factors 2 and 3 in mesenchymal stromal cells. *J Biol Chem*. 2013;288(19):13378-86.
- Zgheib A, Pelletier-Bonnie É, Levros LC Jr, Annabi B. Selective JAK/STAT3 signalling regulates transcription of colony stimulating factor-2 and -3 in Concanavalin-A-activated mesenchymal stromal cells. *Cytokine*. 2013;63(2):187-93.
- Zhang Q, Yu J, Chen Q, Yan H, Du H, Luo W. Regulation of pathophysiological and tissue regenerative functions of MSCs mediated via the WNT signaling pathway (Review). *Mol Med Rep*. 2021;24(3):648.
- Zhang Y, Bai J, Cheng R, Zhang D, Qiu Z, Liu T, Che N, Dong X, Zhao N, Lin X, Liang X, Li F, Li Y, Sun B, Zhao X. TAZ promotes vasculogenic mimicry in gastric cancer through the upregulation of TEAD4. *J Gastroenterol Hepatol*. 2022;37(4):714-726.
- Zhang Y, Bai J, Cheng R, Zhang D, Qiu Z, Liu T, et al. TAZ promotes vasculogenic mimicry in gastric cancer through the upregulation of TEAD4. *J Gastroenterol Hepatol*. 2022; 37(4):714-726.
- Zhang Y, Xie P, Wang X, Pan P, Wang Y, Zhang H, Dong Y, Shi Y, Jiang Y, Yu R, Zhou X. YAP promotes migration and invasion of human glioma cells. *J Mol Neurosci*. 2018;64(2):262-272.
- Zhao B, Kim J, Ye X, Lai ZC, Guan KL. Both TEAD-binding and WW domains are required for the growth stimulation and oncogenic transformation activity of yes-associated protein. *Cancer Res*. 2009; 69(3):1089-1098.
- Zhao D, Pan C, Sun J, Gilbert C, Drews-Elger K, Azzam DJ, Picon-Ruiz M, Kim M, Ullmer W, El-Ashry D, Creighton CJ, Slingerland JM. VEGF drives cancer-initiating stem cells through VEGFR-2/Stat3 signaling to upregulate Myc and Sox2. *Oncogene*. 2015;34(24):3107-19.

- Zhao M, Zhang Y, Jiang Y, Wang K, Wang X, Zhou D, Wang Y, Yu R, Zhou X. YAP promotes autophagy and progression of gliomas via upregulating HMGB1. *J Exp Clin Cancer Res.* 2021;40(1):99.
- Zhao N, Sun BC, Sun T, Ma YM, Zhao XL, Liu ZY, Dong XY, Che N, Mo J, Gu Q. Hypoxia-induced vasculogenic mimicry formation via VE-cadherin regulation by Bcl-2. *Med Oncol.* 2012;29(5):3599-607.
- Zhou B, Tsaknakis G, Coldwell KE, Khoo CP, Roubelakis MG, Chang CH, Pepperell E, Watt SM. A novel function for the haemopoietic supportive murine bone marrow MS-5 mesenchymal stromal cell line in promoting human vasculogenesis and angiogenesis. *Br J Haematol.* 2012;157(3):299-311.
- Zhou H, Yuan Y, Qian H. Expression of STAT3 and vasculogenic mimicry in gallbladder carcinoma promotes invasion and metastasis. *Exp Ther Med.* 2021;22(1):738.
- Zhou J, Ma X, He X, Chen B, Yuan J, Jin Z, Li L, Wang Z, Xiao Q, Cai Y, Zou Y, Cong YS. Dysregulation of PD-L1 by UFMylation imparts tumor immune evasion and identified as a potential therapeutic target. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2023 Mar 14;120(11):e2215732120. doi: 10.1073/pnas.2215732120. Epub 2023 Mar 9. Erratum in: *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2023 May 23;120(21):e2306087120. doi: 10.1073/pnas.2306087120. PMID: 36893266; PMCID: PMC10089188.
- Zhou X, Lei QY. Regulation of TAZ in cancer. *Protein Cell.* 2016; 7(8):548-561.
- Zhu F, Qiu J, Ye H, Su W, Wang R, Fu Y. The Prognostic Significance of Epidermal Growth Factor Receptor Amplification and Epidermal Growth Factor Receptor Variant III Mutation in Glioblastoma: A Systematic Review and Meta-Analysis with Implications for Targeted Therapy. *Int J Mol Sci.* 2025 Apr 9;26(8):3539. doi: 10.3390/ijms26083539. PMID: 40331985; PMCID: PMC12027172.
- Zriek F, Di Battista JA, Alaaeddine N. Mesenchymal stromal cell secretome: Immunomodulation, tissue repair and effects on neurodegenerative conditions. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2021;16(6):656-669.