

Expression de la protéine TFE3 dans les carcinomes rénaux à cellules claires : exploration d'une nouvelle voie d'oncogenèse

Youta Fanjat

▶ **To cite this version:**

Youta Fanjat. Expression de la protéine TFE3 dans les carcinomes rénaux à cellules claires : exploration d'une nouvelle voie d'oncogenèse. Médecine humaine et pathologie. 2020. dumas-03511659

HAL Id: dumas-03511659

https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03511659

Submitted on 5 Jan 2022

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

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

UNIVERSITE DE NICE SOPHIA-ANTIPOLIS

FACULTE DE MEDECINE

THESE

Pour l'obtention du diplôme d'état de Docteur en Médecine

Présentée et soutenue le 11 décembre 2020

Par

Youta FANJAT, né le 19 Septembre 1990

EXPRESSION DE LA PROTEINE TFE3 DANS LES CARCINOMES RENAUX A CELLULES CLAIRES : EXPLORATION D'UNE NOUVELLE VOIE D'ONCOGENESE

Membres du Jury :

Président du jury :	Monsieur le Professeur Jean-François MICHIELS
Directeur de thèse :	Monsieur le Docteur Damien AMBROSETTI
Assesseurs :	Madame la Professeure Fanny BUREL-VANDENBOS
	Monsieur le Docteur Matthieu DURAND
	Madame la Docteure Maeva DUFIES

Université Nice Sophia Antipolis

Faculté de Médecine

Liste des enseignants au 1er septembre 2019 à la Faculté de Médecine de Nice

Doyen

Pr. BAQUÉ Patrick

Vice-doyens

Pédagogie Pr. ALUNNI Véronique

Recherche Pr DELLAMONICA jean

Etudiants M. JOUAN Robin

Chargé de mission projet Campus	**Pr. PAQUIS Philippe**
Conservateur de la bibliothèque	Mme AMSELLE Danièle
Directrice administrative des services	Mme CALLEA Isabelle
Doyens Honoraires	M. RAMPAL Patrick
	M. BENCHIMOL Daniel

Université Nice Sophia Antipolis
Faculté de Médecine

Liste des enseignants au 1er septembre 2019 à la Faculté de Médecine de Nice

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

M.	BAQUÉ Patrick	Anatomie - Chirurgie Générale (42.01)
M.	BERNARDIN Gilles	Réanimation Médicale (48.02)
Mme	BLANC-PEDEUTOUR Florence	Cancérologie – Génétique (47.02)
M.	BOILEAU Pascal	Chirurgie Orthopédique et Traumatologique (50.02)
M.	DARCOURT Jacques	Biophysique et Médecine Nucléaire (43.01)
M.	DRICI Milou-Daniel	Pharmacologie Clinique (48.03)
M.	ESNAULT Vincent	Néphrologie (52-03)
M.	FUZIBET Jean-Gabriel	Médecine Interne (53.01)
M.	GILSON Éric	Biologie Cellulaire (44.03)
M.	GUGENHEIM Jean	Chirurgie Digestive (52.02)
M.	HASSEN KHODJA Reda	Chirurgie Vasculaire (51.04)
M.	HÉBUTERNE Xavier	Nutrition (44.04)
M.	HOFMAN Paul	Anatomie et Cytologie Pathologiques (42.03)
Mme	ICHAI Carole	Anesthésiologie et Réanimation Chirurgicale (48.01)
M.	LACOUR Jean-Philippe	Dermato-Vénéréologie (50.03)
M.	LEFTHERIOTIS Georges	Chirurgie vasculaire ; médecine vasculaire (51.04)
M.	MARQUETTE Charles-Hugo	Pneumologie (51.01)
M.	MARTY Pierre	Parasitologie et Mycologie (45.02)
M.	MICHIELS Jean-François	Anatomie et Cytologie Pathologiques (42.03)
M.	MOUROUX Jérôme	Chirurgie Thoracique et Cardiovasculaire (51.03)
Mme	PAQUIS Véronique	Génétique (47.04)
M.	PAQUIS Philippe	Neurochirurgie (49.02)
M.	PRADIER Christian	Épidémiologie, Économie de la Santé et Prévention (46.01)
M.	QUATREHOMME Gérald	Médecine Légale et Droit de la Santé (46.03)
M.	RAUCOULES-AIMÉ Marc	Anesthésie et Réanimation Chirurgicale (48.01)
M.	ROBERT Philippe	Psychiatrie d'Adultes (49.03)
M.	SCHNEIDER Stéphane	Nutrition (44.04)
M.	THYSS Antoine	Cancérologie, Radiothérapie (47.02)
M.	TRAN Albert	Hépato Gastro-entérologie (52.01)

Université Nice Sophia Antipolis
Faculté de Médecine

Liste des enseignants au 1er septembre 2019 à la Faculté de Médecine de Nice

PROFESSEURS PREMIERE CLASSE

Mme	ASKENAZY-GITTARD Florence	Pédopsychiatrie (49.04)
M.	BARRANGER Emmanuel	Gynécologie Obstétrique (54.03)
M.	BÉRARD Étienne	Pédiatrie (54.01)
M.	BONGAIN André	Gynécologie-Obstétrique (54.03)
Mme	BREUIL Véronique	Rhumatologie (50.01)
M.	CASTILLO Laurent	O.R.L. (55.01)
M.	CHEVALLIER Patrick	Radiologie et Imagerie Médicale (43.02)
M.	DE PERETTI Fernand	Anatomie-Chirurgie Orthopédique (42.01)
M.	FERRARI Émile	Cardiologie (51.02)
M.	FERRERO Jean-Marc	Cancérologie ; Radiothérapie (47.02)
M.	FONTAINE Denys	Neurochirurgie (49.02)
M.	GIBELIN Pierre	Cardiologie (51.02)
M.	HANNOUN-LEVI Jean-Michel	Cancérologie ; Radiothérapie (47.02)
M.	LEVRAUT Jacques	Médecine d'urgence (48.05)
M.	LONJON Michel	Neurochirurgie (49.02)
M.	MOUNIER Nicolas	Cancérologie, Radiothérapie (47.02)
M.	PADOVANI Bernard	Radiologie et Imagerie Médicale (43.02)
M.	PASSERON Thierry	Dermato-Vénéréologie (50-03)
M.	PICHE Thierry	Gastro-entérologie (52.01)
Mme	RAYNAUD Dominique	Hématologie (47.01)
M.	ROSENTHAL Éric	Médecine Interne (53.01)
M.	STACCINI Pascal	Biostatistiques et Informatique Médicale (46.04)
M.	THOMAS Pierre	Neurologie (49.01)
M.	TROJANI Christophe	Chirurgie Orthopédique et Traumatologique (50.02)

Université Nice Sophia Antipolis
Faculté de Médecine

Liste des enseignants au 1er septembre 2019 à la Faculté de Médecine de Nice

PROFESSEURS DEUXIEME CLASSE

Mme	ALUNNI Véronique	Médecine Légale et Droit de la Santé (46.03)
M.	ANTY Rodolphe	Gastro-entérologie (52.01)
M.	BAHADORAN Philippe	Cytologie et Histologie (42.02)
Mme	BAILLIF Stéphanie	Ophtalmologie (55.02)
Mme	BANNWARTH Sylvie	Génétique (47.04)
M.	BENIZRI Emmanuel	Chirurgie Générale (53.02)
M.	BENOIT Michel	Psychiatrie (49.03)
M.	BERTHET Jean-Philippe	Chirurgie Thoracique (51-03)
M.	BOZEC Alexandre	ORL- Cancérologie (47.02)
M.	BREAUD Jean	Chirurgie Infantile (54-02)
Mme	BUREL-VANDENBOS Fanny	Anatomie et Cytologie pathologiques (42.03)
M.	CHEVALIER Nicolas	Endocrinologie, Diabète et Maladies Métaboliques (54.04)
Mme	CHINETTI Giulia	Biochimie-Biologie Moléculaire (44.01)
M.	CLUZEAU Thomas	Hématologie (47.01)
M.	DELLAMONICA Jean	réanimation médicale (48.02)
M.	DELOTTE Jérôme	Gynécologie-obstétrique (54.03)
M	FAVRE Guillaume	Néphrologie (44-02)
M.	FOURNIER Jean-Paul	Thérapeutique (48-04)
Mme	GIORDANENGO Valérie	Bactériologie-Virologie (45.01)
Mme	GIOVANNINI-CHAMI Lisa	Pédiatrie (54.01)
M.	GUÉRIN Olivier	Méd. In ; Gériatrie (53.01)
M.	IANNELLI Antonio	Chirurgie Digestive (52.02)
M.	ILIE Marius	Anatomie et Cytologie pathologiques (42.03)
M	JEAN BAPTISTE Elixène	Chirurgie vasculaire (51.04)
M.	ROHRLICH Pierre	Pédiatrie (54.01)
M.	ROUX Christian	rhumatologie (50.01)
M.	RUIMY Raymond	Bactériologie-virologie (45.01)
Mme	SACCONI Sabrina	Neurologie (49.01)
M.	SADOUL Jean-Louis	Endocrinologie, Diabète et Maladies Métaboliques (54.04)
M.	VANBIERVLIET Geoffroy	Gastro-entérologie (52.01)

Université Nice Sophia Antipolis
Faculté de Médecine

Liste des enseignants au 1er septembre 2019 à la Faculté de Médecine de Nice

MAITRES DE CONFÉRENCES DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS HOSPITALIERS

M.	AMBROSETTI Damien	Cytologie et Histologie (42.02)
Mme	BERNARD-POMIER Ghislaine	Immunologie (47.03)
M.	BRONSARD Nicolas	Anatomie Chirurgie Orthopédique et Traumatologique (42.01)
M.	CAMUZARD Olivier	Chirurgie Plastique (50-04)
Mme	CONTENTI-LIPRANDI Julie	Médecine d'urgence (48-04)
M.	DOGLIO Alain	Bactériologie-Virologie (45.01)
M	DOYEN Jérôme	Radiothérapie (47.02)
M.	FOSSE Thierry	Bactériologie-Virologie-Hygiène (45.01)
M.	GARRAFFO Rodolphe	Pharmacologie Fondamentale (48.03)
Mme	HINAULT Charlotte	Biochimie et biologie moléculaire (44.01)
M.	HUMBERT Olivier	Biophysique et Médecine Nucléaire (43.01)
Mme	LAMY Brigitte	Bactériologie-virologie (45.01)
Mme	LONG-MIRA Elodie	Cytologie et Histologie (42.02)
Mme	MAGNIÉ Marie-Noëlle	Physiologie (44.02)
M.	MASSALOU Damien	Chirurgie Viscérale (52-02)
Mme	MOCERI Pamela	Cardiologie (51.02)
M.	MONTAUDIE Henri	Dermatologie (50.03)
Mme	MUSSO-LASSALLE Sandra	Anatomie et Cytologie pathologiques (42.03)
M.	NAÏMI Mourad	Biochimie et Biologie moléculaire (44.01)
Mme	POMARES Christelle	Parasitologie et mycologie (45.02)
M.	SAVOLDELLI Charles	Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie (55.03)
Mme	SEITZ-POLSKI Barbara	Immunologie (47.03)
M.	SQUARA Fabien	Cardiologie (51.02)
M.	TESTA Jean	Épidémiologie Économie de la Santé et Prévention (46.01)
Mme	THUMMLER Susanne	Pédopsychiatrie (49-04)
M.	TOULON Pierre	Hématologie et Transfusion (47.01)

Université Nice Sophia Antipolis
Faculté de Médecine

Liste des enseignants au 1er septembre 2019 à la Faculté de Médecine de Nice

MAITRE DE CONFÉRENCES DES UNIVERSITÉS

M.	DARMON David	Médecine (53.03)	Générale
Mme	GROS Auriane	Orthophonie (69)	

PROFESSEURS AGRÉGÉS

Mme	LANDI Rebecca	Anglais

PRATICIEN HOSPITALIER UNIVERSITAIRE

M.	DURAND Matthieu	Urologie (52.04)
M.	SICARD Antoine	Néphrologie (52-03)

PROFESSEURS ASSOCIÉS

M.	GARDON Gilles	Médecine (53.03)	Générale
Mme	MONNIER Brigitte	Médecine (53.03)	Générale

MAITRES DE CONFÉRENCES ASSOCIÉS

Mme	CASTA Céline	Médecine (53.03)	Générale
M.	GASPERINI Fabrice	Médecine (53.03)	Générale
M.	HOGU Nicolas	Médecine (53.03)	Générale

Université Nice Sophia Antipolis
Faculté de Médecine

Liste des enseignants au 1er septembre 2019 à la Faculté de Médecine de Nice

Constitution du jury en qualité de 4ème membre

Professeurs Honoraires

M. AMIEL Jean
M ALBERTINI Marc
M. BALAS Daniel
M. BATT Michel
M. BLAIVE Bruno
M. BOQUET Patrice
M. BOURGEON André
M. BOUTTÉ Patrick
M. BRUNETON Jean-Noël
Mme BUSSIERE Françoise
M. CAMOUS Jean-Pierre
M. CANIVET Bertrand
M. CASSUTO Jill-patrice
M. CHATEL Marcel
M. COUSSEMENT Alain
Mme CRENESSE Dominique
M. DARCOURT Guy
M. DELLAMONICA Pierre
M. DELMONT Jean
M. DEMARD François
M. DESNUELLE Claude
M. DOLISI Claude
Mme EULLER-ZIEGLER Liana
M. FENICHEL Patrick
M. FRANCO Alain
M. FREYCHET Pierre
M. GASTAUD Pierre
M. GÉRARD Jean-Pierre
M. GILLET Jean-Yves
M. GRELLIER Patrick
M. GRIMAUD Dominique
M. HOFLIGER Philippe
M. JOURDAN Jacques
M. LAMBERT Jean-Claude
M. LAZDUNSKI Michel
M. LEFEBVRE Jean-Claude
M. LE FICHOUX Yves
Mme LEBRETON Elisabeth
M. MARIANI Roger
M. MASSEYEFF René
M. MATTEI Mathieu
M. MOUIEL Jean
Mme MYQUEL Martine
M. ORTONNE Jean-Paul
M. PRINGUEY Dominique
M. SANTINI Joseph
M. SAUTRON Jean Baptiste
M. SCHNEIDER Maurice
M. TOUBOL Jacques
M. TRAN Dinh Khiem
M VANOBBERGHEN Emmanuel
M. ZIEGLER Gérard

M.C.U. Honoraires

M. ARNOLD Jacques
M. BASTERIS Bernard
M. BENOLIEL José
Mlle CHICHMANIAN Rose-Marie
Mme DONZEAU Michèle
M. EMILIOZZI Roméo
M. FRANKEN Philippe
M. GASTAUD Marcel
M. GIUDICELLI Jean
M. MAGNÉ Jacques
Mme MEMRAN Nadine
M. MENGUAL Raymond
M. PHILIP Patrick
M. POIRÉE Jean-Claude
Mme ROURE Marie-Claire

Table des matières

Liste des abréviations 10

I. Introduction 11

I.1 Le cancer du rein 11

I.2. Objectifs du projet 12

II. Matériel et méthode 12

II.1- Collection de tissus de patients et sélection des blocs de paraffine 12

II.2 – Cohorte TCGA 12

II.3- Immunohistochimie 13

II.4- PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR) 13

II.5 – Culture cellulaire 14

II.6 – Migration cellulaire 14

II.7 – Analyse statistique 14

III. Résultats 14

IV. Discussion générale 19

V. Conclusion 21

VI. Article original 21

VII. Bibliographie 56

SERMENT D'HIPPOCRATE 56

Résumé 57

Liste des abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique

ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire

ARN : acide ribonucléique

ARNm : acide ribonucléique messager

ccRCC : RCC à cellules claires

DFS : Disease Free Survival / Temps jusqu'à apparition des métastases

FISH: Fluorescence in situ hybridization

HAF: Hypoxia-Associated Factor

HGF: Hepatocyte Growth Factor

HIF: Hypoxia Inducible Factor

IHC : Immunohistochemistry

ITK : Inhibiteur de Tyrosine Kinase

LEF1: Lymphoid Enhancer-Binding Factor 1

MiTF : Microphtalmia-associated Transcription Factors

mRCC : metastatic Renal Cell Carcinoma

OS : Overall Survival / survie globale

PFS : Progression Free Survival / Temps jusqu'à progression des métastases

PCR : polymerase chain reaction

RCC : Renal Cell Carcinoma / Cancer du rein

RPMI: Roswell Park Memorial Institute medium

RT : Reverse Transcription

TNM : Tumor Nodes Metastasis

tRCC: Translocation Renal Cell Carcinoma

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

VHL: Von Hippel Lindau

I. Introduction

I.1 Le cancer du rein

En 2018, 403262 nouveaux cas de cancer du rein ont été diagnostiqués dans le monde, à l'origine de 175 098 décès[1]. Le carcinome à cellules rénales (RCC) représente plus de 90% des tumeurs rénales malignes. Les sous-types les plus fréquents de RCC sont les carcinomes rénaux à cellules claires (ccRCC) (85%), les carcinomes papillaires (10-15%) et chromophobes (5%)[2]. Le taux de survie à 5 ans a tendance à s'améliorer mais le pronostic global, en particulier pour les patients atteints d'une maladie de haut grade, est médiocre[1,3]. Le ccRCC est de loin l'entité la plus courante et représente le sous-type le plus agressif de la maladie.

