



Université Bordeaux Segalen

Année 2012

Thèse n° 2026

THÈSE

pour le

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 2

Ecole doctorale Sciences de la Vie et de la Santé
Mention : Sciences, Technologie, Santé
Spécialité : Biologie cellulaire et physiopathologie

Présentée et soutenue publiquement le 17 décembre 2012

Par Barbara LORTAL-CANGUILHEM

« Caractérisation de sept lignées cellulaires humaines de cancer de vessie pour les principaux marqueurs de la transition épithélio-mésenchymateuse, Twist1 et E-cadhérine, et pour une nouvelle drogue, le saracatinib. »

Membres du Jury

Mme le Professeur Paulette BIOULAC-SAGE	Présidente du Jury
Mme le Professeur Bettina COUDERC	Rapporteur
Mme le Professeur Simone MATHOULIN -PELISSIER	Membre du jury
Mme le Docteur Anne PRADINES	Rapporteur
Mme le Docteur Isabelle LAJOIE-MAZENC	Membre du jury
Mme le Docteur Nadine HOUEDE	Directeur de Thèse

Remerciements

J'adresse mes plus sincères remerciements à Mme le Professeur Paulette Bioulac-Sage, pour sa générosité, sa gentillesse et sa bienveillance tout au long de ce travail.

J'adresse mes plus sincères et chaleureux remerciements à Mme Anne Pradines d'avoir accepté la mission impossible de rapporter ma thèse en moins d'une semaine. Promis après, il n'y aura pas d'autre Canguilhem avant au moins 20 ans !!

J'adresse mes plus sincères remerciements à Mme le Dr Isabelle Lajoie-Mazenc et Mme le Professeur Bettina Couderc. Merci d'avoir cru en moi, et de m'avoir poussé à continuer l'internat. Vous êtes mes mamans de la recherche, encore une fois, vous me sauvez. Un grand et éternel merci à vous deux.

J'adresse mes plus sincères remerciements à Mme le Professeur Simone Mathoulin Pelissier pour avoir accepté de siéger dans mon jury et pour m'avoir encouragée et soutenue.

J'adresse mes plus sincères remerciements à Mme le Dr Kouébé, pour m'avoir offert la chance de terminer le travail commencé, et pour son dynamisme contagieux.

À mon mari Bruno, pour m'avoir soutenue et supportée, le pire est derrière le meilleur est devant. Je t'aime.
À ma famille, je vous aime tous.

À mes amis qui m'ont apportés leur soutien sans faille
Céline, sans toi rien n'aurait été possible
Anne Laure, la pro des titres, je n'ai pas trouvé la mouche, mais c'est aussi ça la recherche : ne pas trouver.
Anne Lise, merci pour ta patience, ta gentillesse et ton humour
Jérôme, à qui le tour ?
Simone, et ses précieux conseils
Françoise, Madame référence manager, toujours prête à rendre service.
Martine, de m'avoir épaulée
Stéphanie, merci pour ta bonne humeur

Une pensée spéciale, pour Philippe P, Francesca, Pierre, Pippa et Mrs les Pr Reiffers et Marthan

Un grand merci à toutes les personnes rencontrées au labo, à mes collègues de la pharmacie et de médecine nucléaire.

TABLE DES MATIERES

PARTIE 1 : GENERALITES	6
Introduction générale.....	7
1 Le cancer de la vessie	8
1.1 Epidémiologie	8
1.2 Facteurs de risques	8
1.3 Classification des tumeurs de vessie	9
1.3.1 Anatomie de la vessie.....	9
1.3.2 Classification TNM 2009	9
1.3.3 Classification suivant l'infiltration musculaire	10
1.4 Traitements des cancers de la vessie	11
1.5 Bases de l'oncogénèse dans le cancer de la vessie.....	12
1.5.1 Gènes suppresseurs de tumeur	15
1.5.2 Oncogènes	16
1.5.3 Gènes du chromosome 9	18
2 Migration, invasion et dissémination métastatique	19
2.1 Physiopathologie des métastases.....	19
2.2 Transition Epithélio Méenchymateuse EMT	20
2.2.1 EMT physiologique.....	20
2.2.2 L'EMT et cancérogénèse	21
2.2.3 Modification du cytosquelette lors de l'EMT	22
2.2.4 Modifications moléculaires lors de l'EMT	23
2.2.5 Modification de la matrice extra-cellulaire	24
2.3 MET	24
2.4 Voies de régulation de l'EMT	25
2.4.1 Oncogènes Rb et p53.....	25
2.4.2 E-cadhérine.....	26
2.4.3 Régulation transcriptionnelle	27
3 Twist1	32
3.1 Le gène Twist1	32
3.2 La protéine Twist1	32
3.3 Rôle physiologique dans le développement embryonnaire.....	34
3.4 Twist et cancer	34
3.5 potentiel oncogénique de Twist1.....	35
3.5.1 Twist est un régulateur de l'apoptose et de la sénescence	35
3.5.2 Twist inducteur de la progression tumorale et la formation de métastases.....	36
3.6 Régulation de l'expression de Twist1	38
3.6.1 Twist et STAT3	39
3.6.2 Twist et les récepteurs à tyrosine kinases IGFR-1et VEGFR1	39
3.6.3 Twist et p27	39
4 Protéine c-Src	40
4.1 Src Kinase family (SFKs)	40
4.2 Activation de la protéine Src (c-Src).....	41
4.3 Src et cancérogénèse	42
4.4 Src et EMT	42
4.4.2 Src et STAT3 / Twist1	44
4.4.3 Src et migration	44
4.4.4 Src et angiogénèse	44
5 Le traitement AZD0530	45

5.1	Structure	45
5.2	Mécanisme d'action	46
5.3	Etudes pré-cliniques	46
5.4	Etudes cliniques.....	47
PARTIE 2 : OBJECTIFS		48
Twist1 cible thérapeutique dans le cancer de la vessie?		49
Saracatinib nouvel espoir dans le traitement du cancer de la vessie ?		49
PARTIE 3 : MATERIEL ET METHODE		50
1	Culture cellulaire	51
2	Western blot	51
2.1	Obtention du l'extrait protéique	51
2.2	Dosage.....	52
2.3	Description	52
2.4	Immunodétection.....	52
2.4.1	Anticorps utilisés.....	53
3	Transfection à l'Exgène®	53
4	Immunofluorescence	54
5	RT-qPCR.....	55
5.1	Principe.....	55
5.2	Extraction de l'ARN.....	55
5.3	RT-qPCR.....	55
6	Test de viabilité cellulaire, test du MTT	56
6.1	Principe.....	56
6.2	Traitements pharmacologiques	56
6.3	Méthode.....	56
7	Test d'invasivité ou « wound healing »	57
7.1	Principe.....	57
7.2	Description	57
7.3	Expression des résultats	57
PARTIE 4 : RESULTATS		58
1	Mise en évidence de l'expression de la protéine TWIST1 dans les lignées cellulaires de vessie	59
1.1	Western blot	59
1.1.1	Méthode d'extraction	59
1.1.2	Quantité de protéines déposée.....	60
1.1.3	Dégradation intracellulaire.....	61
1.1.4	Lignée cellulaire « Témoin positif »	61
1.1.5	Optimisation de la détection par l'anticorps primaire anti-Twist1	62
1.1.6	Validation de l'anticorps choisi.....	62
1.2	Immunofluorescence	63
1.3	RT-QPCR.....	66
1.4	Conclusion.....	68
2	Caractérisation de 7 lignées cellulaires de vessie.....	68
2.1	Caractérisation des lignées de cancer de la vessie pour les marqueurs de l'EMT... ..	69
2.2	Caractérisation des lignées pour la cytotoxicité au cisplatine.....	71
2.3	Caractérisation du pouvoir migratoire des 7 lignées cellulaires.....	72
2.3.1	En présence de sérum	73

2.3.2	En l'absence de sérum	74
2.3.3	Comparaison en présence de sérum et en l'absence de sérum	75
3	Effet du traitement par Saracatinib sur le phénotype des lignées cellulaires de vessie ..	78
3.1	Cytotoxicité	78
3.1.1	Observation au microscope	78
3.1.2	Courbes dose-réponse	80
3.2	Migration cellulaire	82
3.2.1	En présence de sérum	82
3.2.2	En l'absence de sérum	85
3.3	Recherche de la voie de signalisation intervenant dans l'action du saracatinib.....	87
3.3.1	Voie de la E-cadhérine	87
3.3.2	Autres voies possibles	92
PARTIE 5 : DISCUSSION PERSPECTIVES		97
PARTIE 6 : CONCLUSION		103
BIBLIOGRAPHIE		105

PARTIE 1 : GENERALITES

Introduction générale

Le cancer est un processus physiologique, dans lequel les cellules cancéreuses acquièrent ou perdent des spécificités qui favorisent l'invasivité, la prolifération, la résistance au traitement. Les caractéristiques suivantes sont spécifiques de l'oncogénèse:

- acquisition du pouvoir invasif et de la capacité à métastaser
- perte de sensibilité aux traitements et aux signaux anti-prolifératifs
- gain de l'immortalité : les cellules sont capables de se multiplier continuellement, il n'existe plus d'inhibition de contact. La prolifération peut être infinie.
- perte du phénomène d'apoptose
- favorisation d'une néoangiogénèse
- favorisation de l'instabilité génétique, avec perturbation des étapes clés du cycle cellulaire ou de la réparation de l'ADN, et bien d'autres voies de signalisations
- perte de l'inhibition de contact
- perte de l'adhérence, et la possibilité de former des colonies en milieu mou
- gain d'altérations épigénétiques au niveau des gènes suppresseurs de tumeurs ou au niveau des oncogènes.

Le cancer est donc un processus complexe faisant intervenir différentes voies.

Le cancer de la vessie, en France se place à la 7^{ième} position, derrière les cancers de la prostate du sein, du colon-rectum, du poumon, des lymphomes.

Les traitements mis en œuvre permettent de diminuer, ou de faire disparaître la tumeur primaire, mais ont du mal à maîtriser la dissémination métastatique responsable de l'apparition de tumeurs secondaires. Le cancer de la vessie est un cancer hautement métastatique, qui échappe aux traitements standards. Il peut envahir le muscle vésical, de cet envahissement dépendra la lourdeur du traitement, lui-même associé à une morbidité plus ou moins élevée.

Il est donc essentiel de définir l'agressivité de la tumeur pour adopter la stratégie de traitement adaptée, et éviter toute intervention chirurgicale inutile. Il est aussi nécessaire de comprendre en détail le mécanisme de formation des métastases, afin de développer de nouveaux axes thérapeutiques.

La dissémination des métastases est induite par le mécanisme de transition épithélio-mésenchymateuse (EMT). L'EMT est un processus physiologique qui participe à la désolidarisation des cellules et à leur invasivité. Elle dominée moléculairement par la répression de la protéine E-cadhérine, et l'expression de la protéine Twist1. Le développement de médicaments anti-invasifs et anti-métastatiques ciblant ces mécanismes reste donc au cœur des nouveaux enjeux thérapeutiques.

1 Le cancer de la vessie

1.1 Epidémiologie

Le cancer de la vessie est le 2^{ième} cancer mondial dans le groupe des cancers uro-génitaux [1], derrière le cancer de la prostate. En 2008, il représentait à travers le monde 386 300 nouveaux cas et 150 200 décès [1]. Les incidences les plus élevées sont retrouvées en Europe, en Amérique du Nord et en Afrique du Nord.

En France, le cancer de la vessie se situe au 7^{ième} rang des cancers les plus fréquents. L'incidence estimée est de 10 729 personnes en 2009 (invs.sante.fr).

Le sexe ratio est nettement en défaveur des hommes, qui sont de loin les plus touchés, et représentent plus de 80 % des cas. Le cancer de la vessie représente la 4^{ième} cause de décès par cancer dans le monde pour les hommes [1].

L'âge moyen au diagnostic est de 70 ans.

1.2 Facteurs de risques

Les facteurs constitutionnels sont :

- l'âge : l'âge de survenu est aux environ 70 ans.
- l'hérédité : il existe des familles à risque pour le cancer de la vessie [2], présentant des génotypes où gènes NAT2 et GSTM1 sont délétés. Ces gènes codent pour des enzymes responsables de la détoxification de l'organisme. [3]
- type de population : certaines populations sont plus sensibles tels les égyptiens
- le sexe : 4 hommes sont touchés pour 1 femme. Cette différence peut s'expliquer par une exposition plus importante aux différents carcinogènes que sont le tabac, ou les amines aromatique issus des produits chimiques de l'industrie. Le pourcentage de cancer de la vessie chez les femmes augmente depuis quelques années et ce, notamment à cause de la progression du tabagisme féminin [4]. Les femmes présentent le plus souvent une maladie avancée associée à un pronostic beaucoup plus grave que chez les hommes [4].

Les facteurs acquis :

- le tabac : le tabagisme est un facteur de risque très important
- l'exposition à certains composés chimiques : amines aromatiques pesticides et leurs dérivés hydroxylés halogénés et sulfonés. (tableau français n°15 des maladies professionnelles), les dérivés de l'aniline, certains hydrocarbures polycycliques, les dérivés industriels du tryptophane, l'arsenic, les pesticides.
- l'infection par *Schistosoma haematobium* ou bilharziose. Cette parasitose causée par des vers plats, est présente essentiellement en Afrique et au Proche-Orient. La contamination se fait par pénétration transcutanée des larves lors de bains en eau douce et stagnante, dans les zones tropicales. La présence du parasite dans la muqueuse provoque une inflammation continue et des altérations de l'arbre urinaire. Non traité ou mal traité, l'évolution, peut aboutir, à long terme, à un cancer de la vessie.

- l'obstacle à l'écoulement de l'urine : sonde mictionnelle, calculs vésicaux

Les facteurs moléculaires :

- les mutations des oncogènes H-RAS, FGFR et PI3K survenant dans l'urothélium sain conduisent à des tumeurs superficielles de vessie [5]
- l'inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs TP53, RB et PTEN mènent à la formation de carcinome invasif. [5]
- les délétions du chromosome 9 et l'augmentation du risque de récurrence associé
- l'altération du gène codant pour le récepteur du facteur de croissance fibroblastique (FGFR) [6].

1.3 Classification des tumeurs de vessie

1.3.1 Anatomie de la vessie

La paroi vésicale est constituée du tissu adipeux, du muscle vésical profond, du muscle vésical superficiel, du chorion (tissu conjonctif sous-muqueux), et d'un épithélium appelé urothélium, en contact avec la lumière de la vessie.

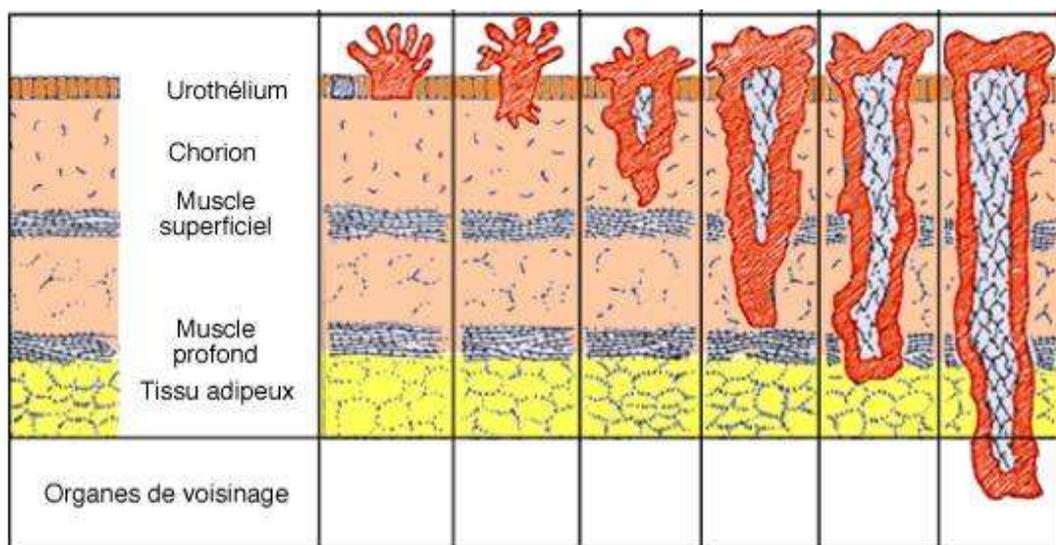


Schéma 1 : Coupe transversale de vessie, envahissement plus ou moins important de la tumeur.

1.3.2 Classification TNM 2009

La classification du cancer de la vessie repose principalement sur une classification histopathologique TNM, de l'«American Joint Committee on Cancer». Elle permet de regrouper les tumeurs en fonction de l'extension de la lésion dans la paroi de la vessie (lettre T), de l'envahissement des ganglions lymphatiques (lettre N de l'anglais Node) situés plus ou moins loin de la tumeur ainsi que de la présence ou de l'absence de métastases à distance (M). Les sites de métastases du cancer de la vessie sont généralement les os, les poumons, les ganglions lymphatiques éloignés de la vessie. Dans le tableau 1 sont répertoriées les caractéristiques de cette classification.

T	Tx	tumeur primitive ne pouvant être classée	
	T0	pas de tumeur primitive décelable	
	Ta	tumeur papillaire non invasive	
	Tis	carcinome <i>in situ</i> : « tumeur plane »	
	T1	tumeur envahissant le chorion	
	T2	T2a	tumeur envahissant le muscle superficiel
		T2b	tumeur envahissant le muscle profond
	T3	T3a	tumeur envahissant microscopiquement le tissu périvésical
		T3b	tumeur envahissant macroscopiquement le tissu périvésical (masse extravésicale)
	T4	T4a	envahissement prostate, utérus ou vagin
T4b		envahissement paroi pelvienne ou paroi abdominale	
N	Nx	ganglions non évaluables	
	N0	pas de métastase ganglionnaire	
	N1, 2	Atteinte des ganglions hypogastriques, obturateurs, iliaques externes ou pré-sacrés : N1 : un seul ganglion atteint ; N2 : plusieurs ganglions atteints.	
	N3	Atteinte d'un ou plusieurs ganglions de l'iliaque commune	
M	M0	Pas de métastase à distance	
	M1	Présence de métastases à distance.	

Tableau 1 : Classification TNM 2009 des tumeurs de la vessie.

1.3.3 Classification suivant l'infiltration musculaire

Les tumeurs de vessie non infiltrantes du muscle (TVNIM) regroupent les tumeurs dites Tis, Ta, et T1 a et b. Les tumeurs superficielles, non infiltrantes ne touchent que la muqueuse. Elles sont les plus fréquentes et présentent entre 70 et 80% des cas de cancer de la vessie. La survie à 5 ans est estimée à 80%. Le risque principal est la récurrence, qui survient dans environ 75 % des cas après un traitement de première intention. 10 à 30% des récurrences progressent, et infiltrent le muscle. Le suivi prolongé de ces tumeurs est essentiel et nécessaire. Il permet de détecter toute récurrence ou progression le plus précocement possible.

Les tumeurs infiltrantes de vessie du muscle (TVIM) regroupent les tumeurs dites T2, T3 a et b, T4 a et b. Elles représentent 20-30% des cancers de la vessie. Les tumeurs infiltrantes atteignent le muscle vésical et nécessitent un traitement plus lourd. Le risque principal est l'évolution métastatique. Les tumeurs ayant envahi le muscle, T2 à T4 ont un pronostic moins favorable que les tumeurs superficielles. Le taux de survie à 5 ans est inférieur à 50%. Il est nécessaire de développer des marqueurs permettant d'identifier au sein des T1 les cancers non invasifs ayant un faible risque de progression et ceux évoluant en cancers

invasifs. La détection plus précoce des cancers T1 à devenir invasif permettra, ainsi d'améliorer le pronostic de ces tumeurs.

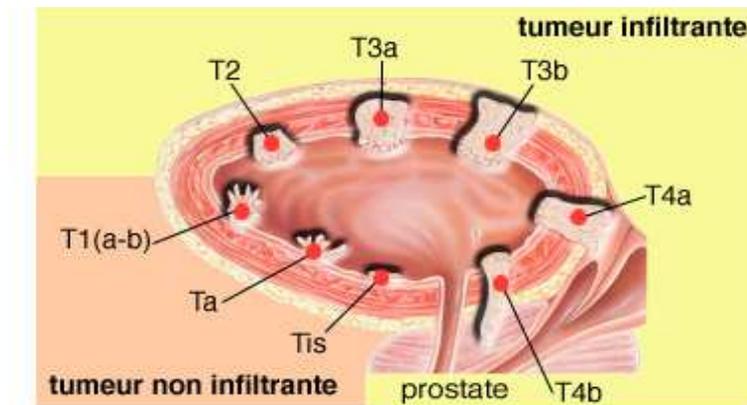


Schéma 2 : Tumeurs infiltrantes (T2, T3a, T3b, T4a, T4b) et non infiltrantes (T1a, T1b, Ta, Tis)

1.4 Traitements des cancers de la vessie

Le traitement est différent suivant qu'il s'agisse d'une tumeur superficielle ou non, et suivant l'envahissement métastatique [7] (INCA cancer de la vessie 2010).

Les tumeurs superficielles

La prise en charge thérapeutique des tumeurs superficielles repose sur un traitement conservateur par une résection transurétrale de vessie. Celle-ci peut être suivie d'instillations endovésicales hebdomadaires visant à réduire le risque de récurrence précoce de mitomycine C (AMETYCINE® : antibiotique antinéoplasique) ou de BCG (IMMUCYST® : immunostimulateur) en fonction du risque de récurrence ou de progression. Le pronostic est généralement bon, mais la rechute est fréquente et la progression en maladie invasive apparaît dans 10-20% des cas.

Les tumeurs infiltrantes

En cas de tumeur de vessie avec infiltration musculaire non métastatique, le traitement de référence repose sur chirurgie lourde et mutilante, par cystectomie totale, avec curage ganglionnaire iliaque bilatéral, qui altère la qualité de vie du patient.

La place de la chimiothérapie néoadjuvante M-VAC (Méthotrexate, Vinblastine, Doxorubicine =Adriamycine, Cisplatine) [8] ou GC (gemcitabine cisplatine) [8], reste discutée. Malgré des taux de réponse élevés à la chimiothérapie, la médiane de survie ne dépasse pas 15 mois et très peu de patients bénéficient d'une réponse de longue durée [8]. La radiochimiothérapie à base de cisplatine comme traitement exclusif peut être une alternative à la chirurgie, en particulier en cas de patient non opérable ou refusant l'intervention.

Les tumeurs métastatiques

Devant une tumeur métastatique, une chimiothérapie à base de cisplatine est proposée de type M-VAC, ou cisplatine-gemcitabine. Le recours à la chirurgie est exceptionnel et dépend de l'envahissement de la musculature.

1.5 Bases de l'oncogénèse dans le cancer de la vessie

De nombreuses altérations génétiques et épigénétiques ont été identifiées comme contribuant directement ou indirectement à la formation de tumeurs de la vessie. Certaines tumeurs présentent fréquemment des événements précis [9], de types altérations génétiques qui sont spécifiquement associées à un type histopathologique de tumeur [10] [5]. Deux grandes voies génétiques se distinguent, basées sur des caractéristiques moléculaires [10] qui permettent de définir 2 grands modèles dans la formation des tumeurs de vessie. Ces 2 modèles possèdent des pronostics différents, telle la survenue de métastases et la survie du patient.

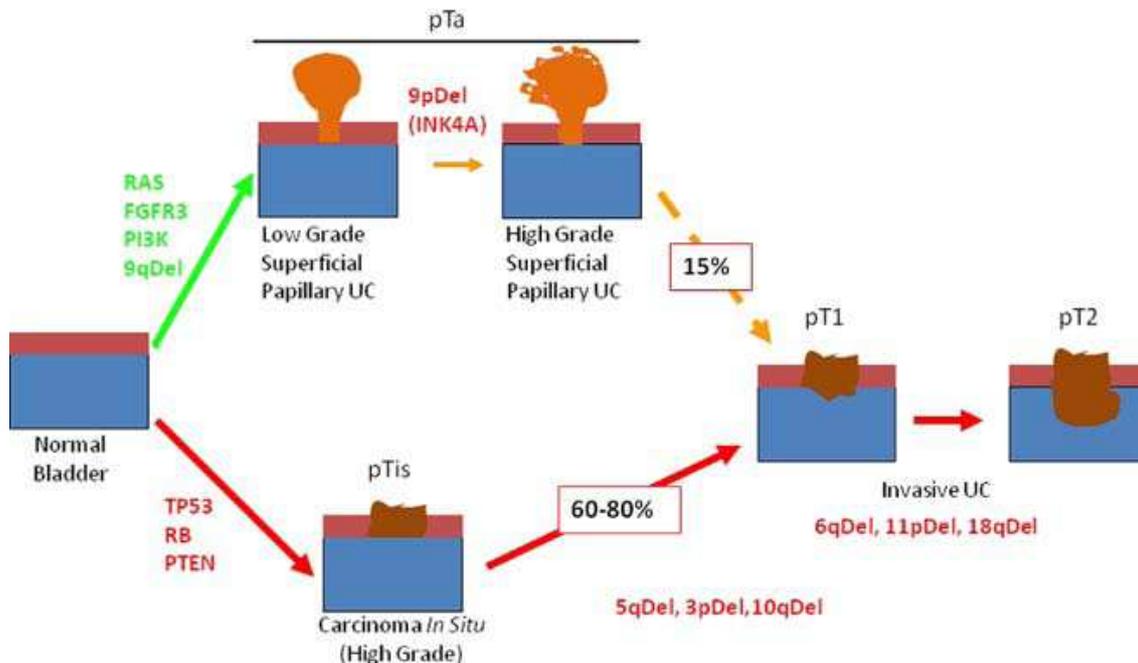


Schéma 3 : Les 2 grandes voies génétiques proposées pour la formation du cancer de la vessie. [9]

D'un côté les tumeurs superficielles papillaires non invasives de type Ta. Elles sont porteuses de mutations des oncogènes H-RAS [5], FGFR3 et PI3K, entraînant un gain de fonction [9]. Elles dérivent d'une hyperplasie de l'urothélium sain et n'évoluent que très rarement en maladie métastatique (tableau 2). La mortalité liée à ce type de cancer reste faible [5] [11], mais présente dans 30% des cas un risque de rechute.

De l'autre côté « les carcinomes in situ » hautement invasifs, de type T2, T3, T4, sont caractérisés par la perte de fonction des gènes suppresseurs de tumeurs tels p53, Rb et PTEN. [5,9]. Ils dérivent d'une dysplasie de l'urothélium sain. Ils évoluent en grande majorité vers une maladie agressive et envahissante, aboutissant à la formation de métastases. Ces derniers possèdent un risque élevé de mortalité lié au cancer. [5] (tableau 2).

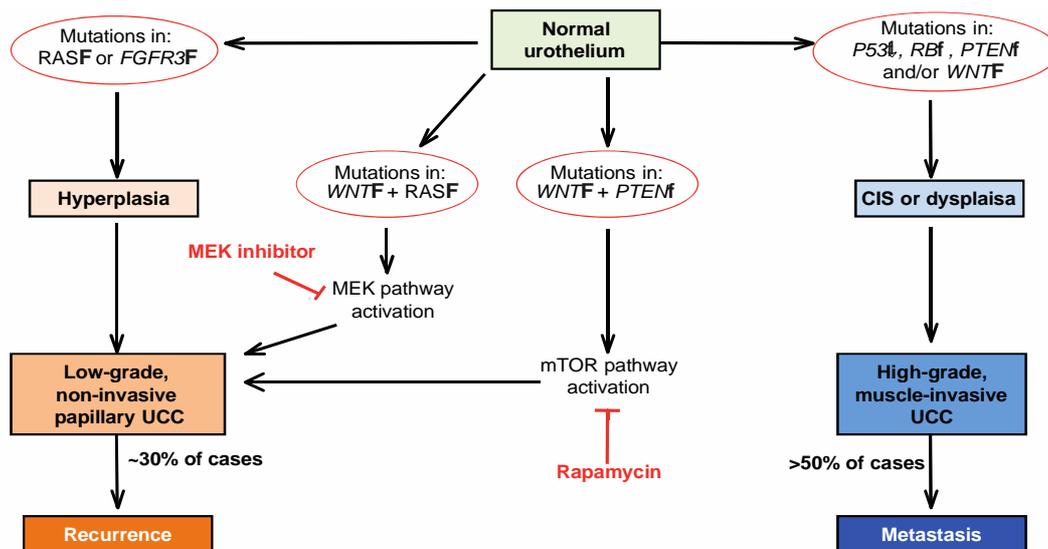


Schéma 4 : Base de l'oncogénèse dans les différents types de cancer de la vessie [11]

Gene (cytogenetic location)	Alteration	Frequency	Gene (cytogenetic location)	Alteration	Frequency
Oncogenes			Oncogenes		
HRAS (11p15)/NRAS (1p13)/KRAS2 (12p12)	Activating mutation	15%	HRAS (11p15)/NRAS (1p13)	Activating mutation	10–15%
FGFR3 (4p16)	Activating mutation	60%–80%	KRAS2 (12p12)	Activating mutation/overexpression	~50%
CCND1 (11q13)	Amplification and/or overexpression	10%–20%	FGFR3 (4p16)	Amplification and/or overexpression	10%–14%
PIK3CA (3q26)	Activating mutation	27%	ERBB2 (17q)	Amplification and/or overexpression	10–20% amplification
MDM2 (12q13)	Overexpression	~30%	CCND1 (11q13)	Amplification and/or overexpression	4% amplification
Tumor suppressor genes			Tumour suppressor genes		
CDKN2A (9p21)	Homozygous deletion or methylation or mutation	HD 20–30% LOH~60%	MDM2 (12q13)	Amplification and/or overexpression	9–11% amplification in ≥T1
PTCH (9q22)	Deletion or mutation	LOH~60% Mutation frequency low	E2F3 (6p22)	Amplification and overexpression	9–11% amplification in ≥T1
DBC1 (9q32–33)	Deletion or methylation	LOH~60%	Tumour suppressor genes		
TSC1 (9q34)	Deletion or mutation	LOH~60%; mutation~12%	CDKN2A (9p21)	Homozygous deletion or Methylation or mutation	HD 20–30% LOH ~60% LOH ~60% Mutation frequency low
Tumeur invasives			PTCH (9q22)	Deletion or mutation	LOH ~60% LOH ~60% Mutation frequency low
			DBC1 (9q32–33)	Deletion or methylation	LOH ~60% LOH ~60% Mutation ~12%
			TSC1 (9q34)	Deletion or mutation	LOH 30%–35% Mutation 17%
			PTEN (10q23)	Homozygous deletion or mutation	37%
			RB1 (13q14)	Deletion	70%
			TP53 (17p13)	Deletion or mutation	
			Tumeurs non invasives		

Tableau 2 : Distribution des altérations génétiques dans les tumeurs superficielles papillaires

Ces 2 grands types de cancer de la vessie, sont aussi caractérisés par des délétions du chromosome 9 [9]. Un troisième groupe expliquant le développement des tumeurs de type T1

se distingue par une évolution clinicopathologique ne correspondant pas aux deux autres. Cependant, aucune donnée moléculaire ne permet de le confirmer [10].

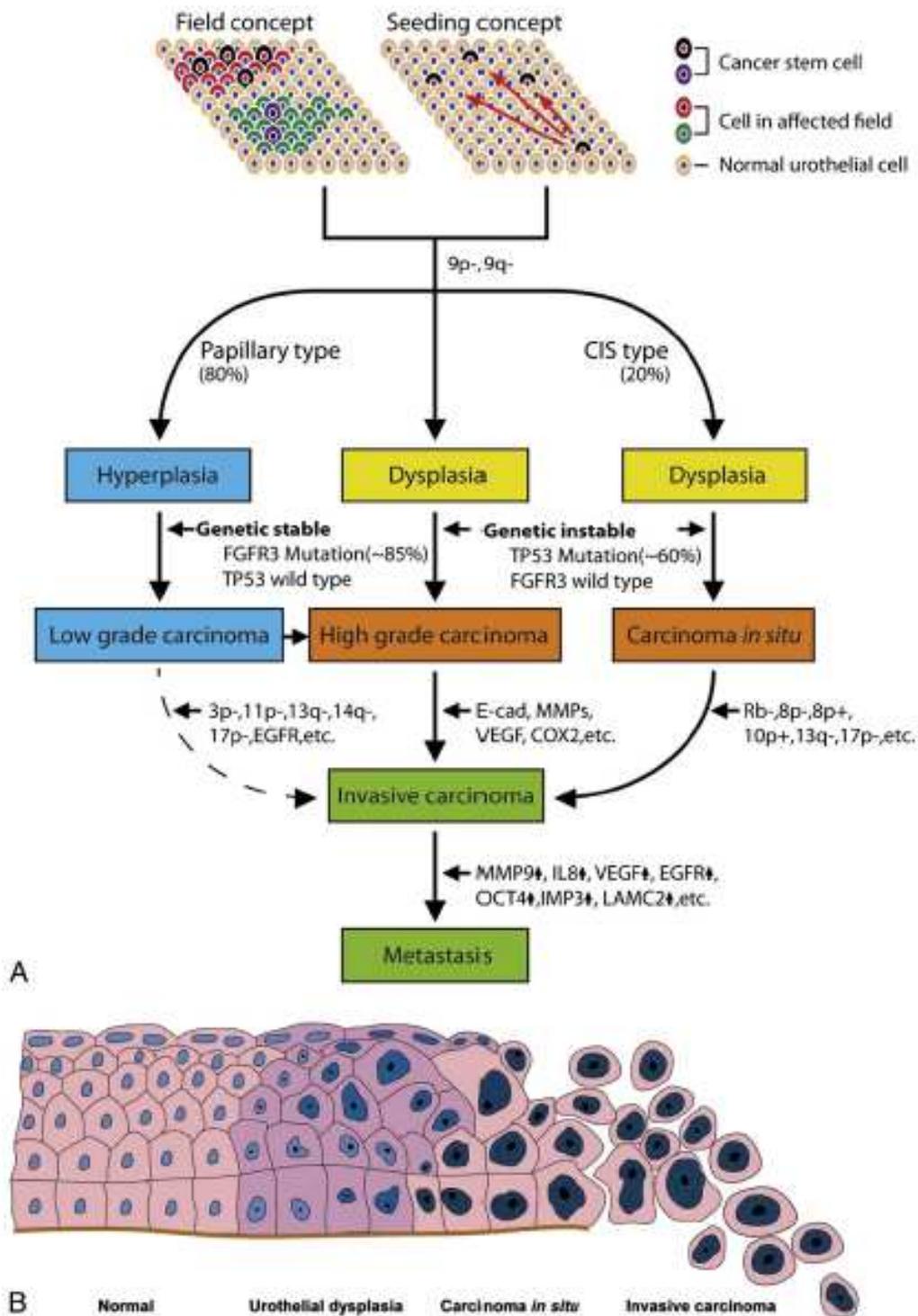


Schéma 5: Base de l'oncogénèse dans les différents types de cancer de la vessie [12].non invasives de type Ta, et les tumeurs invasives de type T2, T3 et T4 [10].

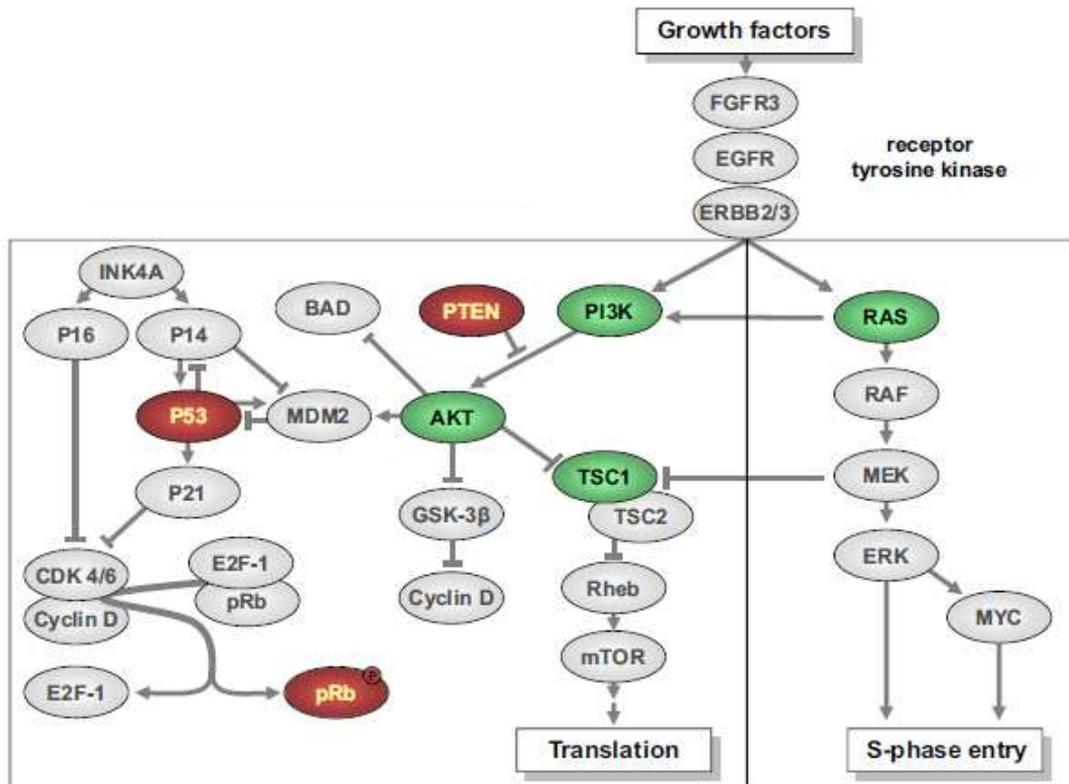


Schéma 6 : voie MAPK/PI3K dans les cancers de la vessie [10], avec les principaux gènes suppresseurs de tumeurs ayant perdu leur fonction : PTEN, p53 et pRb.

1.5.1 Gènes suppresseurs de tumeur

1.5.1.1 TP53

Le gène suppresseur de tumeur TP53 code pour la protéine p53. Il est localisé sur le bras court du chromosome 17. Il est retrouvé muté dans 50% des cancers ce qui en fait le gène le plus fréquemment impliqué dans le développement tumoral [13]. La protéine p53 est impliquée dans le maintien de l'intégrité génique, elle est donc décrite comme étant le « gardien du génome » [14]. Dans les tissus sains, la voie p53 n'est pas activée et le taux d'expression de la protéine reste faible. La protéine HDM2, ubiquitine ligase (MDM2 chez la souris) se lie à p53, et induit sa dégradation par le protéasome. La quantité de protéine p53 intracellulaire est donc diminuée. Lors d'un stress cellulaire comme des dommages à l'ADN (UV, hypoxie, radiations...), la protéine p53 va être modifiée de différentes manières (phosphorylation, acétylation,...) [15]. Ces modifications post-traductionnelles inhibent son interaction avec la protéine MDM2 bloquant ainsi sa dégradation, conduisant à son accumulation dans la cellule. De plus, p53 va transloquer dans le noyau où elle pourra se lier sur des régions spécifiques de l'ADN. Là elle induit la transcription de nombreux gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire, induisant ainsi un blocage en phase G1, ou de gènes régulant l'apoptose conduisant à la mort de la cellule [16].

Dans les tumeurs de vessie invasives de type T2, TP53 est inactivé par mutation dans plus de 40% des cas [17]. La mutation la plus fréquente, plus de 80% des cas, conduit à une mutation

non sens, qui code pour un codon stop prématuré. La protéine p53 mature tronquée, est inactive. Le plus souvent les mutations surviennent sur les exons 5 à 8, qui codent pour le domaine de liaison à l'ADN, nécessaire à l'activité régulatrice transcriptionnelle de la protéine, dans le noyau. [18] [19]. La protéine p53 nucléaire retrouvée est généralement plus stable que la protéine p53 sauvage. Son accumulation permet sa détection par diverses méthodes : immunohistochimie, PCR...

De nombreuses études ont montré que la mutation de TP53, était liée à un phénotype de grade élevé de tumeur de la vessie, associé à un haut risque de récurrence [20].

1.5.1.2 RB (RB1)

Le gène RB1 situé sur le chromosome 13 code pour la protéine du rétinoblastome : pRb. Son expression, et sa fonction sont fréquemment perdues dans différents types de tumeurs comme dans les cancers de la vessie, du poumon, du sein et du cerveau. Les personnes ayant des mutations germinales de RB1 possèdent un risque accru de développer un carcinome épithélial, notamment celui de la vessie [21]. La perte d'hétérozygotie du gène RB1 est fréquente dans le cancer de la vessie [22]. La protéine Rb n'étant plus exprimée, elle ne joue plus son rôle d'inhibiteur du facteur de transcription E2F. E2F libéré, permet à la cellule de progresser de la phase G1 à la phase S du cycle cellulaire. Une augmentation de la prolifération cellulaire en résulte.

1.5.1.3 PTEN

Le gène PTEN situé sur le chromosome 10 code pour la protéine PTEN, impliquée dans la régulation négative de la voie PI3K, et dans l'inhibition de la survie et de la prolifération cellulaire. La protéine PTEN est une lipide phosphatase impliquée dans la déphosphorylation du phosphatidil inositol tri-phosphate (PIP3). Le phosphatidil inositol bi-phosphate (PIP2) ainsi formé ne peut plus activer la voie Akt. La délétion du gène PTEN est rare dans les tumeurs non invasives, mais est fréquemment retrouvée dans les tumeurs invasives [23]. De plus une diminution ou une perte d'expression de la protéine PTEN est observée dans 42% des cancers non invasifs contre 94% dans les cancers invasifs de la vessie. Cette perte d'expression de PTEN est associée à des tumeurs de vessie invasives [24].