Les ccRCC sont caractérisés par une inactivation du gène VHL (3p25.3) via le plus souvent une perte au niveau du bras du chromosome 3p dans plus de 90% des tumeurs. La deuxième copie de VHL est perdue soit par mutation ponctuelle (52,3%) ou par régulation épigénétique (hyperméthylation du promoteur du gène VHL) [4,5]. L'inactivation du gène VHL empêche l'ubiquitination du hypoxia-inducible factor (HIF) conduisant à sa dégradation. La perte de VHL dans le ccRCC entraîne une activation constitutive de HIF1 / 2a et une transactivation de gènes en aval tels que le VEGF. Ces données ont conduit au développement d'un traitement anti-angiogénique ciblant le VEGF. Le traitement standard du RCC métastatique (mRCC) est le sunitinib, un inhibiteur de la tyrosine kinase qui bloque la voie VHL-HIF-VEGF, ou des immunothérapies comme le nivolumab combinés à l'ipilimumab ciblant respectivement PD1 et CTLA4. Cependant, l'optimisation du traitement reste un défi pour la plupart des cas de RCC métastatiques (mRCC)[6,7]. Outre la voie VHL-HIF-VEGF, de nombreuses autres voies oncogènes impliquées dans le ccRCC ont été découvertes. De nouveaux gènes de prédisposition, aussi localisés sur le chromosome 3p, ont été identifiés, comme PBRM1, BAP1 et SETD2, tous impliqués dans la régulation épigénétique[8]. MET est également impliqué dans différents processus oncogènes du CCR. Des mutations activatrices ont été décrites dans le domaine tyrosine kinase, en particulier dans le RCC papillaire[9]. En outre, MET a été identifié comme étant impliqué dans certains mécanismes de résistance au traitement comme le sunitinib[10]. De plus, après une exposition à long terme au sunitinib, les tumeurs rénales peuvent surexprimer les voies de signalisation MET, constituant un mécanisme d'échappement. La compréhension de ces voies alternes de l'oncogenèse dans le cancer du rein présente un intérêt pronostique et théranostique. Il a été démontré que les thérapies ciblant MET, consistant en des inhibiteurs hautement sélectifs de MET-tyrosine kinase, sont des options de traitement prometteuses pour le RCC entraîné par MET[11]. Ainsi le cabozantinib est une molécule qui peut avoir une place dans l'arsenal thérapeutique des RCC, en particulier pour les tumeurs développant une résistance au sunitinib[12]. En 2004, le RCC associé aux translocations de Xp11.2 / fusion du gène du facteur de transcription E3 (TFE3) a été ajouté à la classification de l'Organisation mondiale de la santé

(OMS)[2,13]en tant que carcinome rénal à translocation TFE3 (tRCC). Les tRCC représenteraient environ 20 à 40% des RCC pédiatriques et 1 à 1,6% des RCC adultes [14,15]. Malgré sa faible incidence chez les adultes, le tRCC a un pronostic plus sombre que les autres RCC[16]. TFE3 est un gène situé sur le chromosome Xp11.2 et impliqué dans la fusion de gènes avec plusieurs partenaires conduisant à une surexpression de la protéine TFE3. Histologiquement, les tRCC sont généralement décrits comme possédant une architecture papillaire avec des cellules volumineuses claires ou éosinophiles et des psammomes. En raison de sa morphologie très variable, il peut notamment être confondu avec le ccRCC ou le RCC papillaire[2]. TFE3 est un membre de la microphtalmia-associated transcription factor family (MiTF). Cette famille d'oncogènes est impliquée dans la régulation de l'homéostasie de l'énergie cellulaire, de la biogenèse des lysosomes et de la réponse immunitaire. Leur expression est observée dans différents types de cancers et associée à un pronostic péjoratif. Il a été démontré que TFE3 peut stimuler la transcription de MET[17] et activer les voies de signalisation en aval, y compris la prolifération cellulaire, l'adhésion, la motilité cellulaire et l'invasion. Ces résultats démontrent le rôle majeur du TFE3 dans l'activation de MET et donc dans la carcinogénèse de certains cancers humains.

I.2. Objectifs du projet

Mon travail de thèse a consisté (1) à déterminer s'il existe un groupe de ccRCC exprimant fortement TFE3 en IHC et mRNA, (2) déterminer comment la transcription de TFE3 est augmenté dans les ccRCC, (3) confirmer le lien entre la surexpression de TFE3 et MET dans les ccRCC. Pour cela nous avons analysé l'expression de TFE3 et c-MET en IHC et les niveaux de TFE3, LEF1, MET et podoplanine en mRNA chez des patients atteints de ccRCC, puis nous les avons corrélés avec différentes données cliniques (TNM, progression, survie), en utilisant une cohorte The Cancer Genome Atlas comme cohorte de validation.

II. Matériel et méthode

II.1- Collection de tissus de patients et sélection des blocs de paraffine

Les pièces de tumorectomie ou néphrectomie de 66 ccRCC du CHU de Nice ont été inclues. Les données clinicopathologiques de la cohorte de Nice et de la cohorte française (Nice + Rennes + Bordeaux, n= 166) ont été résumés dans respectivement dans le tableau supplémentaire 1 et le tableau 1. Le marquage immunohistochimique et le dosage d'ARNm ont été réalisés comme décrit ci-dessous.

II.2 – Cohorte TCGA

Les données de séquençage de l'ARN (RNA-Seq) et les données cliniques produites par TCGA ont été téléchargées par cBioportal (www.cbioportal.org, TCGA Firehouse legacy; RNA-Seq V2). 14 patients tRCC (transloqués TFE3) ont été isolés et analysés, avec 434 autres cas de ccRCC. Les résultats utilisés

dans cet ouvrage sont basés en partie ou en totalité sur les données générées par le TCGA Research Network : http://cancergenome.nih.gov/. La méthode de Kaplan-Meier a été utilisée pour l'analyse de la survie sans récidive (DFS) et la survie globale (OS). Les patients ont été séparés en deux groupes en fonction du niveau d'expression de la TFE3 (cut off au troisième quartile). Une analyse différentielle a ensuite été effectuée entre les deux groupes de patients.

II.3- Immunohistochimie

L'analyse en immunohistochimie a été réalisée après échantillonnage du tissu fixé en paraffine en utilisant les anticorps TFE3 (TFE3 (p-16) sc-5958, 1:50 dilution, low pH, Santa Cruz, CA), c-MET (anti-Met (c-Met) antibody (SP44), ab227637, 1:50 dilution, high pH, Abcam, Toronto, ON, Canada) et Podoplanine (mouse anti-podoplanin, 1:25 dilution, high pH, Zytomed systems, Berlin, Germany). Pour TFE3, les podocytes du tissu rénal sain ont servis de témoin interne. Pour c-MET, les tubules dans le rein non tumoral ont servi de témoin interne. Le marquage de la podoplanine a été effectué en évaluant le pourcentage de vaisseaux lymphatiques présents dans la capsule tumorale. Pour c-MET, le marquage membranaire a été évalué ; score 0 si absence de marquage, score 1+ si marquage faible, ou marquage modéré <50% des cellules tumorales, score 2+ si marquage modéré >50% des cellules tumorales ou marquage fort <50%. Un marquage intense de ≥ 50 % des cellules tumorales était considéré comme score 3+. Le système de h-score (score multiplié par le pourcentage de cellules tumorales marquées) a été utilisé pour quantifier le marquage. Pour TFE3, le système d'Allred notamment utilisé pour les cancers du sein[18] a été appliqué. La proportion de cellules positives a été évaluée sur une échelle de 0 à 5 et l'intensité de marquage sur une échelle de 0 à 3, donnant un score global de 0 à 8. Les tumeurs avec un score Allred ≥ 6 ont été considérées comme TFE3 high. L'IHC TFE3 a été réalisée sur 3 cas contrôle de tRCC confirmés par FISH, montrant tous un signal nucléaire diffus, uniforme et intense (Allred score 8, Fig 1D).

II.4- PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR)

5 à 10 copeaux de 20 µm de tissu tumoral en paraffine ont été réalisés pour chaque patient, afin d'extraire l'ARN total. 0.5 µg d'ARN total a été utilisé pour la transcription inverse, utilisant le QuantiTect Reverse Transcription kit (QIAGEN, Hilden, Germany). SYBR master mix plus (Eurogentec, Liege, Belgium) a été utilisé pour la PCR quantitative (qPCR). Le niveau de mRNA a été normalisé à 36B4 mRNA.

II.5 – Culture cellulaire

Des cellules primitives de ccRCC ont été isolés de patients ccRCC du CHU de Nice et ont été cultivés dans un milieu spécifique pour cellules rénales (PromoCell, Heidelberg Germany). Les vecteurs exprimant CT (origene, PS100001), LEF1 (origene, RC225565) ou TFE3 (origene, RC206840) ont été transfectés (JetPEI transfection agent, polyplus, 101-10N) sur des cellules primitives de ccRCC pendant 72h.

II.6 – Migration cellulaire

Les tests de migration cellulaire ont été effectués en utilisant des pores de 8.0 µm. Les cellules appauvris en sérum (1×10^5 cellules) ont été placés dans la chambre supérieure dans du milieu sans FBS, tandis que du milieu contenant 10% de FBS était distribué dans la chambre inférieure. Les cellules ayant migré à travers le filtre et ayant adhéré au niveau de la surface inférieure ont été fixées par du PFA à 3% pendant 20 minutes et colorées pendant 10 minutes avec du crystal violet à 0.5% et du méthanol à 25%. Le nombre de cellules ayant migré a été quantifié par ImageJ.

II.7 – Analyse statistique

Le test de Fisher a été utilisé pour comparer les données cliniques et anatomo-pathologiques. Le test t de Student a été utilisé pour comparer les données continues. Toutes les valeurs p sont basées sur des hypothèses bilatérales, avec des résultats considérés comme statistiquement significatifs si la valeur de p était inférieure à 0.05. La DFS a été définie comme le temps entre la chirurgie et l'apparition de métastases. La PFS a été définie comme le temps entre la chirurgie et la progression, ou la survenue du décès toute cause confondue, en tronquant les patients vivants et sans progression lors du dernier suivi. L'OS a été défini comme le temps entre la chirurgie et la date de décès toute cause confondue, en tronquant les patients vivants lors du dernier suivi. La méthode de Kaplan-Meier pour la production des courbes et le modèle à régression de Cox a été utilisée pour l'analyse des données tronquées.

III. Résultats

Les figures et les tableaux sont rapportés en annexe de l'article original.

TFE3 peut être exprimé chez des patients atteints de ccRCC.

L'expression de TFE3 par IHC a été étudiée chez les 66 cas du CHU de Nice. La cohorte a montré une expression variable avec un Allred score allant de 0 à 7. Aucun cas n'a montré une expression intense et diffuse (Allred 8) comme exprimé sur les témoins tRCC. 46 cas (69.7%) étaient TFE3 Allred low et 20 (30.3%) étaient TFE3 Allred high. Il n'a pas été noté d'association significative entre l'expression de TFE3 et les différentes données anatomo-cliniques.

Tableau 1. sup. Caractéristiques clinico-pathologiques et expression de TFE3 en IHC des patients - cohorte de Nice

Tableau 1. Expression de TFE3 en ARNm et caractéristiques clinico-pathologiques - cohorte Française

Figure 1 : images représentatives de TFE3 en IHC.

Un niveau élevé d'ARNm de TFE3 est corrélé à l'IHC TFE3 et à un profil tumoral agressif qui conduit à un pronostic plus pauvre.

La DFS était significativement abaissée dans le groupe TFE3 Allred high par rapport au groupe TFE3 Allred low (DFS: 91 mois vs > 120 mois, p=0,0069, Fig 2A). Pour confirmer la pertinence de l'expression de TFE3 en IHC, nous avons analysé le niveau d'ARNm de TFE3 dans les mêmes tumeurs. Ceux-ci étaient significativement corrélés (p = 0,0023, Fig 2B). Le taux d'ARNm de TFE3 a ensuite été mesuré dans la cohorte Nice, Bordeaux et Rennes (cohorte française, tableau 1), sur un total de 166 cas. Nous avons utilisé le seuil du troisième quartile pour définir les groupes TFE3 faible et élevé chez les patients ccRCC. 126 cas (75,9%) étaient TFE3 low et 40 cas (24,1%) TFE3 high. Le groupe TFE3 élevé a présenté plus de métastases ganglionnaires (n = 7 (16,3%), p = 0,0026), et un score de Fuhrman plus élevé (p = 0,0014) (tableau 1). Aucune association significative n'a été notée pour les autres données cliniques (sexe, âge, statut T). En utilisant l'ARNm de TFE3 dans la cohorte française, nous avons confirmé sur plus grande cohorte (n = 166, tableau 1), que la surexpression de TFE3 est corrélée à une apparition plus rapide des métastases. Le seuil du troisième quartile a été utilisé pour définir le groupe TFE3 faible et élevé (DFS: 66 mois vs plus de 120 mois, p = 0,0088, Fig 2C).

Fig 2. L'expression en IHC de TFE3 est corrélée au niveau d'ARNm, tous deux corrélés à une diminution de la survie sans récidive (A-C)

Les patients ccRCC surexprimant le TFE3 présentent une DFS réduite similaire à celle des patients tRCC (cohorte TCGA).

Pour confirmer dans une cohorte indépendante la valeur pronostique de TFE3 dans les ccRCC, nous avons analysé la cohorte TCGA (patients ccRCC vs tRCC). Comme précédemment, nous avons utilisé le seuil du troisième quartile pour définir le groupe TFE3 low et high chez les patients ccRCC. Les patients tRCC proviennent de la cohorte ccRCC et pRCC TCGA (KIRC et KIRP respectivement) et sont identifiés par translocation du gène TFE3. L'expression de l'ARNm de TFE3 était significativement corrélée entre le groupe ccRCC TFE3 élevé (n = 48, 78,2%) et le groupe tRCC (n = 14, 2,2%) (p <0,0001, fig 3A).

Nous avons observé que dans le groupe tRCC, il y avait plus de patients de sexe féminin et de patients plus jeunes que dans les groupes de ccRCC TFE3 low et high (p> 0,05). Le groupe ccRCC TFE3 low a montré de meilleurs facteurs pronostiques pour la taille de la tumeur et les métastases ganglionnaires par rapport aux groupes tRCC et de ccRCC TFE3 high (p> 0,05). Le groupe ccRCC TFE3 low a par ailleurs présenté un meilleur stade AJCC par rapport au groupe surexprimant TFE3 (tableau 2).

De même que dans la cohorte française, la DFS était significativement réduite dans le groupe ccRCC TFE3 high et le groupe tRCC par rapport au groupe ccRCC TFE3 low (p=0,0002 et 0,05 respectivement, Fig 2B). Le groupe TFE3 high en ARNm présentait une survie globale (OS) réduite par rapport au groupe TFE3 low (survie médiane : 118,76 mois vs 56,31 mois, p <0,0001, Fig 3C).

Fig 3. Les ccRCC surexprimant TFE3 ont une survie sans progression et une survie globale réduite, comparable aux tRCC (cohorte TCGA)

Tableau 2. Expression de TFE3 en ARNm et caractéristiques clinico-pathologiques des patients examinés (cohorte TCGA)

LEF1 est l'un des principaux facteurs de transcription de la famille MiTF impliqué dans la surexpression du TFE3 dans le ccRCC.

Nous nous sommes ensuite intéressés à la régulation de TFE3 dans les ccRCC. LEF1 est un des facteurs transcription de la famille MiTF impliquée dans la surexpression de TFE3 dans les ccRCC. Il existe 5 principaux régulateurs connus impliqués dans la transcription de MiTF (ARF1, CREB, SOX10, PX3 et LEF1) [19–21]. Dans la cohorte TCGA, nous avons classé les patients en fonction de leur expression de TFE3 mRNA et leur association avec les facteurs de transcriptions cités. LEF1, en tant que régulateur

conduisant à la surexpression de TFE3 en ARNm (p<0.0001, Fig 4A et B). Dans les ccRCC, et par opposition au TFE3, le niveau d'ARNm de MiTF n'était pas corrélé au niveau de LEF1 (figure 4C).

Pour confirmer le lien entre l'expression des niveaux de LEF1 et TFE3, nous avons analysé la cohorte française qui a montré une corrélation significative entre l'ARNm de TFE3 et l'ARNm de LEF1 dans les ccRCC (p <0,0001, Fig 4D). Plus précisément, lorsque le niveau d'ARNm de LEF1 est élevé, il existe un niveau élevé de niveau d'ARNm de TFE3 dans les ccRCC. Ces résultats indiquent que LEF1 est un régulateur important de TFE3 et est nécessaire dans la surexpression de TFE3 dans les ccRCC.

Fig 4. LEF1 semble être un des principaux facteurs de transcription de la famille MiTF impliqué dans la surexpression de TFE3 dans les ccRCC (A-C : cohorte TCGA).

La surexpression de LEF1 dans les cellules primaires du ccRCC augmente l'expression de TFE3 et MET et favorise la migration cellulaire *in vitro*.

Des études de migration ont été réalisées sur des cellules primitives de ccRCC surexprimant LEF1 pour appuyer ces observations. L'analyse *in vitro* a confirmé que les cellules surexprimant LEF1 surexpriment également TFE3 (Sup Fig 1A) et qu'elles sont corrélées à un niveau plus élevé de d'ARNm de MET (Sup Fig 1B). Les cellules surexprimant LEF1 ont également montré une capacité de migration augmentée, comparable aux cellules contrôles surexprimant la TFE3 (Sup Fig 1D). Ces résultats suggèrent que LEF1 est impliqué dans la transcription de TFE3, la prolifération et la métastase des cellules ccRCC.

Sup Fig 1. La surexpression de LEF1 dans les cellules primaires de ccRCC augmente l'expression de TFE3 (B), de MET (C), et augmente la capacité de migration *in vitro* (D).

Un niveau élevé d'ARNm de LEF1 est corrélé à un mauvais pronostic chez les patients ccRCC.

Pour renforcer le lien entre LEF1 et TFE3 sur une tumeur ccRCC et son pronostic chez le patient, nous avons analysé le niveau d'ARNm de LEF1 sur la cohorte française et la cohorte TCGA. La surexpression de LEF1 dans la cohorte française est corrélée à une DFS significativement réduite (DFS : 66 mois vs plus de 120 mois, p = 0,0457, figure 5A) et une survie globale également réduite (SG: 62,81 mois vs 126,8 mois, p = 0,004, figure 5B). L'analyse de la cohorte TCGA confirme ces résultats, avec une DFS significativement réduite (DFS : 61,63 mois vs 123,7 mois, p = 0,0012, Fig 5C) sur des patients ccRCC

avec un taux élevé d'ARNm de TFE3. Ces résultats montrent qu'un niveau d'ARNm de LEF1 élevé, tout comme un niveau d'ARNm de TFE3 élevé, confère un mauvais pronostic.

Fig 5. Le niveau de LEF1 en ARNm est corrélé à un niveau de TFE3 élevé, et un pronostic péjoratif.

La surexpression de TFE3 induit une agressivité des ccRCC en augmentant l'expression de c-MET et en induisant des métastases ganglionnaires.

Nos études *in vitro* dans les cellules primaires de ccRCC ont montré que l'ARNm de MET était surexprimé dans les cellules surexprimant TFE3 (Sup Fig 1C). Ces cellules ont présenté une augmentation significative de ses capacités de migration par rapport aux cellules ccRCC témoins (Sup Fig 1D). Nous avons ensuite analysé comment l'expression de c-MET variait en fonction de la surexpression de TFE3 dans le tissu humain inclus en paraffine ccRCC. Des images représentatives d'expression en IHC sont montrées sur la figure 6A-D. L'analyse IHC de la cohorte de Nice a ainsi montré une corrélation entre l'expression de c-MET et TFE3 dans IHC (p=0,011, Fig 6E et F). En outre, l'analyse de la cohorte française a montré une corrélation significative entre le niveau d'ARNm de MET et les groupes ccRCC qui exprimaient un TFE3 faible ou élevé (p=0,0082, Fig 7A). Cette observation a été confirmée dans la cohorte TCGA avec l'ARNm de MET (p = 0,0349, Fig 7B).

Ensuite, nous avons analysé la podoplanine, une glycoprotéine membranaire largement utilisée en pathologie comme marqueur des vaisseaux lymphatiques. Un niveau d'expression élevé de podoplanine pourrait expliquer le potentiel métastatique du ccRCC induit par l'expression de c-MET, indépendamment de la voie VEGF / HIF. L'analyse de la cohorte française a montré une corrélation significative entre les tumeurs à faible expression d'ARNm de TFE3 et les tumeurs à faible expression ARNm de podoplanine dans le ccRCC (p=0,0133, Fig 7C). La cohorte TCGA a montré une corrélation similaire, avec une expression élevée de l'ARNm de podoplanine sur le groupe ccRCC surexprimant TFE3 (figure 7D). Ces résultats suggèrent que le TFE3 exprimant le ccRCC surexprime la podoplanine pour avoir une agressivité lymphatique et un potentiel métastatique accrus. Dans la cohorte de Nice, nous avons observé que les patients avec une surexpression de TFE3 en ARNm présentaient plus de métastases ganglionnaires par rapport aux patients avec un faible niveau expression (respectivement n = 6, 15% et n = 4, 0,6%, p = 0,0026, tableau 1), ce qui conforte nos observations.

Fig 6. L'expression de c-MET en IHC est corrélée au niveau de TFE3 en ARNm chez les patients ccRCC (cohort de Nice)

Fig 7. TFE3 est corrélé à MET et PDPN enARNm ches les patitents atteints de ccRCC. (A et C: cohorte Française, B et D: cohorte TCGA).

IV. Discussion générale

Notre étude met en évidence que dans certains cas, le ccRCC conventionnel peut exprimer le TFE3 en une quantité telle qu'il peut être détecté par l'IHC, en l'absence de translocation de TFE3. De plus, nous avons identifié une plus grande lymphophilie de ces tumeurs surexprimant la protéine TFE3, l'extension lymphatique n'étant pas une modalité classique de dissémination des ccRCC, et liée à un pronostic plus péjoratif. Nous avons déjà montré que la voie VEGFC est impliquée dans la dissémination lymphatique dans certains cas de ccRCC [22,23]. Il pourrait ainsi être intéressant d'étudier le lien entre les voies de signalisation VEGFC et TFE3-MET.

Les ccRCC correspondent à des tumeurs qui peuvent avoir un profil évolutif très variable, certaines évoluant lentement tandis que d'autres se présentent immédiatement au stade métastatique[3]. Cette variabilité se reflète dans la sensibilité à la chimiothérapie et aux thérapies ciblées. Tous ces éléments obligent à rechercher de nouveaux outils pronostiques et théranostiques. Certaines voies de signalisation oncogéniques ont été très bien analysées et documentées, telle que La voie HIF-VHL-VEGF qui est caractéristique des ccRCC, à la base du développement d'outils diagnostiques, pronostiques et thérapeutiques, et il en va de même dans une moindre mesure pour la voie MITF-MET pour les tRCC[24]. Cependant de plus en plus d'études montrent que ces voies ne sont pas exclusives à un sous-type de tumeur. Par exemple, l'implication de MET a été initialement démontrée dans l'oncogenèse du carcinome papillaire, mais cette voie est également impliquée dans le ccRCC et en particulier dans la résistance des TKI[10]. Nous démontrons de la même manière ici que la voie de signalisation TFE3-MET est impliquée dans le sous-groupe rare des carcinomes de translocation ainsi que dans les ccRCC, sous-type de loin le plus fréquent parmi les tumeurs rénales.

Cette surexpression de la protéine TFE3 peut avoir plusieurs origines. Dans les tRCC, la surexpression résulte d'un réarrangement génique, le gène TFE3 étant placé sous l'influence d'un promoteur [25]. Nous montrons ici que dans les ccRCC, la protéine LEF1 est responsable de la surexpression de TFE3, induisant une transcription de MET accrue, et ainsi de la voie HGF / c-MET correspondante. LEF1 a été identifié initialement comme un gène spécifique appartenant à la famille des facteurs de transcription à haute mobilité spécifique des éléments lymphoïdes [26,27]. MiTF est essentiel dans la différenciation des mélanocytes et il a été démontré qu'il se lie au LEF1 dans les cellules de mélanome. Le même domaine est présent dans le TFE3 et une coopération fonctionnelle entre les deux protéines a déjà été démontrée[28]. Récemment, une étude de Liu et Shang a montré que la régulation positive de l'intégrine

αMβ2 dans les cellules RCC conduisait à une quantité élevée de LEF1[29], induisant une augmentation de la prolifération, de la migration et de l'invasion des cellules RCC. Ces résultats confirment le potentiel cliniquement agressif des tumeurs surexprimant LEF1 que nous avons observé dans notre étude. Nous avons également démontré que parmi les protéines appartenant à la famille MiTF, seul LEF1 est responsable de la surexpression du TFE3. LEF1 pourrait donc être une cible thérapeutique potentielle pour les RCC métastatiques surexprimant le TFE3.

Nous avons démontré que le niveau d'ARNm de TFE3 était corrélé avec le niveau d'ARNm de MET et de PDPN. Pour l'activation de la voie HGF / cMET, HGF se lie à son récepteur c-MET, déclenchant la transphosphorylation de ses terminaisons tyrosine intracellulaires Tyr 1234 et Tyr 1235. Ainsi activé c-MET déclenche plusieurs voies de signalisation en aval, y compris la régulation de la prolifération, la progression du cycle cellulaire et la motilité cellulaire[30,31]. La voie de signalisation HGF / c-MET induit également un processus de lymphangiogenèse indépendant du VEGFR[32], ce qui pourrait expliquer l'agressivité clinique du tRCC et des ccRCC surexprimant le TFE3. Nous avons ainsi défini pour les ccRCC surexprimant TFE3 la voie de signalisation suivante ; activation successive de LEF1, de TFE3, puis de la voie HGF / c-Met qui favorise la lymphangiogenèse, notamment via PDPN, favorisant ainsi le développement des métastases.

Nos résultats suggèrent différentes méthodes d'exploration de la voie d'oncogenèse médiée par TFE3. Dans le cadre du diagnostic des tRCC, il a été montré que l'examen immunohistochimique pouvait constituer un outil de première intention dont la spécificité et la sensibilité sont imparfaites [33–36]. L'existence d'un niveau protéique variable de TFE3 dans les ccRCC explique le manque de spécificité de l'IHC pour le diagnostic des tRCC. L'examen de référence reste l'analyse génétique, principalement par immunofluorescence[37]. Pour l'impact pronostique de TFE3, nous avons cependant montré que l'analyse de l'activation de la voie oncogénique TFE3-MET peut être basée sur l'IHC TFE3, facile à réaliser mais dont la quantification reste grossière, ou par une analyse qPCR, quantitativement plus précise et certainement plus adapté à cet effet. Des travaux supplémentaires sont nécessaires pour définir précisément les recommandations dans ce contexte. Lee et al ont récemment démontré que les RCC peuvent exprimer TFE3 en IHC sans translocation TFE3 en FISH. Sur les 303 cas, 32 ont montré une expression de TFE3 modérée à forte. Après évaluation de l'expression de la TFE3 en l'absence de translocation, la PFS était diminuée chez les patients surexprimant TFE3 par rapport aux autres[38]. Notre étude, avec une cohorte plus large, appuie leur constat.

Nous avons clairement démontré l'impact pronostique de la surexpression de la protéine TFE3 dans les ccRCC et nous avons identifié les mécanismes expliquant l'agressivité des tumeurs présentant une

activation de cette voie oncogène. Cette surexpression de TFE3 induit aussi une résistance aux antiangiogéniques. Ceci a été démontré par l'équipe de Guo[39], via la surexpression de PDL1 mais aussi comme démontré ici par la surexpression de c-MET.

V. Conclusion

Notre étude démontre que des ccRCC peuvent exprimer TFE3 de manière intense en IHC en l'absence de translocation. Dans de tels cas, la protéine LEF1 joue un rôle important dans la surexpression de TFE3, qui est responsable de l'activation de la transcription de MET, et la voie de signalisation correspondante HGF/c-MET, résultant en une tumeur plus agressive et un mauvais pronostic.

Les tRCC restent un défi thérapeutique, avec une réponse clinique insatisfaisante rapportée aux thérapies ciblées conventionnelles du ccRCC contre les inhibiteurs du VEGFR TKI et mTOR[40]. L'identification de la voie d'activation de TFE3 dans certains ccRCC permet d'envisager le développement d'une stratégie thérapeutique commune aux carcinomes de translocation et des ccRCC surexprimant TFE3, notamment par des molécules ciblant la voie MET. La faible incidence de ce type de tumeur limite les possibilités d'essais thérapeutiques, cependant la possibilité de concevoir des études non seulement pour les tRCC mais aussi pour tous les RCC présentant une surexpression de la voie TFE3-MET constitue un objectif très prometteur.

VI. Article original

En cours de soumission.

TFE3 PROTEIN EXPRESSION IN CLEAR CELL RENAL CARCINOMAS: EXPLORATION OF A NEW PATH OF ONCOGENESIS

Youta Fanjat[1], Yann Vano[2], Michael Coutts[3], Christopher Montemagno[4,5,6], Olivia Rastoin[4,5,6], Delphine Borchiellini[7], Matthieu Durand[4,8], Nathalie Rioux-Leclercq[9], Jean-Christophe Bernhard[10,11], Gilles Pagès[4,5,6], Maeva Dufies[4,5,6$], Damien Ambrosetti [1,4,$,£]

1. Department of Pathology, Université Côte d'Azur, CHU Nice, Nice, France.
2. Department of Oncology, Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris, France.
3. Department of Pathology, Maidstone General Hospital, Maidstone
4. University Côte d'Azur, Institute for Research on Cancer and Aging of Nice (IRCAN), CNRS UMR 7284; INSERM U1081, Nice, France
5. Department of Biomedical, Centre Scientifique de Monaco, Principality of Monaco
6. LIA ROPSE, Laboratoire International Associé Université Côte d'Azur – Centre Scientifique de Monaco, Principality of Monaco
7. Department of Oncology, Centre Antoine Lacassagne, Nice, France
8. Department of Urology, Université Côte d'Azur, CHU Nice, Nice, France
9. Department of Pathology, University Hospital, Rennes, France
10. Department of Urology, University Hospital, Bordeaux, France
11. French Research Network on Kidney Cancer UroCCR , Bordeaux, France

$ Contribute equally to this work

£ Corresponding author: Damien Ambrosetti (ambrosetti.d@chu-nice.fr)

OBJECTIVES:

To comprehensively investigate the role of TFE3 protein in clear cell renal cell carcinoma (ccRCC), with respect to prognostic value and biomarker potential.