1.5.2 Oncogènes

1.5.2.1 HRas

Le gène H-Ras est situé sur le bras court du chromosome 11 et code pour une GTPase, la protéine p21. La protéine p21 est impliquée dans la croissance cellulaire en réponse à la liaison du facteur de croissance épidermique (EGF) avec son récepteur (EGFR), ou bien du facteur de croissance des fibroblastes (FGF) avec son récepteur (FGFR3)

Les mutations les plus fréquemment retrouvées se situent sur les codons 12,13 et 61 [25] et conduisent à une activation constitutive de la protéine p21. Le gène HRAS est retrouvé muté dans 10-15% des tumeurs de la vessie tous grades et tous stades confondus [10].

1.5.2.2 PIK3CA

Le gène PI3KCA, situé sur le chromosome 3 code pour une sous unité catalytique appelée p110 α d'une lipide kinase.

La protéine p110 α associée à une autre sous unité dite régulatrice forme la phosphoinositide tri-phosphate 3 kinase de type I (PI3K3 de type I). La famille des PI3K est composée de trois classes : classe I, classe II et classe III) qui diffèrent selon leur structure, leur distribution tissulaires, leur mécanisme d'activation et leur fonction [26] [27]. Les PI3K se présentent généralement sous forme d'hétérodimères constitués d'une sous-unité catalytique et d'une sous-unité régulatrice. La classe I possède toujours une sous unité catalytique appelée p110, mais qui possède 4 isoformes (α , β , γ , δ). La classe I est divisée en 2 groupes A et B [28]. La sous unité catalytique se lie à la sous unité régulatrice, et est ainsi stabilisée. Lors d'un stimulus la sous unité catalytique est libérée et peut jouer son rôle. Elle est capable de rajouter une molécule de phosphate au PIP2 (phosphoinositides di-phosphate) pour donner le PIP3 (phosphoinositides tri-phosphate). Le complexe PI3K type I est stimulé par la liaison du facteur de croissance à l'insuline à son récepteur.

Seules les enzymes de la classe IA sont impliquées dans la carcinogénèse. En effet, la sous unité catalytique p110 est retrouvée mutée dans de nombreux cancers (colon, estomac, endomètre, ovaire, thyroïde, sein, glioblastome) notamment celui de la vessie [29].

La voie PI3K est impliquée dans la croissance cellulaire, la résistance à l'apoptose, l'invasion et la migration cellulaire [30]. C'est le 1^{ier} élément rencontré dans la voie PI3K /Akt / mTOR [31].

Le gène PIK3CA possède une mutation activatrice dans 20-30% des tumeurs superficielles de la vessie de bas grade et de faible stade [10] [32]. Par opposition, ces mutations ont une prévalence très faible dans les tumeurs de vessie de haut grade et invasives. Ces mutations sont aussi retrouvées dans les néoplasmes urothéliaux papillaires à potentiel malin incertain, ce qui suggère que la mutation de PIK3CA survient précocement dans la carcinogénèse urothéliale [32].

Cette mutation PIK3CA est fortement associé à la mutation FGFR3 [32].

1.5.2.3 FGFR3

Cappellen et al ont identifié de nombreuses mutations de FGFR3 dans les tumeurs de vessie [6], qui ont pour effet la stimulation de la voie RAS-MAPK [33]. Ces mutations sont corrélées avec des faibles grades et stades de cancer de la vessie [34]. Par opposition, l'immunohistochimie de l'urothélium sain, ne révèle pas de niveau élevé de cette protéine [35]. La surexpression de FGFR3 est significativement plus importante dans les tumeurs de bas grade non invasives. Une étude sur différentes lignées a montré 80% d'expression dans les tumeurs non invasives versus 50% dans lignées issue de tumeurs invasives [35]. Les mutations de FGFR3 sont associées à des tumeurs de vessie de bon pronostic [6],[36].

1.5.3 Gènes du chromosome 9

L'altération du chromosome 9 est connue depuis longtemps et est présente dans plus de 50 % des tumeurs de la vessie [37] [38]. La délétion est l'altération qui est le souvent mise en évidence sur le chromosome 9, et la 1^{ière} recherchée en cytogénétique [10] (Schéma 7)

Le bras court de ce chromosome, possède une région contenant les gènes suppresseurs de tumeur CDKN2A codant pour p16 et p14^{ARF}, et CDKN2B codant pour p15 [39]. La protéine p16 est le régulateur négatif de la voie Rb, et p14^{ARF} est un régulateur négatif de la voie p53 [40].

La majorité des délétions implique le gène CDKN2A [10]. Les patients atteints de tumeur de la vessie sont le plus souvent délétés sur les 2 allèles du gène CDKN2A. L'homozygotie est associée à un grade et un stade élevé [41]. La perte d'expression de p16 est liée avec une augmentation du risque de rechute dans les tumeurs Ta et T1 [42]. Cependant toutes les études ne sont pas concordantes. Dans certaines études une altération de CDKN2A n'est pas associée à un stade ou un grade de tumeur en particulier [43].

Le bras long contient une succession de plusieurs gènes : PTCH, DBC1, TSC1. Cependant leur rôle dans le cancer de la vessie n'est pas encore très clair. Les mutations du gène PTCH ont des fréquences variables [44]. Des délétions homozygotes de DBC1 ont été identifiées dans de rares cas [45], mais ce gène est le plus souvent inactivé par méthylation [46]. Les mutations de TSC1 ne semblent pas être liées à un type de tumeur de vessie. [10]

Le rôle du chromosome 9 dans le développement d'un cancer de la vessie semble être lié à la capacité de perdre plusieurs gènes en même temps. Les délétions du chromosome 9 traduisant un rôle dans l'augmentation du risque de récurrences des cancers de la vessie [47].

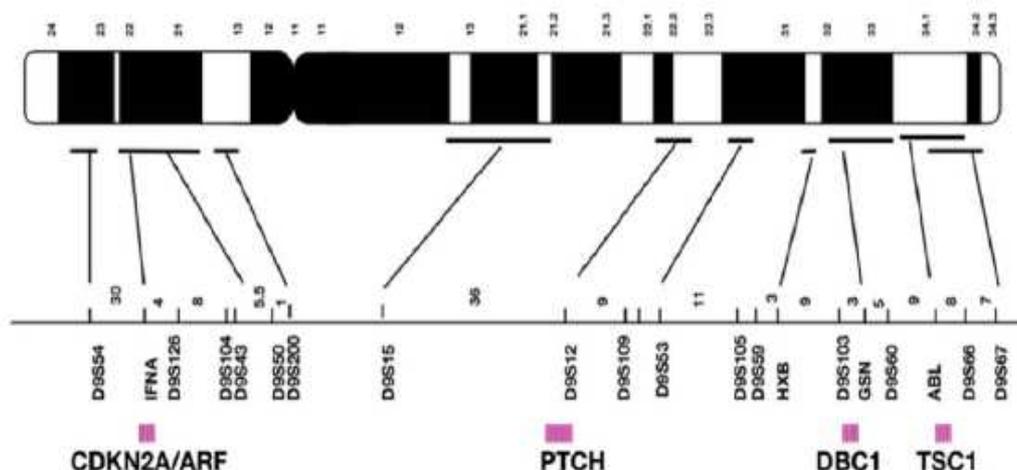


Schéma 7: Chromosome 9 et ses régions délétées [10]

2 Migration, invasion et dissémination métastatique

2.1 Physiopathologie des métastases

Les métastases ou tumeurs secondaires, sont la cause la plus fréquente des décès liés au cancer.

Après avoir subi des modifications permettant d'acquérir les capacités de prolifération et de formation d'une tumeur localisée aussi appelée carcinome *in situ*, les cellules tumorales vont subir de nouvelles modifications qui vont conduire à la dissémination métastatique. Dans les carcinomes le processus métastatique se déroule en plusieurs étapes [48] :

- la néoangiogénèse : elle correspond à l'apparition de néovaisseaux qui vont venir irriguer la tumeur et qui vont permettre d'augmenter les échanges oxygénés et nutritifs ainsi que la dissémination.
- l'invasion : les cellules épithéliales liées entre elles se désolidarisent les unes des autres, et de la basale par perte des jonctions d'ancrage. Ce phénomène conduit à l'augmentation de la mobilité, et de l'invasion.
- l'embolisation ou intravasation: les cellules tumorales passent à travers l'endothélium veineux, ou à travers les vaisseaux lymphatiques, par diapédèse pour entrer dans la circulation systémique
- l'extravasation : c'est le pendant de l'intravasation. Ce phénomène correspond au passage de l'endothélium veineux au niveau des capillaires sanguins, par les cellules tumorales, du système vasculaire vers le tissu environnant
- la multiplication : à ce niveau les cellules vont se multiplier pour former des micrométastases, qui évolueront à plus ou moins long terme en macrométastases. [49]

Toutes ces étapes sont critiques et les cellules doivent lutter contre l'apoptose et l'anoïkis (mort cellulaire initiée à la suite du détachement d'une cellule de la matrice extracellulaire). Seules 0.01% des cellules injectées dans la circulation sont capables de former des métastases [50].

Un certain nombre de gènes sont pro-migratoires comme le TGF β , ERK, les MMP, les protéines Rho. Ils utilisent des facteurs de transcription tels Snail, Slug et Twist1. Mais il existe des gènes qui inhibent cette migration cellulaire et l'apparition de métastases : les Gènes Suppresseurs de Métastases (GSM) [51] [52].

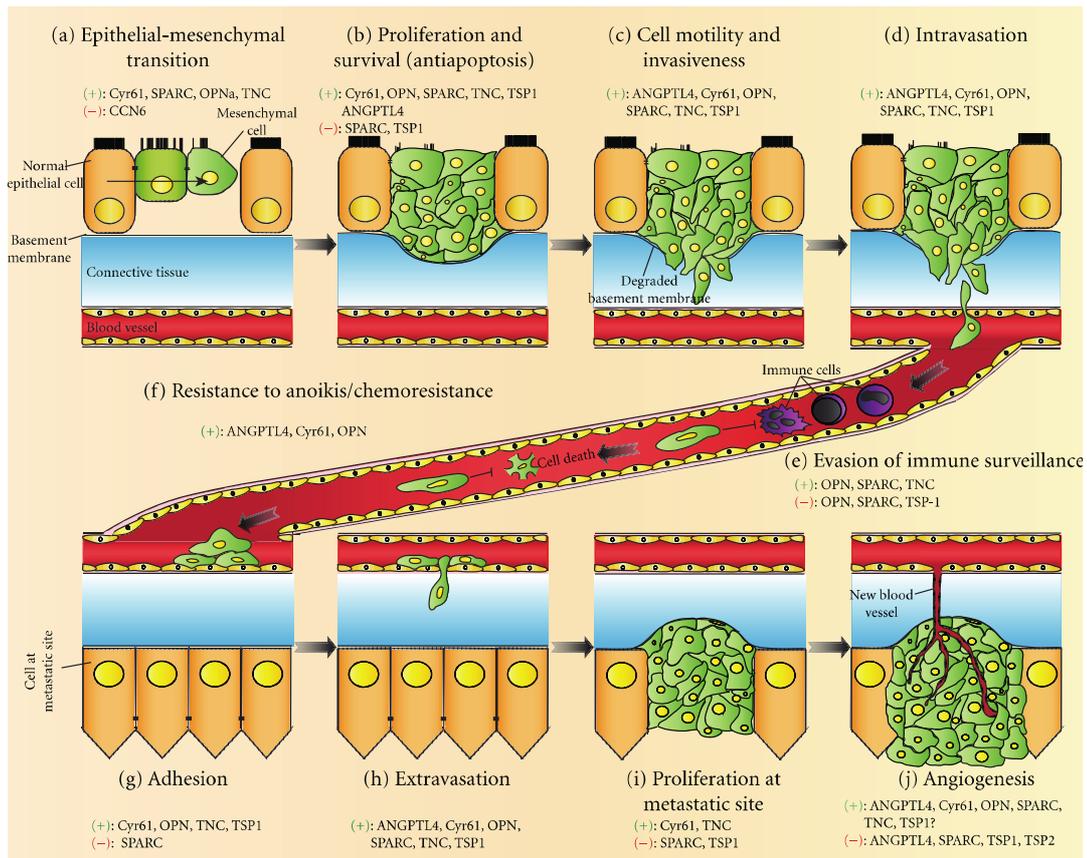


Schéma 8 : Etapes de la dissémination métastatique [53]

2.2 Transition Epithélio Mésenchymateuse EMT

L'EMT, connue depuis les années 1980, a mis énormément de temps à être acceptée en tant que modèle de la progression carcinomateuse. En effet, dans les tumeurs il existe une grande hétérogénéité cellulaire, d'où l'incapacité de distinguer les cellules issues de l'EMT des autres cellules stromales ou des fibroblastes. [54]. Cependant des équipes ont mis en évidence l'EMT sur les fronts invasifs de tumeurs humaines [55] et un état métastable a été décrit lors d'une étape de cicatrisation [56].

2.2.1 EMT physiologique

La transition épithélio mésenchymateuse (EMT) est un processus physiologique fondamental et hautement conservé intervenant lors de l'embryogénèse, qui induit la migration cellulaire [54]. Elle va permettre, lors de la formation de l'embryon, l'individualisation des cellules en deux feuilletts correspondant au deux premiers tissus embryonnaires : l'ectoblaste et le mésoderme [57]. Plus tardivement, lors du développement de l'embryon, l'EMT participe à la gastrulation et à la formation de divers organes. Une masse de cellules va perdre son ancrage par rapport aux autres cellules et au tissu conjonctif puis s'individualise. Ces cellules s'infiltrant et migrent à travers le mésoderme et l'ectoderme suivant un schéma précis pour donner le 3^{ième} feuillet embryonnaire : l'endoderme. Cet endoderme à son tour va se

transformer en somites qui sont à l'origine des crêtes neurales, du cœur, du système musculo-squelettique, mais aussi en gouttière neurale qui donnera les structures crânio-faciales et le système nerveux périphérique [58] [59]. L'EMT est donc un phénomène physiologique transitoire et réversible [57].

A partir de la naissance, dans un organisme « mature », l'EMT est quasiment inactive mais n'est pas pour autant dépourvue de rôles majeurs. L'EMT participe notamment à la reconstruction des organes lésés [60] [61]. Les inducteurs de l'EMT sont considérés comme indétectables dans les cellules saines différenciées des adultes [62]. En effet, leur expression est induite de manière aberrante, lors de conditions pathologiques telle que la fibrose [61] [63] ou lors de la transformation tumorale. [61,62]

2.2.2 L'EMT et cancérogénèse

L'EMT conduit à la perte des caractéristiques épithéliales des cellules et au gain des caractéristiques mésenchymateuses, parallèlement les cellules acquièrent aussi les propriétés des cellules souches, notamment la capacité d'autorenouvellement [64]. Des modifications moléculaires et morphologiques surviennent dans les cellules épithéliales leur permettant d'acquérir les capacités de migration et d'invasion propres aux cellules mésenchymateuses.

L'EMT, constitue donc un processus d'adaptation des cellules cancéreuses face à un milieu hostile : hypoxie, privation de nutriments, contraintes mécaniques [62]. L'EMT peut donc être au cœur de l'échappement aux divers traitements d'une tumeur : radiothérapie, chimiothérapie, ou hormonothérapie [62]. Elle contribue à l'invasion tumorale et, à travers cela, favorise la formation de tumeurs secondaires, les métastases (schéma 8) [61]

L'EMT est impliquée dans l'oncogenèse car elle permet aux cellules cancéreuses d'acquérir des caractéristiques essentielles telles que la perte et l'indépendance d'ancrage, l'acquisition de la capacité d'invasion et la capacité de migration.

Dans les carcinomes, les cellules cancéreuses se multiplient puis rompent leur ancrage aux autres cellules et à la membrane basale. Cet évènement conduit à la destruction de la monocouche cellulaire puis à l'individualisation de la tumeur. Là, les cellules acquièrent la mobilité et le phénotype fusiforme. Par la suite, les cellules mésenchymateuses invasives vont par diapédèse passer au travers de l'endothélium veineux pour disséminer dans l'organisme, coloniser le conjonctif voisin et former des métastases à distance. [65]

Le premier modèle *in vivo*, montrant l'implication de l'EMT dans la dissémination métastatique a été réalisée chez la souris, par l'équipe de Xue [66]. Il a permis de comprendre l'importance de l'EMT comme cible thérapeutique des métastases.

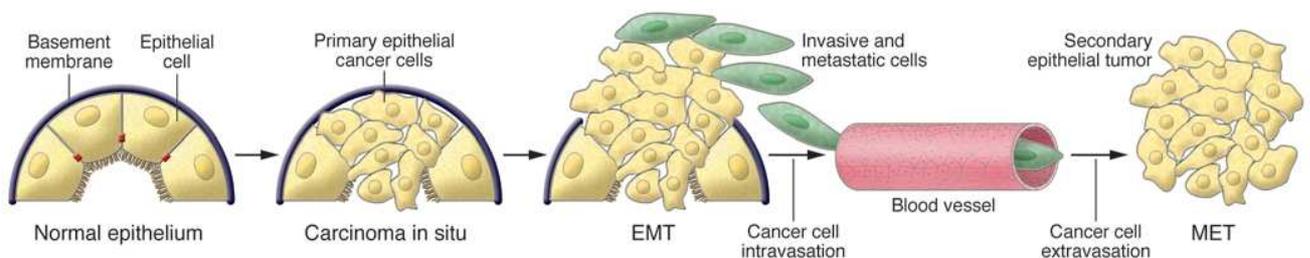


Schéma 9 : Progression d'un carcinome [61]

2.2.3 Modification du cytosquelette lors de l'EMT

Les cellules épithéliales, de morphologie cubique, polarisées, reposent sur une membrane basale. Elles forment une monocouche de cellules retenues entre elles par de nombreuses jonctions : jonctions adhérentes desmosomes, jonctions serrées (tight junctions), et gap junctions. Elles sont raccrochées à la matrice par les héli-desmosomes. Cette organisation limite les mouvements dans un espace bidimensionnel et empêche tout caractère invasif.

Lors de l'EMT, les cellules épithéliales vont perdre leur polarité apical/basal, à travers un remodelage du cytosquelette, ainsi que leur capacités d'adhésion intercellulaire pour finalement se transformer en cellules mésenchymateuses fusiformes, allongées dites en étoiles. Les cellules mésenchymateuses ainsi apparues ne possèdent pas de polarisation, pas ou peu d'ancrage intercellulaire et à la matrice et se retrouvent isolées et mobiles.

La dissolution des jonctions serrées et des desmosomes, conduit à une disparition des points d'ancrage et s'accompagne d'un remaniement du cytosquelette [57]. La protéine β -caténine cytoplasmique est retrouvée dans le noyau, les filaments intermédiaires de cytokératine disparaissent et apparition de vimentine.

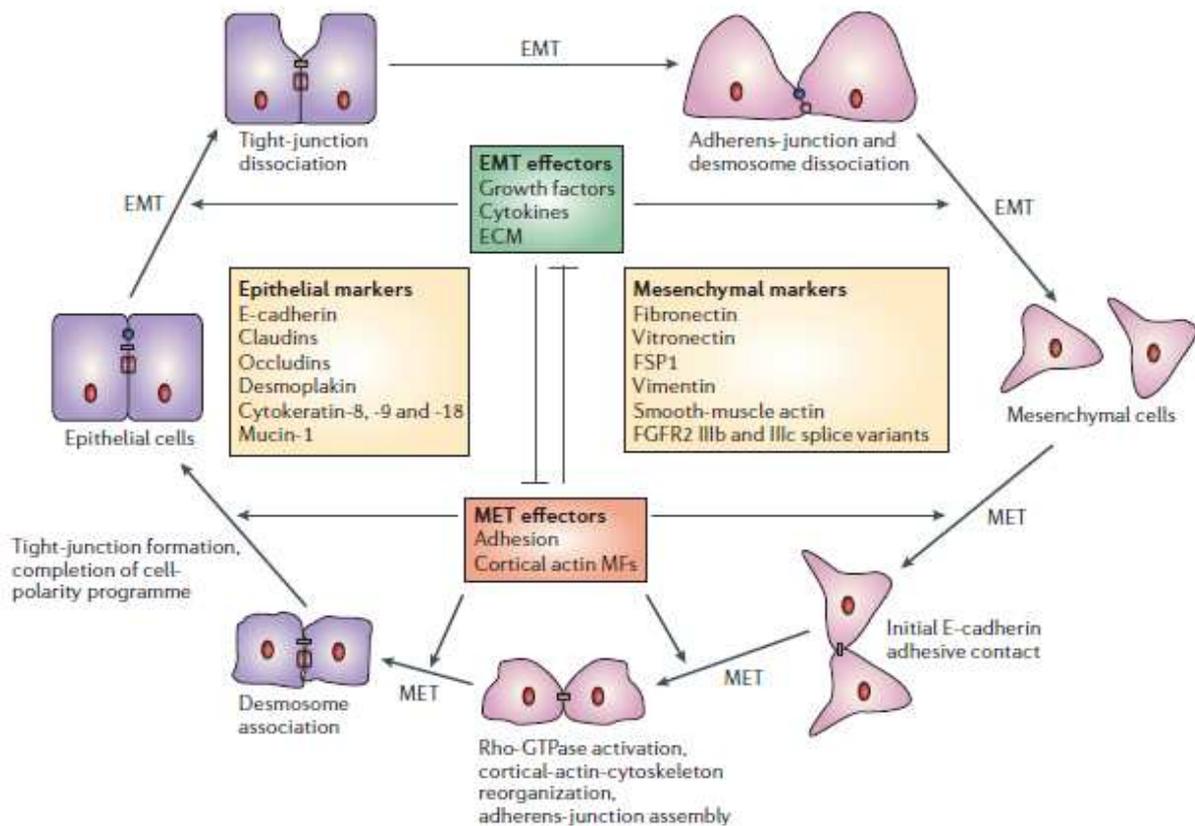


Schéma 10 : cycle des modifications de l'adhérence intercellulaire [57].

2.2.4 Modifications moléculaires lors de l'EMT

L'ancrage intercellulaire et à la matrice est régulé par les cadhérines qui sont des glycoprotéines transmembranaires présentes à la surface de la cellule, aussi appelées CDH. Elles sont sous la dépendance des ions calcium (Ca^{2+}), d'où leur nom cadhérine. Il existe plusieurs types de cadhérines, exprimées différemment suivant les tissus. Les plus importantes sont la P-Cadhérine qui est retrouvée dans le placenta, la VE-Cadhérine dans les cellules endothéliales, la E-cadhérine dans les cellules épithéliales et la N-Cadhérine dans le tissu nerveux et les cellules mésenchymateuses.

Seules deux cadhérines interviennent dans l'EMT la E-cadhérine et la N-cadhérine.

L'EMT est caractérisée par la perte d'expression de marqueurs épithéliaux tels que la E-cadhérine [67] les α et γ -caténines [57], et par l'apparition de marqueurs mésenchymateux tels que la N-cadhérine, la vimentine, et la fibronectine.

Lors de la transition épithélio-mésenchymateuse, l'expression de la E-Cadhérine est diminuée au profit de la N-Cadhérine [68] [69]. Ce phénomène est observé dans de nombreux cancers : bronchiques [70], pancréatiques [71], du rein [72] ou de la sphère ORL [73].

Ce switch entre la E-cadhérine et la N-cadhérine, permet donc au cellules d'acquérir un caractère invasif [74], et est relié à un mauvais pronostic [75] et une progression tumorale [76].

La perte ou la réduction de la E-cadhérine est responsable de l'augmentation de la mobilité cellulaire [77] et de l'invasivité des cellules cancéreuses [78].

La perte de l'expression de la E-cadhérine est directement reliée in vitro à la perte du phénotype épithélial [79].

En effet la réexpression de la E-cadhérine, par expression ectopique dans les cellules ne l'exprimant pas, conduit à une modification de phénotype. Les cellules perdent leur capacité de migration et redeviennent de morphologie et de phénotype épithéliale [79].

Ces cellules acquièrent donc les marqueurs mésenchymateux, tout en perdant les marqueurs épithéliaux et deviennent de phénotype mésenchymateux invasif [65]. La suppression de l'expression de la E-cadhérine est une étape clé dans l'EMT, et suffit à elle seule à induire l'EMT [80]. Cette suppression caractérise les cancers d'origine épithéliale [65].

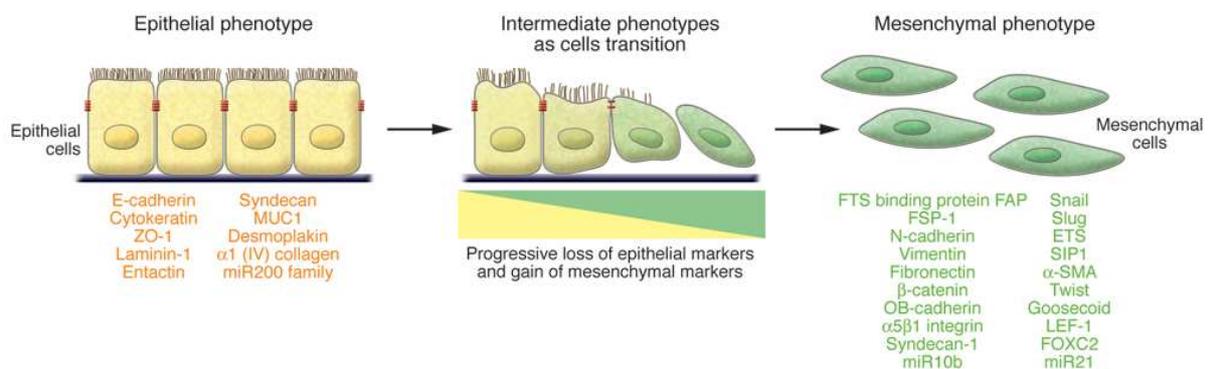


Figure 11 : Expression des différents marqueurs lors de l'EMT [61].

L'EMT est également impliquée dans la résistance aux traitements de chimiothérapies dans de nombreuses localisations : ovaires [81], ORL [82], sein [83], foie [84], pancréas [85], colorectal [86].

2.2.5 Modification de la matrice extra-cellulaire

La matrice extra cellulaire est composée de protéines de soutien telles que le glycogène, la fibronectine, la laminine, le collagène, l'élastine, des protéoglycanes, ainsi que d'autres protéines sécrétées soit par les tumeurs soit par les cellules environnant la tumeur (fibroblastes, macrophages, cellules endothéliales) [87]. Ces protéines exercent un rôle modulateur sur l'adhérence inter cellulaire et entre la cellule et la matrice, donc sur l'EMT, mais aussi un rôle sur la croissance de la tumeur, la prolifération de la tumeur, l'angiogénèse et la croissance [87,88].

Les principales protéines impliquées dans l'adhérence entre la cellule et la matrice extracellulaire sont : ANGPTL4, Cyr61, OPN, SPARC, TNC et TSP1. Les 5 premières protéines sont surexprimées dans les tumeurs ce qui favorise la formation des métastases en augmentant l'expression de marqueurs mésenchymateux et en dérégulant l'expression de la E-cadhérine. [88] La dernière protéine TSP1 a elle un rôle inhibiteur dans la formation des métastases.

D'autre part, il existe dans la matrice extracellulaire de nombreuses enzymes, matrice métalloprotéinases (MMP), cystéines catépsines et sérines protéases qui clivent l'interaction cellule cellules ou cellule matrice, en s'attaquant à la E-cadhérine. Ces interactions sont donc perdues et la mobilité cellulaire se trouve augmentée. De plus les protéases vont dégrader la matrice extracellulaire, ce qui facilite la traversée de la lame basale et l'invasion du tissu avoisinant [89].

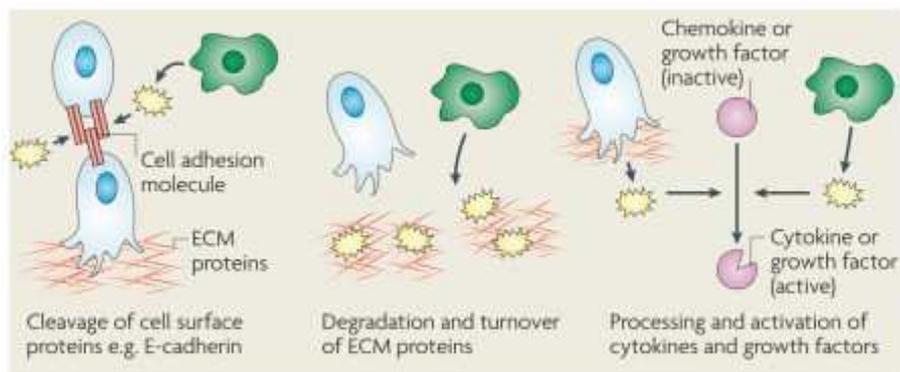


Schéma 12: Dégradation de la matrice extracellulaire [89].

2.3 MET

Le phénomène inverse de l'EMT est appelé MET (transition mésenchymo-épithéliale), permet aux cellules mésenchymateuses d'acquérir un phénotype épithéliale, retrouvant ainsi les mêmes caractéristiques que les cellules souches dont elles sont issues. De morphologie fusiforme, elles acquérir une morphologie cubique et former un épithélium bien différencié. Cet événement est caractérisé par l'apparition d'un marqueur épithéliale, la E-cadhérine. De la même façon que pour l'EMT, ce mécanisme est un processus physiologique embryonnaire qui participe à la formation des somites [90] et entre autre à la néphrogénèse [91] à l'hépatogénèse [92]. Mais ce mécanisme est également impliqué dans des processus pathologiques lors de la formation des métastases. Elle peut expliquer en partie la découverte de métastases de même phénotype épithéliale que les tumeurs primitives [93]. Une fois que les cellules mésenchymateuses arrivent à l'organe à coloniser, elles traversent par diapédèse le vaisseau sanguin. Puis elles se transforment en cellules épithéliales et prolifèrent.

2.4 Voies de régulation de l'EMT

De nombreuses voies ont été décrites, lors de l'embryogénèse, comme favorisant la formation de cellules mésenchymateuses et donc l'EMT. La majorité de ces voies sont réactivées lors de deux processus de l'oncogénèse : l'invasion tumorale et la formation des métastases [94]. Les voies de signalisation contrôlant l'EMT convergent vers le contrôle de la protéine E-cadhérine [57]. Les facteurs de transcriptions régulant négativement l'expression de la E-cadhérine sont donc favorables à l'EMT.

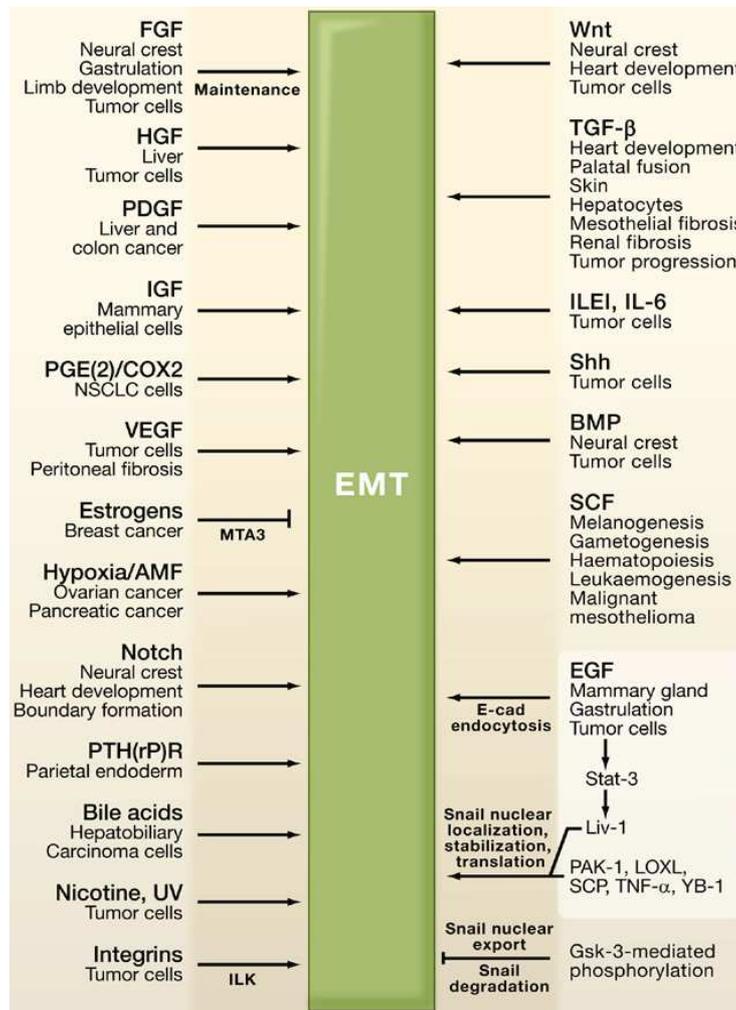


Schéma 13: Les principales voies régulant l'EMT [54]

2.4.1 Oncogènes Rb et p53

Altération des voies de signalisation impliquant RB et P53 (suppresseur de tumeur), induit l'EMT. Ces gènes sont donc des gènes suppresseurs d'EMT.

Cependant la simple suppression de la protéine p53, n'est pas suffisante pour induire une EMT complète, le changement morphologique n'est pas significatif [95]. D'où la complexité de la régulation.

2.4.2 E-cadhérine

Comme nous l'avons vu, l'expression de la E-cadhérine est caractérisée au niveau des cellules épithéliales, et est impliqué l'ancrage intercellulaire. C'est une protéine membranaire, calcium dépendante, participant à la formation des jonctions adhérentes entre cellules épithéliales.

Sa partie extra-cellulaire s'associe avec les E-cadhérine des cellules voisines, pour former des homodimères. Ces liaisons aboutissent à la formation de jonction adhérente, appelée desmosome permettant de maintenir une cohésion intercellulaire. Elle est aussi garante de l'adhérence des cellules avec la basale via la formation de l'hémi-desmosome [96] [97].

Sa partie intra-cellulaire est liée aux caténines (α et β) qui la relie au cytosquelette d'actine. Sa liaison avec le cytosquelette est responsable de nombreux effets sur la signalisation cellulaire. La E-cadhérine, par l'intermédiaire de la β -caténine régule l'expression de gènes critiques intervenant dans la mort cellulaire, la prolifération [65], et dans la résistance aux chimiothérapies [65,98].

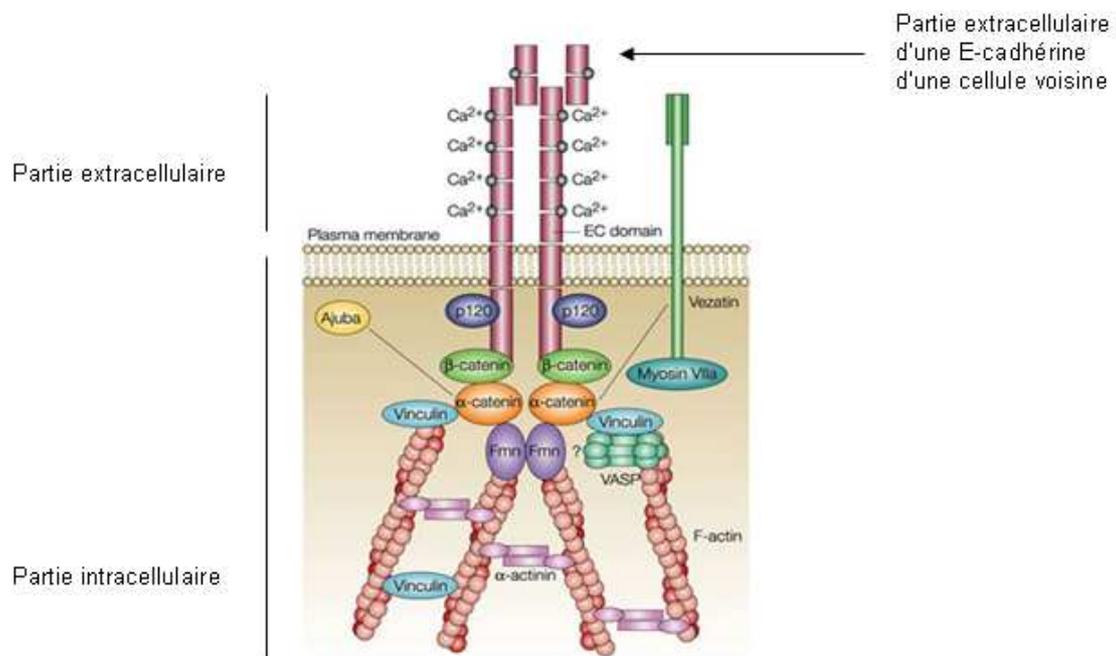


Schéma 14 : Interaction de la E-cadhérine avec le cytosquelette via la β -caténine et l' α -caténine.

Lorsqu'elle n'est pas liée au cytosquelette, la E-cadhérine est une protéine labile en permanence endocytée et recyclée [99].

La perte d'expression de la E-cadhérine est considérée comme un point crucial dans la progression des carcinomes invasifs [78]. Son expression ectopique dans des cellules de carcinome invasif inhibe la capacité d'invasion et la formation des métastases [78]. De plus, dans de nombreuses tumeurs humaines son expression est dérégulée voir perdue [100]. L'expression de la E-cadhérine a donc un rôle protecteur vis-à-vis de l'apparition du phénomène d'EMT.

2.4.3 Régulation transcriptionnelle

Les répresseurs de la E-cadhérine fonctionnent comme des inducteurs de l'EMT. La simple inhibition de l'expression de la E-cadhérine suffit à induire l'EMT. [54]

Les principaux répresseurs connus se divisent en 2 grands groupes suivant leur mode d'action. D'une part, il y a 2 membres de la famille des Snail, Snail (Snail1) et Slug (Snail2) [101], les protéines Zeb1 (connue sous le nom de δ EF1 ou de TCF8) et Zeb2 (SIP1 ou Zfhx1b) [102] [103], et les protéines de la famille des bHLH : E12/E47 (TCF3) [104], qui se fixent au niveau de la séquence consensus E-box du promoteur (5'-CANNTG-3') pour le réprimer et inhiber la synthèse de E-cadhérine [80]. De l'autre il y a les facteurs Twist1 [105], Goosecoid, E2.2 et FoxC2 qui inhibe la transcription de la E-cadhérine par un processus indirect. [100] [106]

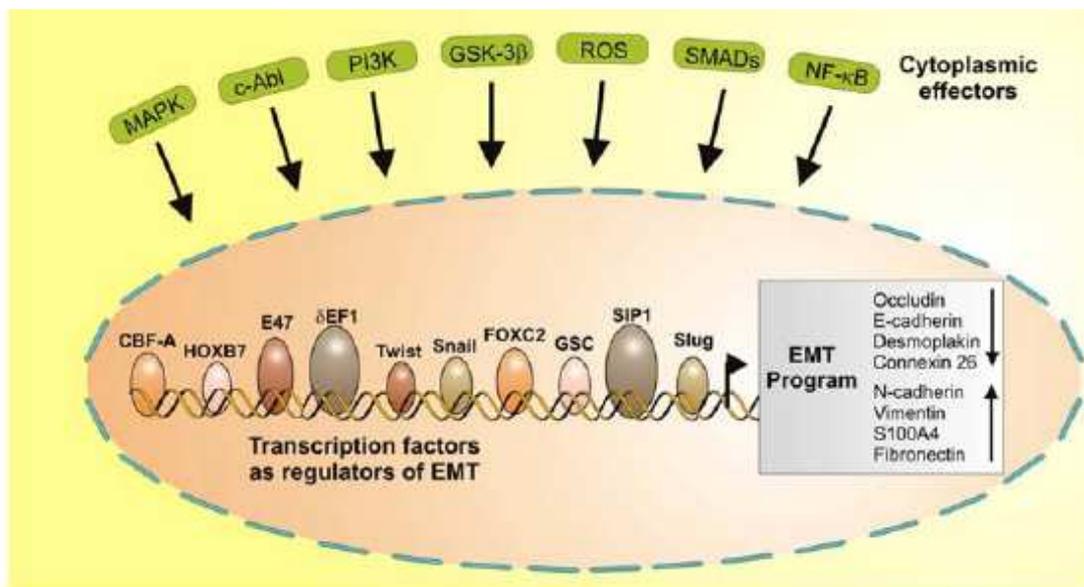


Schéma 15 : Les différentes voies régulant l'EMT lors de l'embryogénèse [94].

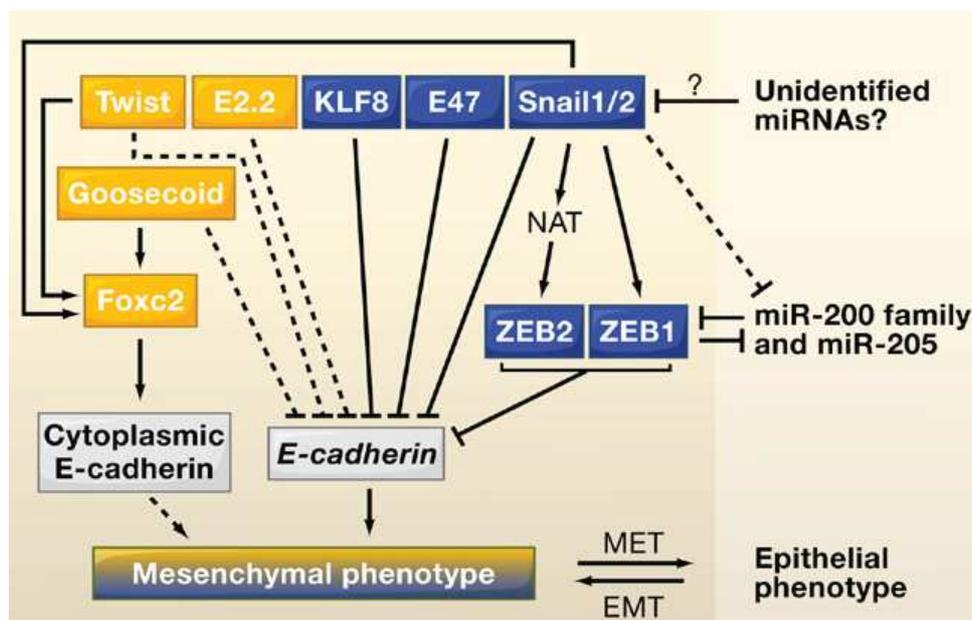


Schéma 16 : Principaux répresseurs de la E-cadhérine [54]

L'expression de la E-cadhérine est aussi régulée négativement par des récepteurs et des tyrosines kinases non récepteur telles que Met et Scr. Ils sont capables de phosphoryler la queue cytoplasmique de la E-cadhérine qui est alors apte à se lier à une Hakai E3-ligase. [107] Le complexe ainsi formé est internalisé dans des endosomes puis recyclé à la surface des cellules ou dégradé dans les endosomes [107,108].