PATIENTS AND METHODS:

TFE3 and c-MET IHCs were performed on 66 cases of ccRCC of the CHU de Nice and were separated into low and high expressing (Allred low and high) groups. The levels of mRNA expression of TFE3, MET and LEF1 were assayed on a French cohort (Nice + Rennes + Bordeaux) comprising 166 cases of ccRCC. The correlations between each protein as well as different clinical data (TNM, disease free survival, overall survival) were compared for each group. We used a The Cancer Genome Atlas (TCGA) cohort comprising 434 ccRCC and 14 tRCC cases as a validation cohort.

RESULTS:

In the Nice cohort, 46 cases (69.7%) were TFE3 Allred low and 20 cases (30.3%) were TFE3 Allred high in IHC. The level of IHC expression was correlated with the level of mRNA expression ($p=0.0023$). Disease-free survival (DFS) was reduced in the Allred high group ($p=0.0197$), and the TFE3 mRNA high group ($p=0.0088$), which was confirmed by the TCGA cohort analysis ($p=0.0005$ for DFS/PFS and $p<0.0001$ for OS). Among MiTF family transcription factors potentially involved in the overexpression of TFE3 in ccRCC, TCGA cohort analysis revealed LEF1 as one of the main ($p<0.0001$), confirmed by the French cohort ($p<0.0001$). ccRCC overexpressing LEF1 in the French cohort were correlated with reduced DFS and OS ($p=0.0457$ and $p=0.004$, respectively). These results were confirmed by the analysis of the TCGA cohort for DFS ($p=0.0012$). Furthermore, analysis of c-MET IHC expression (h-score) was correlated to LEF1 mRNA expression ($p=0.011$) in the Nice cohort. TFE3 overexpression was then correlated to MET mRNA in the French cohort ($p=0.0082$).

TFE3 overexpression was also correlated to Podoplanin mRNA, a specific lymphatic vessel marker, in the French and TCGA cohort ($p=0.0133$ and $p<0.0001$, respectively).

CONCLUSIONS:

CcRCC can overexpress TFE3 in IHC in the absence of translocation. The LEF1 protein plays a crucial role in the overexpression of TFE3, which is responsible for activating MET transcription and the corresponding HGF / c-MET signaling pathway, resulting in a more aggressive tumor with activated lymphatic proliferation.

KEY WORDS: clear cell renal cell carcinoma (ccRCC), TFE3, MET, LEF1, prognostic marker.

BACKGROUND

In 2018, 403,262 new cases of kidney cancer worldwide were diagnosed causing 175,098 deaths[1]. Renal cell carcinoma (RCC) represents more than 90% of malignant kidney tumors. The most frequent subtypes of RCC are clear cell (ccRCC) (85%), papillary (10-15%), and chromophobe (5%) renal cell carcinomas[2]. The 5-year relative survival rate improves continuously but the overall prognosis, especially for patients with a high grade disease, is poor[1,3]. ccRCC is by far the most common entity, and represents the most aggressive subtype of the disease.

CcRCC are actually characterized by biallelic inactivation of VHL gene (3p25.3) via arm-level loss of chromosome 3p in over 90% of the tumours. The second copy of VHL is lost by either point mutation (52.3%) or epigenetic down-regulation (hypermethylation of VHL gene promoter)[4,5]. VHL inactivation prevents the ubiquitination of hypoxia-inducible factor (HIF) for degradation. VHL loss in ccRCC results in constitutive activation of HIF1/2α and subsequent transactivation of downstream genes such as VEGF. These data have led to the development of anti-angiogenic treatment targeting VEGF. Standard treatment for metastatic RCC (mRCC) is sunitinib, a tyrosine kinase inhibitor that block VHL-HIF-VEGF pathway, or immunotherapies like nivolumab combine to ipilimumab targeting PD1 and CTLA4 respectively. However the optimization of treatment remains a challenge for most cases of metastasizing RCC[6,7].

Aside from VHL-HIF-VEGF, a lot of other oncogenic pathways implicated in ccRCC have been discovered. New predisposition genes, also located on chromosome 3p, have been identified such as PBRM1, BAP1 and SETD2, all implicated in epigenetic regulation[8]. MET is also involved in different oncogenic processes of RCC. Activating mutations have been described in the tyrosine kinase domain, especially in papillary

RCC[9]. Furthermore, MET has been identified as being involved in certain mechanisms of resistance to treatment such as sunitinib[10]. After long-term exposure to sunitinib, renal tumors can overexpress MET signaling pathways, constituting an escape mechanism. The understanding of these additional pathways of oncogenesis is of prognostic and theranostic interest. It has been shown that therapeutics targeting MET, consisting in highly selective MET-tyrosine kinase inhibitors, are promising treatment options for MET-driven RCC[11]. Especially cabozantinib, a molecule that may have a place in the therapeutic arsenal of RCCs, particularly for tumors developing resistance to sunitinib[12].

In 2004, RCC associated with Xp11.2 translocations / transcription factor E3 (TFE3) gene fusion was added to the World Health Organization (WHO) classification[2,13] as TFE3-renal carcinoma. Xp11.2 translocation renal cell carcinoma (tRCC) is reported to account for approximately 20-40% of pediatric RCCs and 1-1.6% of adult RCCs [14,15]. Despite the low incidence in adults, tRCC has a worse prognosis than other RCCs[16]. TFE3 is a gene that is located on chromosome Xp11.2, and is involved in gene fusion with multiple partners leading to overexpression of the TFE3 protein. Histologically, tRCC are generally described as papillary architecture with voluminous clear or eosinophilic cells and psammoma bodies. However due to its highly variable morphology it can be mainly confused with ccRCC and papillary RCC[2]. TFE3 is a member of the microphtalmia-associated transcription factor family (MiTF). This family of basic helix-loop-helix leucine-zipper transcription factors are oncogenes implicated in regulation of cellular energy homeostasis, lysosome biogenesis and immune responses. Their expression is observed in different types of cancers and associated with pejoratic behavior. It has been demonstrated that TFE3 can stimulate the transcription of MET [17] and activate downstream signaling pathways, including cell

proliferation, adhesion, cell motility, and invasion. These results demonstrate the major role of TFE3 in activation of MET and thus in the pathobiology of some human cancers. The objective of this study is to confirm the overexpression of the TFE3 protein as well as its prejudicial impact on prognosis in a subgroup of ccRCC and to determine the molecular mechanisms underlying these phenomena, related to MET.

MATERIAL AND METHODS

Study population and classification

Following approval by the institutional review board, the Nice cohort (sup Table 1) consisted in a retrospective study, including 66 consecutives ccRCC cases.

The French cohort (Table 1, n=166) is composed of patient from Nice (Nice cohort), and from Rennes and Bordeaux, respectively included retrospectively and prospectively (UroCCR group, ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03293563).

Clinicopathological data were recorded, immunohistochemical staining and mRNA evaluation was performed as described below.

TCGA Data Analysis

Normalised RNA sequencing (RNA-Seq) data and clinical data produced by The Cancer Genome Atlas (TCGA) were downloaded from cBioportal (www.cbioportal.org, TCGA Firehouse legacy; RNA-Seq V2). Kidney Renal Clear Cell Carcinoma (KIRC) and Kidney Renal Papillary Carcinoma (KIRP) patients were analysed to find tRCC patients (TFE3 translocation), and 14 tRCC patients was found and analysed. Data were available for 434 ccRCC tumor samples TCGA subjected to mRNA expression profiling. The results published here are in whole or in part based upon data generated by the TCGA Research Network: http://cancergenome.nih.gov/. The Kaplan-Meier

method was used to produce DFS and OS survival curves. The patients were separated into two groups with either a high or low TFE3 expression level (third quartile cut off). We then performed a differential analysis between the two groups of patients.

Immunohistochemical Analysis

Formalin-fixed paraffin-embedded tissue containing both tumor and non-tumor kidney tissue was used for immunohistochemical analysis. TFE3 (TFE3 (p-16) sc-5958, 1:50 dilution, low pH, Santa Cruz, CA), c-MET (anti-Met (c-Met) antibody (SP44), ab227637, 1:50 dilution, high pH, Abcam, Toronto, ON, Canada) and Podoplanine (mouse anti-podoplanin, 1:25 dilution, high pH, Zytomed systems, Berlin, Germany). The appropriate positive and negative controls were concurrently carried out. For TFE3, podocytes in normal kidney tissue glomeruli served as internal control. For c-MET, tubules in non-tumor kidney served as internal control. The scoring system was as follows: for podoplanin, we evaluated the percentage of lymphatic vessels present in the tumor capsule. For c-MET, evaluation was made as follow: score 0 if no staining. Score 1+ consisted in weak staining in any amount of tumor cells and moderate, complete or incomplete membranous staining <50% of tumor cells. Score 2+ if >50% of tumor cells showed complete membranous staining with moderate intensity or < 50% tumor cells with strong intensity. ≥ 50 % of strong, incomplete or complete membranous staining was considered 3+. 2+ and 3+ cases were considered as c-MET overexpressing tumors.

For TFE3, the semi-quantitative allred scoring system used in breast cancers [18] was performed; the proportion of positive cells was scored on a scale of 0 to 5, and staining intensity on a scale of 0-3. The proportion and intensity were summed for a total score of 0 to 8. A total allred score ≥ 6 was considered as TFE3 overexpressing tumors.

TFE3 performed on 3 control tRCC confirmed by FISH TFE3 all showed diffuse, strong nuclear staining (Allred score 8, Fig 1D).

Quantitative Real-Time PCR (qPCR) experiments

RNA was extracted from paraffin-embedded tumor material from all patients after selecting paraffin-embedded tumor material. 0.5µg of total RNA was used for the reverse transcription; using the QuantiTect Reverse Transcription kit (QIAGEN, Hilden, Germany), with blend of oligo(dT) and random primers to prime first-strand synthesis. SYBR master mix plus (Eurogentec, Liege, Belgium) was used for qPCR. The mRNA level was normalized to 36B4 mRNA.

Cell culture

Primary ccRCC cells were isolated from a ccRCC patients (CHU of NICE) cultured in a medium specific for renal cells (PromoCell, Heidelberg Germany).

CT (origene, PS100001), LEF1 (origene, RC225565) or TFE3 (origene, RC206840) vector expression were transfected (JetPEI transfection agent, polyplus, 101-10N) on ccRCC primary cells for 72h before experiments.

Migration assay

The migration assay was performed using cell culture inserts with 8.0 µm pore. Serum-starved cells (1×10^5 cells) were seeded into the top chamber in medium without FBS, while medium with 10% FBS was present in the bottom chamber. The cells were incubated for 24 h. Cells that migrated through the filter and adhered to the lower surface were fixated with PFA 3% for 20min and stained for 10 min with 0.5% crystal violet in 25% methanol. Number of migrated cells (picture of the insert) were quantified by ImageJ.

Statistical analysis

Fisher‘s exact test was used to compare clinical and pathological data. Student’s *t* test was used to compare continuous data. All *p* values are based on a two-tailed hypothesis, with results considered satistically significant if the *p* value was less than 0.05. Disease-free survival (DFS) was defined as the time from surgery to the appearance of metastasis. Progression-free survival (PFS) was defined as the time between surgery and progression, or death from any cause, censoring live patients and progression free at the follow-up. Overall survival (OS) was defined as the time between surgery and the date of death from any cause, censoring those alive at the last follow-up. The Kaplan-Meier method was used to produce survival curves and analysis of censored data were performed using Cox models.

RESULTS

TFE3 can be highly expressed in ccRCC patients.

All 66 ccRCC patients from the Nice cohort were reviewed by one general pathologist and one uropathologist. TFE3 overexpression was studied using immunohistochemistry. The cohort showed variable expression of TFE3, from 0 to 7, based on the proportion of positive cells and the intensity of staining. None of our cases showed diffuse strong nuclear staining (Allred score 8, Fig 1D), a feature observed in confirmed tRCC. 46 cases (69.7%) were TFE3 Allred low (score 0 to 5) and 20 (30.3%) were TFE3 Allred high (score 6 and 7, Fig 1 A-C). No significant associations between TFE3 expression levels and clinicopathologic data were noted (Supplementary Table 1).

High TFE3 mRNA level is correlated to TFE3 IHC and to a poor clinical outcome.

DFS was significantly lowered in the TFE3 Allred high group compared to the TFE3 Allred low group (DFS: 91 months vs more than 120 months, p=0.0069, Fig 2A).

To confirm the relevance of TFE3 IHC expression, we analyzed the level of TFE3 mRNA in the same tumor. TFE3 IHC expression in the Nice cohort and mRNA level were significantly correlated (p=0.0023) (Fig 2B).

TFE3 mRNA level was then measured in the Nice, Bordeaux, and Rennes cohort (French cohort, Table 1). A total of 166 cases were evaluated. We used a third quartile cut-off to defined low and high TFE3 group in ccRCC patients. 126 cases (75.9%) were TFE3 low and 40 cases (24.1%) were TFE3 high.

Clinically, the TFE3 high group presented more lymph node metastasis (16.3%, p=0.0026), and a higher Fuhrman score (p=0.001, Table 1). Importantly, no significant association was noted for other clinical data (sex, age, T status).

Using TFE3 mRNA level in the french cohort, we confirm with more patients (n=166 Table 1), that overexpression of TFE3 is correlated with more rapid appearance of metastasis. Third quartile cut-off was used to define low and high TFE3 group (DFS: 66 months vs more than 120 months, p=0.0088, Fig 2C).

TFE3 overexpressing ccRCC patients show reduced DFS similar to the tRCC patients (TCGA cohort).

To confirm, in an independent cohort, the prognostic value of TFE3 in ccRCC, we analyzed the TCGA cohort (ccRCC vs tRCC patients). As previously, we used a third quartile cut-off to define low and high TFE3 group in ccRCC patients. tRCC patients come from ccRCC and pRCC TCGA cohort (KIRC and KIRP respectively) and are identified by TFE3 gene translocation. TFE3 mRNA expression was significantly correlated between ccRCC TFE3 high group (n=48), and the tRCC group (n=14, $p<0.0001$, Fig 3A).

We observed that in the tRCC group there were more female patients and younger patients compared to ccRCC TFE3 low and high groups ($p>0.05$). In ccRCC patients, TFE3 low cases showed better clinical prognostic factors for tumor size and lymph node invasion compared to tRCC and ccRCC TFE3 high groups ($p>0.05$). Furthermore, ccRCC TFE3 low group presented better AJCC staging compared to the ccRCC TFE3 overexpressing group (Table 2).

As in French cohort, DFS was significantly reduced in the ccRCC TFE3 high and the tRCC group compared to the ccRCC low TFE3 group ($p=0.0002$ and 0.05 respectively, Fig 2B). The high TFE3 mRNA group presented reduced overall survival (OS) compared to the low TFE3 group (median survival :118.76 months vs 56.31 months, $p<0.0001$) (Fig 3C).

LEF1 is one of the main transcription factor of the MiTF family implicated in the overexpression of TFE3 in ccRCC.

There are five known main regulators of MiTF transcription (ARF1, CREB, SOX10, PAX3, and LEF1) [19–21]. In the TCGA cohort, we classified different patients' group regarding their TFE3 mRNA level (as previously described) and analyzed several well-known transcription factors associated to MiTF. LEF1 and CREB1 were correlated to TFE3 mRNA level (both $p<0.0001$) as well as PAX3 ($p=0.0234$) (Fig 4A). LEF1 presented the most convincing correlation with TFE3 mRNA level ($p<0.0001$, Fig 4A and B). In ccRCC, and by opposition to TFE3, MiTF mRNA level was not correlated to the LEF1 level (Fig 4C).

To confirm the link between LEF1 and TFE3 level expression, we analyzed the french cohort which showed significant correlation between TFE3 mRNA and LEF1 mRNA in ccRCC ($p<0.0001$) (Fig 4D). More precisely, when LEF1 mRNA level is high, there is a high level of TFE3 mRNA level in ccRCC tumor. These findings indicated that LEF1 is an important regulator of TFE3 and is necessary in the overexpression of TFE3 in ccRCC.

LEF1 overexpression in ccRCC primary cells increase expression of TFE3 and MET and promotes *in vitro* cell migration.

To confirm the link between LEF1 and transcription of TFE3 mRNA, we investigated the effect of LEF1 overexpression in primary ccRCC cells in vitro. The LEF1 overexpression (Sup Fig 1A) led to an increase of TFE3 mRNA. In vitro analysis confirmed that LEF1 overexpressing induce the overexpression of TFE3 mRNA (Sup Fig 1B). LEF1 overexpressed ccRCC cell lines showed increased migration capacities similar to TFE3 overexpressing cell lines compared to the control cells (Sup fig. 1D).

These results suggest that LEF1 is involved in TFE3 transcription, proliferation and metastasis of ccRCC cells.

High LEF1 mRNA level is correlated with poor clinical outcome in ccRCC patients.

To reinforce the link between LEF1 and TFE3 on ccRCC tumor and on prognostic ccRCC patients, we analysed LEF1 mRNA level on French cohort and TCGA cohort. LEF1 overexpressing cases in the french cohort are correlated with significantly reduced DFS (DFS: 66 months vs more then 120 months, p=0.0457, Fig 5A) and OS (OS: 62.81 months vs 126.8 months, p=0.004, Fig 5B). The analysis of the TCGA cohort confirm these results, with significantly reduced DFS (DFS: 61.63 months vs 123.7 months, p=0.0012, Fig 5C) on ccRCC patients with high level of TFE3 mRNA. These results show that high LEF1 mRNA level, like high TFE3 mRNA level, drive a poor clinical outcome.

TFE3 overexpression induces aggressiveness on ccRCC by increasing c-MET expression and lymph node metastasis.

Our *in vitro* studies in ccRCC primary cells showed that MET mRNA was overexpressed in TFE3 overexpressed cells (Sup Fig 1C). These cells presented a significant increase in its migration capacities compared to control ccRCC cells (sup Fig 1D). We then analyzed how c-MET expression varied based on TFE3 overexpression in human ccRCC paraffin-embedded tissue. Representative images of IHC images are shown in Fig 6A-D. IHC analysis of the Nice cohort showed a positive

correlation between c-MET and TFE3 expression in IHC (p=0.011, Fig 6E and F). Furthermore, analysis of the French cohort showed significant correlation between MET mRNA level and ccRCC groups which expressed low or high TFE3 (p=0.0082, Fig 7A). This observation was confirmed in the TCGA cohort with MET mRNA (p=0.0349, Fig 7B).

Next, we analyzed podoplanin, a membrane glycoprotein widely used in pathology as a lymphatic vessel marker. A high podoplanin expression level could explain the metastatic potential of ccRCC induced by c-MET expression, independently of the VEGF/HIF pathway. Analysis of the French cohort showed significant correlation between TFE3 mRNA low expressing tumors and low expressing tumors Podoplanin mRNA in ccRCC (p=0.0133, Fig 7C). TCGA cohort showed similar correlation, with high podoplanin mRNA expression on TFE3 overexpressing ccRCC group (Fig 7D). These results suggest that TFE3 expressing ccRCC overexpress podoplanin to have increased lymphatic aggressiveness and metastatic potential. In the analysis of the Nice cohort, we observed that patients with high TFE3 mRNA expression presented with more lymph node metastasis) compared to low expressing patients (respectively n=6, 15% and n=4, 0.6%, p=0.0026, Table 1), which further supports our observations.

DISCUSSION

Our study highlights that in some cases conventional ccRCC can express TFE3 in such an amount that it can be detectable by IHC, in the absence of TFE3 translocation. In addition, we have identified a greater lymphophilia of these tumors overexpressing the TFE3 protein, the lymphatic extension not being a classic modality of dissemination for ccRCC and linked to a more pejorative prognosis. We have already shown that the

VEGFC pathway is implicated in lymphatic dissemination in some cases of ccRCC [22,23]. It could be interesting to investigate the link between the VEGFC and TFE3-MET signaling pathways.

ccRCC correspond to tumors which can have a very variable evolutionary profile, some evolving slowly while others presenting immediately at the metastatic stage[3]. This variability is also found in the sensitivity to chemotherapy and target therapeutics. All these elements make it necessary to search for prognostic and theranostic tools. Some oncogenic signaling pathways have been very well analyzed and documented for some renal tumor subtype. HIF-VHL-VEGF pathway is the hallmark of ccRCCs, basis for the development of diagnostic, prognostic and therapeutic tools, and it is the same to a lesser extent for the MITF-MET pathway for translocation carcinoma[24]. But more and more studies show that these pathways are not exclusive to a tumor subtype. For example, MET involvement was initially demonstrated in the oncogenesis of papillary carcinoma, but this pathway is also involved in ccRCC especially in TKI resistance[10]. In the same way we demonstrate here that the TFE3-MET signaling pathway is involved in the rare subgroup of translocation carcinomas as well as in ccRCCs, the predominant subtype of renal tumors.

This overexpression of the TFE3 protein is underpinned by different processes. In translocation carcinomas, overexpression results from gene rearrangement, the TFE3 gene being placed under the influence of an activating promoter[25]. We show here that in ccRCC, LEF1 protein is responsible for TFE3 overexpression, inducing increased MET transcription, and the corresponding HGF/c-MET pathway. LEF1 was identified initially as a lymphoid-specific gene belonging to the family of high-mobility group transcription factors[26,27]. MiTF is essential for melanocyte differentiation and it has been shown to bind by LEF1 in melanoma cells. The same domain is present in TFE3

and functional cooperation between the two proteins has already been demonstrated[28]. Recently, a study by Liu and Shang showed that integrin αMβ2 up-regulation in RCC cells led to a high amount of LEF1[29], inducing an increase of proliferation, migration and invasion of RCC cells. These results support the clinical aggressive potential of LEF1 overexpressing tumors in our analysis. In our study we have demonstrated that among the proteins belonging to the MiTF family, only LEF1 is responsible for the overexpression of TFE3. LEF1 could therefore be a potential therapeutic target for metastatic TFE3 overexpressing RCCs.

We demonstrate that TFE3 mRNA level was correlated with MET and PDPN mRNA level. For activation of the HGF/cMET pathway, HGF binds to his receptor, c-MET, triggering transphosphorylation of its intracellular tyrosine terminations Tyr 1234 and Tyr 1235. Activated c-MET triggers several downstream signaling pathways, including regulation of proliferation, cell cycle progression and cell motility[30,31]. HGF/c-MET signaling pathway also induces a lymphangiogenesis process independent of VEGFR[32], which could explain the clinical aggressiveness of tRCC and TFE3 overexpressing ccRCC. Our results permit to define, in ccRCCs overexpressing TFE3, the following signaling pathway, with successive activation of LEF1, TFE3, then the HGF / c-Met pathway which enhances lymphatic proliferation, especially via PDPN, encouraging metastatic behavior of the tumor.

Our results suggest different methods of exploration of the TFE3 oncogenesis pathway. In the context of diagnosis of the translocated carcinoma entity, it has been shown that the immunohistochemical examination could constitute a first-line tool, the specificity and sensitivity of which are imperfect [33–36]. The existence of a certain level of TFE3 protein in some ccRCCs explains the lack of specificity of immunohistochemistry for the diagnosis of translocation carcinomas. For this diagnosis

the gold standard examination remains the genetic analysis, mainly by immunofluorescence[37]. If we consider the prognostic impact of TFE3, we have shown that the analysis of the intensity of the activation of the oncogenic TFE3-MET pathway can be based on a TFE3 immunocytochemical examination, easy to perform but rough quantification or on a qPCR analysis, more quantitatively precise and certainly more suitable for this purpose. Further work is needed to precisely define recommendations in this context. Lee et al recently demonstrated that RCCs can express TFE3 in IHC without TFE3 translocation in FISH. Out of the 303 cases, 32 showed moderate to strong TFE3 expression. After evaluation of TFE3 expression without translocation, PFS was poorer in patients whose tumors expressed TFE3 compared to those who did not[38]. Our finding, in a larger cohort, supports their finding.

We have clearly demonstrated the prognostic impact of TFE3 protein overexpression in ccRCCs and we have identified the mechanisms explaining the aggressiveness of tumors exhibiting an activation of this oncogenic pathway. In addition to the pejorative effect of the overexpression of the TFE3 protein, this induced overexpression is also a mechanism of resistance to antiangiogenic agents. This has been demonstrated by Guo's team[39], via overexpression of PDL1 but also as demonstrated via overexpression of c-MET.

tRCCs remain a therapeutic challenge, with reported unsatisfactory clinical response to conventional ccRCC targeted therapies against VEGFR TKI and mTOR inhibitors [40]. The identification of the activation of TFE3 pathway in some ccRCCs makes it possible to consider the development of a therapeutic strategy common to translocation carcinomas and TFE3 high ccRCCs, in particular based on molecules targeting the MET pathway. This is for the benefit of ccRCCs for which targeted therapies are always necessary, in combination with or as a replacement for treatment

standards, especially if a biomarker drives the use of these treatments. But also for the benefit of translocation carcinomas. The low incidence of this type of tumor limits the possibilities of therapeutic trials. Being able to design studies not exclusively for translocation carcinomas but for all RCC presenting an overexpression of the TFE3-MET pathway constituting a very promising goal.

ACKNOWLEDGMENT

This work was supported by the Fondation de France, the Ligue Nationale contre le Cancer (Equipe Labellisée 2019), the French National Institute for Cancer Research (INCA), and the FX Mora Foundation. This study was conducted as part of the Centre Scientifique de Monaco Research Program, funded by the Government of the Principality of Monaco. The samples from Bordeaux and associated data were collected, selected and made available within the framework of the clinicobiological National Cancer Database Kidney UroCCR project supported by l'Institut National du Cancer (INCa). We thank the IRCAN core facilities (animal and cytometry facilities) for technical help. We thank also the Department of Pathology, especially Sandrine Destre and Marianne Goracci, for technical help and the Department of Genetics, especially Pr Pedeutour, for her support and wise advice.

REFERENCES

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2018;68(6):394-424. doi:10.3322/caac.21492

2. *International Agency for Research on Cancer. WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs(IARC WHO Classification of Tumours). 4th Ed. Lyon: WHO/IARCPress; 2016*.

3. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020. *CA Cancer J Clin*. 2020;70(1):7-30. doi:10.3322/caac.21590

4. Brugarolas J. Molecular Genetics of Clear-Cell Renal Cell Carcinoma. *JCO*. 2014;32(18):1968-1976. doi:10.1200/JCO.2012.45.2003

5. The Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of clear cell renal cell carcinoma. *Nature*. 2013;499(7456):43-49. doi:10.1038/nature12222

6. Znaor A. International Variations and Trends in Renal Cell Carcinoma Incidence and Mortality. *EUROPEAN UROLOGY*. Published online 2015:12.

7. Linehan WM, Srinivasan R, Schmidt LS. The genetic basis of kidney cancer: a metabolic disease. Published online 2011:21.

8. Piva F, Santoni M, Matrana MR, et al. BAP1, PBRM1 and SETD2 in clear-cell renal cell carcinoma: molecular diagnostics and possible targets for personalized

therapies. *Expert Rev Mol Diagn*. 2015;15(9):1201-1210. doi:10.1586/14737159.2015.1068122

9. Rhoades Smith KE, Bilen MA. A Review of Papillary Renal Cell Carcinoma and MET Inhibitors. *Kidney Cancer*. 2019;3(3):151-161. doi:10.3233/KCA-190058

10. Ciamporcero E, Miles KM, Adelaiye R, et al. Combination strategy targeting VEGF and HGF/c-met in human renal cell carcinoma models. *Mol Cancer Ther*. 2015;14(1):101-110. doi:10.1158/1535-7163.MCT-14-0094

11. Choueiri TK, Heng DYC, Lee JL, et al. Efficacy of Savolitinib vs Sunitinib in Patients With MET-Driven Papillary Renal Cell Carcinoma: The SAVOIR Phase 3 Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol*. 2020;6(8):1247-1255. doi:10.1001/jamaoncol.2020.2218

12. Zhou L, Liu X-D, Sun M, et al. Targeting MET and AXL overcomes resistance to sunitinib therapy in renal cell carcinoma. *Oncogene*. 2016;35(21):2687-2697. doi:10.1038/onc.2015.343

13. Malouf GG, Su X, Yao H, et al. Next-Generation Sequencing of Translocation Renal Cell Carcinoma Reveals Novel RNA Splicing Partners and Frequent Mutations of Chromatin-Remodeling Genes. *Clinical Cancer Research*. 2014;20(15):4129-4140. doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-3036

14. Komai Y, Fujiwara M, Fujii Y, et al. Adult Xp11 Translocation Renal Cell Carcinoma Diagnosed by Cytogenetics and Immunohistochemistry. *Clinical Cancer Research*. 2009;15(4):1170-1176. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-1183

15. Bruder E, Passera O, Harms D, et al. Morphologic and molecular characterization of renal cell carcinoma in children and young adults. *Am J Surg Pathol*. 2004;28(9):1117-1132. doi:10.1097/01.pas.0000131558.32412.40

16. Sukov WR, Hodge JC, Lohse CM, et al. TFE3 rearrangements in adult renal cell carcinoma: clinical and pathologic features with outcome in a large series of consecutively treated patients. *Am J Surg Pathol*. 2012;36(5):663-670. doi:10.1097/PAS.0b013e31824dd972

17. Tsuda M, Davis IJ, Argani P, et al. TFE3 Fusions Activate MET Signaling by Transcriptional Up-regulation, Defining Another Class of Tumors as Candidates for Therapeutic MET Inhibition. *Cancer Res*. 2007;67(3):919-929. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-2855

18. Hammond MEH, Hayes DF, Dowsett M, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations for Immunohistochemical Testing of Estrogen and Progesterone Receptors in Breast Cancer. *JCO*. 2010;28(16):2784-2795. doi:10.1200/JCO.2009.25.6529

19. Davis I, Fisher D. MiT Transcription Factor Associated Malignancies in Man. *Cell cycle (Georgetown, Tex)*. 2007;6:1724-1729. doi:10.4161/cc.6.14.4484

20. Hartman ML, Czyz M. MITF in melanoma: mechanisms behind its expression and activity. *Cell Mol Life Sci*. 2015;72(7):1249-1260. doi:10.1007/s00018-014-1791-0

21. Wellbrock C, Arozarena I. Microphthalmia-associated transcription factor in melanoma development and MAP-kinase pathway targeted therapy. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2015;28(4):390-406. doi:10.1111/pcmr.12370

22. Ndiaye PD, Dufies M, Giuliano S, et al. VEGFC acts as a double-edged sword in renal cell carcinoma aggressiveness. *Theranostics*. 2019;9(3):661-675. doi:10.7150/thno.27794

23. Dufies M, Giuliano S, Ambrosetti D, et al. Sunitinib Stimulates Expression of VEGFC by Tumor Cells and Promotes Lymphangiogenesis in Clear Cell Renal Cell Carcinomas. *Cancer Res*. 2017;77(5):1212-1226. doi:10.1158/0008-5472.CAN-16-3088

24. Linehan WM. Genetic basis of kidney cancer: role of genomics for the development of disease-based therapeutics. *Genome Res*. 2012;22(11):2089-2100. doi:10.1101/gr.131110.111

25. Yin X, Wang B, Gan W, et al. TFE3 fusions escape from controlling of mTOR signaling pathway and accumulate in the nucleus promoting genes expression in Xp11.2 translocation renal cell carcinomas. *J Exp Clin Cancer Res*. 2019;38(1):119. doi:10.1186/s13046-019-1101-7

26. Santoso S, Sachs UJH, Kroll H, et al. The Junctional Adhesion Molecule 3 (JAM-3) on Human Platelets is a Counterreceptor for the Leukocyte Integrin Mac-1. *Journal of Experimental Medicine*. 2002;196(5):679-691. doi:10.1084/jem.20020267