2.4.3.1 Voie TGF- β

La famille des TGF- β (transforming growth factors bêta) regroupe plusieurs membres de ligands ayant la particularité de se lier à des récepteurs sérine/thréonine kinases.

Cette voie est une des premières voies impliquées dans l'EMT que ce soit lors de la formation du mésoderme [109], lors de la formation de la valve cardiaque [110], ou de la progression tumorale [100].

Le récepteur au TGF- β est localisé au niveau des jonctions serrées des cellules épithéliales et interagit directement avec l'occludine [111,112] et Par6 [111]. La phosphorylation de Par6 par le récepteur au TGF- β , mène à la perte des jonctions serrées et à la perte de la polarité cellulaire, qui sont des éléments clés de l'EMT [111]

La voie TGF- β est aussi capable d'induire la formation des facteurs de transcription Snail, Slug et Zeb2 supprimant l'expression de la E-cadhérine, aboutissant à la perte de l'adhésion cellulaire. [80]

Cependant la voie TGF- β interagit avec d'autres voies telles que Wnt, Notch, NF- κ B et les signaux générés par les récepteurs à activité tyrosine kinase [100].

2.4.3.2 Voie Wnt

La voie Wnt regroupe plusieurs protéines ayant la particularité d'être palmitoylées. Cette voie canonique est impliquée dans la formation du mésoderme et des crêtes neurales via la stimulation de l'EMT dans l'embryogénèse [113].

L'activation de la voie Wnt résulte en la stabilisation de la β -caténine cytosolique, qui ne peut donc plus être dégradée par le protéasome [114]. La β -caténine est transloquée au noyau où elle s'accumule. Là, elle s'associe au TCF (facteur des cellules T) pour former un facteur de transcription, qui régule l'expression de gènes impliqués notamment dans la polarisation de la cellule, et la prolifération [115].

La voie Wnt agit aussi en activant le facteur de transcription Snail [116] [117], qui va réprimer le gène de la E-cadhérine. Cette perte d'expression de la protéine E-cadhérine, est associée à la désorganisation des jonctions serrées et la libération de la β -caténine, qui stimule la voie Wnt de manière indirecte [117]; il existe donc un rétrocontrôle positif de la voie Wnt par Snail lors de l'EMT [117].

De plus l'induction de la β -caténine est connue pour induire l'expression de 2 autres facteurs de transcription pro-EMT que sont Twist1 [118] et Slug [119].

2.4.3.3 Voie Notch

Cette voie est connue pour moduler négativement l'EMT lors de l'embryogénèse [120]. Cette voie est activée par le TGF- β et le Wnt de manière inconstante lors de toute l'embryogénèse.

La voie Notch est donc insuffisante à elle seule pour induire l'EMT, elle a besoin d'être associée à d'autres voies [100].

2.4.3.4 Voies de signalisations dérivant des signaux des récepteurs à tyrosine kinase

De nombreux récepteurs à activité tyrosine kinase (différents de la voie TGF- β) incluant Met, FGF (facteur de croissance des fibroblastes), IGF (facteur de croissance de l'insuline), EGF (facteur de croissance de l'épithélium), VEGF (facteur de croissance vasculaire), jouent un rôle important durant le remodelage embryonnaire, en contrôlant l'expression de la E-cadhérine [121].

La stimulation par FGF1, EGF ou HGF (facteur de croissance des hépatocytes) induit un phénotype cellulaire en étoile causée par la délocalisation de la E-cadhérine des jonctions adhérentes, suggérant que le récepteur à tyrosine kinase peut induire une dérégulation négative de la E-cadhérine, et ainsi favoriser l'EMT [122].

La liaison du PDGF (facteur de croissance des plaquettes) à son récepteur a été mise en évidence lors de l'acquisition d'un phénotype complet d'EMT induite par TGF- β . [123]

Dans les lignées de cancer pancréatique, le traitement par les facteurs de croissances endothéliaux (VEGF α et β) et leur liaison au récepteur VEGFR-1 induit un changement morphologique et phénotypique des cellules en faveur d'une EMT [124]. Les marqueurs moléculaires caractéristiques des cellules épithéliales changent de localisation dans les premières heures: la E-cadhérine membranaire devient cytoplasmique, puis disparaît 48h après le traitement [124]. Parallèlement, l'expression des facteurs de transcription Twist1, Snail, and Slug augmentent rapidement. L'utilisation d'anticorps inhibant le récepteur au VEGF, et donc son activation, diminue l'expression nucléaire de Twist1 [124]. Le VEGF-R 1 est donc capable d'activer l'EMT *via* l'activation de l'expression de Twist1, dans des lignes humaines de carcinome du pancréas.

2.4.3.5 Voie TGF β -NF- κ B

Le TGF β (transforming growth factor-béta) induit l'EMT dans des cellules épithéliales transformées par H-Ras. L'inhibition de NF- κ B reverse l'activité induite par TGF β , et inhibe le potentiel métastatique de ces cellules *in vivo* [125].

Le complexe NF- κ B/Rel est formé de plusieurs protéines appartenant à la famille des oncoprotéines Rel. Les membres les plus connus sont Rel A(p50), RelB, Rel (c-Rel), NF- κ B1 (p50/105), et NF- κ B2 (p52/100). L'association la plus fréquente est RelA/p50. La stimulation de cet hétérodimère, par différentes voies : agents cytotoxiques, chimiothérapies, irradiation, stimulation du TNF- α , induit sa translocation nucléaire et aboutit à la transcription de gènes intervenant dans l'inflammation, l'immunité et la survie cellulaire [126].

Sous l'effet d'un stimulus NF- κ B va phosphoryler la kinase IKK qui à son tour va phosphoryler IKKB (protéine inhibitrice de NF- κ B) sur les sérines 32 et 36 [127]. IKKB phosphorylée va subir une ubiquitination et être dégradée par le protéasome. NF- κ B, ainsi libre, transloque dans le noyau où il pourra jouer son rôle de facteur de transcription.[128]

L'activation de NF- κ B dans de nombreux modèles de cancers est produite par l'inactivation du gène VHL (Von Hippel Lindau) [129] [130,131] ou la stimulation par le TNF- α [132]. Cette activation conduit à la modification du profil d'expression protéique des cellules. La E-cadhérine disparaît et la N-cadhérine apparaît. NF- κ B induit donc l'EMT [133]. Le switch des cadhérines est rapide et apparaît dès la 4^{ème} heure de traitement par IKKB [133]. Ces modifications sont associées avec une augmentation de l'expression des facteurs de transcription de l'EMT: Slug, et Twist1. D'autre part l'inhibition de NF- κ B entraîne une inhibition de Twist1 [134]. Twist1 est donc une cible de NF- κ B. L'activation de NF- κ B se réalise dans les cellules VHL négatives ou inactivées et de manière dépendante de l'hypoxie *via* le facteur HIF [130,135].

Le TNF- α active l'expression de Twist1 *via* la voie de NF- κ B [132].

Cependant l'expression ectopique de Twist1 diminue l'expression des cytokines induites par NF- κ B, alors que NF- κ B est pro-inflammatoire. D'un point de vue moléculaire Twist1 inhibe l'activité des promoteurs des cytokines en se liant directement sous forme d'homo ou d'hétérodimères au niveau des séquences E-box [132]. Twist1 exerce un rétrocontrôle négatif sur la voie NF- κ B [132]. Il se lie directement à RelA puis inhibe l'activité de NF- κ B [132].

L'activation de Twist1 par NF- κ B est aussi retrouvée dans la voie d'activation des lymphocytes Th1- et dans la réponse inflammatoire associée où l'expression de Twist1 limite l'expression de cytokines, de l'IL-2 et du TNF- α [136].

La voie de TGF β induit les répresseurs de la E-cadhérine que sont Snail1 et Snail 2 (appelés SNAI1 et SNAI2 chez l'homme). [54] [137]

2.4.3.6 Voie de l'hypoxie médiée par HIF

L'hypoxie intratumorale est la conséquence du développement rapide des cellules tumorales. Cette hypoxie est responsable de la résistance à la radiothérapie et à certains traitements. En réponse à cette hypoxie les cellules activent le facteur de transcription de l'hypoxie : HIF-1. En l'absence d'oxygène, il stimule des gènes responsables des fonctions cellulaires importantes en cancérologie que sont l'angiogénèse, l'invasion et l'EMT [138] *via* l'activation de Snail [139] et Twist1 [140].

Le facteur de transcription HIF-1 est un hétérodimère composé d'une sous-unité α codée par le chromosome 14 et une β codée par le chromosome 1.

En condition d'oxygénation normale, le gène Von Hippel-Lindau active la ligase E3 responsable de la destruction permanente de la sous-unité α du complexe HIF [141]. Le complexe HIF est donc inactif.

En condition hypoxique, ou lorsque le gène VHL est muté, la sous unité HIF alpha est stable et peut se complexer avec la sous-unité β [141]. Cette stabilisation, conduit à l'activation de HIF, qui induit alors l'inhibition de la E-cadhérine [138] et l'acquisition du caractère mésenchymateux [138]. Il a été montré, dans les tumeurs de l'ovaire [142], une corrélation entre l'expression de HIF et l'inhibition de l'expression de la E-cadhérine, et donc la favorisation de l'EMT.

De plus, l'inactivation de HIF, par utilisation d'une histone acétylase est suffisante pour reverser l'EMT induite par l'hypoxie [143]. Il a été montré dans des tumeurs du rein et du foie

[138] que les mutations du gène VHL étaient liées à des inactivations de la E-cadhérine. Cette inactivation explique en partie la différence d'expression au sein d'une même tumeur de la E-cadhérine suivant les zones hypoxiques ou non.

3 Twist1

3.1 Le gène *Twist1*

Le gène *Twist1* a été mis en évidence chez la drosophile où il joue un rôle dans la formation des ailes. Ses mutations provoquent des malformations au niveau des ailes, qui subissent des torsions, d'où le terme anglais « Twist » [144]. Le gène est situé chez l'homme sur la petite branche du chromosome 7 sur le locus 21.2 (7p21.2). Il possède 2 exons et un seul intron de 536 pb. (GenBank Accession No.NM_000474) (Howard 1997)

Des mutations peuvent conduire à une maladie génétique autosomale dominante. Le statut homozygote est létal. Le statut hétérozygote conduit au syndrome de Saethre-Chotzen qui appartient à la famille des craniosténoses [145,146]. Elle associe une déformation du visage avec une asymétrie faciale, une implantation basse des cheveux sur le front, des anomalies des oreilles et une syndactylie. Le développement intellectuel peut être normal, mais un retard moyen à modéré est souvent associé [145].

3.2 La protéine *Twist1*

Le gène *Twist1* code pour une protéine de 202 acides aminés [146], qui appartient à la famille des protéines basiques hélice-boucle-hélice et à celle des protéines en doigt de zinc. La protéine *Twist1* est constituée d'une partie hélice-boucle-hélice basique (bHLH) et d'un motif tryptophane-arginine dipeptide (WR), partie très conservée au cours du développement, située dans la région terminale COOH [147].

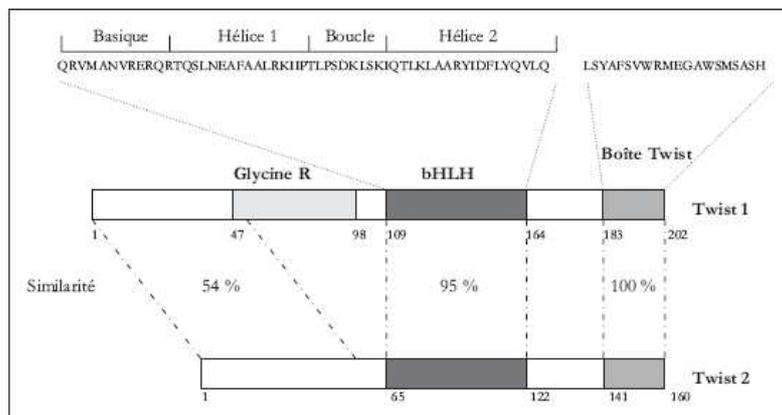


Schéma 17 : structure du gène *Twist1*

La structure tertiaire de cette protéine est composée de 2 hélices alpha espacées par une boucle plus ou moins grande, nécessaires à la dimérisation de la protéine. La juxtaposition des hélices α lors de la dimérisation permet de créer un site de liaison à l'ADN, nécessaire à l'activité transcriptionnelle.

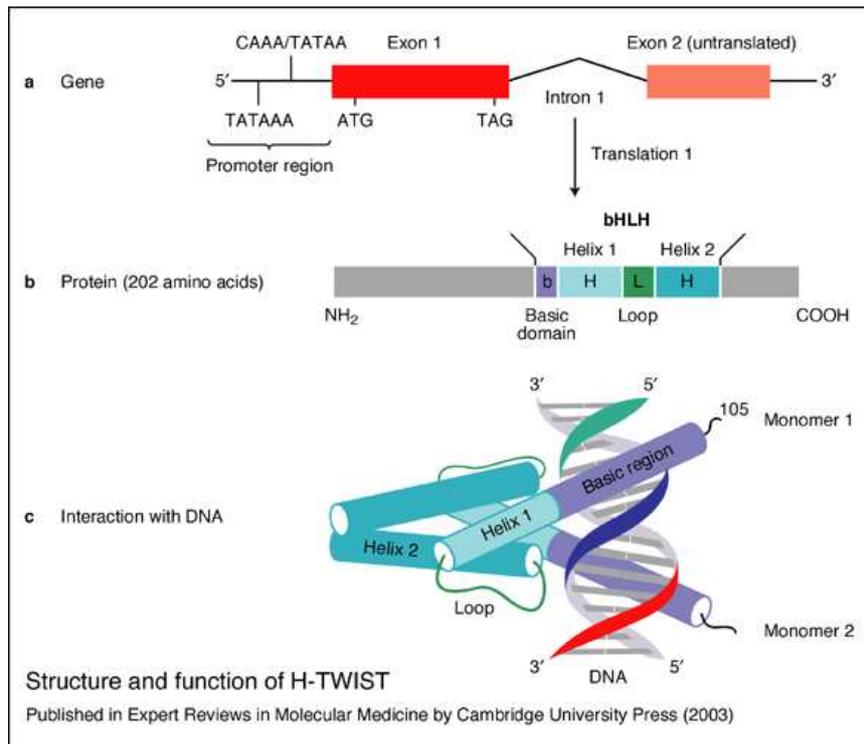


Schéma 18 : Structure du gène TWIST1, et de la protéine Twist1 (bonaventure 2003)

La protéine Twist1 possède la capacité de former des homodimères [148] ou des hétérodimères avec E12, Hand1, Hand2, [149] ce qui lui permet de jouer son rôle de facteur de transcription en se fixant sur la région consensus E-box (CANNTG) du promoteur [150]. La partie acide précédant la première hélice est nécessaire pour se fixer à l'ADN

Les modifications post-traductionnelles réalisées sur la protéine Twist1 sont des phosphorylations.

La protéine Twist1 est phosphorylée par la protéine kinase B (PKB/AKT) sur la Ser42 en N-terminal [151]. Cette phosphorylation conférait aux cellules une protection contre l'apoptose. Cependant la phosphorylation de Twist1 sur la Ser42 n'interviendrait pas dans le signal d'adressage nucléaire de la protéine [152,153].

Twist1 phosphorylé sur la Ser42 a été retrouvé *in vivo* dans de nombreux cancers. Cette phosphorylation est retrouvée très fréquemment dans les cancers du colon, rectum, et du sein, un peu moins dans les cancers du poumon et de la prostate, mais toujours de façon significative [151]. Par opposition cette phosphorylation de la Ser42, n'a jamais été retrouvée dans le tissu sain.

D'autre part, les motifs Thréonine121/Sérine123 et Thréonine 112/Sérine124 ont été retrouvés comme substrat de la protéine kinase A chez l'homme [151,154]. Ces phosphorylations seraient nécessaires à la dimérisation de Twist1, ainsi qu'à son activité et donc son implication dans la neurogénèse et la formation des doigts ainsi que dans le processus de cancérogénèse. Une altération de la phosphorylation peut perturber la dimérisation de Twist1, et donc son activité de facteur de transcription. Une mutation sur la Ser123 empêchant sa phosphorylation est suffisante pour induire un syndrome de Saethre-Chotzen [149].

Il a également été montré une phosphorylation de la Ser68 qui permet de stabiliser la protéine Twist1 et de qui la protège de la dégradation médiée par l'ubiquitination [155]. Cette phosphorylation contribue ainsi à l'invasivité du cancer du sein [155].

Seule la protéine phosphatase 2 (PP2A) appartenant aux groupes des gènes suppresseurs de tumeur [156] est connue pour déphosphoryler Twist1.

3.3 Rôle physiologique dans le développement embryonnaire

La protéine Twist1 est un facteur de transcription qui joue un rôle crucial lors de l'embryogénèse et de la formation du mésoderme [157] [158], [145,159] plus particulièrement lors de la myogénèse [160], la neurulation, la cardiogénèse, l'hématopoïèse [161], et l'ostéogénèse [162] [163] [145]. Twist1 contrôle directement la différenciation des lignées mésenchymateuses en chondrocytes, adipocytes, et ostéocytes.

.Il joue son rôle lors de l'embryogénèse principalement en temps que modulateur de l'EMT

Après la naissance, Twist1 est retrouvé exprimé au niveau des cellules souches mésenchymateuses et dans les cellules ostéoblastiques médullaires [164].

Twist intervient aussi au travers de la régulation de l'EMT physiologique dans la fibrogénèse et la réparation des organes lésés. Mais il intervient aussi au niveau de l'EMT pathologique et son expression est liée à la pathologie cancéreuse.

3.4 Twist et cancer

La protéine Twist1 est surexprimée dans les cancers gastriques [165] [166] dans les rhabdomyosarcomes [167] dans les hépatocarcinomes [168], dans les neuroblastomes [169], les carcinomes nasopharyngés (Song 2006), les tumeurs du sein [170-172] les mélanomes [173], les cancers de la prostate [174], et les gliomes [175]. Parallèlement son expression dans les tissus sains de ces cancers reste faible voir inexistant [172,176].

De plus, l'expression de Twist1 est corrélée avec le stade avancé, ou un mauvais pronostic et un risque accru de métastases dans le cancer de la vessie [176,177] du sein [172], de la prostate [174] de l'ovaire [178], endomètre [178,179], ORL [180] et bien d'autres [174,175,181] [182].

Dans l'ostéosarcome, la surexpression de Twist1 est un facteur de mauvaise réponse à la chimiothérapie [183].

Plus particulièrement dans les carcinomes de la vessie, une corrélation a pu être établie entre Twist1 et les paramètres clinico pathologiques grâce à des techniques de q-PCR, de western blot sur des lignées cellulaires, de TMA et d'immunohistochimie sur des biopsies de tumeurs primaires secondaires ou des tissus sains [176]. L'expression de la protéine Twist1 dans ce type de cancer est plus élevée que dans les cellules saines. Dans le TMA de vessie la protéine Twist1 est même indétectable dans les tissus sains [177]. Une expérience de RT-PCR conclut que l'expression de Twist1 dans les tumeurs est liée à une activité transcriptionnelle augmentée du gène TWIST1.

Le taux de Twist1 augmente avec le stade, le grade et la progression des carcinomes et ce de manière significative statistiquement [176]. Twist1 est peu présent dans les bas grades superficiels T1G1-G2, mais l'est beaucoup plus dans les hauts grades superficiels T1G3. L'expression de Twist1 dans ces stades précoces du cancer de la vessie peut être potentiellement un indicateur de la progression et de l'évolution vers un stade avancé [177].

De plus le taux de Twist1 est nettement plus élevé dans les métastases que dans les tumeurs primaires [177]. Ces résultats sont donc en faveur d'un engagement de Twist1 dans la progression du cancer de la vessie, notamment dans la formation de métastases. Twist1 semble donc être un éventuel marqueur de progression et d'agressivité pour le cancer de la vessie.

3.5 potentiel oncogénique de Twist1

Au vue de toutes les fonctions de Twist1 : anti-apoptotique, , inhibition de p53, inhibiteur de la sénescence [40], inducteur de la croissance en l'absence d'ancrage, Twist 1 est considéré comme un oncogène [167].

3.5.1 Twist est un régulateur de l'apoptose et de la sénescence

Twist1 est un inhibiteur de p53, au travers de nombreuses voies différentes.

Twist1 interfère avec les gènes cibles induits par l'activation de p53, p21, Mdm2 et Bax, [184]. L'inactivation du gène Twist1, conduit à la surexpression de la protéine p14ARF, et à la diminution des niveaux d'expression de MDM2, p53 et p21 [185]. Twist1 favorise la liaison de MDM2 avec p53, et donc l'inhibition de p53. La surexpression de Twist1 inhibe aussi p53 par l'intermédiaire d'ARF (p14ARF), en régulant négativement l'expression de ses ARNm [167]. Twist1 induit donc la sénescence via p14ARF, et la voie p53/p21 et favorise la prolifération cellulaire incontrôlée des cellules cancéreuses, et donc la progression tumorale [185].

Twist1 est aussi capable d'inhiber HOXA5, connu pour être un activateur de p53 [170]. Il inhibe aussi la transcription de p53 [185], en se liant à son coactivateur, une histone acétyltransférase, CBP/p300, [186,187].

Twist1 joue le rôle de facteur de transcription d'AKT2, en se fixant sur son promoteur [188-190], ce qui lui permet ainsi de bloquer l'apoptose.

De plus Twist1 agit négativement sur la sénescence induite par H-Ras via l'inhibition des voies régulation p53 et Rb. Twist1 est corrélé inversement avec p16 qui est un gène intervenant dans la sénescence via la voie Rb, dans le mélanome. Twist1 régule négativement p16 et p21 sans affecter le niveau d'ARF, dans la sénescence [40].

Dans les neuroblastomes, l'oncogène N-myc est fréquemment amplifié alors que les mutations de p53 sont rares, ce qui devrait conduire à une activation de l'apoptose et à une croissance tumorale. Parallèlement, grâce à l'utilisation de microarrays, la protéine Twist1 est retrouvée surexprimée dans ces mêmes cancers, cette surexpression est corrélée à la surexpression de N-myc. En utilisant des siRNA anti-Twist1, l'apoptose a été restaurée dans les lignées de neuroblastomes. Twist1 est donc un inhibiteur de la voie apoptotique. Twist1 protège donc l'action de N-myc, et inhibe la réponse apoptotique induite par la surexpression de N-myc, en inhibant la voie ARF/p53 [169].

Dans des fibroblastes embryonnaires murins (MEF), la transfection de Twist1, protège de l'apoptose par la déprivation en sérum induite ou par la voie c-Myc dépendant de p53 [167,191]. Parallèlement l'expression de Twist1 réduit le niveau de caspase 3 activée (Cystéine protéase protéine 32KDa :CCP32). Dans des lignées MEF p53 positives, les cellules transfectées par Twist1 continuent à proliférer et à former des colonies en soft agar.

Twist1 permet donc de passer outre les fonctions apoptotique et anti-proliférative de p53, il l'antagonise et possède la capacité de promouvoir la croissance indépendante de l'ancrage [167].

Cette progression au travers du cycle, contribue à l'instabilité chromosomique. Cette instabilité causée par la surexpression de Twist est fréquente, et a été observée chez les personnes atteintes du Syndrome Shaver-Kotzen [192], mais aussi plus récemment, dans des lignées de cancer du sein Twist1 positives. De nombreuses altérations chromosomiques ont été retrouvées (aneuploïdies, aberrations chromosomiques, et translocation) [193].

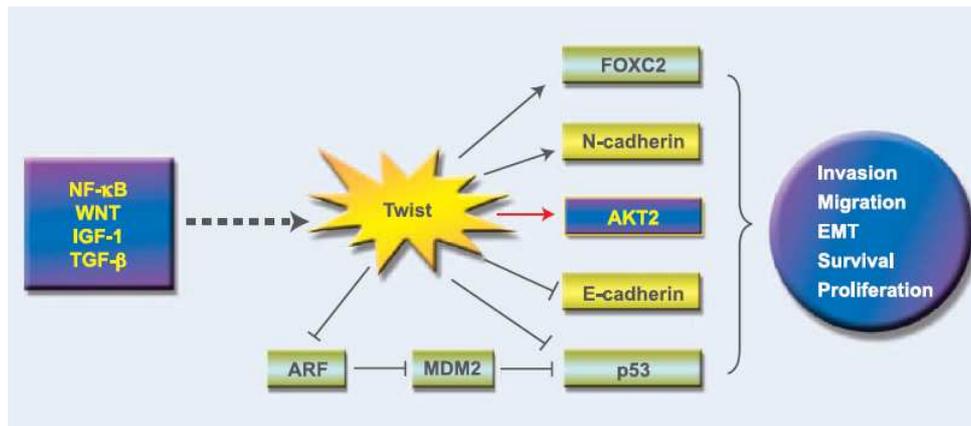


Schéma 19 : cible et effecteurs de Twist1 Cheng G Z et al, *Can Res* 2008

Cette protection de Twist1 envers l'apoptose et la sénescence contribue à la création de facteur de résistance aux traitements chimiothérapeutiques.

Twist est connu pour être un facteur de résistance aux anti-cancéreux tels l'étoposide [194], l'adriamycine [184], le paclitaxel et la vincristine [174,189]. L'utilisation de siRNA anti-Twist1, a permis de rétablir et d'améliorer l'efficacité de l'adriamycine dans des lignées de cancer du sein, en bloquant le phénomène d'EMT, en rétablissant l'apoptose, en inhibant l'invasion, en réduisant la production de P-gp, et en réduisant les résistances croisées [184]. Twist bloque l'apoptose induite par le paclitaxel [190], en activant la voie Akt [190].

Twist1 induit aussi une protection de l'ADN, face aux espèces réactives de l'oxygène générées par la stimulation par le TNF- α [151].

Twist1 contribue à la résistance acquise aux traitements par synthèse de la protéine d'efflux des médicaments, la P-gP via la stimulation de la protéine YB1. Le gène YB1 est transcrit grâce au facteur de transcription Twist1 qui se fixe au niveau de la séquence E-box du promoteur de YB1 [195].

Twist1 protège aussi les lignées de cancers du sein de l'irradiation (radiations ionisantes gamma) au travers une dérégulation de la voie de p53, ce qui se traduit par une progression dans le cycle, une survie cellulaire et une régulation négative des cibles telles que p21 et MDM2 [170].

3.5.2 Twist inducteur de la progression tumorale et la formation de métastases

Twist est inducteur de la progression tumorale à plusieurs niveaux.

La surexpression de Twist1 dans les lignées de cancers de la prostate, et de sein augmente les capacités d'invasion et de migration, suggérant que l'expression de la protéine Twist1 est liée à la capacité d'invasion des cellules de cancer de la prostate [172,174]. Dans des modèles murins transfectés par Twist1 et ayant perdu l'expression de Twist1, les métastases pulmonaires visualisées sont significativement plus petites et moins nombreuses que dans les souris où l'expression de Twist1 n'est pas abolie. L'histologie confirme aussi que le nombre de micrométastases à diminuer de manière importante, mais que leur taille reste identique au groupe témoin [172]. De plus l'inhibition de Twist1 est capable d'induire la suppression des métastases par induction de la MET in vivo [172,174].

Twist1 a donc un rôle dans la formation des métastases et la prévention des micrométastases [172], grâce à l'acquisition des capacités de migration et d'invasion.

Twist est impliqué dans la formation de l'EMT [164,170].

L'expression stable de Twist1 dans des lignées du sein, saines MDCK de type épithéliales pures, conduit à la perte de l'inhibition de contact, l'apparition d'un phénotype morphologique mésenchymateux, forme étoilée, expression des marqueurs mésenchymateux (N-Cadhérine, vimentine, fibronectine). Parallèlement, les marqueurs épithéliaux disparaissent.

De plus, dans des lignées MCF7, la surexpression de Twist conduit à la perte de la croissance dépendante du support. Les cellules sont capables de se regrouper et de former des sphères denses en milieu matrigel, et acquièrent une morphologie fusiforme, aptes à migrer et à s'infiltrer au travers des vaisseaux sanguins [170]. Twist1 joue son rôle de régulateur de l'EMT via son action inhibitrice sur la E-cadhérine [125]. En se liant à la protéine Bmi1, Twist1 réprime la transcription de la E-cadhérine, en se liant à la séquence E-box de son promoteur [196,197]. Cette action favorise le phénomène d'EMT et facilite la formation des métastases [198].

De plus Twist1 est impliqué dans la formation d'invadopodes, dans des lignées de cancer du sein via la l'expression de PDGFR α qui à son tour active la protéine Src. Ces protusions membranaires permettent une dégradation de la matrice et une progression des cellules. Ces progrès favorisant la formation des métastases [199]. Twist1 favorise aussi l'activité des métalloprotéinases (MMP). Il réprime TIMP1 un inhibiteur clé des MMPs [164,200].

D'autre part Twist1 possède un rôle important dans la formation des métastases osseuses ostéolytiques du cancer de la prostate, en agissant au niveau des cellules souches contenues dans la moelle osseuse, et en dérégulant l'équilibre osseux. Twist1 possède 2 actions sur le remodelage osseux : il stimule les ostéoclastes et donc la dégradation de l'os, et il inhibe la minéralisation induite par les ostéoblastes. Twist1 permet aussi de stimuler la production de facteurs de différenciation de la moelle osseuse. Twist1 favorise donc la formation de métastases ostéolytiques via sa cible RUNX2 [201] et un facteur de sécrétion DKK1 qu'il régule positivement en se liant sur sa séquence E-box (Dickkopf homolog 1) [202]. Dans cette étude, les tumeurs primaires de prostate exprimant Twist1, sont associées avec un risque élevé de développement de métastases [202].

En plus de favoriser la capacité d'invasion, la formation de colonies et la formation des métastases, Twist1 intervient aussi dans la formation de la néoangiogenèse induite lors de la formation de métastases.

Twist1 intervient sur la synthèse de VEGF, en augmentant sa production dans des lignées de cancer du sein MCF7 transfectées stables par un rétrovirus codant pour Twist1. Dans ce modèle cellulaire de surexpression, Twist1 permet aussi d'induire in vivo une angiogenèse

caractérisée par une augmentation du volume vasculaire, et par une augmentation de la perméabilité vasculaire [181].

Dans des lignées d'hépatocarcinome humain, sous conditions hypoxiques, la protéine Twist1 est surexprimée. Cette surexpression est reliée à la formation de nouveaux vaisseaux. L'inhibition par si-RNA de Twist1 est capable d'inhiber cette formation de vaisseaux induites par l'hypoxie [203]. Twist1 est donc capable d'induire la formation de vaisseaux en période d'hypoxie. Récemment, dans un modèle murin, l'utilisation de si-RNA anti Twist1 a permis d'inhiber la néovascularisation de la rétine [204].

Dans les carcinomes hépatocellulaires (HCC), de nombreux cas surexpriment Twist1 alors que les tissus sains ne l'expriment pas. Dans les HCC surexprimant Twist1, il est apparu une densité de microvaisseaux significativement supérieure, par rapport à ceux n'exprimant pas Twist1. De plus la surexpression de Twist1 est corrélée avec la surexpression du VEGF. Twist1 semble donc jouer un rôle important dans l'angiogénèse des HCC [205]. Twist1 semble avoir un rôle pro-angiogénique.

3.6 Régulation de l'expression de Twist1

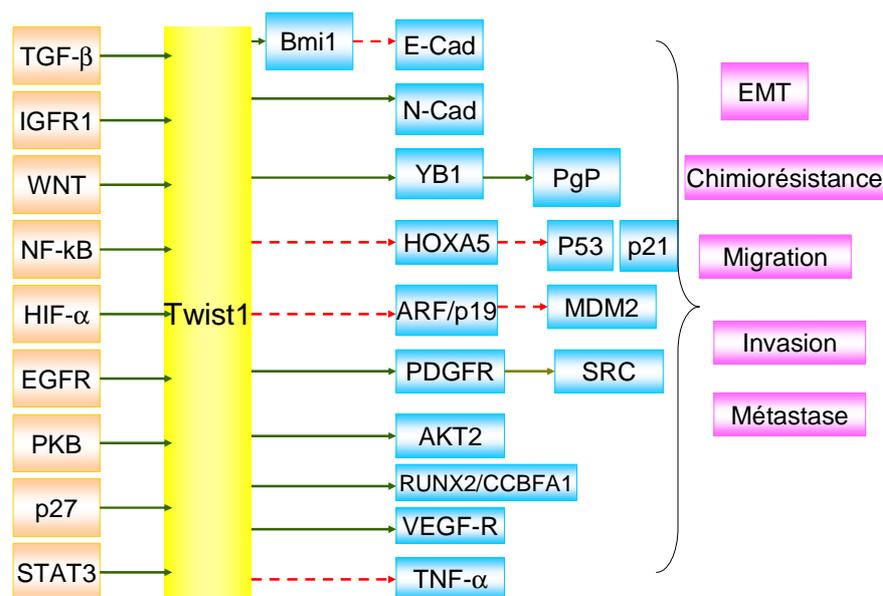


Schéma 20 : voie de régulation et cibles de la protéine Twist1

Comme nous l'avons vu précédemment Twist1 est un facteur de l'EMT et à ce titre il peut être régulé par certaines voies communes à la régulation de l'EMT telles les voies NF-κB, TGF-β et HIFα (voir paragraphes 2.4.3.5 et 2.4.3.6)

Le TNF-α active l'expression de Twist1 via la voie de NF-κB [132].

3.6.1 Twist et STAT3

Le dimère STAT3 se lie directement sur le promoteur de Twist1 et active sa transcription [206]. Une inhibition de STAT3 conduit à une réduction d'expression de la protéine Twist1, dans des lignées cancéreuses de cancer du sein. Cette perte d'expression de la protéine Twist1 est associée à la perte d'invasivité, de migration et à la perte de la capacité à former des colonies. L'expression ectopique de Twist1 permet de restaurer le phénotype. Twist1 est donc une cible de STAT3 [206].

Chez l'homme *in vivo* dans des tumeurs du sein, l'expression de STAT3 phosphorylée est corrélée avec le niveau de Twist1 et avec un grade avancé [206].

STAT3 permet la surexpression de la protéine Twist1 en agissant au niveau de la transcription de Twist1, par liaison directe avec son promoteur [206].

3.6.2 Twist et les récepteurs à tyrosine kinases IGFR-1 et VEGFR1

L'IGF induit l'expression du gène Twist1. Dans des cellules mutées pour le récepteur de l'IGF, la surexpression de Twist1 est impossible. Twist1 est donc induit par la liaison de l'IGF à son récepteur [194]. D'un point de vue mécanistique, l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de certaines voies tel l'U0126 spécifique de la voie ERK kinase, suggère que l'expression de Twist1 induite par IGF1, est sous la dépendance des voies MEK/MAPK et plus précisément de ERK [194]. Cette cascade d'activation induite par la liaison de IGF à son récepteur, met en jeu la voie ERK, qui a pour cibles STAT3 et Myc qui sont elles aussi connues pour interagir avec Twist1 [167,206].

Dans les lignées de cancer pancréatique, le traitement par les facteurs de croissances endothéliaux (VEGF α et β) et leur liaison au récepteur VEGFR-1 induit un changement morphologique et phénotypique des cellules en faveur d'une EMT. Les marqueurs moléculaires caractéristiques des cellules épithéliales changent de localisation dans les premières heures: la E-cadhérine membranaire devient cytoplasmique, puis disparaissent 48h après le traitement. Parallèlement, l'expression des facteurs de transcription Twist1, Snail, and Slug augmentent rapidement. L'utilisation d'anticorps inhibant le récepteur au VEGF, et donc son activation, diminue l'expression nucléaire de Twist1 [124]. Le VEGF-R 1 est donc capable d'activer l'EMT via l'activation de l'expression de Twist1, dans des lignes humaines de carcinome du pancréas.

3.6.3 Twist et p27

D'un autre côté la surexpression de p27 (protéine qui surexprimée dans des cellules souches embryonnaires humaines, inhibe le cycle cellulaire en phase G1) conduit à un phénotype de cellules épithéliales, alors que sa perte d'expression conduit à l'expression de phénotype mésenchymateux, ce phénotype étant associé avec une augmentation de l'expression de la protéine Twist1. Twist1 est donc sous la dépendance de p27. La protéine p27 contrôle l'EMT via sa fixation sur le promoteur de Twist1 [207].

4 Protéine c-Src

La protéine Src est un proto-oncogène [208] [209]. Son expression et son activité sont fréquemment augmentées au cours de la progression cancéreuse [210] et sont reliées à un mauvais pronostic dans de nombreux cancers [211]. Elle joue un rôle important en oncogénèse et notamment dans la progression cancéreuse et l'invasion [212] [213] *via* la formation de métastases et l'angiogénèse.

L'activité catalytique des kinases de la famille Src est nécessaire à la destruction des jonctions serrées et des desmosomes au niveau de l'interaction entre cadhérines [214].

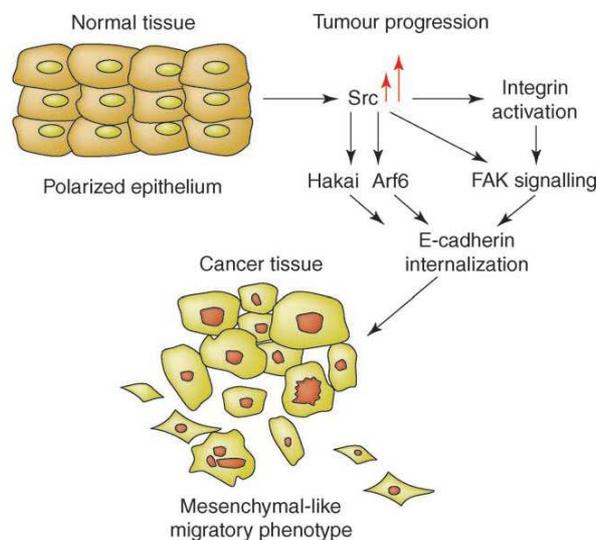


Schéma 20 : Induction de l'EMT via l'activation de la voie Src et l'internalisation de la e-cadhérine [215].

4.1 Src Kinase family (SFks)

La kinase Src appartient à la famille des kinase SRC (Steroid Receptor Coacticateur), qui compte 12 membres identifiés c-Src, Fyn, Yes, Yrk, Lyn, FGGr, Blk, Lck, Brk, Srm et Frk. [216]. Seules les protéines Src, Fyn et Yes sont exprimées ubiquitairement. Ces protéines sont des enzymes tyrosines kinases non liées à un récepteur, elles ne possédant pas d'ancrage à la membrane. Elles sont libres dans le cytoplasme où elles interviennent dans la transduction du signal.

Chaque membre possède une structure constituée de 4 domaines SH1, SH2, SH3 et SH4. Le domaine SH1 est un domaine catalytique, les domaines SH2 et SH3 sont des domaines de liaisons aux protéines, qui permettent de moduler l'activité catalytique du domaine SH1. [209,217]. Ils permettent aussi l'interaction avec les récepteurs à tyrosine kinase transmembranaires [218]. Le domaine SH4 est présent dans la partie N-terminale et représente une petite région possédant un domaine de myristoylation [208] nécessaire pour une éventuelle localisation à la membrane [209] [219]. Elles sont présentes dans les tissus sains

ou cancéreux [220] [209]. La voie des SKFs participe à de nombreuses fonctions physiologiques durant le développement et l'âge adulte, incluant la progression dans le cycle cellulaire, la reconnaissance immunitaire, l'adhésion [221], la migration, la régulation de l'apoptose, la croissance et la différenciation cellulaire [216,220,222-224]. Ces actions sont médiées par l'interaction des Src avec de nombreux récepteurs à tyrosines kinases [216]. La protéine c-Src (Src) est impliquée précocement en cancérologie, et dans les stades métastatiques [225] [226].

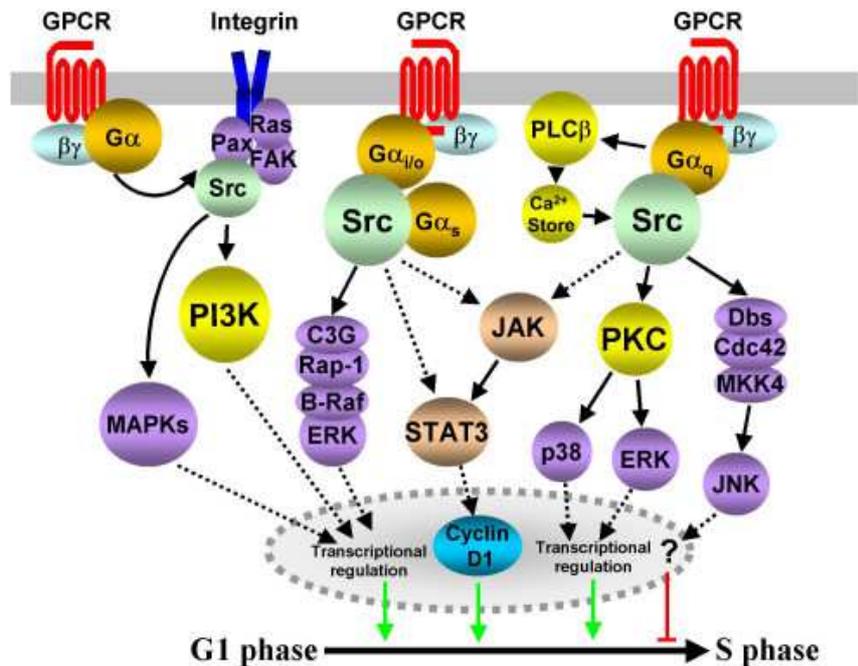


Figure 21 : Voies utilisant la protéine Src.