27. Simon DI, Chen Z, Xu H, et al. Platelet Glycoprotein Ibα Is a Counterreceptor for the Leukocyte Integrin Mac-1 (Cd11b/Cd18). *The Journal of Experimental Medicine*. 2000;192(2):193-204. doi:10.1084/jem.192.2.193

28. Yasumoto K -i. Microphthalmia-associated transcription factor interacts with LEF-1, a mediator of Wnt signaling. *The EMBO Journal*. 2002;21(11):2703-2714. doi:10.1093/emboj/21.11.2703

29. Liu Y, Shang D. Transforming growth factor-β1 enhances proliferative and metastatic potential by up-regulating lymphoid enhancer-binding factor 1/integrin αMβ2 in human renal cell carcinoma. *Mol Cell Biochem*. 2020;465(1-2):165-174. doi:10.1007/s11010-019-03676-8

30. Maulik G, Shrikhande A, Kijima T, Ma PC, Morrison PT, Salgia R. Role of the hepatocyte growth factor receptor, c-Met, in oncogenesis and potential for therapeutic inhibition. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 2002;13(1):41-59. doi:10.1016/S1359-6101(01)00029-6

31. Paumelle R, Tulashe D, Kherrouche Z, et al. Hepatocyte growth factor/scatter factor activates the ETS1 transcription factor by a RAS-RAF-MEK-ERK signaling pathway. *Oncogene*. 2002;21(15):2309-2319. doi:10.1038/sj.onc.1205297

32. Achen MG, Stacker SA. Tumor lymphangiogenesis and metastatic spread—New players begin to emerge. *Int J Cancer*. 2006;119(8):1755-1760. doi:10.1002/ijc.21899

33. Macher-Goeppinger S, Roth W, Wagener N, et al. Molecular heterogeneity of TFE3 activation in renal cell carcinomas. *Mod Pathol*. 2012;25(2):308-315. doi:10.1038/modpathol.2011.169

34. Rao Q, Williamson SR, Zhang S, et al. TFE3 break-apart FISH has a higher sensitivity for Xp11.2 translocation-associated renal cell carcinoma compared with TFE3 or cathepsin K immunohistochemical staining alone: expanding the

morphologic spectrum. *Am J Surg Pathol*. 2013;37(6):804-815. doi:10.1097/PAS.0b013e31827e17cb

35. Camparo P, Vasiliu V, Molinie V, et al. Renal translocation carcinomas: clinicopathologic, immunohistochemical, and gene expression profiling analysis of 31 cases with a review of the literature. *Am J Surg Pathol*. 2008;32(5):656-670. doi:10.1097/PAS.0b013e3181609914

36. Kim SH, Choi Y, Jeong HY, Lee K, Chae JY, Moon KC. Usefulness of a break-apart FISH assay in the diagnosis of Xp11.2 translocation renal cell carcinoma. *Virchows Arch*. 2011;459(3):299-306. doi:10.1007/s00428-011-1127-5

37. Lee HJ, Shin DH, Noh GY, et al. Combination of immunohistochemistry, FISH and RT-PCR shows high incidence of Xp11 translocation RCC: comparison of three different diagnostic methods. *Oncotarget*. 2017;8(19). doi:10.18632/oncotarget.16481

38. Lee HJ, Shin DH, Kim SY, et al. *TFE3* translocation and protein expression in renal cell carcinoma are correlated with poor prognosis. *Histopathology*. 2018;73(5):758-766. doi:10.1111/his.13700

39. Guo X, Li R, Bai Q, Jiang S, Wang H. TFE3-PD-L1 axis is pivotal for sunitinib resistance in clear cell renal cell carcinoma. *J Cell Mol Med*. Published online November 3, 2020. doi:10.1111/jcmm.16066

40. Tannir NM, Jonasch E, Albiges L, et al. Everolimus Versus Sunitinib Prospective Evaluation in Metastatic Non-Clear Cell Renal Cell Carcinoma (ESPN): A Randomized Multicenter Phase 2 Trial. *Eur Urol*. 2016;69(5):866-874. doi:10.1016/j.eururo.2015.10.049

TABLES AND FIGURES

Supp. table 1. Clinicopathological features and TFE3 IHC expression of the cases examined – Nice cohort

	ccRCC		p value
	TFE3 allred low	TFE3 allred high	
Total	46	20	
Femme	16 (35%)	5 (25%)	ns
Homme	30 (65%)	15 (75%)	
age	64	60	ns
T1/2	23 (50%)	10 (50%)	ns
T3/4	23 (50%)	10 (50%)	
Nx	43 (93%)	19 (95%)	ns
N1	3 (7%)	1 (5%)	
ISUP 1/2	10 (22%)	5 (25%)	ns
ISUP 3/4	36 (78%)	15 (75%)	
Vascular invasion			
no	32 (70%)	16 (80%)	ns
yes	14 (30%)	4 (20%)	
Necrosis			
no	28 (61%)	15 (75%)	ns
yes	18 (39%)	5 (25%)	
AJCC stage			
1/2	20 (43 %)	8 (40%)	ns
3/4	26 (56%)	12 (60%)	
Allred score	4 (0-5)	6 (6-7)	

Figure 1 : representative images of TFE3 immunostaining of ccRCC A-D. (A) Allred low case (score 0-5), nuclear staining score 0 in immunohistochemistry (B) Allred low case, (score 0-5), variable nuclear staining score1+ with areas without nuclear staining .(C) Allred High case (6-7) with variable areas of weaker nuclear staining (2-3+), (D) tRCC case (allred score 8) with uniform 3+ nuclear staining.,Podocytes in glomeruli served as internal control. (x200)

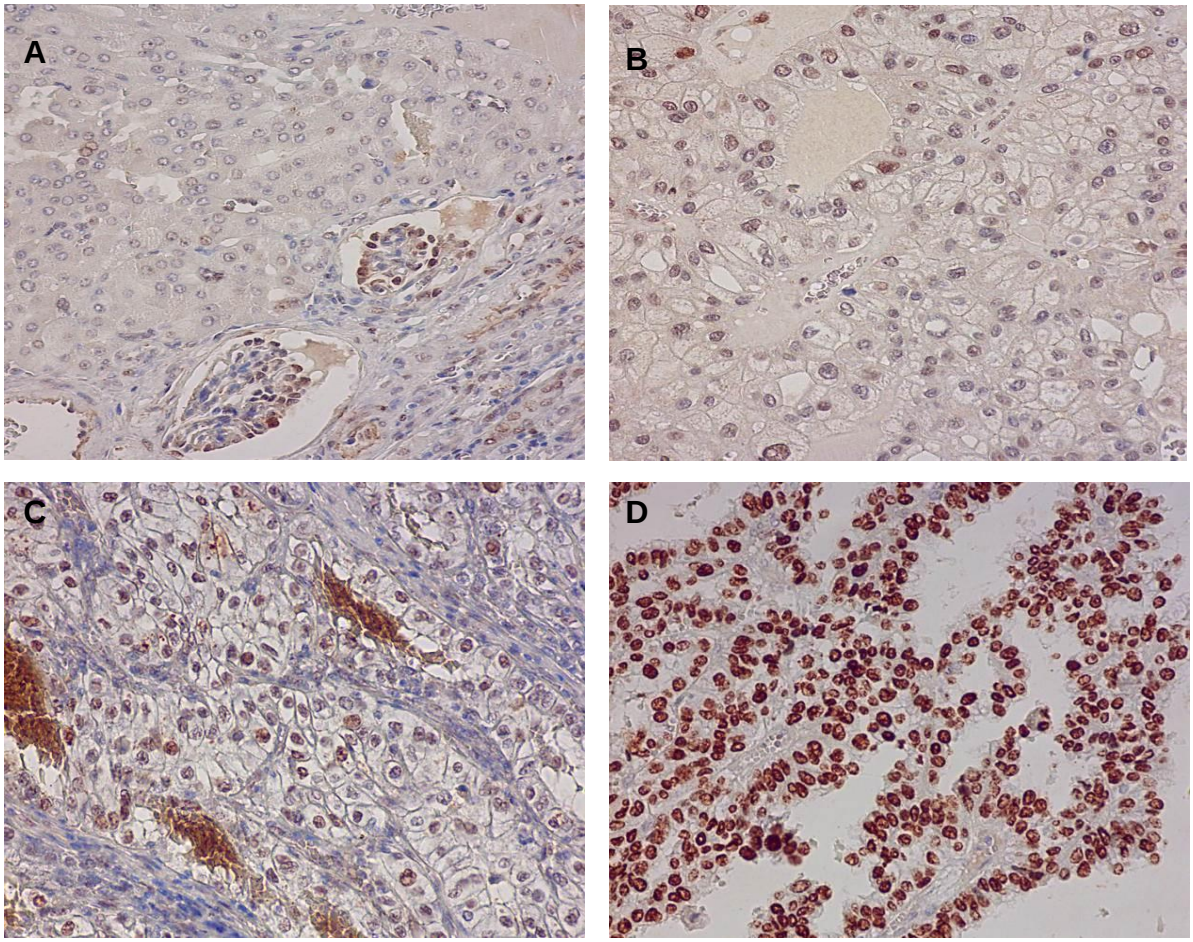
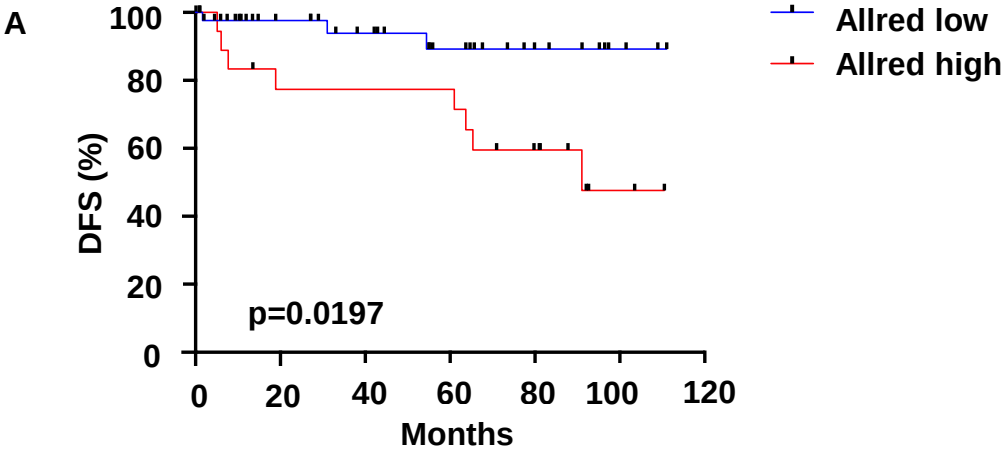


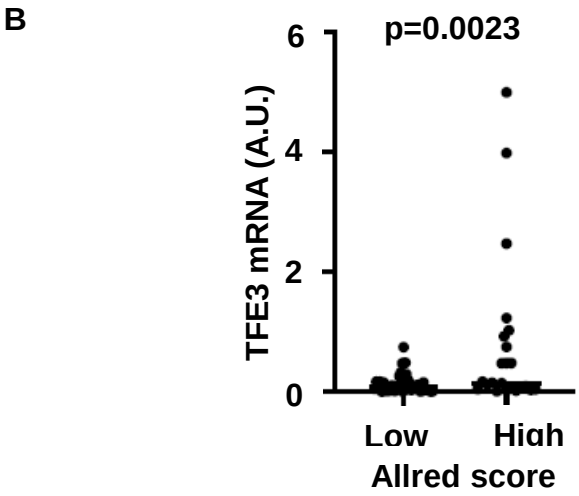
Table 1. TFE3 mRNA expression and clinico-pathological features – French cohort

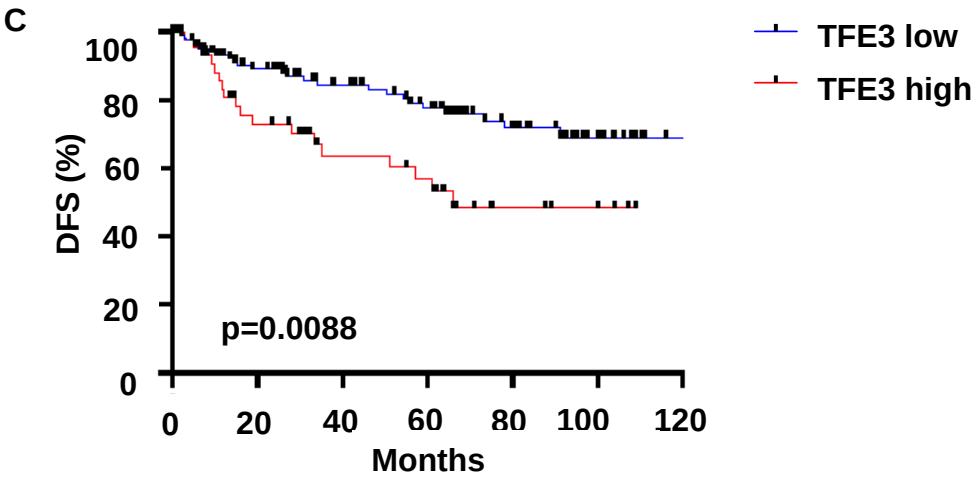
	ccRCC		p value
	TFE3 low	**TFE3 high**	
Total	126	40	
Female	29 (23%)	10 (25%)	ns
Male	97 (77%)	30 (75%)	
Age	64.1	62.6	ns
T1/2	82 (62.7%)	25 (62.5%)	ns
T3/4	44 (37.3%)	15 (37.5%)	
N0	122 (95.4%)	34 (85%)	0.0026
N1	4 (0.6%)	6 (15%)	
ISUP 1/2	46 (36.5%)	11 (27.5%)	0.0014
ISUP 3/4	80 (63.5%)	29 (72.5%)	

Fig 2. TFE3 IHC is correlated with mRNA level, which are both corelated with decreased DFS (A-C) (A) Kaplan-Meier analysis of DFS of ccRCC cohort separated in low or high allred score group. (B) TFE3 mRNA level in patients with low allred score and high allred score (Nice cohort). (C) Kaplan-Meier analysis of DFS of ccRCC cohort separated in low or high TFE3 mRNA group.