4.2 Activation de la protéine Src (c-Src)

L'activation de cette protéine est accompagnée d'un changement conformationnel [209]. La forme inactivée le domaine SH2 se lie le résidu tyrosine phosphorylé en position 530 (Y530) situé en position C-terminal. La protéine ne peut pas se lier avec un substrat extérieur, elle est inactive [209]. La déphosphorylation de la tyrosine en position 530 conduit à une dissociation du domaine SH2. La protéine est dite en configuration « ouverte », le site catalytique SH1 devient accessible. La protéine est activée [227].

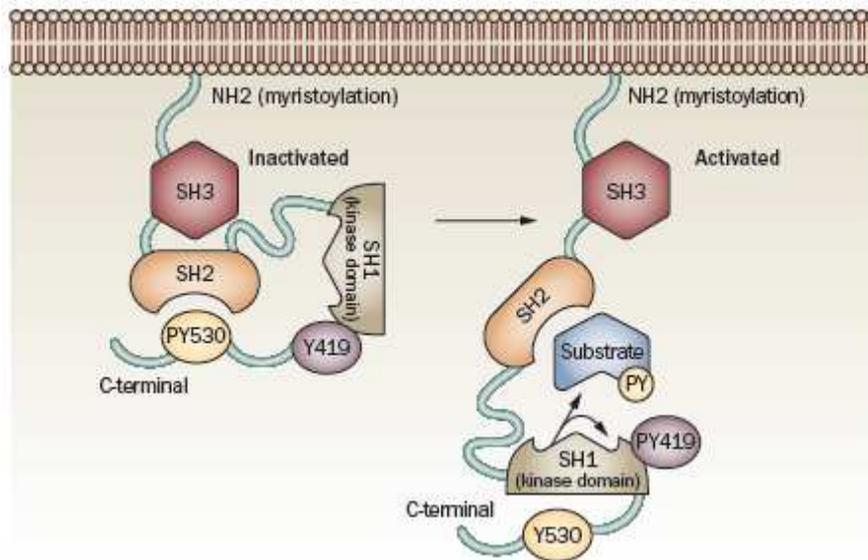


Schéma 22 : Structures de la protéine c-Src active et inactive [209].

4.3 Src et cancérogénèse

En cancérogénèse la protéine Src est particulièrement impliquée dans la mobilité, l'invasion, la survie, l'angiogénèse et la prolifération [220,222].

La kinase Src, localisée dans le cytosol active une série de substrats tels que la FAK (Focal Adhesion Kinase), la PI3K et les STAT [223,224]. L'interaction entre l'EGFR et la kinase Src est complexe. La kinase Src semble être impliquée dans la résistance aux thérapies via une interaction indépendante ou une association avec d'autres récepteurs [83,228]. Cette voie souvent perturbée dans les cancers, représente un choix stratégique comme nouvelle cible et pour développer de nouveaux médicaments.

4.4 Src et EMT

Plus particulièrement, dans les cancers épithéliaux, le proto-oncogène v-Src est impliqué dans le phénomène d'EMT [220,229]. Il favorise la perte d'adhésion inter-cellulaire [218,220] ainsi que la perte d'adhésion à la matrice extracellulaire. Il modifie la forme des cellules [230], et contribue à l'invasion cellulaire [209].

Dans les cellules transfectées par le gène v-Src, il existe une perte d'organisation des filaments d'actine [231,232], aboutissant à une modification de la forme cellulaire. Les cellules épithéliales de forme cubique se transforment en cellules fibroblastiques, par le processus d'EMT [230].

Src contribue à l'invasion cellulaire, [209,209] à travers la perte d'adhésion et l'acquisition de mobilité. La kinase Src contrôle l'adhésion intercellulaire via la E-cadhérine [215] et l'adhésion cellulaire à la matrice extracellulaire via les intégrines [215].

4.4.1.1 Src et E-cadhérine

L'activation de Src provoque la dissociation de l'adhérence intercellulaire *via* son interaction avec la p120 caténine, en désorganisant les jonctions serrées [218]. Le complexe Src/FAK phosphoryle la E-cadhérine, qui va perdre sa localisation membranaire [233] et être internalisée [234]. Le complexe E-cadhérine-caténine, ne peut plus jouer son rôle dans les jonctions d'ancrage [215,235]. La cellule est ainsi libre d'ancrage et gagne la capacité de mobilité. Cette internalisation de la E-cadhérine dans les cellules KM12C est dépendante de la phosphorylation de Src par FAK [215]. L'inhibition de l'expression de Src retient la β -caténine dans le cytosol, ce qui favorise sa liaison à la E-cadhérine, d'où la diminution de mobilité des cellules [215].

4.4.1.2 Src et intégrines

Src interagit avec FAK au niveau de ses séquences SH3 et SH2 [236], puis s'associe avec lui pour former un complexe Src/FAK [237]. A l'intérieur de ce complexe, Src phosphoryle la sous-unité cytoplasmique des intégrines, ce qui entraîne une perte de fonction des intégrines. Le cytosquelette intégrine-actine se trouve donc perturbé d'où une déstabilisation voire une disparition de l'adhérence à la matrice [238] et une augmentation de mobilité [239]. Ce complexe Src /FAK est aussi capable d'interagir sur l'assemblage des microfilaments d'actine et sur la déstabilisation des points d'adhésion *via* son interaction avec RhoA [210,224,240-242] et la paxilline [243] permettant un gain de motilité.

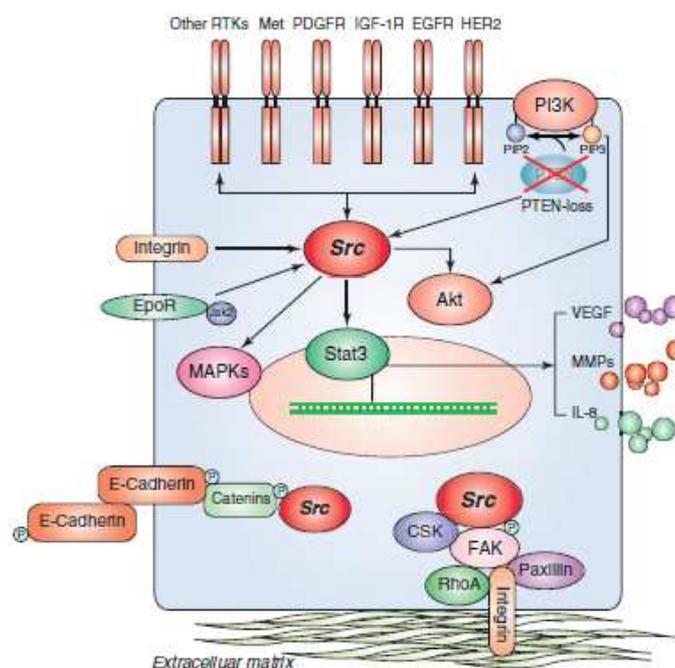


Schéma 23 : Action de Src sur la dissociation des jonctions adhérentes et sur les intégrines [218].

4.4.2 Src et STAT3 / Twist1

La protéine STAT3 (Signal transducer and activator of transcription 3), est une protéine dont l'action est reconnue dans le processus de cancérogénèse, plus précisément dans l'angiogénèse [244,245]. Elle permet d'initier la progression et l'invasion [246-248] [249].

STAT3 est activée par la liaison de facteurs de croissance à leur récepteur ou par la stimulation par la famille des SRC tyrosines kinases [249]. Ces ligands en se liant à leurs récepteurs induisent la phosphorylation de STAT3 par la kinase Janus. STAT3 phosphorylé peut dimériser, transloquer dans le noyau et jouer son rôle de facteur de transcription [250,251].

Src phosphoryle STAT3 et lui permet ainsi de jouer son rôle de facteur de transcription [246], en augmentant sa capacité de liaison à l'ADN [250,251]. L'inhibition de Src conduit dans un premier temps à l'inhibition de STAT3, puis très vite à la surexpression de STAT3 [249].

STAT3 induit la transcription de Twist1 en se liant directement à son promoteur [206]. Une inhibition de STAT3 par des si-RNA conduit à une réduction d'expression de la protéine Twist1, ainsi que de son niveau d'ARNm, dans des lignées de cancer du sein. Cette perte de Twist1, qui est un des principaux régulateurs de l'EMT est associée à une perte d'invasivité, de migration et à l'incapacité à former des colonies [206].

4.4.3 Src et migration

Twist1 est aussi capable d'intervenir sur la formation d'invadopodes (filaments d'actines) de la membrane plasmique qui permettent à la cellule de se déplacer, et de dégrader la matrice à travers l'activation de Src [218]. L'activation de Src est capable d'induire l'invasion et la migration au site primaire d'une tumeur lorsque la formation d'invadopodes est prédominante [218]. Cependant l'inhibition de l'activation de Src est aussi capable d'induire des microtentacules composés de microtubules appelés protusions [218,252]. Ces protusions favorisent l'agrégation homocellulaire dans la circulation sanguine [253]. Les cellules se regroupent et sont ainsi moins fragilisées ce qui augmente le risque de dissémination métastatique [254]. De plus les protusions sont aussi responsables de l'agrégation des cellules cancéreuses aux plaquettes, d'où la majoration du risque de thrombose dans certains cancers [255,256].

Src joue donc un rôle dans la survie et la dissémination des cellules métastatiques [218].

4.4.4 Src et angiogénèse

Src régule le microenvironnement de la tumeur en stimulant l'angiogénèse. Src régule l'expression de facteurs pro-angiogéniques que sont le VEGF [257], et l'IL8 dans les cellules cancéreuses et les cellules stromales [258]. Les récepteurs de ces facteurs, une fois activée sont capables de phosphoryler Src qui stimule la perméabilité vasculaire des cellules endothéliales, et la néovascularisation [209]. L'activation de Src par le récepteur au VEGF (VEGFR) est aussi capable de stimuler la migration cellulaire.[259].

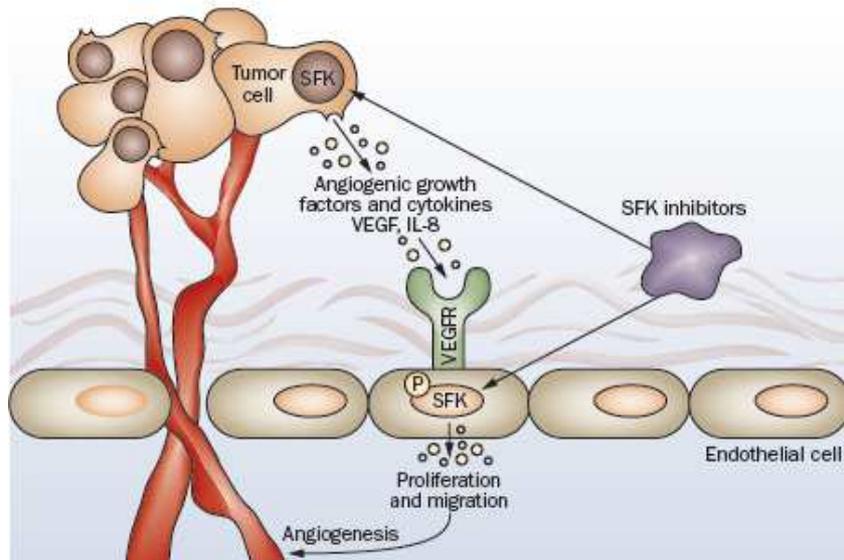


Schéma 24 : Action de Src sur l'angiogénèse [209].

5 Le traitement AZD0530

Le traitement AZD0530 est un inhibiteur compétitif de la kinase protéine Src.

5.1 Structure

L'AZD0530, est petite molécule aussi appelée saracatinib, ou N-(5-Chloro-1,3-benzodioxol-4-yl)-7-[2-(4-méthylpiperazin-1-yl) éthoxy]-5- (tétrahydro-2H-pyran-4-yloxy) quinazolin-4-amine. Elle dérive de la substitution en 5,7 d'une anilinoquinazoline [260].

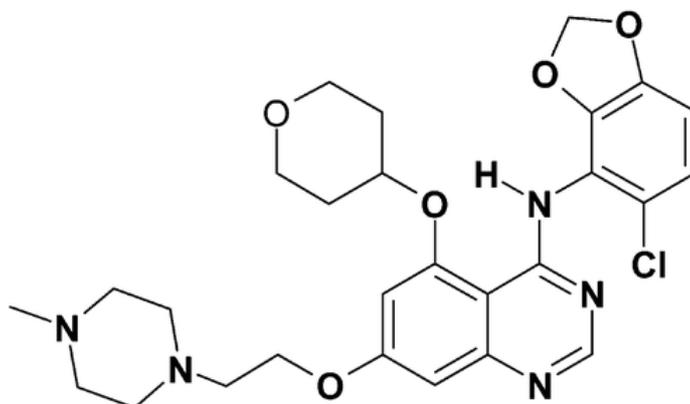


Schéma 25 : Structure chimique de l'AZD0530 ou saracatinib.

5.2 Mécanisme d'action

Le saracatinib présente une grande affinité pour le domaine tyrosine kinase (SH1) des enzymes c-Src et Abl [261], en bloquant de manière compétitive le domaine de liaison à l'ATP [262]. La demi-vie de ce composé est de 40 heures, il est utilisé par voie orale. Il possède une faible activité antiproliférative, mais c'est un inhibiteur de l'adhésion cellulaire, de la migration et de l'invasion [263], de la croissance sans ancrage [264]. Cependant combiné à certaines drogues, dont les inhibiteurs de CHK1, il peut agir en synergie et potentialiser l'effet de mort cellulaire [265].

5.3 Etudes pré-cliniques

De nombreuses études précliniques ont été menées en monothérapie avec le saracatinib sur des lignées de différents types tumorales : prostate métastatique [266], rein [267], cancer folliculaire de la thyroïde [197,197,268] leucémie myéloïde chronique [269], lymphome [270], colo-rectal [271], cancer gastrique [272], mélanomes [273], poumon (CBNPC) [274,275], fibrosarcome [276], ORL [277], sein [278,279]. Dans tous les cas le saracatinib inhibait la croissance cellulaire ainsi que l'invasion et l'ancrage, le plus souvent de manière dose dépendante. Une diminution de la formation des invadopodes [277] ainsi qu'une re-sensibilisation à la radiothérapie des cellules, ont été observées [280]. Ces travaux sont en faveur d'une action anti-métastatique du saracatinib.

Des modèles murins traités par le saracatinib en monothérapie ont aussi été utilisés dans de nombreux cancers : prostate [281,282], pancréas [283,284], carcinome de la peau [285] poumon (CBNPC). Plus particulièrement le saracatinib a été utilisé sur des modèles murins de tumeur de vessie [263]. L'activité *in vitro* de ce traitement a conduit à la perte d'invasivité et à une stabilité de l'adhésion inter-cellulaire. Par comparaison, les souris traitées par le saracatinib, ont présenté une quantité nettement inférieure de tumeurs secondaires par rapport au groupe non traités [263]. Le saracatinib semble donc être une molécule prometteuse anti-invasive dans les tumeurs de vessie. Là aussi les effets anti-invasifs et anti-métastatiques ont été mis en évidence, ainsi qu'une diminution du volume tumoral.

De nombreuses molécules ont été testées en association avec le saracatinib avec le selumetinib dans le mélanome [286] , avec le sunitinib dans le rein [267], avec le tamoxifène dans le cancer du sein RE+ [287], avec l'anastrozole dans le cancer du sein hormono-résistant [288], avec le fluoro-uracile dans le cancer gastrique [289] et avec l'imatinib dans les leucémies myéloïdes chroniques [269]. Le saracatinib a été associé à l'anastrozole ou au fulvestrant dans le cancer du sein et testé sur des xénogreffes dans la souris [290,291]. Lors de toutes ces associations le saracatinib a montré une activité anti-tumorale augmentée, une synergie d'action, son utilisation a permis dans de nombreux cas une diminution des résistances aux médicaments associés [290,291].

5.4 Etudes cliniques

Le saracatinib a été testé chez l'homme sain pour vérifier certains paramètres que sont la fonction rénale [292] et la résorption osseuse [292] , avant d'être testé chez le patient cancéreux.

Les différentes études de phase 1 en monothérapie ont permis de définir la dose maximale tolérée (DMT) comprise entre 175 et 250 mg journalier [293,294], d'évaluer les paramètres de pharmacocinétique, la tolérance et la sécurité d'emploi [295,296]. Les principales toxicités retrouvées sont des troubles hématologiques (anémie, neutropénie, leucopénie, thrombocytopénie), une toxicité rénale, un rash, des arthralgies, des myalgies, une asthénie, des nausées, et une anorexie. Le saracatinib reste cependant un médicament bien supporté. Une autre étude de phase 1 en combinaison avec un inhibiteur de la voie VEGF (cediranib) a été menée [297]. Elle aboutit elle aussi à la même DMT de 175 mg/j.

Parallèlement de nombreuses études de phase II ont été menées en monothérapie visant à démontrer une efficacité d'action, dans de nombreux cancers avancés présentant des métastases : cancer de la prostate résistant à la castration [298], où une baisse du PSA de 30% était l'objectif principal, cancer ORL [299], cancer digestifs (gastriques ou gastro-oesophagien) [300], cancer du sein non hormono dépendant [301], mélanome métastatique [289]. Tous ces essais de phase II en monothérapie ont conduit à la même conclusion : le saracatinib ne possède qu'une très faible activité anti-tumorale en monothérapie chez l'homme alors que les études pré-cliniques étaient prometteuses.

De nombreuses études d'association sont apparues, dans le cancer du pancréas en association avec la gemcitabine [302], avec le paclitaxel et ou le carboplatine dans les tumeurs primaires solides [303], avec le carboplatine et le paclitaxel (étude OVERT1).

Mais les résultats sont là aussi décevants. Une réserve peut être émise car les sujets n'étaient pas choisis sur des critères biologiques précis. Peut-être qu'une sélection plus stricte sur des biomarqueurs définis pourrait sélectionner une population qui tirerait bénéfice du saracatinib.

PARTIE 2 : OBJECTIFS

Twist1 cible thérapeutique dans le cancer de la vessie?

Le rôle central de Twist1 dans le programme d'EMT, de développement des métastases et de résistance aux traitements, en font un parfait candidat comme cible thérapeutique.

L'inhibition de Twist1 par des si-RNA anti-Twist1 dans des lignées de cancer de la prostate (DU175 et PC3), se traduit par une augmentation de la mort cellulaire, et donc une sensibilisation accrue des lignées au paclitaxel. L'inactivation de Twist1 supprime les capacités de migration et d'invasion des cellules de cancer de la prostate hormono-indépendant [174].

La répression de l'expression de Twist1 par des si-RNA dans des fibroblastes murins, augmente la sensibilité à l'étoposide et ré-induit la mort cellulaire, inhibée par l'expression de Twist1 [194]. Dans une autre équipe, travaillant sur le cancer du poumon non à petites cellules, Twist1 a été déplété par l'utilisation de si-RNA anti-Twist1 dans les lignées A549. Les cellules ont été re-sensibilisées à l'action du cisplatine. Cette sensibilité induite par l'inhibition de Twist1 passe par l'induction de la voie JNK [304].

Ces expériences suggèrent que la régulation négative de Twist1 peut être une cible, pour :

- accroître la sensibilité des drogues pro-apoptotiques, ou pour la rétablir en stimulant l'apoptose ou la sénescence
- diminuer la formation de métastases, en inhibant l'invasion et la migration

Dans un premier temps nous caractériserons les lignées de vessie pour l'expression de Twist1, puis nous étudierons l'influence de Twist1 comme potentielle cible dans le cancer de la vessie. Nous étudierons aussi l'effet d'une drogue le saracatinib et la possible intervention de Twist dans son mode d'action.

Saracatinib nouvel espoir dans le traitement du cancer de la vessie ?

Le saracatinib est une drogue anti-invasive testée dans différents cancers, mais dont l'action n'a été que peu testée dans le cancer de la vessie. Nous aborderons dans ce travail les effets pharmacologiques du saracatinib sur les différentes lignées de cancer de la vessie d'un point de vue morphologique, cytotoxique et invasif, après les avoir caractérisées pour les différents marqueurs de l'EMT (E-cadhérine, N-cadhérine et vimentine). Notre hypothèse est que l'action anti-invasive du saracatinib implique un blocage de la voie de l'EMT.

PARTIE 3 : MATERIEL ET METHODE

1 Culture cellulaire

Nous disposons de 7 lignées immortalisées issues de carcinome de vessie : EJ, J82, JMSU1, TCCSUP, SD48, SW780, T24.

Les cellules J82, TCCSUP et T24 ont été achetées à l'ATCC (America Tissue Culture Collection). Les lignées SD48 et JMSU1 ont été fournies par l'équipe de François Radvanyi de l'Institut Curie. Les lignées SW780 et EJ ont été fournies par Dr. L Yamashiro Joyce de l'université de Los Angeles (UCLA).

Les lignées sont cultivées en monocouche dans un milieu RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium), complété en L-glutamine et enrichi par 10% de sérum de veau foetal (SVF). Les cellules sont cultivées en flasques dans un incubateur à 37°C, en présence de 5% de dioxyde de carbone (CO₂).

Les milieux sont renouvelés une à deux fois par semaine, suivant l'état de confluence des cellules. Dès que les cellules sont à confluence, elles sont repiquées. Le milieu nutritif est aspiré, les cellules sont lavées au PBS puis décollées à l'aide de trypsine. Elles sont remises en suspension dans du milieu de culture neuf, comptées au Coulter Counter® de Coultronics, et enfin réensemencées dans une nouvelle flasque.

Tous les 10 passages, les cellules sont jetées et des nouvelles cellules sont remises en culture.

2 Western blot

Les cellules sontensemencées dans des plaques 6 puits.

2.1 Obtention de l'extrait protéique

Deux techniques ont été testées et utilisées, la technique de congélation-décongélation, et la technique dite au RIPA.

Techniques de congélation-décongélation

La lyse des cellules a été effectuée par le protocole appelé *Ultimate freeze-thaw lysis for mammalian cells* dont le principe repose sur l'éclatement des cellules par des cycles de congélations-décongélation successifs dans de l'azote liquide à -196 °C.

Les cellules d'un puits d'une plaque 6 puits sont rincées au PBS 1X froid, et sont décollées par grattage dans 500 µL de PBS, puis centrifugées à 13 000 rpm. Le surnageant est éliminé et le culot est resuspendu dans 50 µL d'un tampon de lyse (600 mM de KCl, 20 mM de tris HCl pH 7,8 et 20 % de glycérol) auquel on ajoute un cocktail d'inhibiteurs de protéases (tablette *complete mini EDTA-free*, Roche). Les cellules sont alors plongées dans un bain d'azote liquide quelques secondes puis laissées à température ambiante jusqu'à décongélation totale. Ce cycle congélation-décongélation est répété 2 fois. Les lysats cellulaires sont de nouveau centrifugés. Le surnageant contenant les protéines totales est transféré dans un tube neuf, puis 1 µL de benzonase (Novagen, 250 U/µL) est ajouté au mélange pour digérer l'ADN résiduel. Cette digestion s'effectue à température ambiante pendant 10 min.

Technique d'extraction par le RIPA

Les cellules d'un puits d'une plaque 6 puits sont rincées au PBS 1X froid, et sont décollées par grattage sur la glace dans 80 µL de RIPA de chez Santa Cruz (tampon de lyse 1X, 1% Nonidet P-40, 0,50% sodium déoxycholate, 0,1% SDS, 0,004% de sodium azide à 100 µg/mL, 1% PMFS dans du DMSO, 1% cocktail inhibiteur de protéases et 1% orthovanadate). La solution est versée dans un ependorf lui-même disposés pendant 20 minutes dans la glace. Puis le tube est centrifugé à 13 000 rpm pendant 5 minutes. Le surnageant contenant les protéines totales est transféré dans un tube neuf, puis 1 µL de benzonase (Novagen, 250 U/µL) est ajouté au mélange pour digérer l'ADN résiduel. Cette digestion s'effectue à température ambiante pendant 10 min.

2.2 Dosage

Les protéines sont ensuite dosées grâce au kit colorimétrique BioRad utilisant la méthode de Lowry. Les échantillons à doser sont comparés à une gamme de BSA (comprenant les concentrations 0,5 ; 1 ; 2 ; 3 et 5 µg/µL). La densité optique du produit de la réaction colorimétrique est mesurée au bout de 15 min à 750 nm avec un spectrophotomètre en plaque 96 puits. Les échantillons sont utilisés immédiatement ou conservés à -80 °C.

2.3 Description

De façon générale, 50 µg de protéines provenant de lysat cellulaire ou d'extrait nucléaire, ont été utilisés pour l'analyse par western Blot. Les protéines sont soumises à une électrophorèse en gel de polyacrylamide de 12%. Deux types de gels sont préparés : 1 gel de « *resolving* » dont la composition est la suivante : (acrylamide/bisacrylamide 10%, Tris-HCl 375 mM pH 8,8, SDS 0,1%, APS 0,05%, TEMED 0,05%) au dessus du quel est coulé un gel de « *stacking* » dont la composition est : (Acrylamide/bisacrylamide 5%, Tris-HCl 125 mM pH 6,8, SDS 0,1%, APS 0,05%, TEMED 0,1%). Les échantillons de protéines sont dilués dans du tampon de charge 4X (Tris-HCl 62,5mM pH 6,8, glycérol 25%, SDS 2%, bleu de bromophénol 0,01%, β- mercaptoéthanol 5%), déposés sur le gel de « *stacking* » et soumis à une électrophorèse de 2 h à 80 V dans un tampon de migration (Trizma Base 25 mM, Glycine 192 mM, SDS 0,1%, pH 8,3). Cette technique permet la séparation des protéines selon leur poids moléculaire qui est apprécié grâce à la migration en parallèle d'un marqueur de poids moléculaire correspondant à une gamme de protéines de 10 kDa à 250 kDa (*Precision Plus Protein™ Standards*, Bio-Rad). Les protéines sont transférées du gel sur une membrane de PolyVinylidene Fluoride (PVDF) dans un le système Iblot® Dry Blotting System (Invitrogen) en 7 minutes selon les recommandations du fournisseur.

2.4 Immunodétection

Après transfert, les membranes sont saturées par incubation dans du PBS-T (0,1% Tween dans PBS 1X) contenant 10% de lait pendant 30 minutes à température ambiante sous

agitation rotative. Elles sont ensuite incubées toute la nuit à 4°C avec l'anticorps primaire (voir ci-dessous) dans du PBS-T contenant 5% de lait. Après trois lavages dans du PBS-T, les membranes sont incubées avec les anticorps secondaires appropriés couplés à la peroxydase dans du PBS-T contenant 5% de lait pendant 1 heure sous agitation. Après une nouvelle série de lavages dans du PBS-T, les membranes sont recouvertes d'une solution contenant le substrat de la peroxydase (luminol) et un peroxyde (Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate, Millipore). La transformation enzymatique du substrat conduit à l'émission de lumière qui est révélée à l'aide de l'appareil Fusion FX7 (Fisher Bioblock Scientific).

2.4.1 Anticorps utilisés

Les anticorps primaires et secondaires utilisés sont décrits dans le tableau ci-dessous.

cible	type	dilution	référence
Anticorps primaires			
anti-E-cadhérine	souris	1/1000 ^{ième}	Santa Cruz sc-59780
anti-N-cadhérine	souris	1/1000 ^{ième}	Invitrogen 33-3900
anti-Twist	lapin	1/250 ^{ième}	Santa Cruz sc-15393
anti-actine	souris	1/1000 ^{ième}	Santa-cruz sc-58679
anti-Flag	lapin	1/400 ^{ième}	F71425 Sigma Aldrich
anti-vimentine	mousse	1/ 400 ^{ième}	Invitrogen 18-0052
Anticorps secondaires			
Anti-lapin		1/10 000 ^{ième}	Santa Cruz sc 2027
Anti-souris		1/10 000 ^{ième}	Santa Cruz Sc2025

3 Transfection à l'Exgène®

Les cellules sontensemencées la veille pour atteindre les 50 à 70% de confluence le jour de la transfection. Les valeurs des ensemencements sont données dans le tableau ci-dessous.

Boites	24 puits	96 puits
Nombre de cellules	50 000 si traitement 10 000 pas de traitement	15 000-20 000

Le lendemain de l'ensemencement la solution de transfection est préparée. Dans un tube 1, l'Exgène® est mélangé avec le chlorure de sodium stérile. Dans un tube 2, l'ADN (vecteur plasmidique) est mélangé au chlorure de sodium stérile. Les 2 tubes sont agités au vortex, puis le contenu du tube 1 est ajouté dans le tube 2 gouttes à gouttes, tout en vortexant. Il est nécessaire de respecter cet ordre. Puis la solution est incubée 10 min à température ambiante. Parallèlement, le milieu de culture des cellules est aspiré, les puits sont lavés au PBS, et du milieu + SVF est rajouté. La solution de transfection est rajoutée goutte à goutte dans chaque puits. A la fin de l'opération, les cellules sont remises dans l'incubateur. Il est nécessaire d'attendre 48 heures avant toute nouvelle action afin d'optimiser la transfection. Les valeurs d'ADN et d'ExGène® optimales pour 1 puits sont décrites dans le tableau ci-dessous.

Types de boîtes	6 puits	12 puits	24 puits	48 puits	96 puits
Quantité d'ADN en ng	1000	500	300	170	100
Quantité d'ExGène en µL	8	4.5	2.5	1.4	0.8
QSP NaCl en µL par tube 1 et 2	50	28	15	9	5
Volume total en µL =tube 1+ tube 2 (1/10 du volume de culture)	100	56	30	18	10
Volume milieu µL du puits	1500	1000	500	250	100

4 Immunofluorescence

D'un point de vue méthodologique, les cellules sont cultivées sur des lamelles de verre disposées au fond des puits d'une plaque 24 puits. Après lavage au PBS, les cellules sont fixées pendant 10 min dans une solution de formaldéhyde à 4%, puis rincées au PBS. Afin de neutraliser les groupements aldéhydes libres, une solution de chlorure d'ammonium (50 mM) est ajoutée aux cellules qui sont incubées à température ambiante pendant 10 min, puis lavées au PBS. Les cellules sont perméabilisées par une solution de Triton X-100 à 0,5% pendant 5 min, avant d'être lavées avec de la gélatine à 0,2% pendant 30 min afin de bloquer les sites de fixation non spécifique, puis rincées au PBS. Pour l'immunodétection, les lamelles de verre sont déposées, dans des chambres humides, sur une solution d'anticorps primaire dilué dans de la gélatine à 0,2 % et incubées durant toute la nuit à 4°C. Le lendemain, les lamelles sont lavées avec de la gélatine à 0,2 % pendant 5 minutes, puis trois fois avec du PBS avant d'être incubées avec l'anticorps secondaire correspondant couplé à un fluorophore (Tableau IV) pendant 1 h à température ambiante. La suite des étapes est réalisée à l'abri de la lumière afin de limiter l'excitation du fluorophore. Elle comporte un nouveau lavage à la gélatine suivi de trois lavages au PBS et un marquage des noyaux au Hoechst (Molecular Probes 10 mg/mL) dilué au 1/5000ème pendant 10 min à température ambiante. Enfin, les cellules sont lavées une dernière fois au PBS pendant 5 min.

Puis les lamelles sont montées sur des lames à l'aide de Fluoromonte® et mises à sécher au four, avant l'observation.

Anticorps anti :	Twist Santa Cruz sc 81417	E cadhérine Invitrogen 33-3400	N cadhérine Invitrogen 33-3900	pFAK Santa Cruz sc-11765
spécificité	souris	souris	souris	lapin
dilution	1/100	1/200	1/200	1/200
incubation	4 heures à T ambiante ou la nuit au frigo			

couleur	VERT	ROUGE
nom	ALEXA 488	ALEXA 594
dilution	1/400	1/400
incubation	1 heure à température ambiante	

5 RT-qPCR

5.1 Principe

Dans un premier temps, l'ARN cellulaire est extrait de la cellule, puis est isolé. L'ARN obtenu est ainsi mis en présence d'une reverse transcriptase pour synthétiser un bras d'ADN complémentaire à partir de l'ARN. Cet ADN monobrin est mis en présence d'une ADN polymérase qui synthétisera le brin manquant d'ADN. Ainsi à partir d'un monobrin d'ARN, un ADN double brin est obtenu.

Cet ADN double brin est soumis au principe de PCR, pour rechercher le gène désiré ici TWIST1.

5.2 Extraction de l'ARN

Les ARNs sont extraits à l'aide du kit RNeasy Mini (Qiagen) selon les instructions du fabricant. Une quantité appropriée de cellules (environ 1 000 000 de cellules par boîte de diamètre 10cm) est lysée puis homogénéisée par passages répétés (4 à 6 fois) du lysat au travers d'une aiguille. Une fois le lysat homogène, les ARNs sont purifiés sur colonne de silice « RNeasy ». Les ARNs élués de la colonne dans 50 µL d'eau MilliQ stérile exempte de RNase sont congelés à -80°C.

Le dosage des ARN est réalisé à l'aide de l'appareil NanoDrop™ (Labtech) par spectrophotométrie à 260 nm. La contamination protéique est estimée par une lecture de l'absorbance (DO) à 280 nm. Pour une bonne qualité des échantillons, le rapport DO260/DO280 doit être compris entre 1,9 et 2. Un rapport inférieur à 1,9 signifie la présence de contaminants protéiques. S'il est supérieur à 2, il existe une contamination par l'isothiocyanate de guanidine utilisé lors de la préparation. L'intégrité de l'ARN est évaluée dans un bioanalyseur Agilent2100

5.3 RT-qPCR

Elle est réalisée grâce au kit de synthèse d'ADNc SuperSript VILO (Invitrogen).

Dans la glace, le mélange suivant est réalisé : 500ng d'ADNc, 4 µl du mélange de réaction VILO™ 5X, 2 µl du mélange enzymatique SuperScriptR 10X (contient la reverse transcriptase III) et 20µL d'eau traitée sans DEPC. Puis la solution est vortexée et incubée à 25°C pendant 10 minutes. Puis la température est augmentée à 42°C pendant 60 minutes, et se termine à 85°C pendant 5 minutes

La qPCR en temps réel est réalisée avec 10 ng ADNc, dans un volume final de 25 µL contenant: 1X SYBR green, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 µM de chaque amorce, 0.2 mM d'un mélange de désoxynucléotides (dNTPs), 1 unité de Taq Polymérase d'ADN (Invitrogen).

Les amorces suivantes ont été utilisées pour amplifier les gènes d'intérêt :

Twist1: 5'GTCCGCAGTCTTACGAGGAG3' et 5'CCAGCTTGAGGGTCTGAATC3'

GAPDH, 5'GAGTCAACGGATTTGGTCGT3' et 5'TTGATTTTGGAGGGATCTCG3'

E-cadhérine: 5'TGCCAGAAAATGAAAAGG3'et 5'GTGTATGTGGCAATGCGTTC3'

18S: 5'CCTGGATACCGCAGCTAGGA3'et 5'GCGGCGCAATACCAATACGAATGCCCC3'

Les réactions de PCR sont réalisées à l'aide d'un appareil de type Rotor-Gene 3000 (Corbett Research): 5 min at 95°C; 40 cycles de 30 s à 95°C, 30 s à 55°C et 30 s à 72°C; suivis par une élongation finale de 2 min à 72°C.

Pour chaque échantillon, 3 réactions de RT indépendantes suivies de 3 réactions indépendantes de PCR ont été effectuées. Chaque échantillon est normalisé par les gènes de ménage GAPDH et RNA18S. Les résultats sont analysés par la méthode du cycle seuil (cycle threshold : C_t), comparant les valeurs du C_t obtenues pour tous les échantillons avec le contrôle positif. Les résultats sont exprimés en niveau ARNm normalisé par rapport au contrôle.

Les produits de la PCR sont déposés sur des gels 2% agarose et séparés par électrophorèse pour vérifier la taille attendue des amplifiats.

6 Test de viabilité cellulaire, test du MTT

6.1 Principe

L'essai au MTT (3, 4, 5 diméthylthiazol-2,5 diphényl tétrazolium bromide) repose sur la réduction du sel de tétrazolium en MTT-formazan par les déshydrogénases mitochondriales des cellules viables. Le MTT-formazan donne des cristaux pourpres qui sont solubles dans les solvants organiques tel le DMSO (diméthyl sulfoxide) et dont on peut évaluer la concentration par spectrométrie. L'absorbance ou densité optique (DO) est ensuite mesurée à 2 longueurs d'onde 570 nm et 630 nm. Le différentiel de DO : $DO_{570}-DO_{630}$ est proportionnel au nombre de cellules viables.

6.2 Traitements pharmacologiques

Nous avons utilisé des traitements par :

- une solution de cisplatine ayant une concentration de 3,33mM
- une solution de saracatinib ayant une concentration de 10mM

6.3 Méthode

Les cellules sontensemencées à la densité de 1000 cellules par puits sur des plaques 96 puits. Le lendemain, les cellules sont traitées pendant 2,5 cycles de division (environ 3jours) par des doses croissantes de drogues (AZD0530 ou Cisplatine). A 72 heures, le traitement est arrêté par un lavage au PBS. Une solution de MTT à 0,5 mg/mL est déposée dans chaque puits. Le MTT est laissé 4 heures au contact des cellules à 37°C. Puis le MTT est aspiré, et 200µL de DMSO sont déposés par puits. L'absorbance ou densité optique (DO) est ensuite mesurée à 2

longueurs d'onde 570 nm et 630 nm. La lecture de la DO s'effectue ensuite aux 2 longueurs d'ondes définie.

7 Test d'invasivité ou « wound healing »

7.1 Principe

Une blessure est réalisée sur une monocouche de cellules confluentes. Cette blessure permet de délimiter un espace vierge de cellule. Les cellules en culture vont aller coloniser cette partie vierge de toute cellule. Suivant le temps nécessaire au recouvrement de cette surface nue, l'invasivité du type cellulaire sera défini. Plus l'espace est recouvert rapidement plus le type cellulaire est dit invasif.

7.2 Description

Les cellules sontensemencées à 30 000 cellules et incubées pendant 24 h à 37°C en présence de 5% CO₂ en présence de milieu avec sérum (10 % SVF).

Au bout de 24h, la zone de blessure est créée grâce au « wound maker » qui permet de réaliser la blessure sur les 96 puits de la plaque de façon simultanée et régulière. Deux rinçages par PBS sont alors effectués afin d'éliminer les cellules décollées. Puis les traitements par saracatinib (8 concentrations : 0, 3 nM, 10 nM, 30 nM, 100 nM, 300 nM, 1 µM et 3µM) ou temsirolimus (2 concentrations : 0 ou 40 nM) sont ajoutés en présence de milieu contenant 10% de sérum. Ce nouveau milieu est additionné en hydroxyurée (HU) afin de bloquer le prolifération cellulaire.

Les plaques sont ensuite placées à 37°C, 5% de CO₂, dans le vidéo microscope qui permet une acquisition en cinétique en contraste de phase (plateforme de « Long term time-lapse imaging »). Une image est prise toutes les 2 heures, jusqu'à un temps de 48 heures.

Chaque condition, est testée en duplicata.

Pour la migration en déprivation de sérum.

Après 24 heures de culture avec sérum, ors de la création de la zone de blessure, le milieu de culture est remplacé par du milieu sans sérum, puis les cellules sont à nouveaux incubées 24 heures à 37°C, 5% de CO₂.

7.3 Expression des résultats

Le paramètre mesuré est la « relative wound density », qui correspond à la densité de confluence dans la zone de blessure, en fonction du temps. Cette densité représente le pourcentage d'envahissement de la blessure exempte de la multiplication. Plus la densité de confluence est importante plus les cellules ont occupées l'espace vide. La densité de confluence est donc le reflet de la vitesse de migration, et donc de la capacité migratoire des cellules.

PARTIE 4 : RESULTATS

1 Mise en évidence de l'expression de la protéine TWIST1 dans les lignées cellulaires de vessie

Dans le but de comprendre si Twist1 pouvait être une cible potentielle dans le cancer de la vessie, nous avons choisi dans un premier temps de caractériser l'expression de la protéine Twist1 dans 7 lignées de vessie.

1.1 Western blot

Nous avons réalisé un western blot sur les extraits protéiques issus de 7 lignées cellulaires de vessie (EJ, JMSU1, T24, TCCSUP, SD48, SW780 et J82).

Après révélation, nous n'avons mis en évidence aucune expression de la protéine Twist1. Nous nous sommes donc posé différentes questions, nous amenant à tester certains paramètres qui pourraient expliquer l'absence de protéine dans un western blot.

1.1.1 Méthode d'extraction

Une des raisons les plus fréquentes pouvant expliquer l'absence de détection de protéines en western blot est la méthode de l'extraction protéique. Nous avons donc choisi de comparer deux méthodes d'extraction, celle au RIPA, et la méthode dite de « congélation/décongélation », sur deux lignées cellulaires : JMSU1 et EJ.

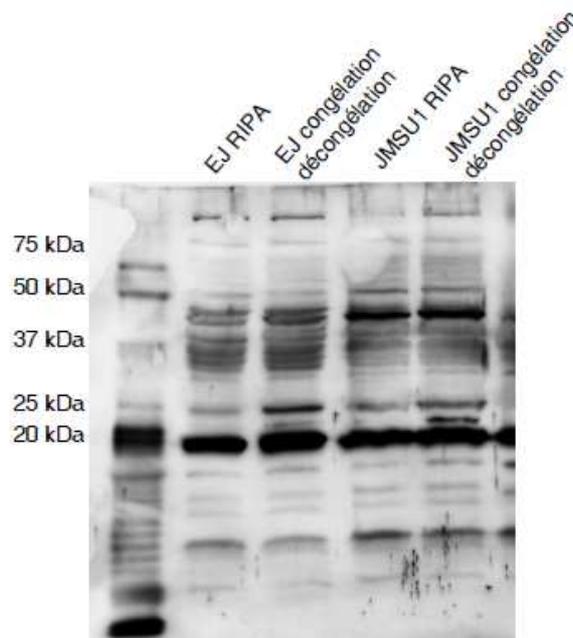


Figure 1: Western Blot Twist1 - Comparaison des méthodes RIPA vs « congélation/décongélation », sur les lignées cellulaires JMSU1 et EJ. (Dépôt de 100µg d'extrait par puits).

Les 2 techniques d'extraction utilisées sur les lignées cellulaires JMSU1 et EJ, ne nous ont pas permis de montrer une différence au niveau des protéines extraites et analysées en western blot. Quelque soit la technique utilisée de nombreuses bandes aspécifiques étaient présentes.

Aucune des 2 méthodes utilisées ne nous a permis d'identifier précisément la bande correspondant à la protéine Twist1.

La technique d'extraction au RIPA étant celle la plus retrouvée pour extraire la protéine Twist1 dans la bibliographie, nous avons décidé de poursuivre nos investigations en utilisant cette méthode d'extraction.

1.1.2 Quantité de protéines déposée

Une autre hypothèse pouvant expliquer l'absence de détection en western blot de la protéine Twist1 est la quantité d'extrait protéique déposé, qui peut être trop faible.

Nous avons réalisé des dépôts de protéines de quantités différentes. 50 μ g, 70 μ g et 100 μ g de protéines pour les différentes lignées J82, EJ, JMSU1, T24, SD48, SW780 et TCCSUP.

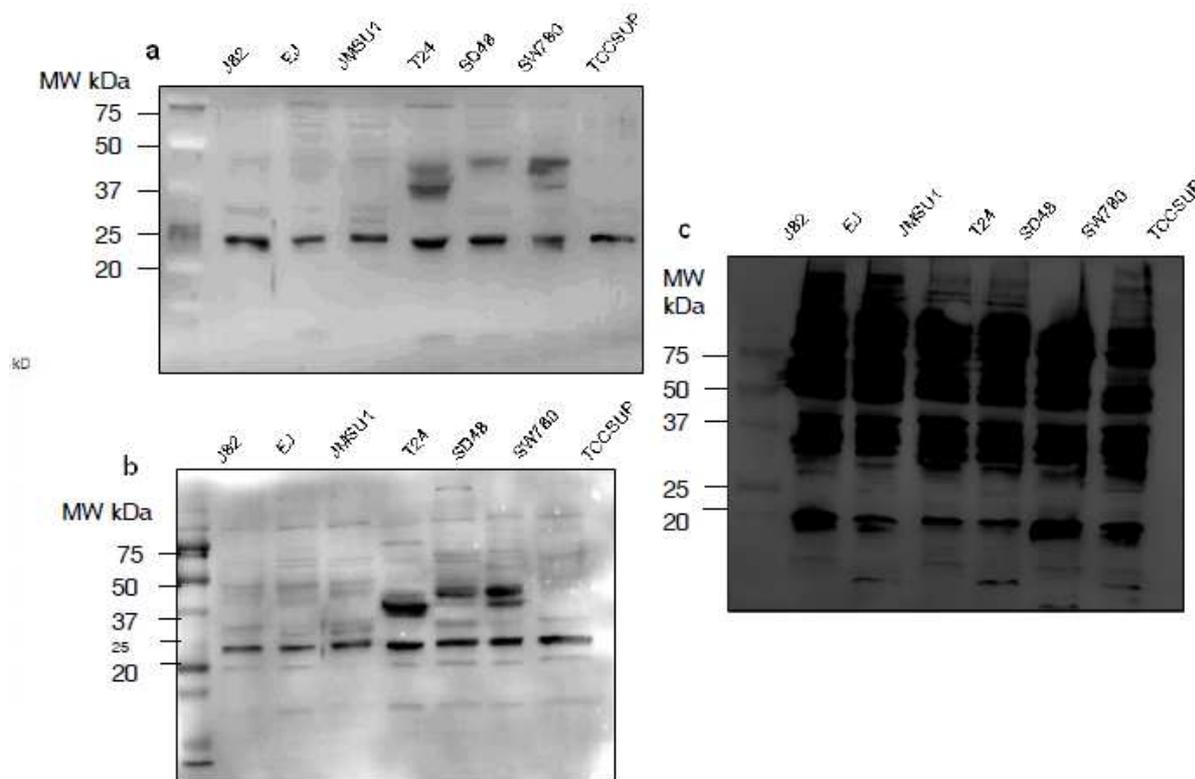


Figure 2 : Western Blot Twist1. a) dépôt de 50 μ g d'extrait protéique. b) dépôt de 70 μ g d'extrait protéique. c) dépôt de 100 μ g d'extrait protéique.

Le dépôt de 100 μ g de protéine est trop important, car le western blot apparait saturé après révélation. La quantité 100 μ g a donc été exclue. Le dépôt à 50 μ g présente moins de bandes aspécifique et n'apparait pas saturé, cependant aucune ne possède un poids moléculaire pouvant correspondre à celui de Twist1 (28 kDa). Le dépôt à 70 μ g présente de nombreuses bandes dont certaines sont présentes entre les poids 25 et 30 kDa.

Quelque soit la quantité d'extrait protéique déposée, la protéine Twist1 n'a pu être mise en évidence. Cependant pour la suite des expériences nous avons choisi de faire des dépôts à 70 μ g.

1.1.3 Dégradation intracellulaire

Une autre hypothèse repose sur la dégradation de la protéine Twist1. En effet différents mécanismes peuvent être responsables de la dégradation rapide de la protéine. Ces mécanismes impliquent notamment le cycle du protéasome.

Nous avons donc choisi d'inhiber le système protéasome à travers l'utilisation d'un peptide aldéhyde inhibiteur spécifique le MG132®. Les cultures cellulaires ont été traitées avec une solution de MG132-DMSO avec une concentration à 25µM en MG132®.

Pour cela les cultures cellulaires ont été traitées à une concentration de 25 µM de MG132®. Puis les protéines ont été extraites par la méthode de RIPA et 70µg ont été déposés.

Dans ces conditions nous n'avons pas observé de différence d'expression protéique entre la condition contrôle et la condition traitée par MG132® et non traités, dans la zone d'intérêt (20-25 kDa). L'absence de bande à la taille correspondant à la protéine Twist1 ne semble donc pas être reliée à la dégradation par le protéasome.

Les résultats ne sont pas présentés.

1.1.4 Lignée cellulaire « Témoin positif »

Devant le grand nombre de bandes aspécifiques il nous était difficile d'identifier la protéine Twist1 avec certitude. Nous avons donc recherché dans la littérature un témoin positif de lignées cellulaires à l'expression de la protéine Twist1 en western blot. La lignée PC3 de cancer de prostate possède une protéine Twist1 détectable [188,195]. L'utilisation d'extrait protéique de cette lignée nous a donc servi de témoin positif pour contrôler la taille à laquelle nous devons attendre in signal Twist1.

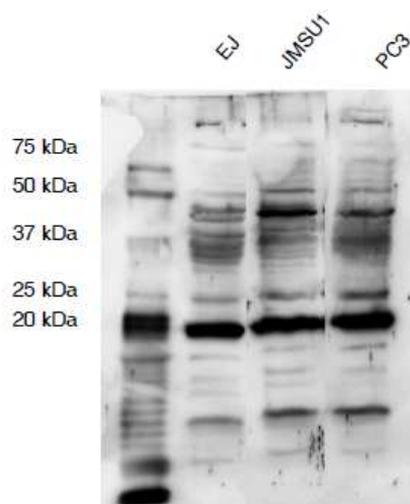


Figure 3 : Western blot Twist1- révélation par l'anticorps anti Twist1 de chez ABCAM-extrait protéique réalisé à l'aide de la méthode par RIPA, dépôt de 100µg de protéines.

La figure 3 montre, une fois encore, la présence de nombreuses bandes aspécifiques, ce qui ne permet pas d'identifier avec certitude la bande correspondant à la protéine Twist1. De plus, dans le puits correspondant à l'extrait protéique issu de la lignée PC3, aucune bande ne paraît être surexprimée dans la zone correspondant à la taille de Twist1 (20-25kDa). L'absence pour le témoin positif nous a donc conduit à envisager un problème de révélation lié à l'anticorps utilisé.

1.1.5 Optimisation de la détection par l'anticorps primaire anti-Twist1

Nous avons donc testés différents anticorps utilisés dans la littérature pour la protéine Twist1. Principalement des anticorps du laboratoire Santa Cruz : le sc81417, et le sc15393 ainsi que d'autres non utilisés dans la littérature, des laboratoires ABCAM ab50581, et ABCAM ab49254, ABNOVA Ab (D01P).

L'anticorps sc81417 ne montrait qu'une seule bande qui aurait pu être Twist1 mais qui ne migrerait pas au bon poids moléculaire. L'anticorps ab50581 présentait trop de bandes aspécifiques. L'anticorps ab49254 ne permettait de détecter aucune bande. Les anticorps sc81417 et ab49254, ab50581 n'ont donc pas permis la détection de la protéine Twist1.

Seul l'anticorps sc15393 semblait spécifique de la protéine Twist1.

Nous avons choisi de tester plusieurs dilutions de l'anticorps primaire sc15393: 1/1000^{ième}, 1/500^{ième} et 1/250^{ième}. Les extraits protéiques ont été obtenus par la méthode d'extraction au RIPA et déposés sur un gel d'acrylamide à 12%.

A l'issue de ces westerns blot nous avons conclu que nous utiliserions l'anticorps antiTwist1 de chez Santa Cruz Sc 15393, à la dilution 1/250^{ième}. Ces conditions nous ont permis de distinguer une bande pouvant correspondre à la protéine Twist1. (figure4)

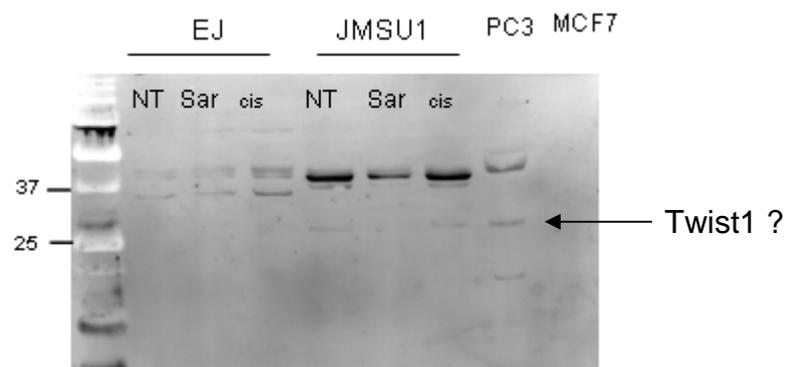


Figure 4 : Western blot Twist1- Lignées EJ et JMSU1 soumis à différents traitements (NT : cellules non traitées, Sar : traitement par le saracatinib, Cis : traitement par le cisplatine) - Lignée PC3 (contrôle positif de Twist1) - Lignée MCF7 (contrôle négatif de Twist1)- révélation par l'anticorps anti-Twist1 sc15393

1.1.6 Validation de l'anticorps choisi

Afin de vérifier la spécificité de l'anticorps anti-Twist1 sc15393, nous avons réalisé une transfection des cellules par un plasmide Twist1-Flag.

Nous avons choisi de transfecter la lignée JMSU1 qui était la lignée dans laquelle nous pensions pouvoir identifier la protéine Twist1, d'après le résultat du western blot présenté en Figure 4. La lignée JMSU1 a été transfectée par le vecteur Twist1-Flag en présence d'Exgène®. 70µg d'extraits protéiques issus des lignées TCCSUP, EJ, JMSU1, J82, SD48, T24 ainsi que la lignée JMSU1 transfectée par Twist1-Flag ont été déposés.

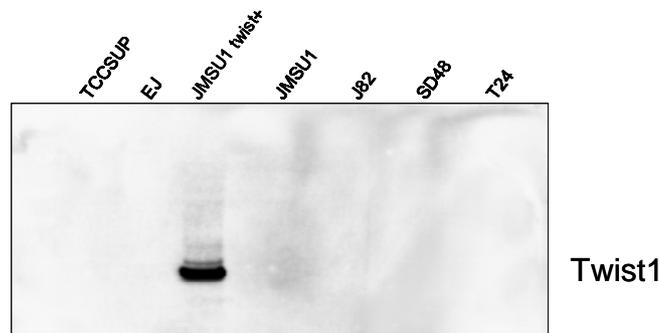


Figure 5 : Western blot Twist 1- Révélation avec l'anticorps sc 15393 dilué au 1/250^{ième}

Comme le montre la Figure 5, une seule bande est bien détectée dans la lignée JMSU1 transfectée par le vecteur Twist1-Flag lorsque l'anticorps anti-Twist1 sc15393 à la dilution de 1/250^{ième} est utilisé. Par ailleurs, cette bande était strictement superposable à celle obtenue avec l'anticorps anti-Flag dilué au 1/400^{ième} (résultat non présenté). Ce résultat nous permet donc de valider la spécificité de l'anticorps sc15393. Cependant, comme nous l'observons sur la Figure 5, aucune bande n'est détectée dans les autres lignées non transfectées. Ces conditions expérimentales ne nous permettent donc pas de mettre en évidence l'expression de la protéine Twist1.

D'autre part, d'autres western blot, réalisé dans les mêmes conditions expérimentales ne nous ont pas permis de reproduire la mise en évidence de l'expression de la protéine Twist1 à l'état basal. Nous avons donc été contraints d'abandonner cette méthode de détection, ne sachant pas s'il s'agissait d'un artefact ou d'une véritable détection.

D'après la littérature, il n'y a que de très rares exemples de western blot permettant de détecter l'expression endogène de la protéine du Twist1. Ce constat tend donc à renforcer l'hypothèse que la protéine Twist1 est quasiment impossible à détecter à l'état basal en utilisant la méthode de western blot. Nous nous sommes donc orientés d'autres moyens exploratoires.

1.2 Immunofluorescence

La méthode du western blot n'étant pas concluante, nous avons choisi de caractériser l'expression de la protéine Twist1 in situ par immunofluorescence.

Nous avons choisi de développer 2 techniques d'immunofluorescence.

Dans une première approche quantitative nous avons mis en culture dans des boîtes 96 puits spécifiquement utilisées pour l'ICys (microscope confocal à balayage laser), 4 types de

lignées : EJ, JMSU1, SD48 et Sw780. Après plusieurs essais sur les anticorps, les concentrations utilisées et les modalités de fixation, le protocole suivant a été choisi : fixation au formaldéhyde 4%, après 24h, suivi d'une perméabilisation au Triton 100X. Le marquage a été effectué par l'anticorps anti-Twist1 Santa Cruz sc81417 (l'autre anticorps Santa Cruz sc15393 ne donnant aucun signal en immunofluorescence).

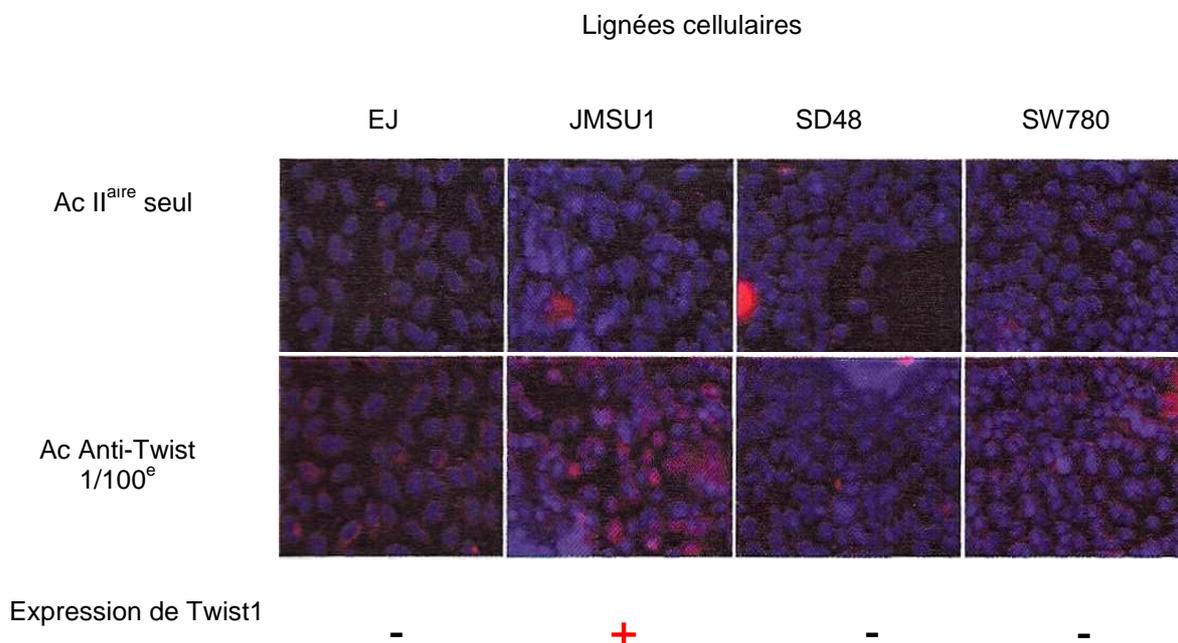


Figure 6 : Cytométrie à balayage laser Twist1 - Lignées cellulaires de vessie : EJ, JMSU1, SD48 et SW780- détection par l'anticorps anti-Twist1 sc81417)

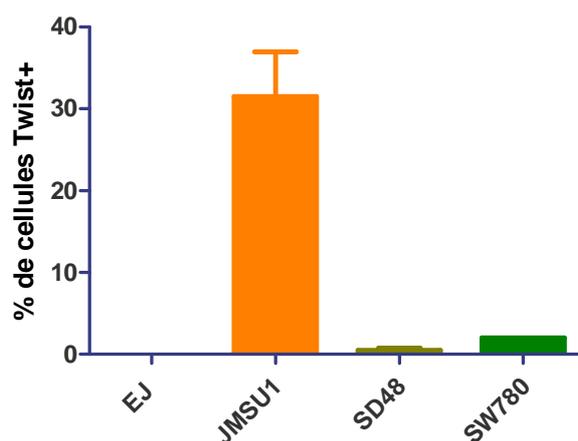


Figure 7 : Quantification de l'expression de la protéine Twist1 à partir de l'immunofluorescence obtenue en ICys, (% de cellules marquées sur la population cellulaire totale)

Comme le montre la figure 6, seule la lignée JMSU1 présente une faible expression de la protéine Twist1 dans ces conditions expérimentales, Les autres lignées, EJ, SW780, SD80,

TCCSUP, J82 et T24 se sont révélées négatives (seuls les résultats pour les lignées JMSU1, EJ, SD48 et SW780 sont montrés).

La normalisation du niveau d'expression de la protéine Twist1 dans la lignée JMSU1 permet de conclure que 30% de la population cellulaire exprime la protéine Twist1. L'expression de Twist1 n'est pas donc pas uniforme au sein de la population des cellules JMSU1, certaines cellules expriment fortement Twist1, d'autres plus faiblement et beaucoup ne l'expriment pas.

Nous avons donc réalisé des images de meilleure résolution au microscope confocal. Le marquage primaire utilise l'anticorps anti-Twist1 Santa Cruz sc81417 et le marquage secondaire utilise un anticorps anti-souris marqué au fluorochrome vert (Alexa488). Les noyaux sont marqués à l'Hoescht.

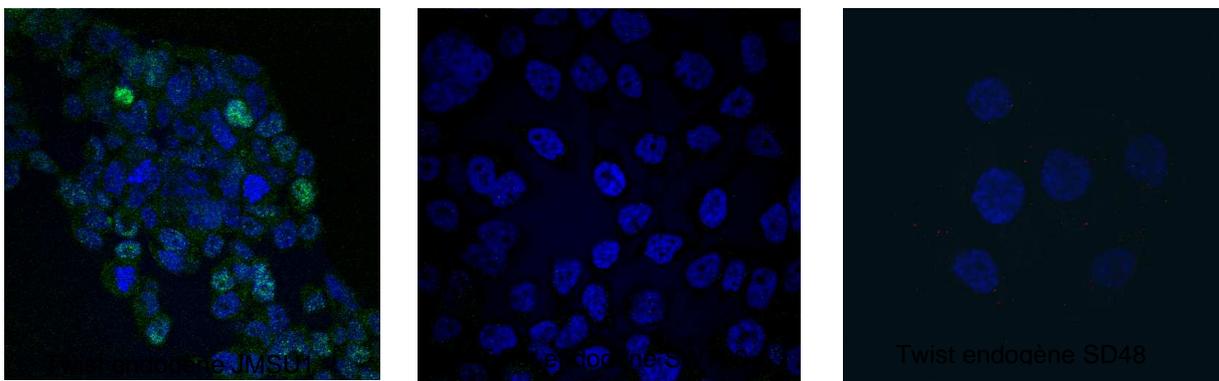


Figure 8 : Immunofluorescence - Marquage Alexa 488 (vert) de la protéine Twist1 (sc81417)-Fixation au formaldéhyde 4%, perméabilisation au Triton 100X

Comme observé sur la figure 8, un marquage correspondant à la protéine Twist1 n'est observé que dans la lignée JMSU1 (absence de marquage pour les lignées SW780 et SD48). Cela permet donc de confirmer les résultats obtenus précédemment.

Par ailleurs, cette expérience nous permet de confirmer que l'expression de Twist1 au sein de la lignée JMSU1 est bien hétérogène. De plus, la protéine Twist1 semble majoritairement localisée au niveau du cytoplasme, et de manière plus rare au niveau du noyau. Cette localisation nucléaire de la protéine Twist1 est en accord avec son rôle de facteur de transcription.

Les lignées SW780 et SD48 n'expriment pas la molécule Twist1 et ce qui confirme les résultats obtenus en western blot. La lignée JMSU1 exprime faiblement la protéine Twist1. L'expression se fait de façon hétérogène au sein de la population des JMSU1, de nombreuses cellules n'expriment pas Twist1 et il semble qu'il y ait plusieurs niveau d'expression de Twist1. De plus, l'expression de Twist1 semble être principalement cytoplasmique, mais dans certains cas, elle peut être nucléaire.

1.3 RT-QPCR

La méthode de western blot ne permet pas d'identifier clairement l'expression de la protéine Twist1. Le marquage en immunofluorescence étant un marquage faible nous avons choisi de valider nos résultats à l'aide de la méthode de RT-QPCR, pour quantifier le niveau d'ARNm du gène Twist1.

Pour cela nous avons développé une méthode de RT-qPCR. L'ARNm a été extrait puis soumis à une reverse transcriptase pour donner un ADNc à l'aide du kit Quiagen®. Puis l'ADNc a été soumis à une PCR en temps réel, mettant en évidence le gène Twist1.

Le contrôle positif était réalisé par la lignée JMSU1 transfectée par le vecteur codant pour la protéine de fusion Twist1-Flag. Les lignées étaient considérées comme positives si l'ADNc de Twist1 apparaissait avant 30 cycles, d'amplification.

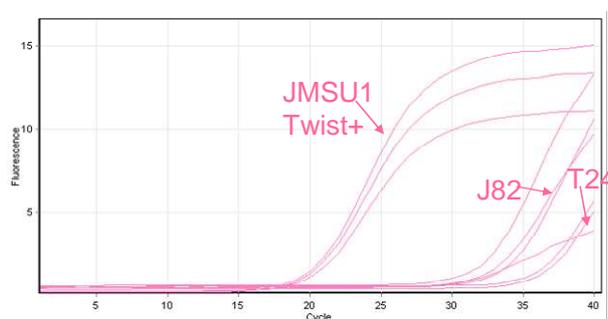


Figure 9 : RT-qPCR sur les lignées J82, T24 et JMSU1 - Quantité d'amplification correspondant au gène Twist1 (correspondant à la fluorescence) en fonction du nombre de cycles de PCR. (Les contrôles réalisés sur les gènes de ménage GAPDH et 18S, ne sont pas représentés.)

La valeur « Ct » (Threshold cycle) représente le seuil à partir duquel la fluorescence apparaît. La valeur du Ct est proportionnelle au nombre de copies de l'ADN amplifié présentes au départ dans l'échantillon. L'analyse par le logiciel Rotorgene, nous a permis d'obtenir les valeurs Ct1 et Ct2 pour chaque lignée. A l'intérieure de chaque lignée, nous avons différencié les valeurs Ct1 et Ct2 pour le gène de ménage choisi GAPDH, et les valeurs Ct1 et Ct2 pour le gène étudié Twist1.[305]

Nous avons utilisés la technique du $\Delta\Delta Ct$ qui est une quantification relative.

La valeur $\Delta Ct1$ est obtenue par soustraction du Ct1 du gène de ménage(GAHP) au Ct1 du gène d'intérêt (Twist1), pour la lignée étudiée

La valeur $\Delta Ct2$ est obtenue par soustraction du Ct2 du gène de ménage(GAHP) au Ct2 du gène d'intérêt (Twist1), pour la lignée positive pour twist1 soit ici JMSU1 transfectée Twist1.

La valeur $\Delta\Delta Ct$ est obtenue en soustrayant $\Delta Ct1$ à $\Delta Ct2$.

La valeur Différentiel (Diff) est égale à $Diff = 2^{(-\Delta\Delta Ct)}$

Reference genes						
T24-GAPDH	CT 1	12,60				
JMSU1Twist-GAPDH	CT 2	13,70				
Test genes			Diff	Δ CT1	Δ CT 2	Δ CT2 - Δ CT 1
T24-Twist	CT 1	32,80				
JMSU1Twist-Twist	CT 2	16,90	131072,00	20,20	3,20	-17,00

Reference genes						
J82-GAPDH	CT 1	13,00				
JMSU1Twist-GAPDH	CT 2	13,70				
Test genes			Diff	Δ CT1	Δ CT 2	Δ CT2 - Δ CT 1
J82-Twist	CT 1	29,80				
JMSU1Twist-Twist	CT 2	16,90	12416,75	16,80	3,20	-13,6

Reference genes						
EJ-GAPDH	CT 1	12,00				
JMSU1Twist-GAPDH	CT 2	13,70				
Test genes			Diff	Δ CT1	Δ CT 2	Δ CT2 - Δ CT 1
EJ-Twist	CT 1	31,65				
JMSU1Twist-Twist	CT 2	16,90	89524,81	19,65	3,20	-16,45

Reference genes						
SD48-GAPDH	CT 1	11,90				
JMSU1Twist-GAPDH	CT 2	13,70				
Test genes			Diff	Δ CT1	Δ CT 2	Δ CT2 - Δ CT 1
SD48-E-Twist	CT 1	29,60				
JMSU1Twist-Twist	CT 2	16,90	23170,48	17,70	3,20	-14,5

Reference genes						
SW780-GAPDH	CT 1	11,80				
JMSU1Twist-GAPDH	CT 2	13,70				
Test genes			Diff	Δ CT1	Δ CT 2	Δ CT2 - Δ CT 1
SW780-E-Twist	CT 1	30,70				
JMSU1Twist-Twist	CT 2	16,90	53231,77	18,90	3,20	-15,7

Reference genes						
JMSU1-GAPDH	CT 1	11,20				
JMSU1Twist-GAPDH	CT 2	13,70				
Test genes			Diff	Δ CT1	Δ CT 2	Δ CT2 - Δ CT 1
JMSU1-Twist	CT 1	27,80				
JMSU1Twist-Twist	CT 2	16,90	10809,41	16,60	3,20	-13,4

Tableau 1: valeurs des RT-QPCR réalisées pour le gène d'intérêt Twist1, sur les lignées JMSU1, SD48, SW780, EJ, T24 et J82

Les lignées EJ, J82, T24, SD48 et SW780 présentent un différentiel d'expression par rapport au témoin positif JMSU1 transfecté Twist1-Flag très élevé. Elles peuvent être considérées négatives pour l'expression de Twist1. Ces résultats confirment nos résultats d'immunofluorescence et de western-blot pour l'absence de Twist1 dans les lignées SD48, SW780, EJ, T24 et J82 et sa très faible expression dans les lignées JMSU1.

1.4 Conclusion

Les lignées de tumeur de vessie sont donc négatives en western blot pour Twist1, sauf la lignée JMSU1 qui apparaît faiblement positive mais dont le résultat n'a pas été reconfirmé par western blot.

Dans un deuxième temps des immunofluorescences ont été réalisées sur les différentes lignées de cancers de la vessie. La seule lignée apparaissant positive pour l'expression de la protéine Twist1 est là aussi JMSU1. Cependant, l'expression de Twist1 dans cette lignée, n'est pas homogène ce qui laisse penser que seules certaines cellules sont capables d'exprimer Twist1. Nos résultats sont en accord avec les travaux d'immunohistochimie réalisés sur des tumeurs de vessie (Thèse d'exercice de Marc Vergnolles 2010). Après la réalisation d'une immunohistochimie de Twist1, le nombre de cellules marquées est extrêmement faible, au sein de la population tumorale. Le marquage était considéré comme positif si au moins 1 cellule était marquée. Ainsi 21 tumeurs sur 23 ont été considérées comme positives, alors qu'elles n'exprimaient des quantités de Twist1 très faibles.

En conclusion de cette première partie, l'expression de la protéine Twist1 n'est présente que dans un seul type de lignée, ce qui ne permet pas de généraliser à l'ensemble des tumeurs de vessie. La faible expression de la protéine Twist1 au sein de la seule lignée l'exprimant et son hétérogénéité au sein de la même lignée n'en font pas un facteur diagnostique ou une cible thérapeutique. Donc pour répondre à notre première hypothèse : Twist1 ne peut pas être une cible ni un facteur diagnostique.

2 Caractérisation de 7 lignées cellulaires de vessie

Twist1 ne représentant pas un facteur diagnostique ni une potentielle cible thérapeutique, nous nous sommes tournés vers l'étude d'autres facteurs impliqués dans l'EMT : E-cadhérine, N-cadhérine et vimentine. Nous nous sommes donc intéressés à l'expression de ces différents marqueurs de l'EMT, dans les différentes lignées de cancer de vessie dont nous disposons. Nous avons choisi les lignées EJ, J82, SD48, SW780, T24, JMSU1 et TCCSUP dont les principales caractéristiques sont détaillées dans le tableau ci-dessous [306-309]. La lignée TCCSUP, suivant les articles, exprime ou non la E-cadhérine. De ce fait elle est classée dans soit en les lignées épithéliales non invasives soit en lignées mésenchymateuses faiblement invasives.

Lignée	Phénotype	Twist1	p53	E cad	N cad	Vimentine	Autres
J82	mésenchymateuse invasive	+	Mutation Délétion	-	+	+	Formation de colonies en agar mou Non tumorigénique MDM2 + Rb-
EJ	mésenchymateuse invasive		Mutation faux sens	-	+	+	Formation de colonies en agar mou Tumorigénique
T24	mésenchymateuse invasive	+	Délétion	-			Formation de colonies en agar mou Non tumorigénique Rb +
JMSU1	mésenchymateuse invasive						Formation de colonies en agar mou Non tumorigénique
TCCSUP	épithéliale non invasive ou mésenchymateuse invasive		Mutation non sens	-/+	+	-	Non tumorigénique MDM2 + Rb-
SD48	épithéliale non invasive			+	-		
SW780	épithéliale non invasive			+	-		

Tableau n° : données bibliographiques des lignées choisies.

2.1 Caractérisation des lignées de cancer de la vessie pour les marqueurs de l'EMT

Dans un premier temps nous avons caractérisé les lignées cellulaires de vessie, pour les différents marqueurs épithéliaux (E-cadhérine) et mésenchymateux (N-cadhérine, vimentine). Le western blot a été réalisé sur les 7 lignées cellulaires JMSU1, SD48, SW780, T24, J82, TCCSUP et EJ. La migration s'est faite sur un gel acrylamide 12%. L'anticorps anti-E-cadhérine, anti-N-cadhérine ou anti-vimentine est déposé sur la nuit à 4°C à la dilution 1/1000^{ième}. Le lendemain, l'anticorps secondaire est déposé au 1/10000^{ième}, et les membranes sont révélées à l'aide de la solution Millipore®.

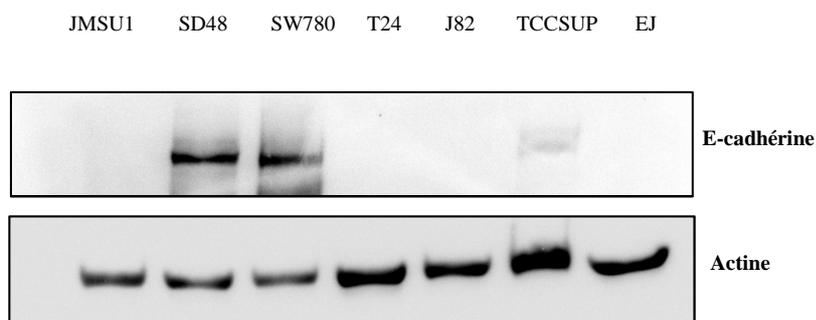


Figure 10 : Western blot E-cadhérine- 7 lignées de cancer de la vessie

La figure 10 montre que les lignées SD48, SW780 et TCCSUP sont positives pour l'expression de la protéine E-cadhérine. Les lignées SD48 et SW780 expriment fortement la protéine E-cadhérine, alors que la lignée TCCSUP exprime la protéine E-cadhérine dans des proportions beaucoup moins importantes. Les lignées JMSU1, T24, J82 et EJ n'expriment pas la protéine E-cadhérine.

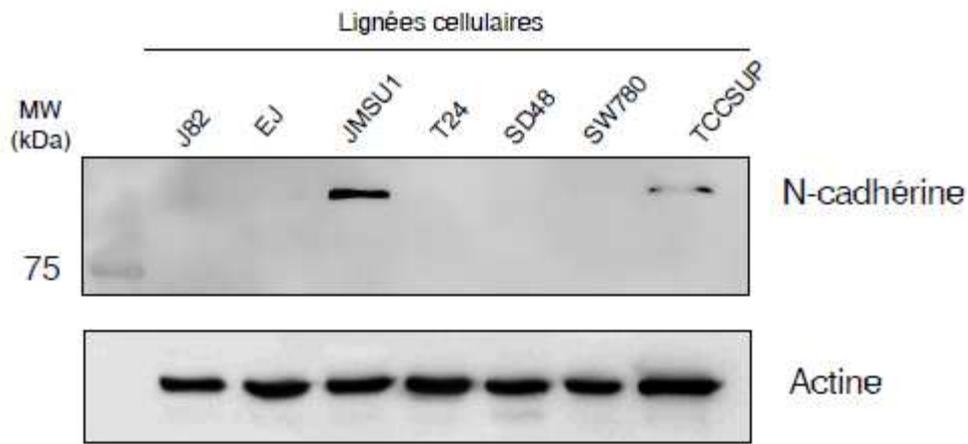


Figure 11 : Western blot N-cadhérine - 7 lignées de cancer de la vessie

La Figure 11 montre que les lignées JMSU1 et TCCSUP expriment la N-cadhérine. La lignée JMSU1 exprime fortement la N-cadhérine alors que la lignée TCCSUP exprime très faiblement la N-cadhérine. Les lignées SD48, SW780, EJ et T24 sont négatives pour l'expression de la N-cadhérine.

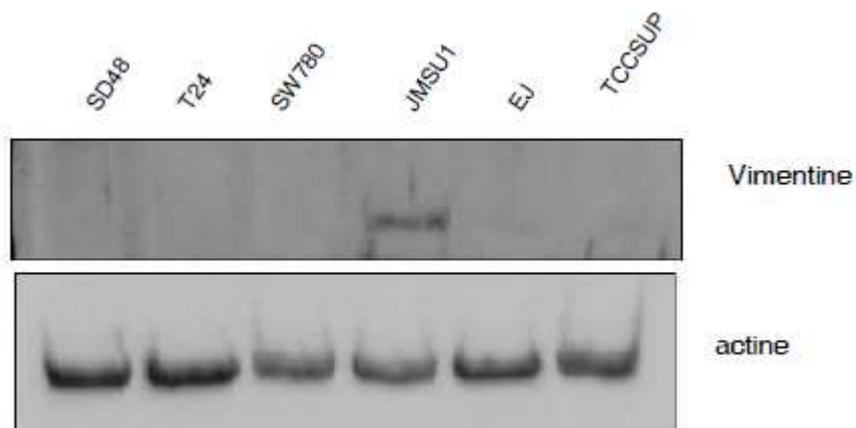


Figure 12 : Western blot vimentine - 6 lignées de cancer de la vessie

La Figure 12 montre que seule la lignée JMSU1 exprime la protéine vimentine. Les autres lignées EJ, TCCSUP, T24, SD48, SW780 et TCCSUP n'expriment pas la protéine vimentine.

Les caractéristiques des lignées EJ, J82, JMSU1, TCCSUP, T24, SD48 et SW780 ont été résumées dans le tableau 3.

Marqueurs	JMSU1	EJ	TCCSUP	T24	J82	SD48	SW780
E-cadhérine	-	-	+	-	-	+++	+++
N-cadhérine	+++	-	+	-	-	-	-
Vimentine	++	-	-	-		-	-
Morphologie ATCC	/	fibroblaste	épithéliale	épithéliale	épithéliale	/	épithéliale
Classement	mésench	mésenc.	Mésen/epi	épithéliale	épithéliale	épithéliale	épithéliale

Tableau 3: résumé des caractéristiques des 7 lignées cellulaires de cancer de la vessie et classification en type mésenchymateux ou épithélial. ; / : lignées non présentes à l'ATCC.

Les lignées exprimant la E-cadhérine sont classées en lignées épithéliales. Les lignées exprimant la N-cadhérine et la vimentine sont classées en lignées mésenchymateuses. Cependant certaines lignées sont difficilement « classables » car négatives pour tous les marqueurs étudiés. Nous nous sommes donc basés sur le phénotype décrit par l'ATCC (American Type Culture Collection): fibroblaste ou épithélial. Seules les lignées JMSU1 et SD48 ne figurent pas à l'ATCC.

Nous avons donc conclu que les cellules SD48, et SW780 exprimant la E-cadhérine et pas la N-cadhérine ni la vimentine sont des cellules de type épithéliale. La lignée JMSU1 n'exprimant pas la E-cadhérine, mais exprimant la N-cadhérine et la vimentine, est donc classée comme mésenchymateuse.

La lignée EJ est présentée comme une lignée fibroblastique, nous l'avons donc classée comme mésenchymateuse. Les lignées T24 et J82 n'expriment aucun des marqueurs et sont de phénotype épithélial. Nous les avons donc classé dans les épithéliales.

La lignée TCCSUP exprime la E-cadhérine, mais exprime aussi la N-cadhérine, et elle est décrite à l'ATCC de phénotype épithéliale, donc nous l'avons classé à cheval entre les lignées mésenchymateuses et invasives.

2.2 Caractérisation des lignées pour la cytotoxicité au cisplatine

Pour cette expérience nous avons limité l'étude à 4 lignées : 2 mésenchymateuses (EJ et JMSU1) et 2 épithéliales (SD48 et SW780).

Ces 4 lignées ont été traitées par un des médicaments de référence dans le traitement du cancer de la vessie, le cisplatine. Les 4 lignées sont traitées, en triplicate, par des doses croissantes de cisplatine pendant 72 h : 0 ; 1 ; 3 ; 5 ; 10 ; 30 ; 50 ; 100 μ M de cisplatine, et l'effet sur la viabilité cellulaire est mesuré par le test de MTT classique. Des courbes de survie, exprimant le pourcentage de cellules vivantes en fonction de la concentration en drogue ont été obtenues. La DL50 obtenue représente la dose tuant 50% des cellules pour le traitement concerné. Plus la DL50 est faible plus la lignée est sensible.

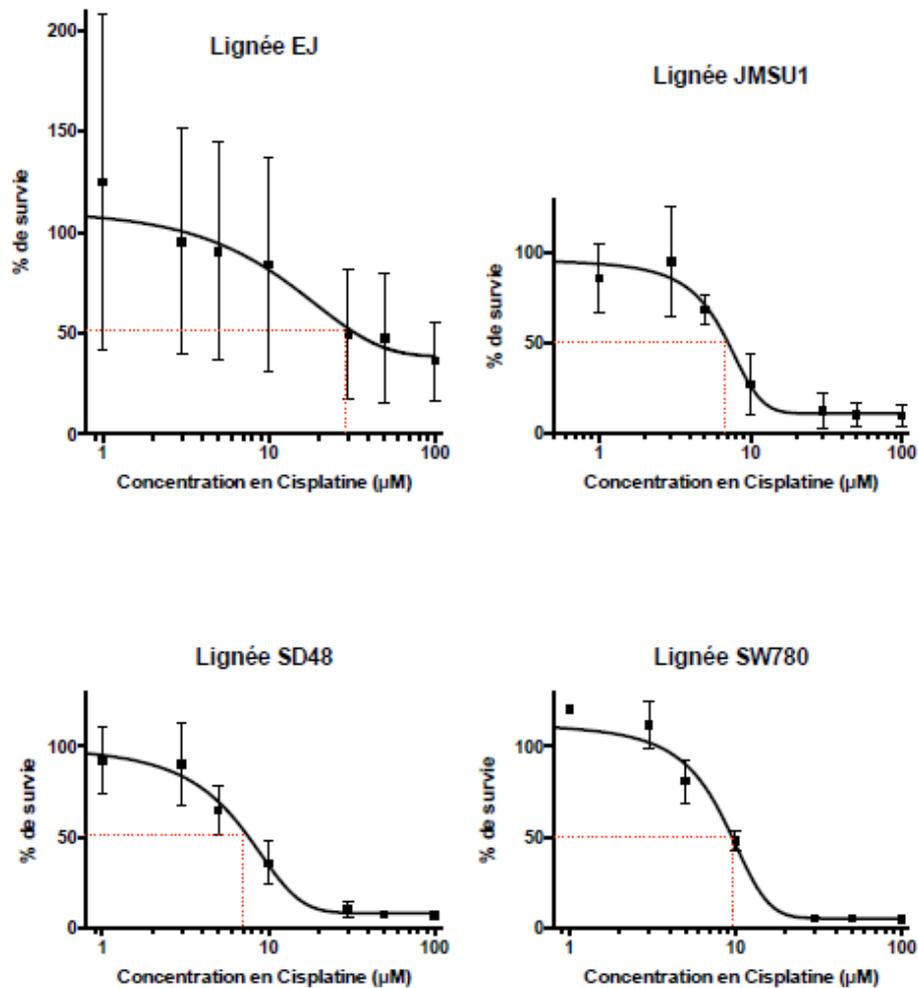


Figure 13: Test au MTT, exprimant le pourcentage de cellules vivantes en fonction de la concentration en drogue.

lignées	SD48	JMSU1	SW780	EJ
DL 50	5,86 µM	6,59 µM	8,22 µM	19,93 µM
Expression E-cadhérine	+	-	+	-

Tableau 4 : Dose de cisplatine pour laquelle 50% des cellules sont vivantes après traitement - Lignées EJ JMSU1 SD48 et SW780.