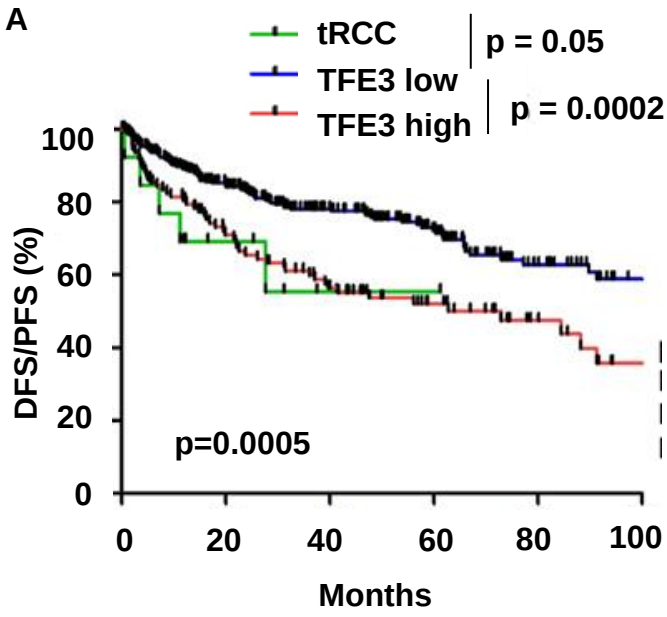
ccRCC	Allred low	Allred high
Median survival (months)	Undefined	91

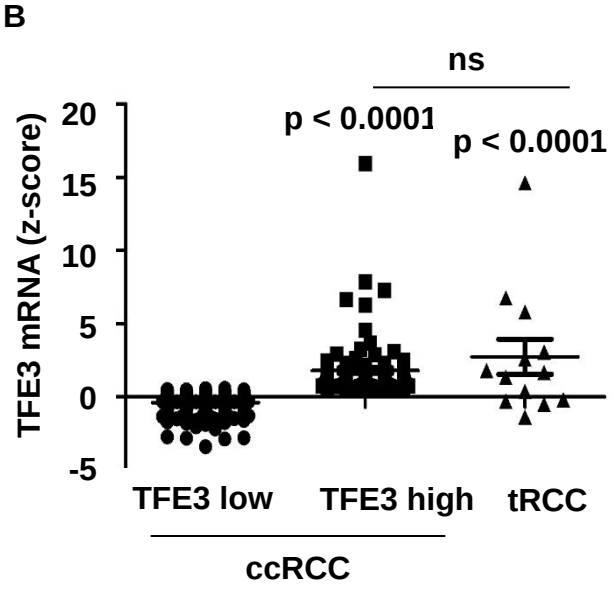




ccRCC	TFE3 low	TFE3 high
Median survival (months)	Undefined	66

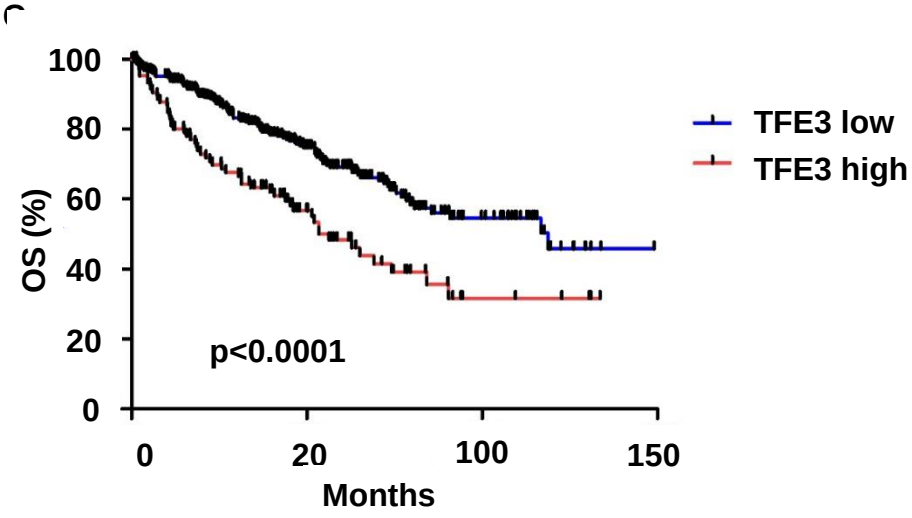
Fig 3. TFE3 overexpressing ccRCC group shows a reduced DFS and OS similar to the tRCC group (TCGA cohort) (A) Correlation of TFE3 expression between TFE3 low ccRCC, TFE3 high ccRCC, and tRCC group. (B) Kaplan-Meier analysis of DFS/PFS of tRCC, TFE3 low ccRCC, TFE3 high ccRCC patients. (C) Kaplan-Meier analysis of OS of ccRCC patients. Statistical significance (p values) is indicated.





	ccRCC TFE3 low	ccRCC TFE3 high	tRCC
Median survival (months)	123.7	72.9	Undefined
75% survival	53.6	16.5	10.5

	ccRCC TFE3 low	ccRCC TFE3 high	tRCC
Patients (n)	325	109	14
TFE3 mRNA (mean expression)	-0.381	1.811	2.749



ccRCC	TFE3 low	TFE3 high
Median survival (months)	118.76	56.31

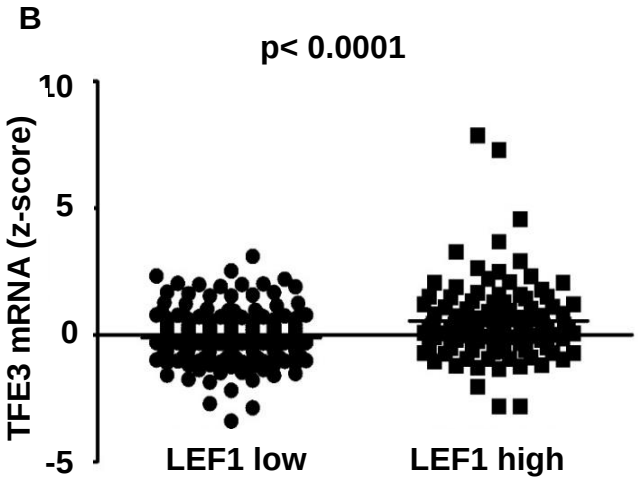
Table 2. TFE3 mRNA expression and clinical-pathological features of the cases examined - TCGA cohort

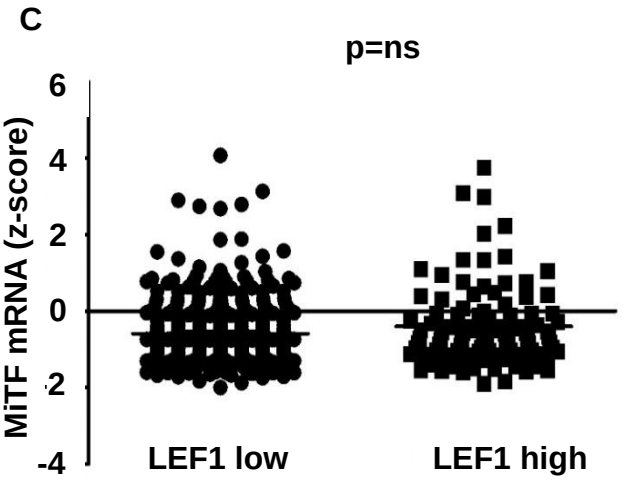
	ccRCC		tRCC	p value TFE3 low vs TFE3 High	p value TFE3 low vs tRCC	p value TFE3 high vs tRCC
	TFE3 low	TFE3 high				
Total	325	109	14			
Female	96 (30.4%)	30 (28%)	9 (64.3%)	ns	0.008	0.006
Male	220 (69.6%)	77 (72%)	5 (35.7%)			
Age	62.2	62.6	53.9	ns	0.008	0.008
T1/2	202 (66.4%)	54 (50.5%)	6 (42.9%)	0.003	0.06	ns
T3/4	102 (34.6%)	53 (49.5%)	8 (57.1%)			
N0	188 (95.4%)	45 (86.5%)	7 (70%)	0.02	0.0007	ns
N+	9 (0.6%)	7 (15.5%)	3 (30%)			
M0	260 (82.8%)	79 (73.8%)	12 (85.7%)	0.043	ns	ns
M1	54 (8.2%)	28 (26.2%)	2 (14.3%)			
Stage 1/2	198 (64.7%)	52 (48.6%)	9 (64.3%)	0.003	ns	ns
Stage 3/4	108 (35.3%)	55 (51.4%)	5 (35.7%)			

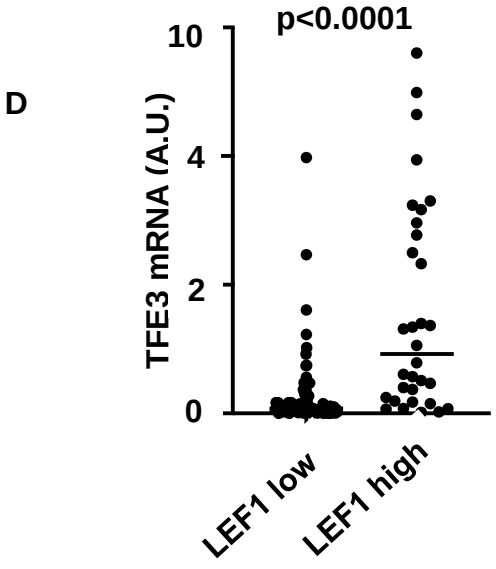
Fig 4. LEF1 seems to be one of the main transcription factor of the MiTF family implicated in the overexpression of TFE3 in ccRCC (A-C: TCGA cohort). (A) TFE3 mRNA level in patients group with low or high level of transcription factor (eg ATF1, third quartile cut-off was used). (B and C) Correlation of TFE3 and MiTF mRNA, respectively, in patients group with low or high LEF1 expression. (D) Correlation of TFE3 mRNA in the french cohort in patient group with low or high LEF1 expression. Statistical significance (p values) is indicated.

A

TFE3 mRNA (z-score)	Low	High	p value
ATF1	0.16 ± 0.06	0.012 ± 0.22	ns
CREB1	0.23 ± 0.08	-0.28 ± 0.08	<0.0001
SOX10	0.16 ± 0.08	0.0002 ± 0.09	ns
PAX3	0.047 ± 0.07	0.49 ± 0.17	0.0234
LEF1	-0.11 ± 0.04	0.55 ± 0.15	<0.0001



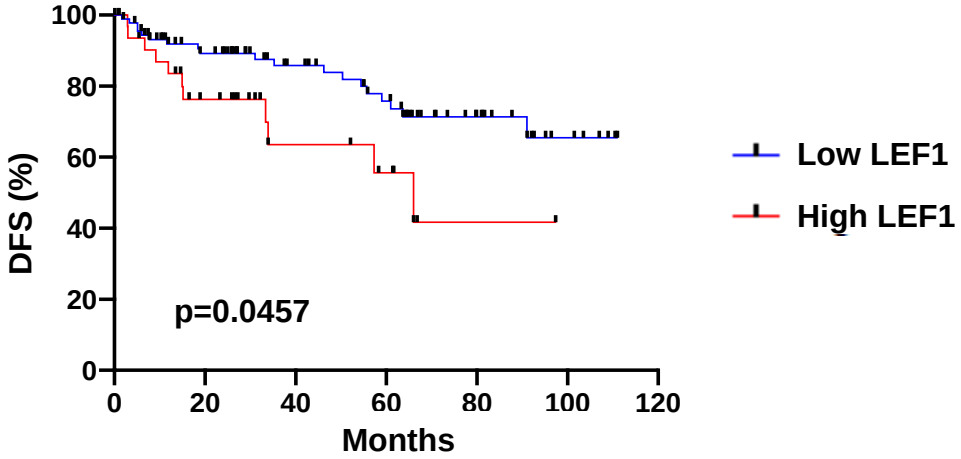




ccRCC	LEF1 low	LEF1 high
TFE3 mRNA (A.U.)	0.2433	1.584

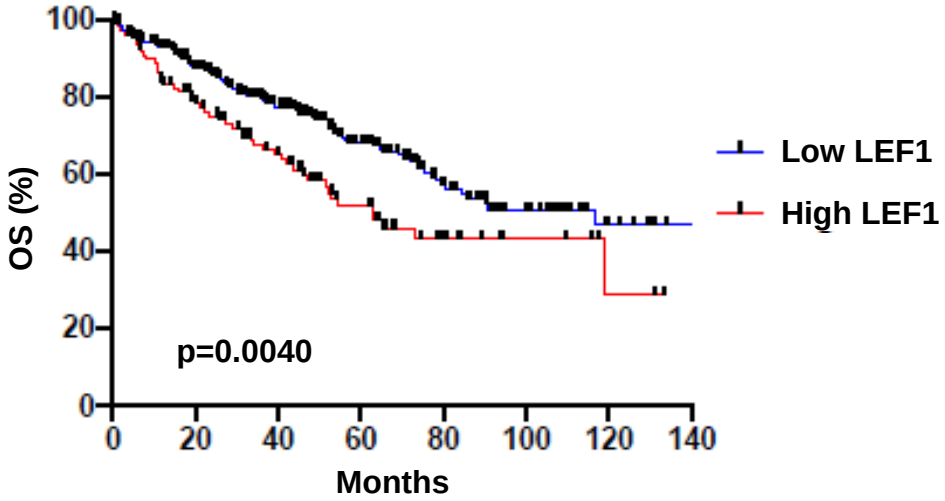
Fig 5. LEF1 mRNA level is correlated with a higher TFE3 level, and poor clinical outcome. (A) Kaplan-Meier analysis of DFS of ccRCC with low or high level LEF1 mRNA in the french cohort (B and C) Kaplan-Meier analysis of OS and DFS, respectively, in ccRCC patients group with low or high LEF1 expression in the TCGA cohort. Statistical significance (p values) is indicated.

A



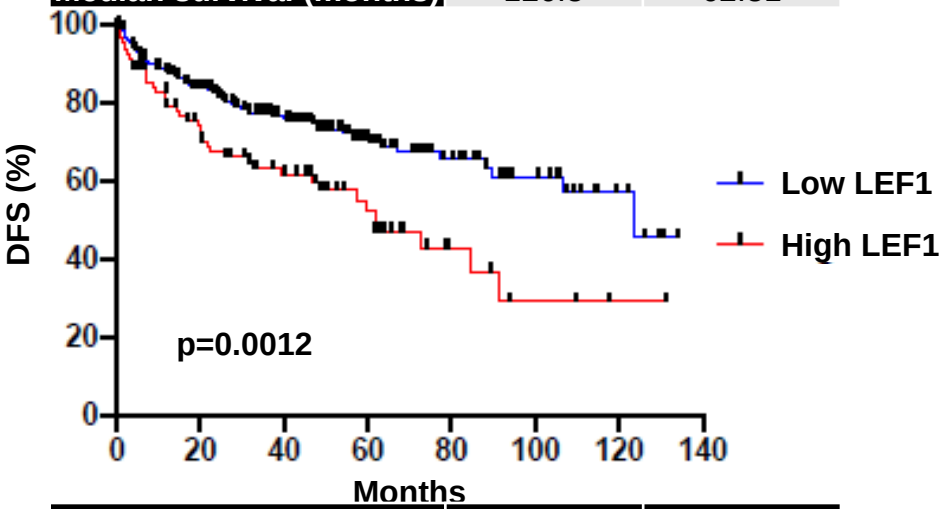
ccRCC / french cohort	LEF1 low	LEF1 high
Median survival (months)	Undefined	66