Les lignées JMSU1, SD48 et SW780 présentent une DL50 quasi-équivalente, et font preuve d'une plus grande sensibilité que la lignée EJ. Il n'y a aucune correspondance entre l'expression de la E-cadhérine ou le type de lignée et la sensibilité au cisplatine, cependant, il faudrait beaucoup plus de lignées pour pouvoir conclure. Ce résultat s'explique par le mode d'action du cisplatine qui est un agent alkylant qui se fixe au niveau de l'ADN en formant des liaisons covalentes ou adduits conduisant à la mort par apoptose de la cellule.

2.3 Caractérisation du pouvoir migratoire des 7 lignées cellulaires

Après avoir caractérisé les lignées pour 3 facteurs de l'EMT, nous avons pu les classer en lignées mésenchymateuses ou en lignées épithéliales.

Nous nous sommes posé la question de savoir quel était le pouvoir migratoire de ces lignées cellulaires. Le pouvoir migratoire étant lié au caractère invasif des cellules. L'invasivité est une des capacités acquises par les cellules lors de l'EMT. Nous souhaitons mettre en évidence un lien entre le statut EMT de ces lignées cellulaires et leur pouvoir migratoire.

2.3.1 En présence de sérum

Le pouvoir migratoire des 7 lignées cellulaires EJ, JMSUI, SD48, SW780, T24 et TCCSUP a été testée grâce au test de « wound healing », en présence de SVF (10%).

La densité cellulaire de la blessure est mesurée toutes les 2 heures jusqu'à 48 heures, elle traduit la vitesse d'envahissement de la blessure et donc le pouvoir migratoire. Un contrôle par cytochalasine D, agent déstabilisateur des microfilaments, inhibant la migration a été effectué pour chaque lignée. Ainsi pour ce témoin, l'augmentation de la densité cellulaire au niveau de la blessure, n'est causée que par la multiplication cellulaire et non par la migration cellulaire. L'effet de multiplication cellulaire reste négligeable pour certaines lignées telles T24, TCCSUP, JMSU1, SD48, SW780, mais peut être importants dans d'autres lignées telles EJ et J82.

Le temps de 12 h a été choisi pour regarder la migration des lignées, car au delà les courbes présentent un mélange de multiplication cellulaire et de migration. Ainsi la densité cellulaire sur la partie lésée est liée à la migration cellulaire et non à la multiplication de la population cellulaire.

Plus la densité relative est importante plus la vitesse de recouvrement et donc de migration est importante. La densité relative représente donc le pouvoir migratoire.

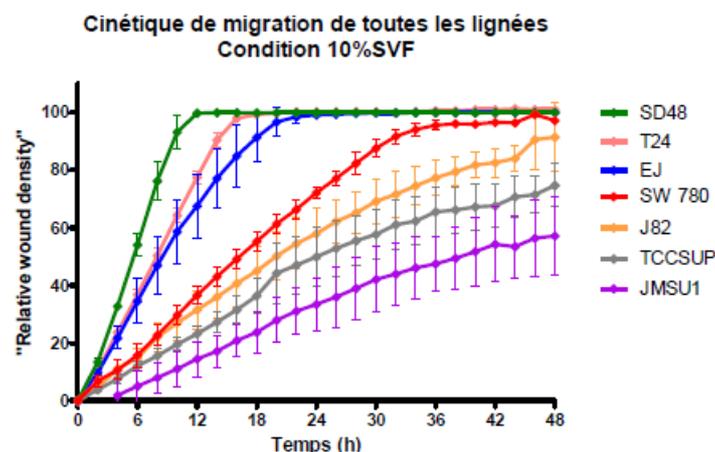


Figure 14 : Cinétique de migration de 7 lignées cellulaires de cancer de la vessie en présence de sérum. La densité cellulaire de la blessure est exprimée en fonction du temps.

En présence de sérum les cinétiques de migration des lignées sont les suivantes : SD48 migre le plus rapidement puis viennent ensuite les lignées T24 et EJ, puis suivent les lignées SW780 et J82, TCCSUP et enfin JMSU1 qui est la lignée la moins invasive. Il est surprenant de voir que les lignées épithéliales migrent plus vite que les lignées mésenchymateuses. Nous nous

attentions à ce que les lignées E-cadhérine négatives, classées en mésenchymateuses migrent le plus vite.

Lignée	SD48	T24	EJ	SW780	TCCSUP	J82	JMSU1
Densité relative de recouvrement	100	77.5	67.6	36.6	23.77	18	17.7
E-cadhérine	+++	-	-	+++	+	-	-

Tableau 5 : Densité relative de recouvrement en fonction des lignées, traduisant leur caractère invasif, à 12heures en présence de milieu avec sérum

En conclusion, en présence de sérum, il n’y a pas de corrélation entre le statut mésenchymateux/épithéliale des lignées de cancer de vessie et le pouvoir migratoire des cellules.

2.3.2 En l’absence de sérum

Devant cette absence de corrélation, nous avons réalisés la même expérience en l’absence de sérum qui est connu pour ses propriétés chemoattractantes, pouvant favoriser et introduire un biais dans la mesure de ce paramètre.

Le pouvoir migratoire des ces 7 lignées cellulaires EJ, JMSUI, SD48, SW780, T24 et TCCSUP a donc été mesuré grâce au test de « wound healing », en absence de SVF (10%).

La densité relative cellulaire de la blessure est mesurée toutes les 2 heures jusqu’à 48 heures, et traduit la capacité de migration des lignées. La multiplication cellulaire en milieu 0% de sérum est négligeable contrairement à la condition 10% sérum, mais nous avons maintenu les mêmes conditions d’expérience. Un contrôle par cytochalasine D, agent déstabilisateur des microfilaments, inhibant la migration a été effectué pour chaque lignée

Le temps de 12 h a été choisi pour étudier la migration cellulaire. Ainsi la densité cellulaire sur la partie lésée est liée à la migration cellulaire et non à la multiplication de la population cellulaire.

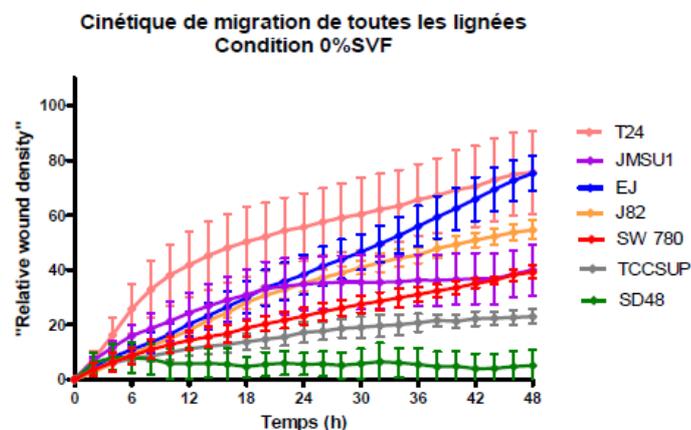


Figure 15: Cinétique de migration de 7 lignées cellulaires de cancer de la vessie en l’absence de sérum. La densité cellulaire de la blessure est exprimée en fonction du temps.

Lignées	T24	J82	JMSU1	EJ	SW780	TCCSUP	SD48
Densité relative de recouvrement	41.8	31.5	24.3	20.2	14.2	11.24	5.8
E-cadhérine	-	-	-	-	+++	+	+++

Tableau 4 : Densité relative de recouvrement en fonction des lignées, traduisant leur caractère invasif, à 12 heures en l'absence de sérum, et expression de la E-cadhérine.

En l'absence de sérum, la lignée migrant le plus vite est T24 suivie de JMSU1 puis de EJ, ensuite viennent J82 puis SW780, et pour terminer TCCSUP et SD48 sont les moins rapides. Ces résultats sont en adéquation avec ce qui était attendu. Les lignées E-cadhérine négatives (T24, J82, JMSU1, EJ) possède le pouvoir migratoire le plus important, alors que les lignées E-cadhérine positives (SW70, SD48 et TCCSUP) sont les lignées les moins rapides.

2.3.3 Comparaison en présence de sérum et en l'absence de sérum

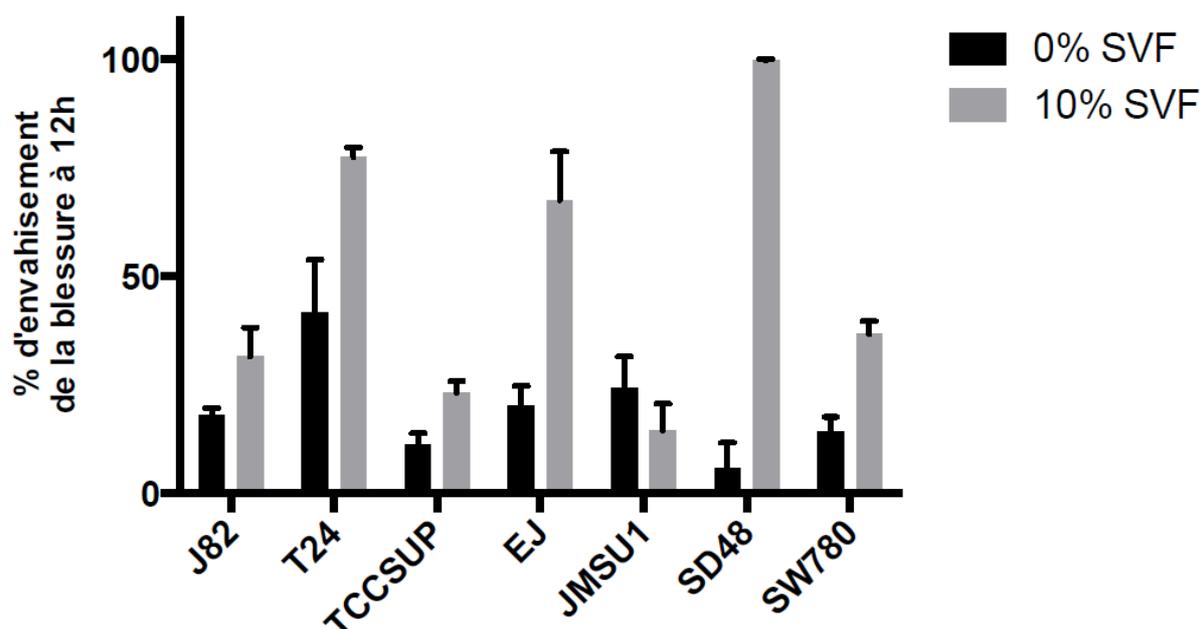


Figure 16 : Courbes représentant la densité cellulaire de la blessure, en présence ou en l'absence de sérum pour chaque lignée au temps 12 heures.

Pour certaines lignées, les vitesses de migration sont très différentes en présence ou en absence de sérum de veau fœtal 10%. Dans le cas de la lignée épithéliale SD48, la capacité migratoire est complètement inhibée en l'absence de sérum, ce qui montre que la capacité de migration de la cellule est basée sur des composés attracteurs présents dans le sérum et non sur le potentiel migratoire seul de la lignée.

De plus, en l'absence de sérum, les lignées migrant le moins vite sont les lignées SW780, TCCSUP et SD48. Ces mêmes lignées sont les lignées qui expriment la E-cadhérine. Il semble donc y avoir un lien entre l'expression de la E-cadhérine et la capacité migratoire. Les lignées exprimant la E-cadhérine, possèdent la vitesse de migration la plus faible et les lignées n'exprimant pas la E-cadhérine possèdent les vitesses de migration les plus importantes.

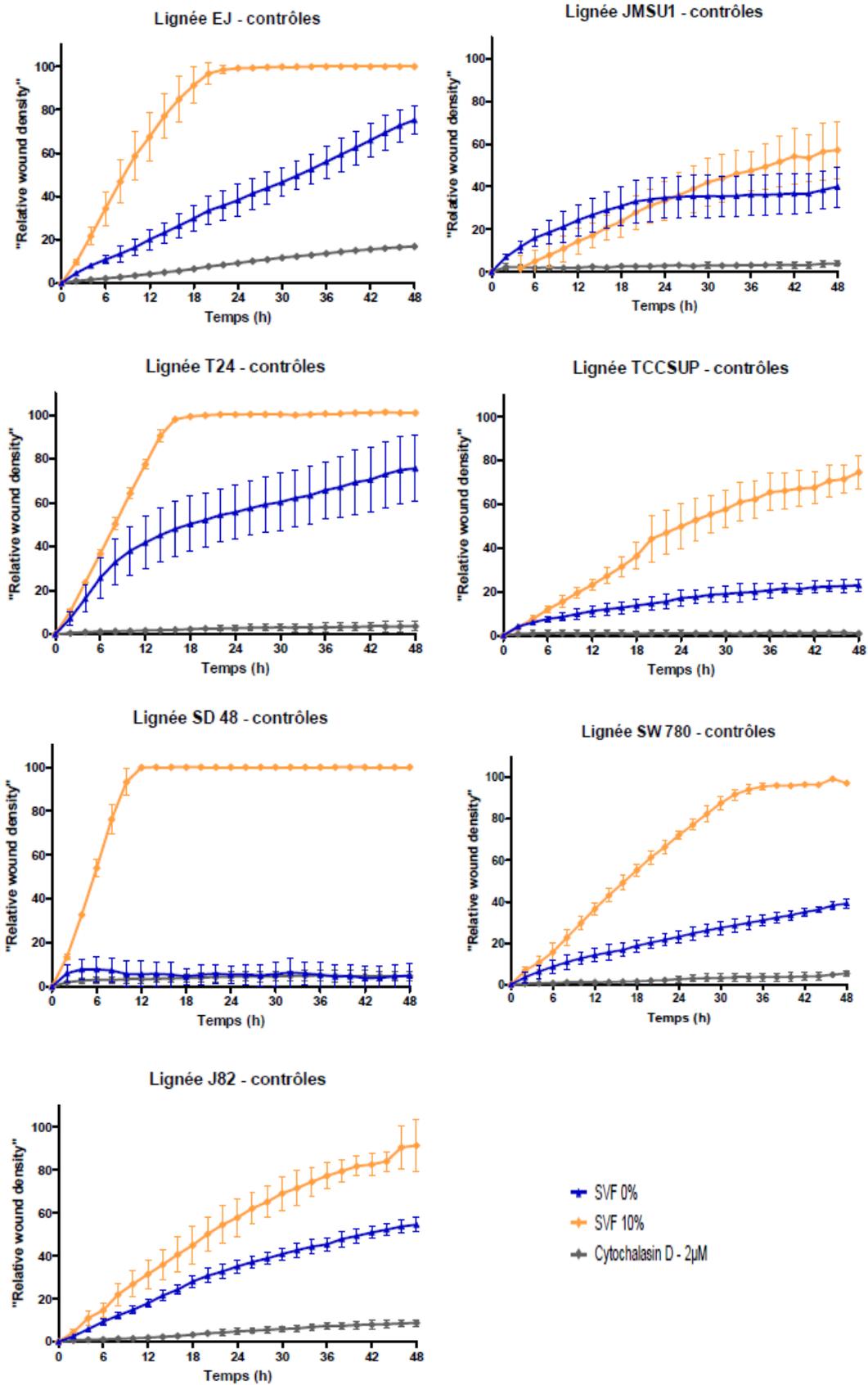


Figure 17: Courbes représentant la densité cellulaire de la blessure, en fonction du temps écoulés, en présence ou en l'absence de sérum.

3 Effet du traitement par Saracatinib sur le phénotype des lignées cellulaires de vessie

Le saracatinib (AZD0530) est un inhibiteur de la migration, de part son action inhibitrice sur les kinases Src. Nous avons traité nos lignées de cancer de la vessie, par cette drogue et nous avons étudié sa cytotoxicité et son effet anti-migratoire.

3.1 Cytotoxicité

3.1.1 Observation au microscope

Dans un premier temps nous avons observé au microscope, d'un point de vue morphologique, l'effet de l'addition de saracatinib (AZD0530) à différentes concentrations.

Nous avons choisi 4 lignées cellulaires de vessie, 2 lignées épithéliales (SD48 et SW780) et 2 lignées mésenchymateuses (EJ et JMSU1). Ces lignées ont été traitées par des doses croissantes de saracatinib 1 μM , 3 μM , 5 μM , 10 μM , 30 μM , 50 μM et 100 μM sur un temps court de 6 heures, puis observées au microscope à balayage laser (ICys). Nous avons aussi traité les lignées JMSU1, SD48 et SW70 par des doses croissantes de cisplatine : 1 μM , 3 μM , 5 μM , 10 μM , 30 μM , 50 μM et 100 μM sur un temps court de 6 heures afin de pouvoir comparer l'effet du saracatinib à une des drogues de référence utiliser pour traiter le cancer de la vessie en clinique.

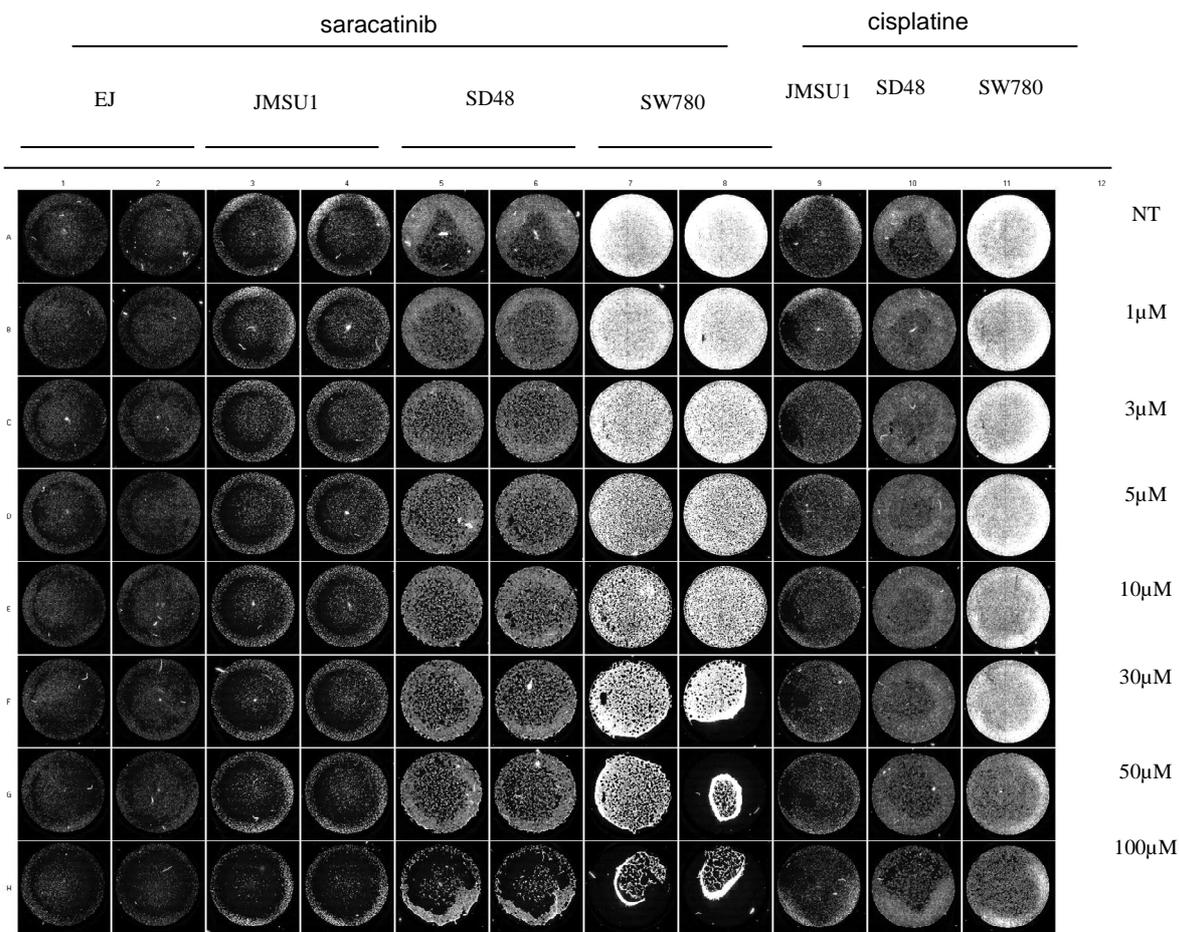


Figure 18 : Traitement pas doses croissantes de saracatinib des lignées EJ, JMSU1, SD48 et SW780, et traitement par des doses croissantes de cisplatine sur les lignées JMSU1, SD48 et SW780

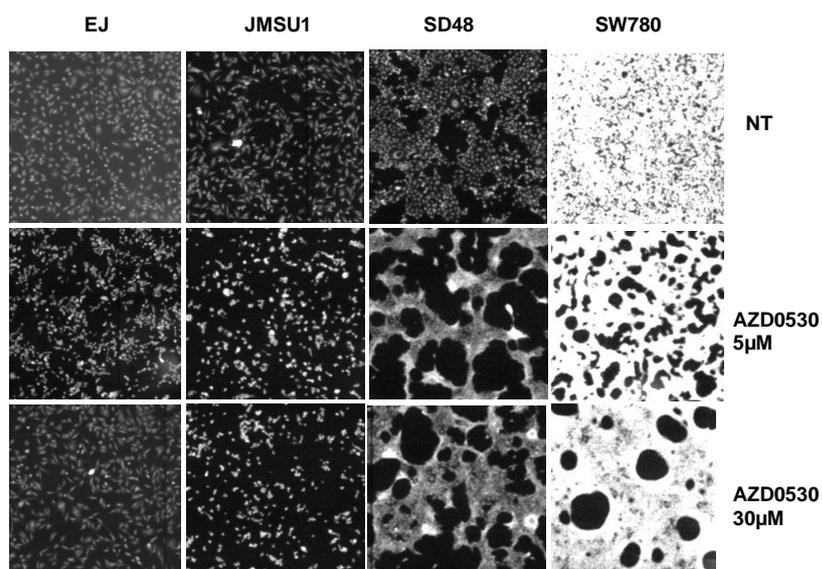


Figure 19 : Grossissement des lignées EJ, JMSU1, SD48 et SW780 au traitement 5 et 30 μ M de saracatinib

D'un point de vue morphologique, les lignées E-cadhérine négative, EJ et JMSU1 présentent un isolement et une individualisation des cellules. D'autre part la quantité de cellules semble diminuer et ce de manière dose dépendante. Les cellules épithéliales, SD48 et SW780, présentent un aspect très différent, les cellules se regroupent et forment des lacunes. Le cytoplasme des cellules semble être réduit ou rétracté. L'adhésion intercellulaire semble augmentée. D'autre part la quantité de cellules semble diminuer et ce de manière dose dépendante.

D'une manière générale, les lignées de vessie semblent très sensibles à l'action du saracatinib. Son effet cytotoxique est dose dépendante. Les lignées SD48 et SW780 (E-cadhérine positives) sont plus sensibles à l'effet cytotoxique du saracatinib que les autres, ces lignées étant. En comparaison ces lignées semblent beaucoup plus résistantes au cisplatine.

Nous avons donc choisi pour la suite de travailler avec des doses de saracatinib de 1 μM , 5 μM et 10 μM , les doses supérieures à 10 μM étant trop toxiques pour les cellules. Nous avons cherché à quantifier la sensibilité des cellules au saracatinib de manière plus précise, pour cela nous avons réalisé des courbes dose-réponse.

3.1.2 Courbes dose-réponse

Un test de vitalité au MTT, a été réalisé afin de valider les résultats précédents. Ce test nous a permis de calculer avec précision la DL50 des lignées. La DL50 étant la dose tuant 50% des cellulesensemencées de chaque lignée pour une molécule donnée. Plus la DL50 est petite plus la lignée cellulaire est sensible à la drogue soit ici au saracatinib. Les lignées ont été classées en fonction de leur sensibilité au saracatinib.

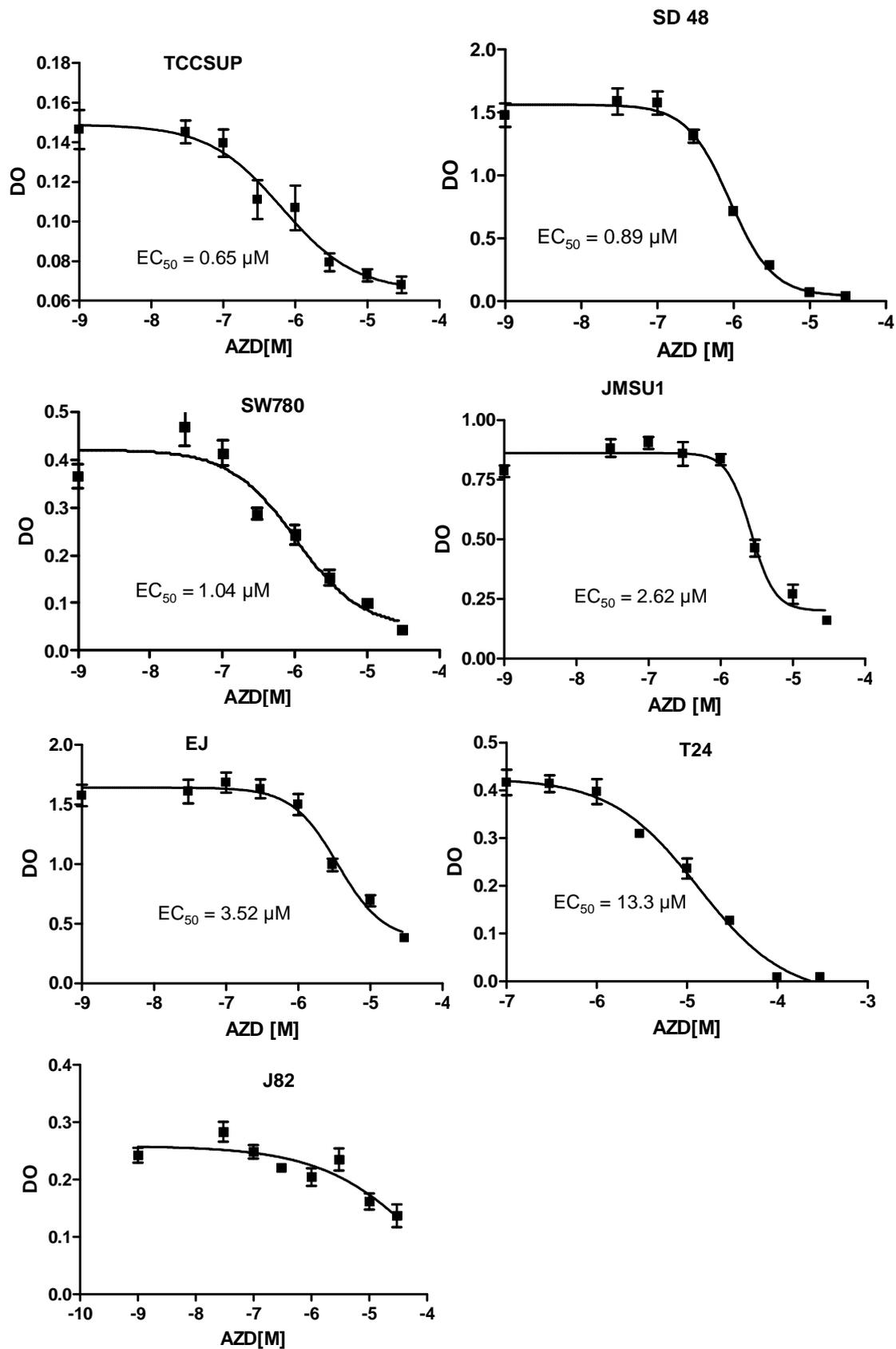


Figure 20 : Les cellules sont incubées avec des concentrations croissantes (0 à 30μM) de saracatinib pendant 72h puis la viabilité cellulaire est évaluée grâce au test au MTT. Chaque valeur correspond à la moyenne plus ou moins écart type de 3 expériences réalisées 5 fois.

Lignées cellulaires	TCCSUP	SD48	SW780	JMSU1	EJ	T24	J82
DL 50	0.65 μ M	0.89 μ M	1.40 μ M	2.62 μ M	3.52 μ M	13.3 μ M	> 13.3 μ M
E-cadhérine	+	+++	+++	-	-	-	-

Tableau 6 : Tableau représentant la DL50 de chaque lignée.

Les lignées les plus sensibles sont les lignées TCCSUP, SD48, SW780, les lignées EJ et JMSU1 sont moins sensibles et les lignées T24 et J82 sont de loin les plus résistantes. Les lignées TCCSUP SD48 et SW780 sont des lignées épithéliales E-cadhérine positives. Les lignées EJ, JMSU1, T24 et J82 sont des lignées E-cadhérine négatives. Les lignées épithéliales TCCSUP, SD48, SW780 non invasives, E-cadhérine positives, sont peu sensibles à l'action cytotoxique du saracatinib, alors que les lignées E-cadhérine négatives, JMSU1, EJ, T24 et J82, invasives sont très sensibles à l'action du saracatinib. **L'efficacité *in vitro* du saracatinib semble donc être liée à la présence de la E-cadhérine.**

3.2 Migration cellulaire

Après avoir étudié la réponse pharmacologique des lignées de cancer de vessie d'un point de vue cytotoxique nous avons étudié l'effet anti-migratoire du saracatinib. Nous avons testé son pouvoir migratoire et nous avons cherché s'il existait une corrélation entre l'expression de la E-cadhérine et l'action anti-migratoire du saracatinib.

Précédemment, nous avons mis en évidence l'action du sérum sur le pouvoir migratoire. Nous avons donc testé dans les mêmes conditions, avec ou sans sérum, l'effet du saracatinib sur la migration cellulaire des 7 lignées de vessie (EJ, JMSU1, SD48, SW780, TCCSUP, J82 et T24), par le test du « wound healing ».

Nous avons calculé l'IC50 de migration, qui correspond à la concentration en saracatinib inhibant 50% du recouvrement de la blessure à 12h. Ce paramètre nous permet de définir la vitesse de migration des lignées. Les courbes obtenues représentent la migration, dans la zone de blessure, mesurée en fonction des concentrations de composé saracatinib (dose réponse) à 4 temps de mesures (6h, 12h, 24h, 48h). Les lignées ont été traitées par des doses croissantes de saracatinib : 0M ; 3nM ; 10nM ; 30nM ; 100nM ; 300nM ; 1 μ M ; 3 μ M.

Afin que les données obtenues soient caractéristiques de la migration cellulaire et qu'elles ne soient pas biaisées par l'effet lié à la multiplication cellulaire, les cellules ont également été traitées par de l'hydroxyurée (1 μ M) agent inhibant la multiplication cellulaire.

3.2.1 En présence de sérum

Dans un premier temps nous avons observé et défini le pouvoir migratoire des lignées en présence de sérum dans le milieu de culture. Comme lors de la caractérisation des lignées, nous nous sommes placés à 12heures, pour définir l'IC50 de migration.

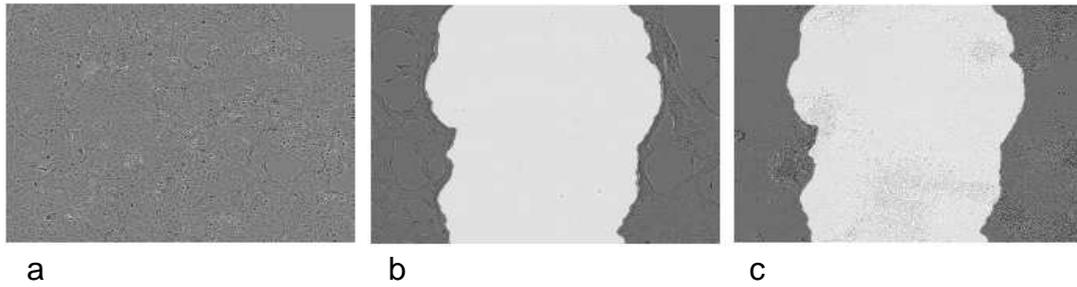


Figure 21 : Lignée SD48 a) avant création de la blessure b) après création de la blessure c) à 48h après création de la blessure, en milieu SVF + hydroxyurée sous traitement 3 μM de saracatinib

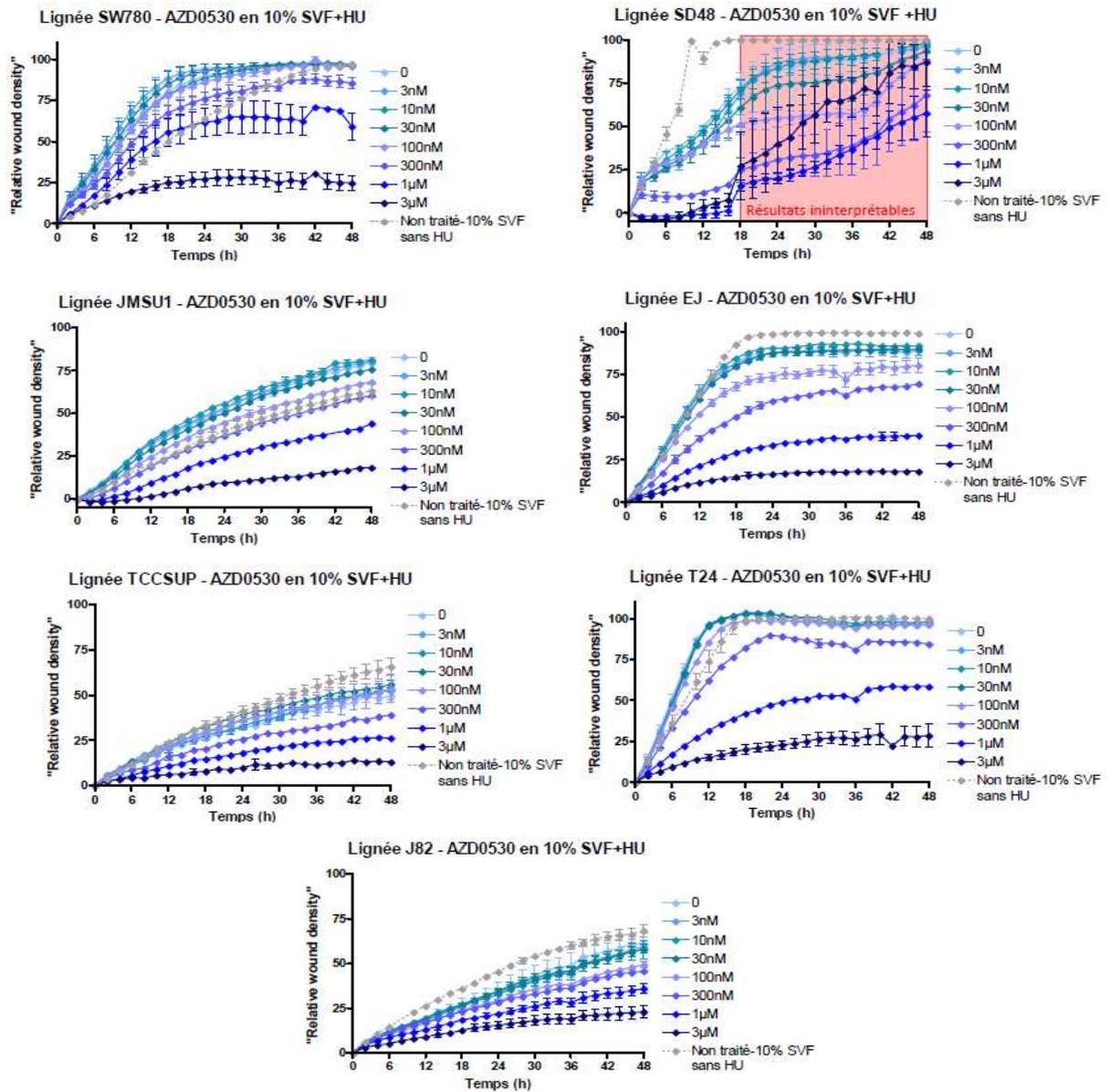


Figure 22 : Courbes représentant la migration cellulaire évaluée à partir de la densité cellulaire dans la zone de blessure en fonction de la concentration de saracatinib (AZD0530) à différents temps (6h, 12h, 24h, 48h), en présence de sérum.

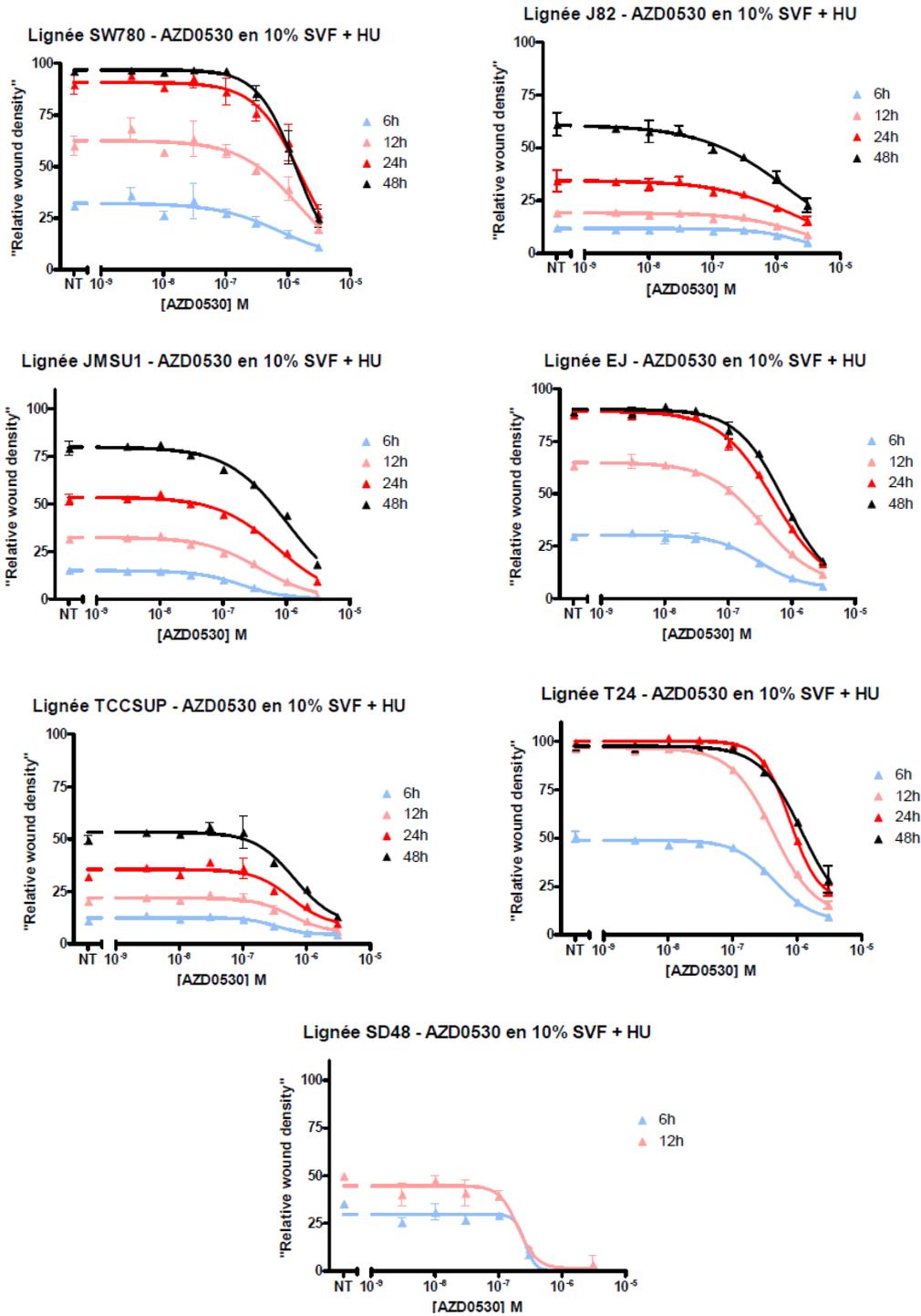


Figure 22 : Courbes représentant la migration cellulaire évaluée à partir de la densité cellulaire dans la zone de blessure en fonction de la concentration de saracatinib (AZD0530) à différents temps (6h, 12h, 24h, 48h), en présence de sérum

Lignées	SD48	JMSU1	EJ	T24	TCCSUP	SW780	J82
IC50	202 nM	373 nM	344 nM	430 nM	564 nM	1450 nM	2580 nM
E-cadhérine	+++	-	-	-	+	+++	-

Tableau 7 : Tableau représentant les IC50 de migration correspondant au potentiel invasif des lignées traitées au saracatinib à 12heures, en présence de sérum.

Les données obtenues pour la lignée J82 sont ininterprétables car les lignées ont été fortement endommagées par le traitement au saracatinib en milieu avec sérum, hydroxyurée. L'apparition de débris cellulaires dans la zone de blessure a faussé le calcul de la densité cellulaire dès 18h.

La lignée SD48 est très sensible sur le plan cytotoxique, et il ne reste que très peu de cellules au-delà de 12 heures. Les données obtenues après le temps 12 heures ne permettent pas d'obtenir les courbes de survie à 24 et 48h.

D'une manière générale le traitement par saracatinib agit de manière dose dépendante. Il a inhibé de manière dose-dépendante la capacité de migration des 7 lignées de cancers de vessie.

3.2.2 En l'absence de sérum

Dans un deuxième temps, nous avons observé et défini le caractère invasif des 4 lignées E-cadhérine négative, en l'absence de sérum : JMSU1, EJ, T24, J82. Nous les avons soumises à un traitement par des doses croissantes de saracatinib 0 M ; 3 nM ; 10 nM ; 30 nM ; 100 nM ; 300 nM ; 1 µM ; 3 µM. pendant 6, 12, 24 et 48 h. Nous avons choisi de ne pas étudier les lignées TCCSUP, SD48 et SW780 car ces lignées E-cadhérine positives, présentent un très faible pouvoir migratoire en l'absence de sérum. L'adjonction de saracatinib sur ces lignées en l'absence de sérum aurait conduit à une migration quasi inexistante car ces cellules sont également les plus sensibles au saracatinib. Le traitement de ces lignées par le saracatinib en l'absence de sérum aurait aboutit à des courbes inexploitable.

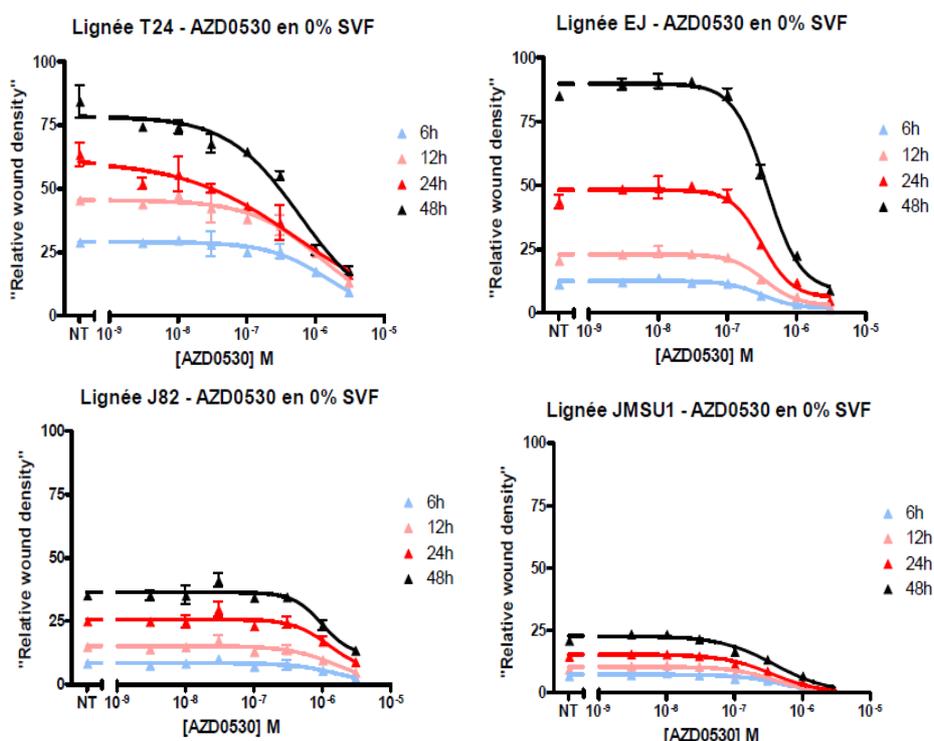


Figure 23 : Courbes représentant la densité cellulaire dans la zone de blessure en fonction de la concentration de saracatinib à différents temps (6h, 12h, 24h, 48h), en l'absence de sérum

Lignées	JMSU1	EJ	T24	J82
IC50	379 nM	345nM	1170nM	1640 nM
E-cadhérine	-	-	-	-

Tableau 8: Tableau : tableau représentant les IC50 de migration correspondant au potentiel invasif des lignées traitées au saracatinib à 12 heures, en l'absence de sérum.

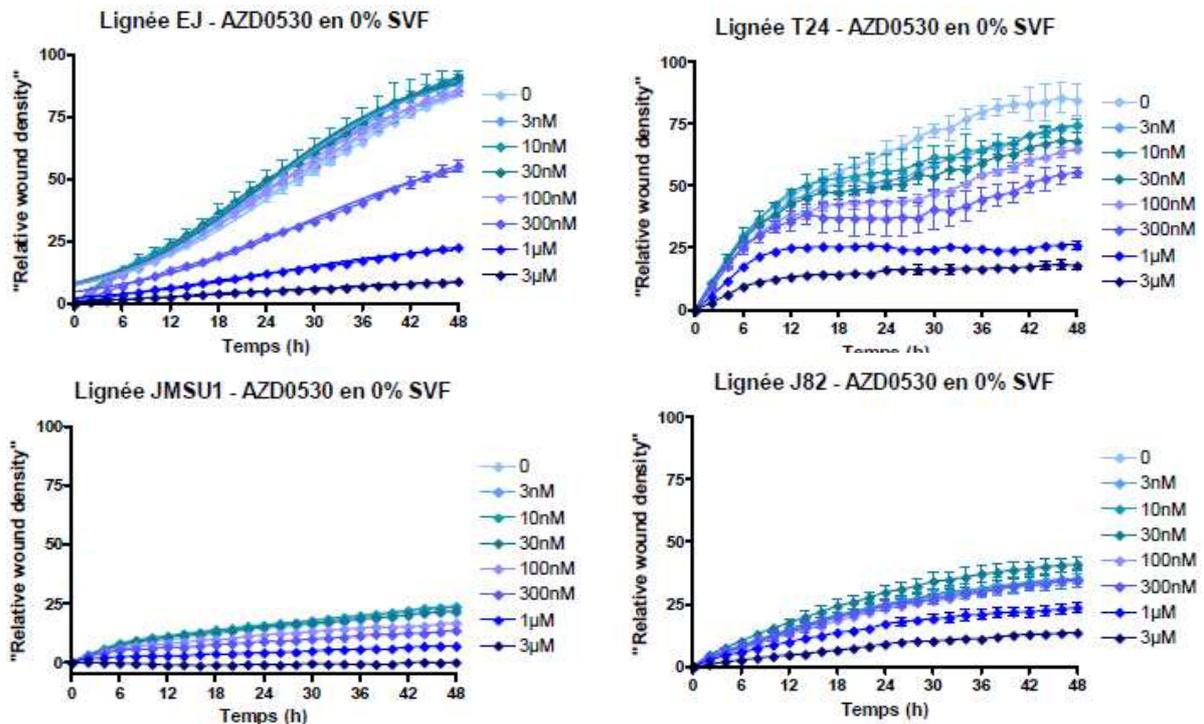


Figure 24 : Courbes représentant la densité cellulaire dans la zone de blessure en fonction de la concentration de saracatinib à différents temps (6h, 12h, 24h, 48h), en l'absence de sérum.

Au temps 12heures, et en l'absence de sérum, les lignées EJ et JMSU1 traitées par saracatinib présentent les mêmes IC50 qu'en présence de sérum. La lignée T24 devient beaucoup plus résistante en l'absence de sérum car son IC50 est augmentée. La lignée J82 devient moins résistante (IC50 diminuée), mais reste de loin la plus résistante au saracatinib.

Plus généralement, en considérant les courbes de traitement dans leur ensemble, il apparaît qu'en l'absence de sérum, et en l'absence de traitement saracatinib les lignées EJ et T24 ont migré rapidement et ont totalement recouvert la zone de blessure après 48h. L'addition de saracatinib dans le milieu diminue nettement cet envahissement à 48h, et ce de manière dose dépendante. Les lignées J82 et JMSU1 ont migré plus lentement et la densité cellulaire dans la zone de blessure est restée inférieure à 50. Pour ces 4 lignées, la vitesse de migration en absence de sérum est réduite en comparaison avec la condition de migration en présence de sérum et d'hydroxyurée.

Le saracatinib a inhibé de manière dose dépendante la capacité de migration en absence de sérum dans les 4 lignées.

3.3 Recherche de la voie de signalisation intervenant dans l'action du saracatinib

Le mécanisme d'action du saracatinib passe par l'inhibition des Src kinases, cependant d'après nos résultats, il semblerait qu'il y ait un lien entre l'effet du saracatinib et l'expression de la E-cadhérine. Nous avons donc traité certaines lignées de cancer de la vessie par le saracatinib et observé l'effet au niveau de la E-cadhérine.

3.3.1 Voie de la E-cadhérine

3.3.1.1 Immunofluorescence

Nous avons choisi 2 types de lignées : les SD48, lignées épithéliales peu invasives, exprimant la E-cadhérine et les JMSU1, lignées mésenchymateuses invasives, n'exprimant pas la E-cadhérine.

Ces lignées ont été soumises à un traitement par le saracatinib (AZD0530) à différentes concentrations : 0, 1, 5 et 10 μ M.

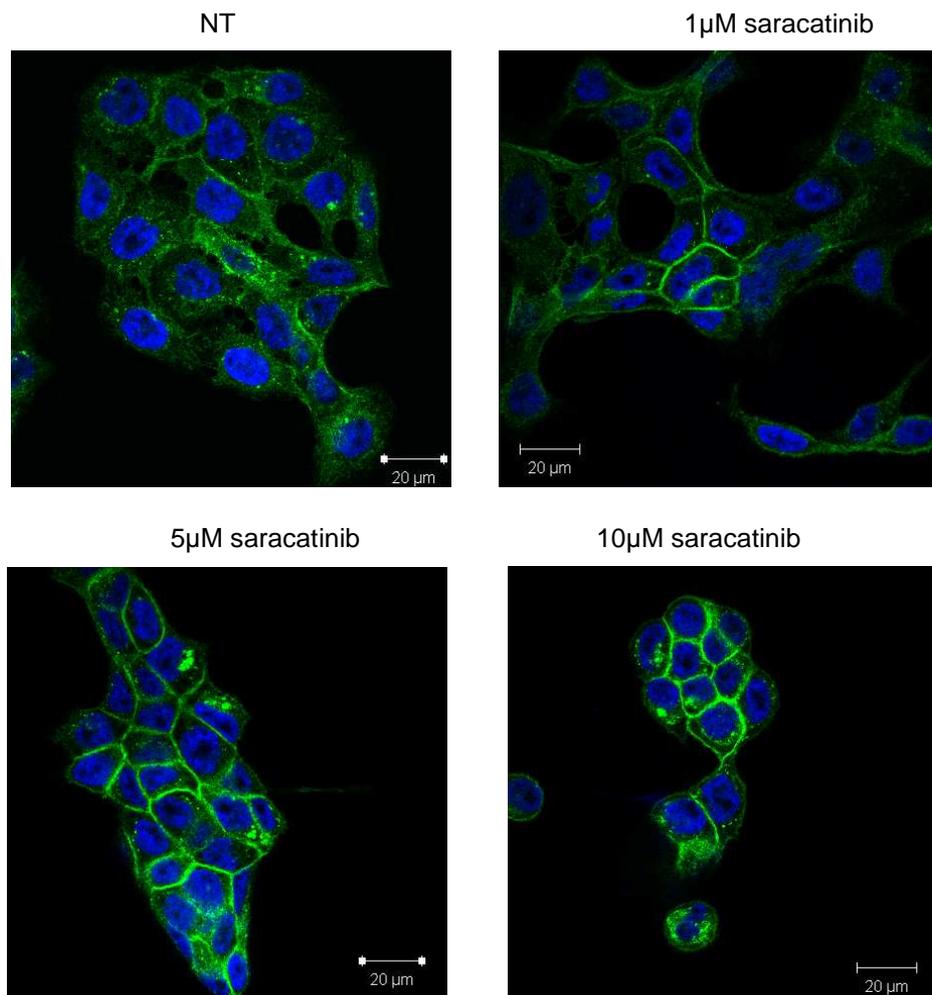


Figure 25: Immunofluorescence réalisée sur les cellules SD48 traitées par des doses croissantes de saracatinib (0 ; 1 ; 5 et 10 μ M) au temps 4 heures - Marquage E-cadhérine (vert)

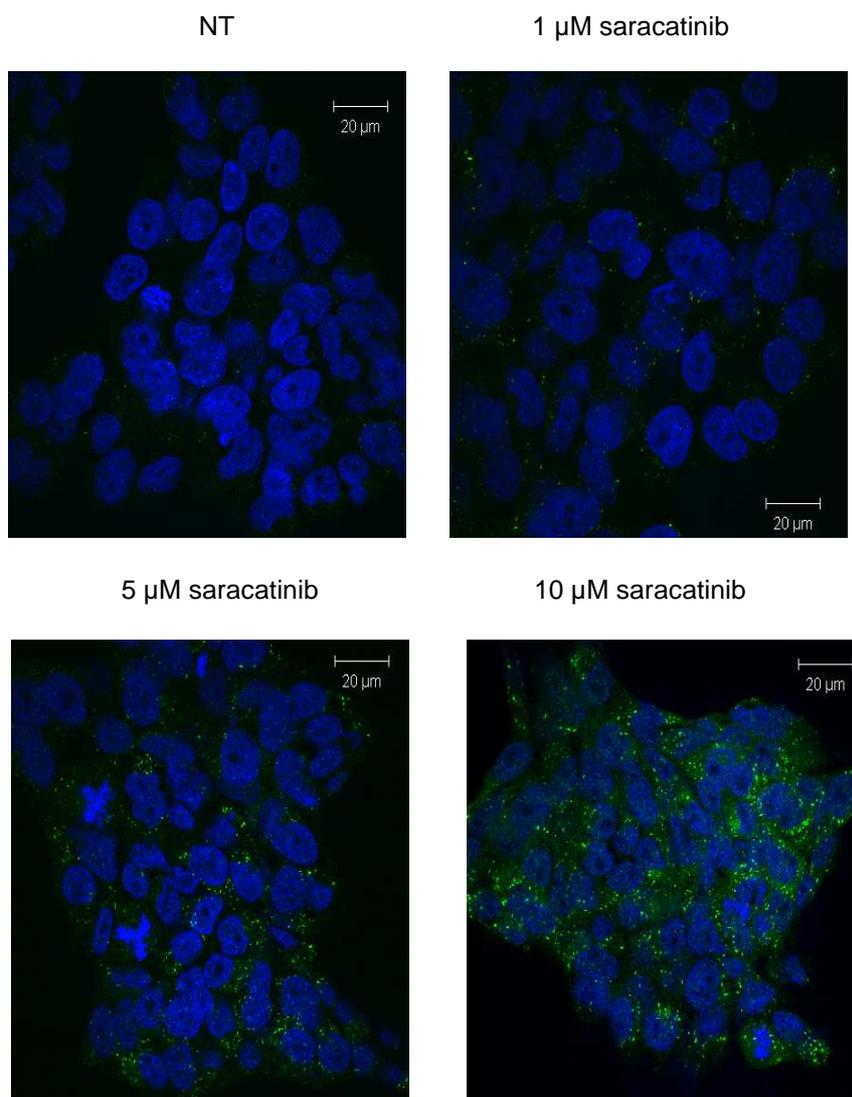


Figure 26 : Immunofluorescence réalisée sur les cellules JMSU1 traitées par des doses croissantes de saracatinib (0 ; 1 ; 5 et 10 μ M) au temps 4 heures - Marquage E-cadhérine (vert)

La Figure 23 montre que dans les cellules SD48 non traitées la localisation de la E-cadhérine est diffuse au niveau du cytoplasme. Lors du traitement par saracatinib, la E-cadhérine se relocalise au niveau des membranes plasmiques. Plus la concentration de saracatinib est importante, plus cet effet de localisation membranaire est amplifié.

Le traitement de la lignée SD48 (E-cadhérine positive) par le saracatinib, modifie complètement la distribution de la E-cadhérine, de manière dose dépendante. De cytoplasmique, la protéine semble devenir membranaire. De plus, l'intensité du marquage semble augmentée, mais l'immunofluorescence ne nous permet pas de conclure sur une réelle augmentation de l'expression de la E-cadhérine après traitement au saracatinib.

La Figure 24 montre que dans les cellules JMSU1 non traitées il n'y a pas de marquage de la E-cadhérine. Cela confirme l'absence d'expression de cette protéine à l'état basal dans cette

lignée. Lors du traitement par saracatinib, un marquage punctiforme de la E-cadhérine apparaît au niveau des cytoplasmes. Plus la concentration de saracatinib augmente plus cet effet est amplifié. Le traitement de la lignée JMSU1 par le saracatinib induit l'apparition de la E-cadhérine de manière dose dépendante.

L'ensemble de ces résultats montre clairement que le mécanisme d'action du saracatinib met en jeu la voie de régulation de la E-cadhérine. La E-cadhérine semble donc être un marqueur de réponse du saracatinib que ce soit dans les lignées E-cadhérine positives ou E-cadhérine négatives. Cependant, à l'aide de l'immunofluorescence nous ne pouvons conclure si l'effet du saracatinib est un effet quantitatif sur le niveau d'expression de E-cadhérine.

3.3.1.2 Western blot

L'immunofluorescence, n'ayant pu servir à la quantification de la E-cadhérine lors des traitements par saracatinib, nous avons réalisé la même expérience, et mis en évidence l'expression de la E-cadhérine par western-blot. Cette expérience a été réalisée sur 2 lignées cellulaires : la lignée SD48 (E-cadhérine positive) et JMSU1 (E-cadhérine négative).

Les cellules sont traitées par des doses croissantes de saracatinib sur un temps court (4h) puis le culot cellulaire est traité par RIPA et déposé sur un gel 12% acrylamide. Les blots ont été quantifiés pour normaliser l'expression de la E-cadhérine par rapport à l'expression d'actine.

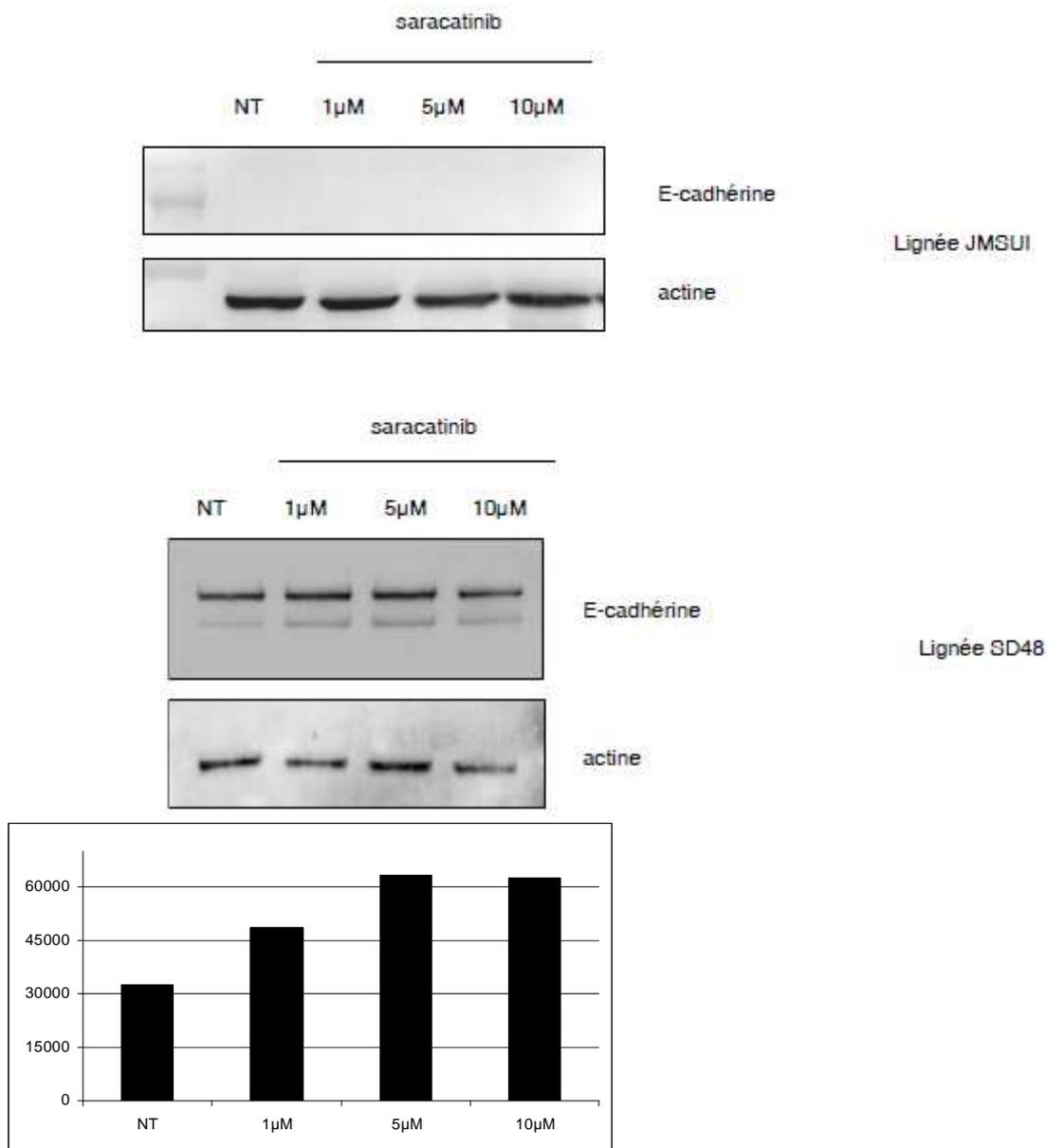


Figure 27 : Western blots E-cadhérine dans les lignées SD48 et JMSU1. Quantification du niveau d'exprrsion de la E-cadhérine des lignées SD48 (intensité des bandes correspondant à E-cadhérine rapport es à l'intensité des bandes correspondant à l'actine).

Comme le montre la Figure 25, pour la lignée JMSU1, le western blot ne met pas en évidence une expression de la E-cadhérine, sous traitement saracatinib. Le saracatinib n'intervient donc pas dans la stimulation de l'expression de la E-cadhérine dans cette lignée.

En revanche, pour la lignée SD48, le traitement par saracatinib semble induire une augmentation de l'expression de la E-cadhérine. Cette observation vient confirmer les résultats obtenus en immunofluorescence (cf Figure24).

3.3.1.3 RT-qPCR

Les expériences d'immunofluorescence et de western blot présentées dans le paragraphe précédent nous orientent donc vers l'hypothèse suivante : le saracatinib stimule l'expression de la E-cadhérine dans les lignées E-cadhérine positive (par exemple SD48) mais il n'intervient pas dans l'expression de la E-cadhérine dans les lignées E-cadhérine négative (par exemple JMSU1).

Afin d'éprouver cette hypothèse, nous avons réalisé une RT-qPCR sur les ARNm de la E-cadhérine sur les lignées E-cadhérine positive SD48 et SW780, et sur des lignées E-cadhérine négative JMSU1 et T24.

Les niveaux d'expression de la E-cadhérine dans les cellules traitées ont été normalisés par les niveaux d'expression de la E-cadhérine dans les cellules non traitées pour chaque lignée. Ainsi cette valeur représentant l'état basal normalisé à l'intérieur de chaque cellule est représentée par un histogramme à 100%, même lorsque la lignée est E-cadhérine négative (JMSU1 et T24).

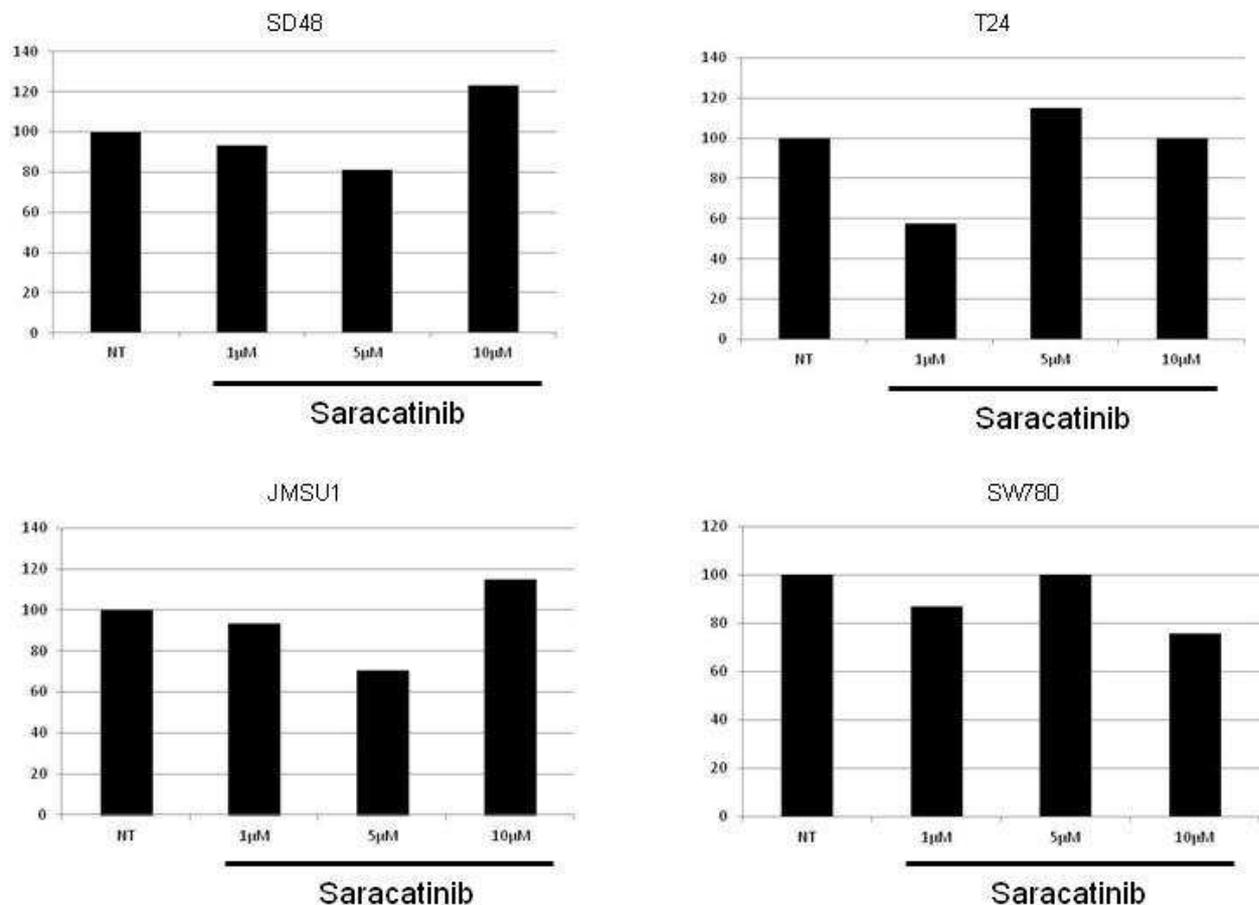


Figure 28 : Quantification de la E-cadhérine sous traitement AZD 0, 1, 5, 10 µM, à partir des RT-qPCR réalisés sur les ARNm de E-cadhérine.

Comme nous pouvons l'observer sur la Figure 26, le niveau d'ARNm de la E-cadhérine n'est pas modifiée de manière significative dans la lignée SW780 (E-cadhérine positive) suite au traitements par le saracatinib. Cependant, pour les lignées JMSU1 et T24 (E-cadhérine

négatives pour la protéine) le traitement par saracatinib semble induire l'expression de l'ARNm de E-cadhérine, par rapport au niveau basal.

Pour la lignée SD48, le traitement par 10 μ M de saracatinib, semble augmenter le niveau d'expression de l'ARNm de la E-cadhérine.

3.3.1.4 Conclusion

Pour la lignée SD48, une relocalisation à la membrane plasmique de la E-cadhérine sous traitement saracatinib a été observé en immunofluorescence. Cette relocalisation est accompagnée d'une augmentation de l'intensité du marquage pouvant s'expliquer soit par une augmentation de la quantité de la protéine E-cadhérine, soit par l'effet de regroupement des protéines E-cadhérine au même endroit rendant le marquage plus intense.

L'utilisation du western blot et de la RT-qPCR, nous a permis de conclure que le traitement saracatinib induisait également une augmentation de la quantité d'ARNm messager de la E-cadhérine. Cette observation suggère donc fortement que le saracatinib induit une régulation positive du niveau d'expression de la E-cadhérine dans la lignée SD48.

Pour la lignée JMSU1 (E-cadhérine négative en western blot et en immunofluorescence), le traitement par des doses croissantes de saracatinib montrait l'apparition d'un marquage punctiforme cytoplasmique en immunofluorescence. L'utilisation du western blot n'a pas permis de vérifier l'apparition de la protéine E-cadhérine. Cependant la technique de RT-qPCR, met en évidence une augmentation du niveau d'ARNm de la E-cadhérine dans les cellules traitées au saracatinib. Il semble donc que le saracatinib régule de manière positive l'expression de la E-cadhérine, bien que cette lignée soit caractérisée comme négative quant à l'expression de la protéine E-cadhérine. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer la non visualisation en western blot de la protéine E-cadhérine néosynthétisée : protéine non active car tronquée, ou mal repliée, protéine trop faiblement exprimée, ou protéine subissant un turn over trop rapide.

En conclusion la voie de la E-cadhérine semble être un marqueur de la réponse au saracatinib.

3.3.2 Autres voies possibles

3.3.2.1 Voie des protéines d'ancrage

Bien que la protéine E-cadhérine semble impliquée dans le mécanisme d'action du saracatinib, son expression n'est pas être directement reliée à l'effet anti-invasif du saracatinib. Nous avons donc recherché d'autres molécules pouvant être impliquées cette action du saracatinib. Nous nous sommes intéressés à la N-cadhérine, dont l'expression est liée à celle de la E-cadhérine, mais aussi à pFAK qui est connu pour réguler la localisation et la quantité de la E-cadhérine. Nous avons regardé l'effet du saracatinib sur la bêta-caténine. En effet, la bêta-caténine se lie fortement à la E-cadhérine lors de l'inhibition de la protéine Src, ce qui favorise l'encrage cellulaire et donc la perte de mobilité (Avizienyte E et Frame MC 2005).

Nous avons travaillé sur les 3 lignées cellulaires de cancers de la vessie E-cadhérine positives dont nous disposions : SD48, SW780 et TCCSUP. Ces lignées ont été ensemencées sur plaque 96 puits, afin de réaliser une immunofluorescence. Nous avons soumis, 24 heures après l'ensemencement, ces lignées à un traitement croissant de saracatinib : 1, 5, 10 μ M, pendant un temps court de 4 heures. Puis les cellules ont été lavées et un marquage par les différents anticorps E-cadhérine, N-cadhérine, béta-caténine, pFAK, a été réalisé suivi par un marquage secondaire. Le contrôle (CTRL) est représenté dans les graphes ci-dessous et correspond au dépôt de l'anticorps primaire seul, sans anticorps secondaire. L'axe des ordonnées représente la fluorescence émise par chaque puit.

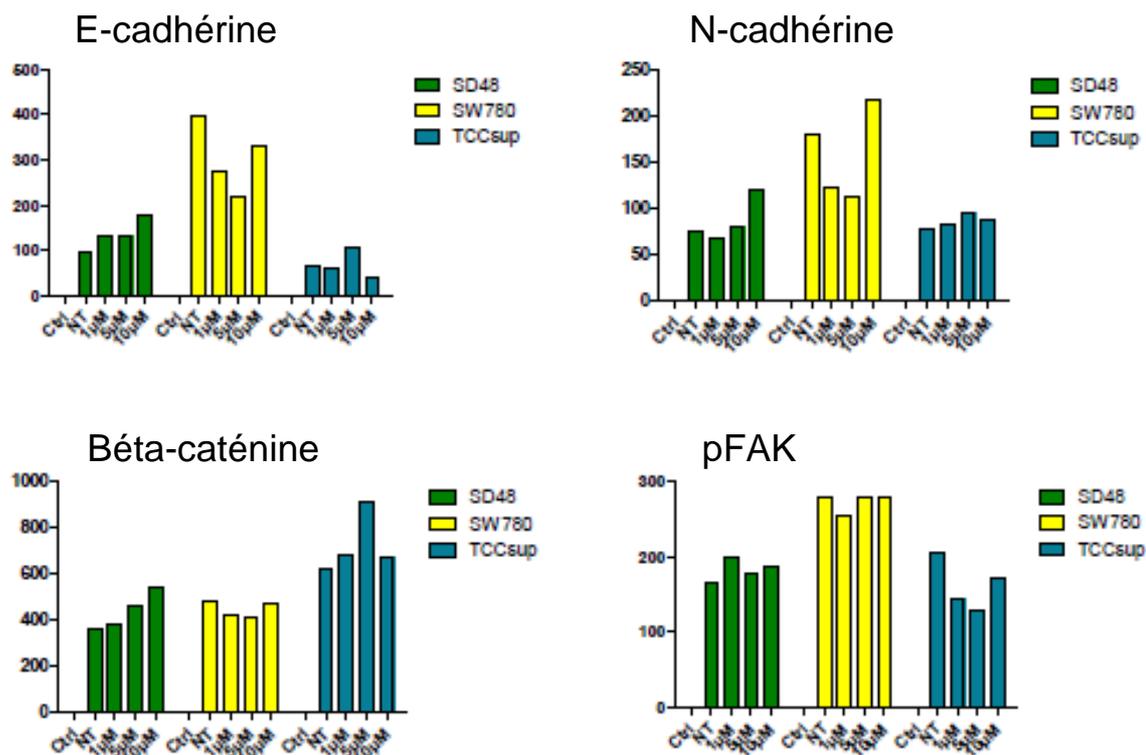


Figure 29 : Quantification à l'ICys d'immunofluorescence de 4 protéines d'intérêt (E-cadhérine, N-cadhérine, Béta-caténine, pFAK) suite au traitement par saracatinib (0, 1, 5, 10 μ M). Les unités représentent l'intensité de fluorescence. Ctrl : contrôle par anticorps primaire ; NT : non traité ; 1, 5, 10 μ M : traitement par saracatinib.

Comme nous pouvons l'observer sur la Figure 27, l'augmentation de l'expression de la E-cadhérine est confirmée pour les lignées SD48 suite au traitement par le saracatinib. Cependant, cette augmentation n'est pas retrouvée pour les autres lignées E-cadhérine positives SW780, et TCCSUP.

Pour les protéines N-cadhérine, béta-caténine et pFAK, les taux d'expression sont relativement constants quelque soit la lignée cellulaire et indépendamment du traitement par le saracatinib.

Le traitement par saracatinib ne semble donc pas réguler l'expression des protéines N-cadhérine, béta-caténine, et pFAK, sur les lignées TCCSUP, SW780.

3.3.2.2 Voie m-tor

Nous avons également cherché si la voie m-TOR était impliquée dans l'invasivité des lignées de cancer de vessie. Nous avons à notre disposition un inhibiteur de l'activité chymotrypsine du protéasome temsirolimus TORISEL®, qui inhibe la voie de m-TOR et qui est utilisé dans le traitement dans le traitement du cancer du rein. Nous avons testé l'invasivité cellulaire des 7 lignées de cancer de la vessie grâce au test du « wound healing » en présence de temsirolimus. La migration cellulaire a été évaluée par mesure de la densité cellulaire de la blessure en fonction du temps, pour le contrôle et pour la condition traitée par 40µM de temsirolimus, en présence de 10% sérum.

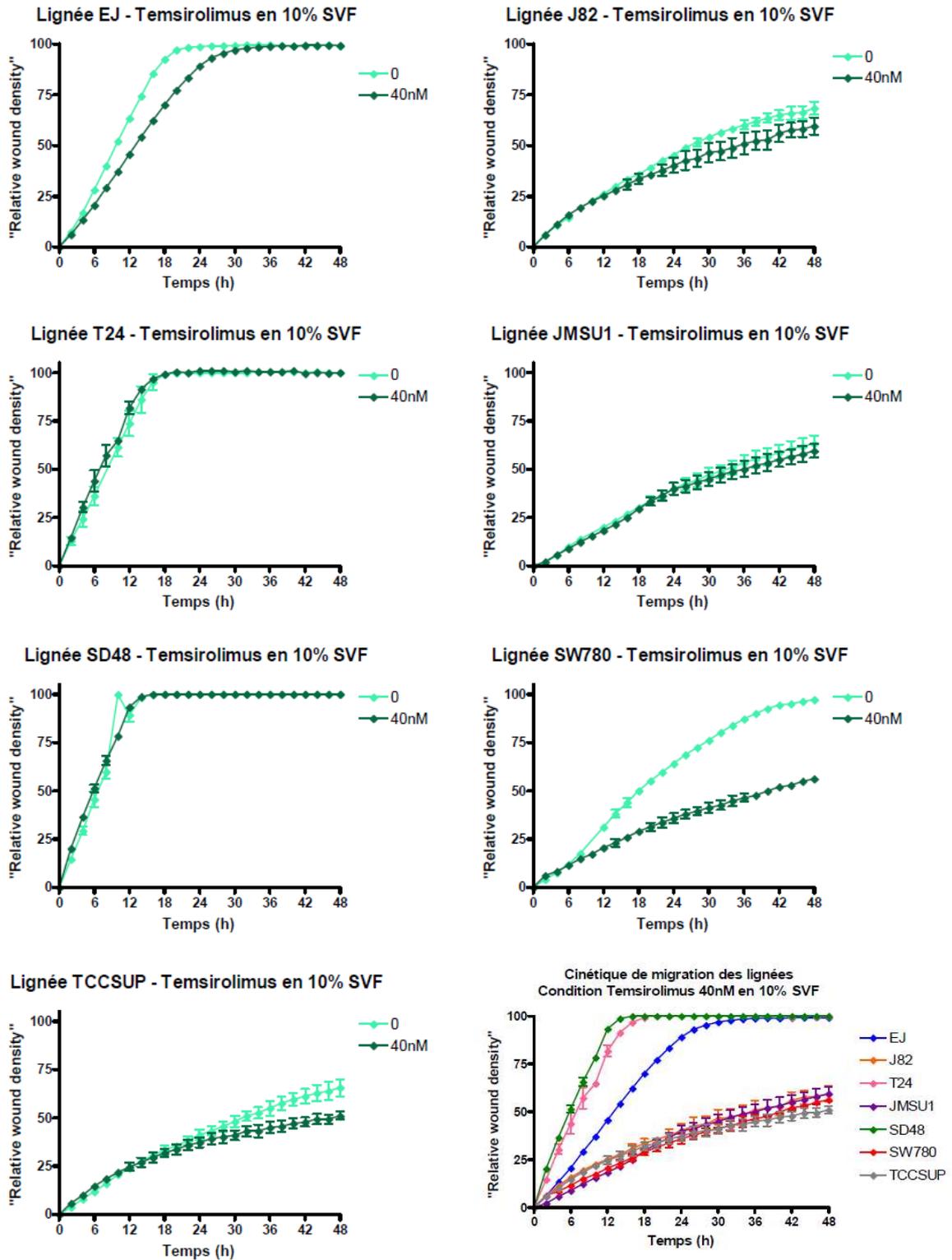


Figure 30 : La densité cellulaire de la blessure a été mesurée toutes les 2 heures, avec ou sans traitement par le temsirolimus, dans les 7 lignées cellulaires

Comme le montre la figure 28, le traitement par temsirolimus n'a pas une action identique sur toutes les cellules. Il n'a aucune action sur les lignées JMSU1, SD48, et T24, les courbes avec

ou sans traitement sont superposables. Par contre, dans les lignées TCCSUP, EJ et J82 il retarde l'envahissement de la blessure donc il ralentit faiblement la vitesse de migration des lignées. Pour la lignée SW780, l'action du temsirolimus est importante. Il réduit de manière significative la vitesse de migration des cellules

L'action du temsirolimus reste peu importante sur ces lignées sauf pour la lignée SW780 et potentiellement pour les lignées TCCSUP, EJ et J82. Mais cette action anti-migratoire n'est pas associée à l'expression de la E-cadhérine ni à l'action anti-invasive du temsirolimus.

PARTIE 5 : DISCUSSION PERSPECTIVES

Dans une première partie, nous avons étudié le rôle de la protéine Twist1 dans différentes lignées de cancer de la vessie dans le but de déterminer si cette protéine pouvait constituer une cible potentielle dans le traitement de ce type de cancers. Nous avons tout d'abord caractérisé 7 lignées cellulaires de vessie pour l'expression de Twist1. Pour ce faire, nous avons mis en œuvre trois techniques : deux permettant d'évaluer le niveau d'expression de la protéine (western-blot et immunofluorescence) et une permettant d'évaluer le niveau d'expression de l'ARNm codant la protéine (RT-qPCR).

La mise en évidence de l'expression de la protéine Twist1 s'est révélée extrêmement compliquée par la méthode de western blot. Plusieurs voies d'optimisation ont été envisagées mais aucune d'entre elles n'a été concluante. Il ne nous a pas été possible d'observer l'expression de la protéine Twist1 dans les différentes lignées étudiées.

Une piste qui pourrait permettre d'améliorer cette détection en western blot consiste en la préparation d'extraits nucléaires dans le but de concentrer la protéine Twist1 sachant que celle-ci en tant que facteur de transcription doit présenter une localisation majoritairement nucléaire. Cependant cette hypothèse est controversée par les images obtenues en immunofluorescence montrant une localisation de la protéine Twist1 majoritairement cytoplasmique.

Parallèlement, les expériences de marquage par immunofluorescence ont permis de mettre en évidence l'expression de la protéine Twist1 uniquement dans les lignées JMSU1. Dans cette lignée, le niveau d'expression de Twist1 semble néanmoins faible et non uniforme au sein de la population cellulaire. Ces expériences ont également permis de montrer que la localisation de Twist1 est à la fois nucléaire et cytoplasmique, Cette observation peut paraître surprenante de par la fonction première de facteur de transcription de Twist1. Par ailleurs, le méthode d'immunofluorescence n'a pas permis d'observer l'expression de la protéine Twist1 dans les lignées EJ, SD48 et SW780.