B

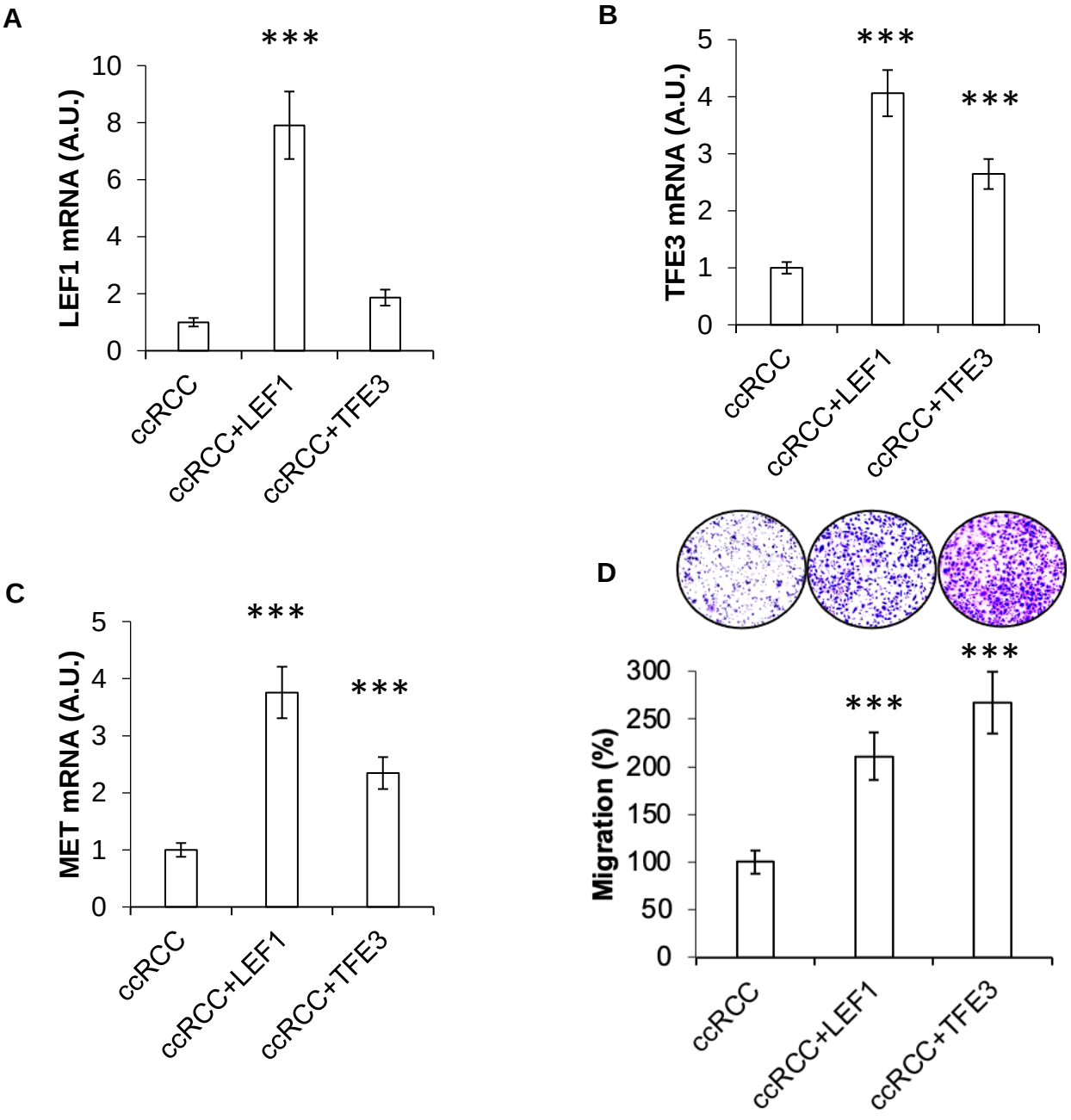


ccRCC / TCGA cohort	LEF1 low	LEF1 high
Median survival (months)	126.8	62.81

C

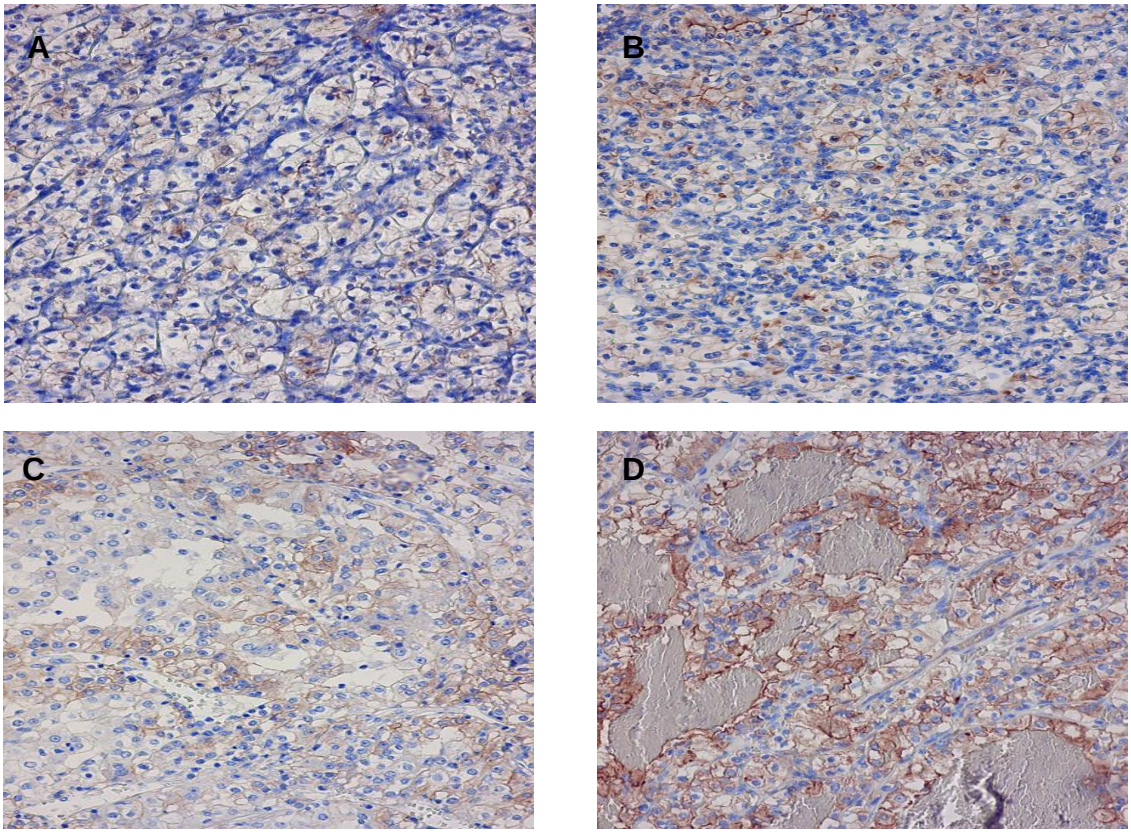


ccRCC / TCGA cohort	LEF1 low	LEF1 high
Median survival (months)	123.7	61.63



Sup fig 1. LEF1 overexpression in ccRCC primary cells increase expression of TFE3 and MET and promotes *in vitro* cell migration. Primary ccRCC cells were transfected with CT, LEF1 or TFE3 vector expression. (A-C) After 72h, the mRNA level of LEF1, TFE3 and MET were evaluated by qPCR. D, Serum-stimulated cell migration was analyzed using Boyden chamber assays. The level of migration of CT (ccRCC) cells was considered as the reference value (100 %). Representative images of the lower surface of the membranes are shown.

Fig 6. c-MET IHC expression is correlated to TFE3 mRNA level in ccRCC patients (Nice cohort). (A-D) representative images of c-MET immunostaining of ccRCC: (A) c-Met low staining, with variable areas without staining and with incomplete weak membranous staining (score 1+). (B) c-Met low staining, with <10% areas with mild incomplete membranous staining (score 2+) (C) c-Met high staining, with>50% areas of mild membranous staining (score 2+) (D) c-Met high staining, with complete, strong membranous staining (score 3+).Tubules cytoplasmic and membranous staining served as internal control. (x200) (E)Table of the Nice cohort h-score of c-MET expression in IHC (h_score= % of positive cells x intensity) (F) Correlation of c-MET IHC expression (h-score) and TFE3 mRNA in patients with low or high level TFE3 mRNA. Statistical significance (p values) is indicated.



E

c-MET intensity	ccRCC TFE3 low	ccRCC TFE3 high	p value
0	10.2%	0.05%	2.3^{E}-7
1	26.5%	14.7%	
2	53.1%	14.7%	
3	10.2%	70.6%	

F

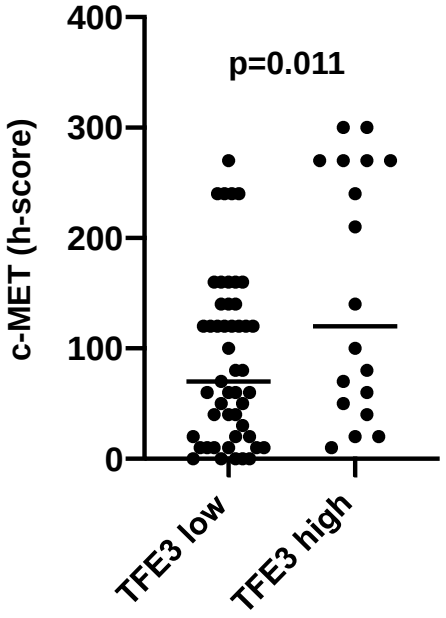
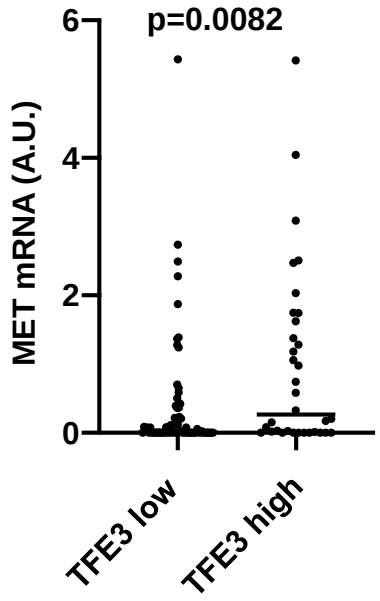


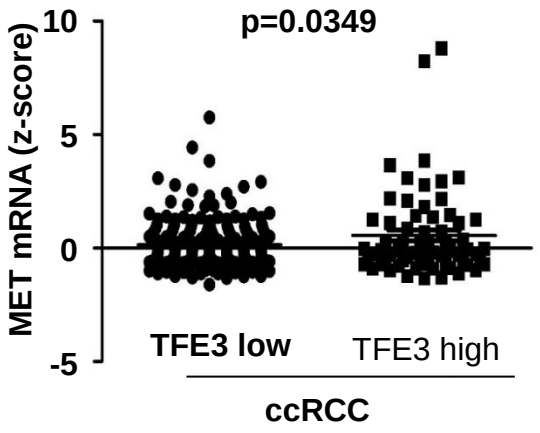
Fig 7. TFE3 is correlated to MET and PDPN mRNA level in ccRCC patients (A and C: French cohort, B and D: TCGA cohort). (A,B) Correlation of MET mRNA level in ccRCC patients group with low or high level TFE3 mRNA level. (C,D) Correlation of PDPN mRNA level in ccRCC patients group with low or high TFE3 mRNA level. Statistical significance (p values) is indicated.

A



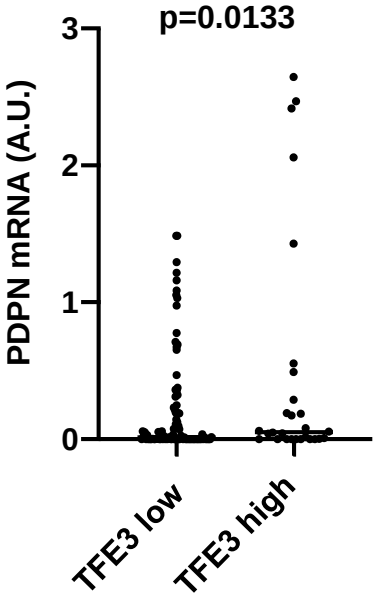
ccRCC / french cohort	TFE3 low	TFE3 high
MET mRNA (A.U.)	0.3786	0.968

B



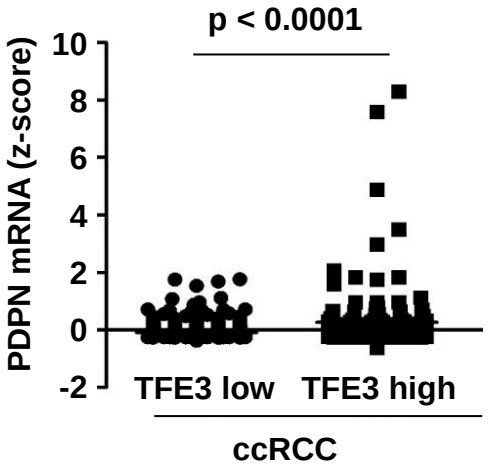
ccRCC / TCGA	TFE3 low	TFE3 high
Patients (n)	325	109
MET mRNA (mean expression)	0.225	0.67

C



ccRCC / french cohort	TFE3 low	TFE3 high
PDPN mRNA (A.U.)	0.1983	0.4738

D



ccRCC / TCGA	TFE3 low	TFE3 high
Patients (n)	325	109
PDPN mRNA (mean expression)	-0.081	0.558

VII. Bibliographie

Les références ainsi que leur ordre d'apparition dans le texte sont identiques à la version article.

Cf fin de manuscrit.

SERMENT D'HIPPOCRATE

Au moment d'être admis à exercer la médecine, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité.

Mon premier souci sera de rétablir, de préserver ou de promouvoir la santé dans tous ses éléments, physiques et mentaux, individuels et sociaux.

Je respecterai toutes les personnes, leur autonomie et leur volonté, sans aucune discrimination selon leur état ou leurs convictions. J'interviendrai pour les protéger si elles sont affaiblies, vulnérables ou menacées dans leur intégrité ou leur dignité. Même sous la contrainte, je ne ferai pas usage de mes connaissances contre les lois de l'humanité.

J'informerai les patients des décisions envisagées, de leurs raisons et de leurs conséquences. Je ne tromperai jamais leur confiance et n'exploiterai pas le pouvoir hérité des circonstances pour forcer les consciences.

Je donnerai mes soins à l'indigent et à quiconque me le demandera. Je ne me laisserai pas influencer par la soif du gain ou la recherche de la gloire.

Admis dans l'intimité des personnes, je tairai les secrets qui me seront confiés. Reçu à l'intérieur des maisons, je respecterai les secrets des foyers et ma conduite ne servira pas à corrompre les mœurs.

Je ferai tout pour soulager les souffrances. Je ne prolongerai pas abusivement les agonies. Je ne provoquerai jamais la mort délibérément.

Je préserverai l'indépendance nécessaire à l'accomplissement de ma mission. Je n'entreprendrai rien qui dépasse mes compétences. Je les entretiendrai et les perfectionnerai pour assurer au mieux les services qui me seront demandés.

J'apporterai mon aide à mes confrères ainsi qu'à leurs familles dans l'adversité.

Que les hommes et mes confrères m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses ; que je sois déshonoré et méprisé si j'y manque.

Résumé

Introduction

Le carcinome à cellules rénales à translocation (tRCC) est une entité récente approuvée par l'OMS en 2014, exprimant fortement TFE3 en immunohistochimie (IHC). C'est une tumeur survenant majoritairement chez les enfants, cependant une infime portion survient chez les adultes, avec un pronostic sombre. Certains carcinomes rénaux à cellules claires (ccRCC) expriment aussi TFE3 en IHC. L'objectif de cette étude était de confirmer la présence d'un groupe de ccRCC exprimant la TFE3 en IHC, de déterminer comment le TFE3 était surexprimé, et déterminer le pronostic d'un tel groupe de ccRCC.

Matériel et méthode

Les IHC de TFE3 et c-MET ont été réalisées sur 66 cas de ccRCC du CHU de Nice et ont été séparés en groupes d'exression de TFE3 réduit (Allred low) et élevé (Allred high). Les niveaux d'expression en ARNm de TFE3, MET et LEF1 ont été dosés sur une cohorte française (Nice + Rennes + Bordeaux) regroupant 166 cas de ccRCC. Les corrélations entre chaque protéine ainsi que différentes données cliniques (TNM, progression, survie) ont été comparées pour chaque groupe. Une cohorte The Cancer Genome Atlas (TCGA) avec 434 ccRCC et 14 tRCC a servi comme cohorte de validation.

Résultats

Dans la cohorte de Nice, 46 cas (69.7%) étaient TFE3 Allred low et 20 cas (30.3%) étaient TFE3 Allred high. Le niveau d'expression en IHC était corrélé au niveau d'ARNm (p=0.0023). La survie sans récidive (DFS) était diminuée dans le groupe Allred high (p=0.0197) et le TFE3 high en ARNm (p=0.0088), ce qui a été confirmé dans la cohorte TCGA (p=0.0005 pour la DFS/PFS et p<0.0001 pour la survie globale). La cohorte TCGA a révélé LEF1 comme un des principaux facteurs de transcription de la famille MiTF impliqué dans la surexpression de TFE3 dans les ccRCC (p<0.0001), avec une corrélation avec l'expression du mRNA de TFE3 dans la cohorte française (p<0.0001). Les cas de ccRCC surexprimant LEF1 dans la cohorte française étaient corrélés à une DFS et une OS réduite (p=0.0457 et p=0.004, respectivement). Ce résultat est confirmé par l'analyse de la cohorte TCGA pour la DFS (p=0.0012). L'analyse de c-MET a ensuite montré une corrélation de son niveau d'expression en IHC et en mRNA (p=0.011). La surexpression de TFE3 était aussi corrélée à l'expression de MET dans la cohorte française d'une part (p=00082), et à l'expression de la Podoplanine, un marqueur de vaisseaux lymphatiques dans la cohorte française et la cohorte TCGA d'autre part (p=0.0133 et p<0.0001, respectivement).

Conclusion

Les ccRCC peuvent surexprimer TFE3 en IHC en l'absence de translocation. La protéine LEF1 joue un rôle dans la surexpression de TFE3, qui pourrait être responsable de l'activation de la transcription de MET, et la voie de signalisation correspondante HGF/c-MET, résultant en une tumeur plus agressive avec une prolifération de vaisseaux lymphatiques augmentée.