Plusieurs hypothèses peuvent donc être émises :

L'expression de la protéine Twist1 est peut être gérée par des mécanismes (épigénétiques ?) post-transcriptionnel ?, ce qui limite son expression. Pour s'affranchir de cette hypothèse nous pourrions tester des facteurs déméthylants.

Pour confirmer et compléter les résultats obtenus en western blot et en immunofluorescence, nous avons réalisé des RT-qPCR afin de caractériser le niveau d'expression de l'ARNm de Twist1 sur les 7 lignées cellulaires de vessie. Cette technique ne nous a pas permis de conclure sur le niveau d'expression de l'ARNm de Twist1. Pour la mise en œuvre de cette méthode nous avons utilisé comme témoin positif de l'expression Twist1, la lignée JMSU1 transfectée par le vecteur Twist1-Flag. A posteriori, ce choix peut s'avérer discutable. En effet, une cellule transfectée exprime potentiellement une quantité extrêmement importante de protéine Twist1. Il est donc possible que le différentiel d'expression de l'ARNm de Twist1 entre cette lignée le surexprimant et les lignée non transfectées soit trop importante et masque un niveau d'expression basal faible. Cependant, la lignée JMSU1 est la lignée qui présente le plus petit différentiel d'expression des 7 lignées. Cette observation suggère donc que cette lignée puisse exprimer l'ARNm codant pour Twist1 et viendrai corroborer les résultats obtenus concernant le niveau d'expression de la protéine Twist1. Ce résultat pourrait être confirmé en refaisant la même expérience en utilisant un contrôle positif plus adapté. Nous

pourrions par exemple utiliser une lignée sauvage connue pour exprimer Twist1, comme la lignée cellulaire de carcinome de prostate PC3.

Dans la littérature très peu d'articles montrent une expression de Twist1 par western blot dans les lignées cancéreuses sauvages [310], le plus souvent les westerns blot mettent en évidence une protéine Twist1 surexprimée [177]. D'autre part, les lignées J82 et T24 sont positives pour Twist1 ce que nous ne retrouvons pas en western blot, mais possiblement en RT-qPCR pour la lignée J82 mais pas pour la lignée T24 [310,311].

Malgré de nombreuses tentatives d'optimisation de ces différentes expériences, il semble donc très difficile de mettre en évidence l'expression de la protéine Twist1 dans ces différentes lignées. Soit parce que les outils à notre disposition (techniques, anticorps) ne sont pas assez robustes, soit parce que le niveau d'expression de cette protéine est extrêmement faible, ou trop transitoire. De plus, pour la seule lignée dans laquelle nous avons pu détecter Twist, la lignée JMSU1, nous avons observé une hétérogénéité de marquage. Pour toutes ces raisons, il semble que la protéine Twist1 ne représente pas un marqueur caractéristique des cancers de la vessie, bien que l'expression de la protéine Twist1 représente déjà un marqueur pronostique dans de nombreux cancers hépatocarcinome [312], cancer du poumon non à petites cellules [313], cancer du sein [314], ORL [315], ostéosarcome [316]. Cependant des travaux réalisés sur des tumeurs humaines définissent Twist1 comme un possible marqueur de la progression métastatique [317,318].

Dans une deuxième partie, nous avons choisi de caractériser les 7 lignées cellulaires de cancers de la vessie pour plusieurs marqueurs impliqués dans le mécanisme de l'EMT, marqueurs épithéliaux (E-cadhérine) et mésenchymateux (N-cadhérine et vimentine).

Sur la base des résultats obtenus, nous avons pu classer les lignées soit dans les mésenchymateuses, soit dans les épithéliales en fonctions de leur profil d'expression des différents marqueurs. Les lignées JMSU1, EJ ont été classées en mésenchymateuses : et la lignée SD48, SW780 en épithéliales.

Cependant certaines lignées présentaient des profils d'expression mixtes caractéristiques tant des lignées mésenchymateuses que des lignées épithéliales. Ainsi, Nous avons classé la lignée TCCSUP qui présentait des caractéristiques épithéliale (expression de la E-cadhérine) et mésenchymateuse (expression N-cadhérine) à cheval entre ces 2 types cellulaires. Concernant les lignées T24 et J82, qui selon nos résultats présentent également ce profil « hybride », nous nous sommes basés sur la classification de l'ATCC qui les définit d'un point de vue morphologique comme épithéliales. Pour avoir plus de certitude nous aurions pu utiliser un deuxième marqueur épithélial comme la desmoplakine.

Nos résultats pour la caractérisation des marqueurs de l'EMT concordent, avec les quelques résultats présents dans la littérature [307,308].

Par la suite, nous avons évalué le potentiel cytotoxique du cisplatine (chimiothérapie de référence dans le traitement du cancer de la vessie) et du saracatinib sur ces différentes lignées. A l'aide d'une observation microscopique de la morphologie cellulaire post-traitement, nous avons pu valider la gamme de concentration que nous avons par la suite utilisée pour réaliser les courbes de doses-réponse.

Les expériences de cytotoxicité ont été réalisées sur 4 lignées pour le cisplatine et sur 7 lignées pour le saracatinib. Dans les 2 cas, les résultats ont montré que le potentiel cytotoxique est dose-dépendant. Les ordres de grandeur des doses de saracatinib utilisées sont de l'ordre des mêmes doses que celles retrouvées avec le traitement au cisplatine.

Nous avons cherché à identifier une corrélation entre la sensibilité des lignées à ces deux drogues et le profil d'expression des marqueurs de l'EMT de ces lignées.

Pour le cisplatine, il n'y a pas de corrélation entre la présence de E-cadhérine et l'effet cytotoxique. Cette observation est en adéquation avec le mécanisme d'action connu du cisplatine. En effet cette drogue cible les mécanismes apoptotiques, et donc vraisemblablement pas les mécanismes de l'EMT.

Pour le saracatinib, les lignées E-cadhérine sont apparues comme étant les lignées les plus sensibles. Les lignées les plus invasives étant les lignées mésenchymateuses (E-cadhérine négatives), et le saracatinib étant surtout connu pour ses propriétés anti-invasives, ce résultat nous est apparu surprenant. Nous pouvons donc conclure que le traitement par saracatinib pourrait-être utilisé comme traitement cytotoxique, et que les lignées E-cadhérine positives sont les plus sensibles à son action. Cette constatation n'est pas retrouvée dans la littérature.

Après avoir étudié le potentiel cytotoxique du saracatinib sur les lignées de cancer de la vessie, nous avons étudié son action anti-migratoire. Pour ce faire nous avons choisi le test du « wound healing ».

Les résultats obtenus montrent que l'adjonction de saracatinib diminue les pourcentages de migration au temps 12 heures. Cette observation confirme l'action anti-invasive connue du saracatinib [267,272,278] notamment dans le cancer de la vessie [263]. Cette drogue peut donc avoir un rôle dans les lignées de cancer de vessie. La présence ou non de sérum dans le milieu, semble n'avoir que peu d'importance. La déprivation en sérum, additionnée à la sensibilité au saracatinib des lignées E-cadhérine positives, nous a conduits à ne tester l'action antiproliférative du saracatinib en l'absence de sérum, que sur les lignées E-cadhérine négatives. Cette expérience, ne nous a pas permis de relier la présence de la protéine E-cadhérine à l'action antiproliférative du saracatinib.

Cependant pour être plus précis sur le potentiel invasif des cellules nous pourrions développer un modèle murin avec des tumeurs E-cadhérine positives ou E-cadhérine négatives et observer si l'expression de la E-cadhérine induit une modification

D'après les expériences ci-dessus, il semble y avoir un lien entre le potentiel cytotoxique du saracatinib et l'expression de la E-cadhérine. Nous avons donc réalisé une immunofluorescence de la E-cadhérine, sous traitement par saracatinib dans 2 types cellulaires, une lignée E-cadhérine positive (SD480) et une lignée E-cadhérine négative (JMSU1).

Dans la lignée SD48, le traitement par saracatinib entraîne une modification de localisation de la E-cadhérine, de manière dose dépendante. La E-cadhérine cytoplasmique vient se

concentrer au niveau des membranes plasmiques et des zones de contact intercellulaire. Le marquage est fortement augmenté à ce niveau. Nous nous sommes posés la question de savoir si cette augmentation de marquage était causée par une augmentation de la protéine E-cadhérine ou par une concentration de la protéine, en un endroit donné. L'utilisation du western blot a permis de confirmer que l'augmentation de marquage observée en immunofluorescence était liée à une augmentation de l'expression de la protéine E-cadhérine. Par ailleurs, l'utilisation de la méthode de RT-qPCR, confirme, pour la lignée SD48 les résultats obtenus en western blot et en immunofluorescence. Les effets induits par le saracatinib semblent donc mettre en jeu des mécanismes d'action impliquant les voies de signalisations régulant l'expression de la E-cadhérine.

Dans la lignée JMSU1, le traitement par saracatinib induit de manière dose dépendante l'apparition d'un marquage ponctiforme cytoplasmique correspondant à la protéine E-cadhérine. Cette augmentation de l'expression suite au traitement par saracatinib n'a pas été retrouvée en western blot. En revanche, la méthode de RT-qPCR a mis en évidence l'expression de l'ARNm de la E-cadhérine. Une possible explication aux résultats contradictoires obtenus en immunofluorescence et en western blot pourrait être donnée par l'anticorps utilisé. En effet, les anticorps utilisés en immunofluorescence et en western blot sont différents. L'apparition de E-cadhérine peut correspondre à une protéine immature, tronquée, mal repliée non détectable par l'anticorps en western blot ou bien à un artefact de marquage en immunofluorescence. D'autres hypothèses peuvent expliquer la non visualisation en western blot de la protéine E-cadhérine néosynthétisée : protéine trop faiblement exprimée, ou protéine subissant un turn over trop rapide.

Au regard de ces résultats discordant, non retrouvés pour les autres lignées en RT-qPCR, le saracatinib ne semble pas posséder d'action globale commune sur les différentes lignées de cancer de la vessie. L'action du saracatinib ne semble pas agir directement sur l'expression de l'ARNm de la E-cadhérine, ni sur l'expression de la protéine E-cadhérine (western blot) lorsque les cellules ne possèdent pas de E-cadhérine endogène. Par contre, le saracatinib augmente l'expression et la localisation à la membrane de la E-cadhérine lorsqu'elle est déjà présente dans la cellule (SD48).

Il serait intéressant d'éteindre la E-cadhérine, et d'observer si la sensibilité au saracatinib est modifiée. La transfection par la E-cadhérine des lignées peu sensibles d'un point de vue cytotoxique au saracatinib serait une autre expérience à réaliser pour observer une sensibilité restaurée au saracatinib. Nous pourrions aussi traiter les lignées sur des temps plus long de saracatinib et d'observer l'effet sur l'expression de la protéine E-cadhérine.

La régulation de la protéine E-cadhérine ne pouvant pas à elle seule expliquer l'action du saracatinib, nous nous sommes donc intéressés à d'autres molécules d'adhésion intervenant dans le phénomène d'EMT. Par une méthode d'immunofluorescence nous avons recherché une modification de l'expression des protéines N-cadhérine, pFAK et bêta-caténine sous traitement saracatinib. Aucune modification du niveau d'expression de ces différents marqueurs n'est apparue consécutivement au traitement par saracatinib.

Par ailleurs, il est possible que le saracatinib ait un rôle inhibiteur de la Src kinase impliquée dans une autre voie cellulaire. Nous avons donc recherché quelles autres molécules d'adhésion pouvaient intervenir dans l'EMT. Les lignées les plus sensibles d'un point de vue cytotoxique au saracatinib étant les lignées épithéliales (E-cadhérine positive) nous les avons

utilisées pour la suite du travail. Nous avons observé par quantification d'immunofluorescence si le saracatinib modifiait l'expression de pFAK, bêta caténine et N-cadhérine.

Nous, avons à notre disposition un autre médicament déjà commercialisé dans le cancer du rein le TORISEL® ou temsirolimus qui inhibe la voie m-Tor. La voie m-Tor est connue pour être surexprimé dans le cancer superficiel de la vessie et est corrélée avec la récurrence et la progression de la maladie. Nous avons soumis nos 7 lignées de cancer de vessie à un test de « wound healing », en présence de milieu contenant du sérum et traitées par une dose de 40 nM de temsirolimus. Le traitement par temsirolimus ne possède pas une action identique sur toutes les cellules. La migration des lignées SW780 et TCCSUP est très largement ralenti par l'addition de temsirolimus, alors que la migration des autres lignées EJ, J82, T24, JMSU1, SD48 n'est pas affecté par l'addition de temsirolimus.

PARTIE 6 : CONCLUSION

Les enjeux majeurs du traitement du cancer de vessie sont d'éviter la rechute invasive et la dissémination de métastases. Le phénomène d'EMT permettant aux cellules cancéreuses d'acquérir la capacité de migration est un des mécanismes à l'origine de la formation des métastases. Les protéines Twist1 et E-cadhérine font partis des principaux régulateurs de l'EMT, et sont impliquées dans de nombreux cancers [167,319,320].

Dans ce contexte, nous avons donc recherché si Twist1 pouvait être une cible diagnostique, pronostique ou thérapeutique, dans le cancer de vessie.

Les résultats négatifs ou équivoques obtenus durant ce travail, ne nous ont par permis de caractériser Twist1 comme un marqueur diagnostique ou une cible potentielle dans le cancer de vessie.

Dans une deuxième partie de notre travail, nous nous sommes intéressés à une nouvelle molécule thérapeutique ayant une action anti-invasive, le saracatinib, dont le mode d'action inhibe les protéines Src. Nous avons recherché un possible lien avec la E-cadhérine.

Nous avons montré que les lignées de cancer de la vessie E-cadhérines positives, sont très sensibles d'un point de vue cytotoxique au traitement par saracatinib. Par ailleurs, nous avons montré que le saracatinib possède aussi une action anti-invasive sur les 7 lignées de cancer de vessie avec une sensibilité différente. Néanmoins cet effet ne semble pas être corrélé à la présence de la E-cadhérine.

Dans la lignée SD48 E-cadhérine positive, le traitement par saracatinib induit une augmentation de l'expression de E-cadhérine, accompagnée d'une relocalisation au niveau membranaire. De plus dans la lignée JMSU1, E-cadhérine négative, le traitement par le saracatinib induit l'apparition d'un marquage punctiforme de la E-cadhérine en immunofluorescence. Le mode d'action du saracatinib semble donc mettre en jeu la protéine E-cadhérine, cependant cette voie ne permet pas à elle seule de l'expliquer.

Le saracatinib aurait donc un intérêt potentiel dans le cancer de vessie, de part son action cytotoxique et anti-invasive. Il serait intéressant de caractériser plus en détails les lignées les plus sensibles à son action. La E-cadhérine pourrait jouer éventuellement un rôle prédictif à la réponse cytotoxique. D'autre part, de récentes études ont mis en évidence que le saracatinib que peu d'action en monothérapie, et qu'une association permettrait de potentialiser ses effets. Nous pourrions dans l'avenir étudier l'effet et les mécanismes d'actions liés à l'association de cette molécule avec le cisplatine, afin de mettre en évidence une éventuelle synergie d'action au niveau cytotoxique et anti-invasif [302].

BIBLIOGRAPHIE

Reference List

- [1] Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. *Global cancer statistics. CA Cancer J Clin* 2011;61:69-90.
- [2] Hemminki K, Bermejo JL, Ji J, Kumar R. *Familial bladder cancer and the related genes. Curr Opin Urol* 2011.
- [3] Thier R, Bruning T, Roos PH, Rihs HP, Golka K, Ko Y, et al. *Markers of genetic susceptibility in human environmental hygiene and toxicology: the role of selected CYP, NAT and GST genes. Int J Hyg Environ Health* 2003;206:149-71.
- [4] Fajkovic H, Halpern JA, Cha EK, Bahadori A, Chromecki TF, Karakiewicz PI, et al. *Impact of gender on bladder cancer incidence, staging, and prognosis. World J Urol* 2011.
- [5] Kamat AM, Mathew P. *Bladder cancer: imperatives for personalized medicine. Oncology (Williston Park)* 2011;25:951-8, 960.
- [6] Cappellen D, De OC, Ricol D, de MS, Bourdin J, Sastre-Garau X, et al. *Frequent activating mutations of FGFR3 in human bladder and cervix carcinomas. Nat Genet* 1999;23:18-20.
- [7] Juffs HG, Moore MJ, Tannock IF. *The role of systemic chemotherapy in the management of muscle-invasive bladder cancer. Lancet Oncol* 2002;3:738-47.
- [8] Sternberg CN, Donat SM, Bellmunt J, Millikan RE, Stadler W, De MP, et al. *Chemotherapy for bladder cancer: treatment guidelines for neoadjuvant chemotherapy, bladder preservation, adjuvant chemotherapy, and metastatic cancer. Urology* 2007;69:62-79.
- [9] Castillo-Martin M, Domingo-Domenech J, Karni-Schmidt O, Matos T, Cordon-Cardo C. *Molecular pathways of urothelial development and bladder tumorigenesis. Urol Oncol* 2010;28:401-8.
- [10] Goebell PJ, Knowles MA. *Bladder cancer or bladder cancers? Genetically distinct malignant conditions of the urothelium. Urol Oncol* 2010;28:409-28.
- [11] Ahmad I, Sansom OJ, Leung HY. *Exploring molecular genetics of bladder cancer: lessons learned from mouse models. Dis Model Mech* 2012;5:323-32.
- [12] Cheng L, Zhang S, MacLennan GT, Williamson SR, Lopez-Beltran A, Montironi R. *Bladder cancer: translating molecular genetic insights into clinical practice. Hum Pathol* 2011;42:455-81.
- [13] Levine AJ. *The p53 tumour suppressor gene and product. Cancer Surv* 1992;12:59-79.
- [14] Lane DP. *Cancer. p53, guardian of the genome. Nature* 1992;358:15-6.
- [15] Woods DB, Vousden KH. *Regulation of p53 function. Exp Cell Res* 2001;264:56-66.
- [16] Vogelstein B, Kinzler KW. *Achilles' heel of cancer? Nature* 2001;412:865-6.
- [17] Fujimoto K, Yamada Y, Okajima E, Kakizoe T, Sasaki H, Sugimura T, et al. *Frequent association of p53 gene mutation in invasive bladder cancer. Cancer Res* 1992;52:1393-8.
- [18] Knowles MA. *Tumor suppressor loci in bladder cancer. Front Biosci* 2007;12:2233-51.
- [19] Puzio-Kuter AM, Castillo-Martin M, Kinkade CW, Wang X, Shen TH, Matos T, et al. *Inactivation of p53 and Pten promotes invasive bladder cancer. Genes Dev* 2009;23:675-80.

- [20] Wallerand H, Bakkar AA, De Medina SG, Pairon JC, Yang YC, Vordos D, et al. Mutations in TP53, but not FGFR3, in urothelial cell carcinoma of the bladder are influenced by smoking: contribution of exogenous versus endogenous carcinogens. *Carcinogenesis* 2005;26:177-84.
- [21] Fletcher O, Easton D, Anderson K, Gilham C, Jay M, Peto J. Lifetime risks of common cancers among retinoblastoma survivors. *J Natl Cancer Inst* 2004;96:357-63.
- [22] Cairns P, Proctor AJ, Knowles MA. Loss of heterozygosity at the RB locus is frequent and correlates with muscle invasion in bladder carcinoma. *Oncogene* 1991;6:2305-9.
- [23] Puzio-Kuter AM, Castillo-Martin M, Kinkade CW, Wang X, Shen TH, Matos T, et al. Inactivation of p53 and Pten promotes invasive bladder cancer. *Genes Dev* 2009;23:675-80.
- [24] Tsuruta H, Kishimoto H, Sasaki T, Horie Y, Natsui M, Shibata Y, et al. Hyperplasia and carcinomas in Pten-deficient mice and reduced PTEN protein in human bladder cancer patients. *Cancer Res* 2006;66:8389-96.
- [25] Reddy EP, Reynolds RK, Santos E, Barbacid M. A point mutation is responsible for the acquisition of transforming properties by the T24 human bladder carcinoma oncogene. *Nature* 1982;300:149-52.
- [26] Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 2002;296:1655-7.
- [27] Deane JA, Fruman DA. Phosphoinositide 3-kinase: diverse roles in immune cell activation. *Annu Rev Immunol* 2004;22:563-98.
- [28] Garcia Z, Kumar A, Marques M, Cortes I, Carrera AC. Phosphoinositide 3-kinase controls early and late events in mammalian cell division. *EMBO J* 2006;25:655-61.
- [29] Wong KK, Engelman JA, Cantley LC. Targeting the PI3K signaling pathway in cancer. *Curr Opin Genet Dev* 2010;20:87-90.
- [30] Yuan TL, Cantley LC. PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene* 2008;27:5497-510.
- [31] Norman P. Selective PI3Kdelta inhibitors, a review of the patent literature. *Expert Opin Ther Pat* 2011;21:1773-90.
- [32] Lopez-Knowles E, Hernandez S, Malats N, Kogevinas M, Lloreta J, Carrato A, et al. PIK3CA mutations are an early genetic alteration associated with FGFR3 mutations in superficial papillary bladder tumors. *Cancer Res* 2006;66:7401-4.
- [33] Hart KC, Robertson SC, Donoghue DJ. Activation of H-ras61L-specific signaling pathways does not require posttranslational processing of H-ras. *Exp Cell Res* 2000;257:89-100.
- [34] Billerey C, Chopin D, Urbriot-Lorton MH, Ricol D, Gil Diez de MS, Van RB, et al. Frequent FGFR3 mutations in papillary non-invasive bladder (pTa) tumors. *Am J Pathol* 2001;158:1955-9.
- [35] Tomlinson DC, Baldo O, Harnden P, Knowles MA. FGFR3 protein expression and its relationship to mutation status and prognostic variables in bladder cancer. *J Pathol* 2007;213:91-8.
- [36] Hernandez S, de MS, Agell L, Juanpere N, Esgueva R, Lorente JA, et al. FGFR3 mutations in prostate cancer: association with low-grade tumors. *Mod Pathol* 2009;22:848-56.
- [37] Cairns P, Shaw ME, Knowles MA. Initiation of bladder cancer may involve deletion of a tumour-suppressor gene on chromosome 9. *Oncogene* 1993;8:1083-5.
- [38] Linnenbach AJ, Pressler LB, Seng BA, Kimmel BS, Tomaszewski JE, Malkowicz SB. Characterization of chromosome 9 deletions in transitional cell carcinoma by microsatellite assay. *Hum Mol Genet* 1993;2:1407-11.

- [39] Berggren P, Kumar R, Sakano S, Hemminki L, Wada T, Steineck G, et al. Detecting homozygous deletions in the CDKN2A(p16(INK4a))/ARF(p14(ARF)) gene in urinary bladder cancer using real-time quantitative PCR. *Clin Cancer Res* 2003;9:235-42.
- [40] Ansieau S, Bastid J, Doreau A, Morel AP, Bouchet BP, Thomas C, et al. Induction of EMT by twist proteins as a collateral effect of tumor-promoting inactivation of premature senescence. *Cancer Cell* 2008;14:79-89.
- [41] Chapman EJ, Harnden P, Chambers P, Johnston C, Knowles MA. Comprehensive analysis of CDKN2A status in microdissected urothelial cell carcinoma reveals potential haploinsufficiency, a high frequency of homozygous co-deletion and associations with clinical phenotype. *Clin Cancer Res* 2005;11:5740-7.
- [42] Bartoletti R, Cai T, Nesi G, Roberta GL, Baroni G, Dal CM. Loss of P16 expression and chromosome 9p21 LOH in predicting outcome of patients affected by superficial bladder cancer. *J Surg Res* 2007;143:422-7.
- [43] Berggren d, V, Kumar R, Adolfsen J, Larsson P, Norming U, Onelov E, et al. Prognostic significance of homozygous deletions and multiple duplications at the CDKN2A (p16INK4a)/ARF (p14ARF) locus in urinary bladder cancer. *Scand J Urol Nephrol* 2006;40:363-9.
- [44] McGarvey TW, Maruta Y, Tomaszewski JE, Linnenbach AJ, Malkowicz SB. PTCH gene mutations in invasive transitional cell carcinoma of the bladder. *Oncogene* 1998;17:1167-72.
- [45] Nishiyama H, Takahashi T, Kakehi Y, Habuchi T, Knowles MA. Homozygous deletion at the 9q32-33 candidate tumor suppressor locus in primary human bladder cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 1999;26:171-5.
- [46] Habuchi T, Takahashi T, Kakinuma H, Wang L, Tsuchiya N, Satoh S, et al. Hypermethylation at 9q32-33 tumour suppressor region is age-related in normal urothelium and an early and frequent alteration in bladder cancer. *Oncogene* 2001;20:531-7.
- [47] Simoneau M, LaRue H, Aboukassim TO, Meyer F, Moore L, Fradet Y. Chromosome 9 deletions and recurrence of superficial bladder cancer: identification of four regions of prognostic interest. *Oncogene* 2000;19:6317-23.
- [48] Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer* 2003;3:453-8.
- [49] Geiger TR, Peeper DS. Metastasis mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 2009;1796:293-308.
- [50] Mehlen P, Puisieux A. Metastasis: a question of life or death. *Nat Rev Cancer* 2006;6:449-58.
- [51] Shevde LA, Welch DR. Metastasis suppressor pathways--an evolving paradigm. *Cancer Lett* 2003;198:1-20.
- [52] Smith SC, Theodorescu D. Learning therapeutic lessons from metastasis suppressor proteins. *Nat Rev Cancer* 2009;9:253-64.
- [53] Chong HC, Tan CK, Huang RL, Tan NS. Matricellular proteins: a sticky affair with cancers. *J Oncol* 2012;2012:351089.
- [54] Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 2009;139:871-90.
- [55] Prall F, Ostwald C. High-degree tumor budding and podia-formation in sporadic colorectal carcinomas with K-ras gene mutations. *Hum Pathol* 2007;38:1696-702.
- [56] Savagner P, Arnoux V. [Epithelio-mesenchymal transition and cutaneous wound healing]. *Bull Acad Natl Med* 2009;193:1981-91.

- [57] Thiery JP, Sleeman JP. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006;7:131-42.
- [58] Christ B, Ordahl CP. Early stages of chick somite development. *Anat Embryol (Berl)* 1995;191:381-96.
- [59] Locascio A, Nieto MA. Cell movements during vertebrate development: integrated tissue behaviour versus individual cell migration. *Curr Opin Genet Dev* 2001;11:464-9.
- [60] Martin P. Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. *Science* 1997;276:75-81.
- [61] Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 2009;119:1420-8.
- [62] Ansieau S, Courtois-Cox S, Morel AP, Puisieux A. Failsafe program escape and EMT: a deleterious partnership. *Semin Cancer Biol* 2011;21:392-6.
- [63] Radisky DC, Kenny PA, Bissell MJ. Fibrosis and cancer: do myofibroblasts come also from epithelial cells via EMT? *J Cell Biochem* 2007;101:830-9.
- [64] Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 2008;133:704-15.
- [65] Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2002;2:442-54.
- [66] Xue C, Plieth D, Venkov C, Xu C, Neilson EG. The gatekeeper effect of epithelial-mesenchymal transition regulates the frequency of breast cancer metastasis. *Cancer Res* 2003;63:3386-94.
- [67] Peinado H, Portillo F, Cano A. Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis. *Int J Dev Biol* 2004;48:365-75.
- [68] Cavallaro U, Christofori G. Multitasking in tumor progression: signaling functions of cell adhesion molecules. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1014:58-66.
- [69] Agiostratidou G, Hult J, Phillips GR, Hazan RB. Differential cadherin expression: potential markers for epithelial to mesenchymal transformation during tumor progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2007;12:127-33.
- [70] Sato M, Shames DS, Hasegawa Y. Emerging evidence of Epithelial-to-Mesenchymal Transition in lung carcinogenesis. *Respirology* 2012.
- [71] Nakajima S, Doi R, Toyoda E, Tsuji S, Wada M, Koizumi M, et al. N-cadherin expression and epithelial-mesenchymal transition in pancreatic carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004;10:4125-33.
- [72] Harten SK, Shukla D, Barod R, Hergovich A, Balda MS, Matter K, et al. Regulation of renal epithelial tight junctions by the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene involves occludin and claudin 1 and is independent of E-cadherin. *Mol Biol Cell* 2009;20:1089-101.
- [73] Pyo SW, Hashimoto M, Kim YS, Kim CH, Lee SH, Johnson KR, et al. Expression of E-cadherin, P-cadherin and N-cadherin in oral squamous cell carcinoma: correlation with the clinicopathologic features and patient outcome. *J Craniomaxillofac Surg* 2007;35:1-9.
- [74] Hazan RB, Qiao R, Keren R, Badano I, Suyama K. Cadherin switch in tumor progression. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1014:155-63.
- [75] Hirohashi S. Inactivation of the E-cadherin-mediated cell adhesion system in human cancers. *Am J Pathol* 1998;153:333-9.
- [76] Agiostratidou G, Hult J, Phillips GR, Hazan RB. Differential cadherin expression: potential markers for epithelial to mesenchymal transformation during tumor progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2007;12:127-33.

- [77] Nollet F, Berx G, Van RF. The role of the E-cadherin/catenin adhesion complex in the development and progression of cancer. *Mol Cell Biol Res Commun* 1999;2:77-85.
- [78] Perl AK, Wilgenbus P, Dahl U, Semb H, Christofori G. A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma. *Nature* 1998;392:190-3.
- [79] Behrens J, Mareel MM, Van Roy FM, Birchmeier W. Dissecting tumor cell invasion: epithelial cells acquire invasive properties after the loss of uvomorulin-mediated cell-cell adhesion. *J Cell Biol* 1989;108:2435-47.
- [80] Peinado H, Olmeda D, Cano A. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer* 2007;7:415-28.
- [81] Ahmed N, Abubaker K, Findlay J, Quinn M. Epithelial mesenchymal transition and cancer stem cell-like phenotypes facilitate chemoresistance in recurrent ovarian cancer. *Curr Cancer Drug Targets* 2010;10:268-78.
- [82] Maseki S, Ijichi K, Tanaka H, Fujii M, Hasegawa Y, Ogawa T, et al. Acquisition of EMT phenotype in the gefitinib-resistant cells of a head and neck squamous cell carcinoma cell line through Akt/GSK-3beta/snail signalling pathway. *Br J Cancer* 2012;106:1196-204.
- [83] Zhang W, Feng M, Zheng G, Chen Y, Wang X, Pen B, et al. Chemoresistance to 5-fluorouracil induces epithelial-mesenchymal transition via up-regulation of Snail in MCF7 human breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2012;417:679-85.
- [84] Chen X, Lingala S, Khoobyari S, Nolta J, Zern MA, Wu J. Epithelial mesenchymal transition and hedgehog signaling activation are associated with chemoresistance and invasion of hepatoma subpopulations. *J Hepatol* 2011;55:838-45.
- [85] Wang Z, Li Y, Ahmad A, Banerjee S, Azmi AS, Kong D, et al. Pancreatic cancer: understanding and overcoming chemoresistance. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2011;8:27-33.
- [86] Hoshino H, Miyoshi N, Nagai K, Tomimaru Y, Nagano H, Sekimoto M, et al. Epithelial-mesenchymal transition with expression of SNAIL-induced chemoresistance in colorectal cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;390:1061-5.
- [87] Chiodoni C, Colombo MP, Sangaletti S. Matricellular proteins: from homeostasis to inflammation, cancer, and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 2010;29:295-307.
- [88] Chong HC, Tan CK, Huang RL, Tan NS. Matricellular proteins: a sticky affair with cancers. *J Oncol* 2012;2012:351089.
- [89] Joyce JA, Pollard JW. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer* 2009;9:239-52.
- [90] Takahashi Y, Sato Y, Suetsugu R, Nakaya Y. Mesenchymal-to-epithelial transition during somitic segmentation: a novel approach to studying the roles of Rho family GTPases in morphogenesis. *Cells Tissues Organs* 2005;179:36-42.
- [91] Horster MF, Braun GS, Huber SM. Embryonic renal epithelia: induction, nephrogenesis, and cell differentiation. *Physiol Rev* 1999;79:1157-91.
- [92] Vainio S, Lin Y. Coordinating early kidney development: lessons from gene targeting. *Nat Rev Genet* 2002;3:533-43.
- [93] Christiansen JJ, Rajasekaran AK. Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis. *Cancer Res* 2006;66:8319-26.
- [94] Berx G, Raspe E, Christofori G, Thiery JP, Sleeman JP. Pre-EMTing metastasis? Recapitulation of morphogenetic processes in cancer. *Clin Exp Metastasis* 2007;24:587-97.

- [95] Elenbaas B, Weinberg RA. Heterotypic signaling between epithelial tumor cells and fibroblasts in carcinoma formation. *Exp Cell Res* 2001;264:169-84.
- [96] Watabe M, Nagafuchi A, Tsukita S, Takeichi M. Induction of polarized cell-cell association and retardation of growth by activation of the E-cadherin-catenin adhesion system in a dispersed carcinoma line. *J Cell Biol* 1994;127:247-56.
- [97] Tepass U. Adherens junctions: new insight into assembly, modulation and function. *Bioessays* 2002;24:690-5.
- [98] Kajiyama H, Shibata K, Terauchi M, Yamashita M, Ino K, Nawa A, et al. Chemoresistance to paclitaxel induces epithelial-mesenchymal transition and enhances metastatic potential for epithelial ovarian carcinoma cells. *Int J Oncol* 2007;31:277-83.
- [99] Le TL, Yap AS, Stow JL. Recycling of E-cadherin: a potential mechanism for regulating cadherin dynamics. *J Cell Biol* 1999;146:219-32.
- [100] Yang J, Weinberg RA. Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Dev Cell* 2008;14:818-29.
- [101] Cano A, Perez-Moreno MA, Rodrigo I, Locascio A, Blanco MJ, del Barrio MG, et al. The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol* 2000;2:76-83.
- [102] Vandewalle C, Comijn J, De CB, Vermassen P, Bruyneel E, Andersen H, et al. SIP1/ZEB2 induces EMT by repressing genes of different epithelial cell-cell junctions. *Nucleic Acids Res* 2005;33:6566-78.
- [103] Bolos V, Peinado H, Perez-Moreno MA, Fraga MF, Esteller M, Cano A. The transcription factor Slug represses E-cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transitions: a comparison with Snail and E47 repressors. *J Cell Sci* 2003;116:499-511.
- [104] Perez-Moreno MA, Locascio A, Rodrigo I, Dhondt G, Portillo F, Nieto MA, et al. A new role for E12/E47 in the repression of E-cadherin expression and epithelial-mesenchymal transitions. *J Biol Chem* 2001;276:27424-31.
- [105] Casas E, Kim J, Bendesky A, Ohno-Machado L, Wolfe CJ, Yang J. Snail2 is an essential mediator of Twist1-induced epithelial mesenchymal transition and metastasis. *Cancer Res* 2011;71:245-54.
- [106] Sobrado VR, Moreno-Bueno G, Cubillo E, Holt LJ, Nieto MA, Portillo F, et al. The class I bHLH factors E2-2A and E2-2B regulate EMT. *J Cell Sci* 2009;122:1014-24.
- [107] Pece S, Gutkind JS. E-cadherin and Hakai: signalling, remodeling or destruction? *Nat Cell Biol* 2002;4:E72-E74.
- [108] Pece S, Gutkind JS. E-cadherin and Hakai: signalling, remodeling or destruction? *Nat Cell Biol* 2002;4:E72-E74.
- [109] Kimelman D. Mesoderm induction: from caps to chips. *Nat Rev Genet* 2006;7:360-72.
- [110] Boyer AS, Erickson CP, Runyan RB. Epithelial-mesenchymal transformation in the embryonic heart is mediated through distinct pertussis toxin-sensitive and TGFbeta signal transduction mechanisms. *Dev Dyn* 1999;214:81-91.
- [111] Ozdamar B, Bose R, Barrios-Rodiles M, Wang HR, Zhang Y, Wrana JL. Regulation of the polarity protein Par6 by TGFbeta receptors controls epithelial cell plasticity. *Science* 2005;307:1603-9.
- [112] Barrios-Rodiles M, Brown KR, Ozdamar B, Bose R, Liu Z, Donovan RS, et al. High-throughput mapping of a dynamic signaling network in mammalian cells. *Science* 2005;307:1621-5.

- [113] Wu J, Yang J, Klein PS. Neural crest induction by the canonical Wnt pathway can be dissociated from anterior-posterior neural patterning in *Xenopus*. *Dev Biol* 2005;279:220-32.
- [114] Hsu SC, Galceran J, Grosschedl R. Modulation of transcriptional regulation by *LEF-1* in response to *Wnt-1* signaling and association with beta-catenin. *Mol Cell Biol* 1998;18:4807-18.
- [115] Nelson WJ, Nusse R. Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science* 2004;303:1483-7.
- [116] Yook JI, Li XY, Ota I, Fearon ER, Weiss SJ. Wnt-dependent regulation of the E-cadherin repressor snail. *J Biol Chem* 2005;280:11740-8.
- [117] Stemmer V, De CB, Berx G, Behrens J. Snail promotes Wnt target gene expression and interacts with beta-catenin. *Oncogene* 2008;27:5075-80.
- [118] Onder TT, Gupta PB, Mani SA, Yang J, Lander ES, Weinberg RA. Loss of E-cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways. *Cancer Res* 2008;68:3645-54.
- [119] Conacci-Sorrell M, Simcha I, Ben-Yedidia T, Blechman J, Savagner P, Ben-Ze'ev A. Autoregulation of E-cadherin expression by cadherin-cadherin interactions: the roles of beta-catenin signaling, Slug, and MAPK. *J Cell Biol* 2003;163:847-57.
- [120] Cornell RA, Eisen JS. Notch in the pathway: the roles of Notch signaling in neural crest development. *Semin Cell Dev Biol* 2005;16:663-72.
- [121] Ciruna B, Rossant J. FGF signaling regulates mesoderm cell fate specification and morphogenetic movement at the primitive streak. *Dev Cell* 2001;1:37-49.
- [122] Boyer B, Tucker GC, Valles AM, Franke WW, Thiery JP. Rearrangements of desmosomal and cytoskeletal proteins during the transition from epithelial to fibroblastoid organization in cultured rat bladder carcinoma cells. *J Cell Biol* 1989;109:1495-509.
- [123] Jechlinger M, Sommer A, Moriggl R, Seither P, Kraut N, Capodiecci P, et al. Autocrine PDGFR signaling promotes mammary cancer metastasis. *J Clin Invest* 2006;116:1561-70.
- [124] Yang AD, Camp ER, Fan F, Shen L, Gray MJ, Liu W, et al. Vascular endothelial growth factor receptor-1 activation mediates epithelial to mesenchymal transition in human pancreatic carcinoma cells. *Cancer Res* 2006;66:46-51.
- [125] Huber MA, Kraut N, Beug H. Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression. *Curr Opin Cell Biol* 2005;17:548-58.
- [126] Pham CG, Bubici C, Zazzeroni F, Knabb JR, Papa S, Kuntzen C, et al. Upregulation of *Twist-1* by *NF-kappaB* blocks cytotoxicity induced by chemotherapeutic drugs. *Mol Cell Biol* 2007;27:3920-35.
- [127] Baldwin AS. Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor *NF-kappaB*. *J Clin Invest* 2001;107:241-6.
- [128] Baldwin AS. Regulation of cell death and autophagy by *IKK* and *NF-kappaB*: critical mechanisms in immune function and cancer. *Immunol Rev* 2012;246:327-45.
- [129] Qi H, Ohh M. The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein sensitizes renal cell carcinoma cells to tumor necrosis factor-induced cytotoxicity by suppressing the nuclear factor-kappaB-dependent antiapoptotic pathway. *Cancer Res* 2003;63:7076-80.
- [130] An J, Fisher M, Rettig MB. *VHL* expression in renal cell carcinoma sensitizes to bortezomib (PS-341) through an *NF-kappaB*-dependent mechanism. *Oncogene* 2005;24:1563-70.

- [131] Sourbier C, Danilin S, Lindner V, Steger J, Rothhut S, Meyer N, et al. Targeting the nuclear factor-kappaB rescue pathway has promising future in human renal cell carcinoma therapy. *Cancer Res* 2007;67:11668-76.
- [132] Sasic D, Richardson JA, Yu K, Ornitz DM, Olson EN. Twist regulates cytokine gene expression through a negative feedback loop that represses NF-kappaB activity. *Cell* 2003;112:169-80.
- [133] Pantuck AJ, An J, Liu H, Rettig MB. NF-kappaB-dependent plasticity of the epithelial to mesenchymal transition induced by Von Hippel-Lindau inactivation in renal cell carcinomas. *Cancer Res* 2010;70:752-61.
- [134] Takeda K, Takeuchi O, Tsujimura T, Itami S, Adachi O, Kawai T, et al. Limb and skin abnormalities in mice lacking IKKalpha. *Science* 1999;284:313-6.
- [135] An J, Rettig MB. Mechanism of von Hippel-Lindau protein-mediated suppression of nuclear factor kappa B activity. *Mol Cell Biol* 2005;25:7546-56.
- [136] Niesner U, Albrecht I, Janke M, Doebis C, Loddenkemper C, Lexberg MH, et al. Autoregulation of Th1-mediated inflammation by twist1. *J Exp Med* 2008;205:1889-901.
- [137] Barrallo-Gimeno A, Nieto MA. The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer. *Development* 2005;132:3151-61.
- [138] Esteban MA, Tran MG, Harten SK, Hill P, Castellanos MC, Chandra A, et al. Regulation of E-cadherin expression by VHL and hypoxia-inducible factor. *Cancer Res* 2006;66:3567-75.
- [139] Lester RD, Jo M, Montel V, Takimoto S, Gonias SL. uPAR induces epithelial-mesenchymal transition in hypoxic breast cancer cells. *J Cell Biol* 2007;178:425-36.
- [140] Yang MH, Wu MZ, Chiou SH, Chen PM, Chang SY, Liu CJ, et al. Direct regulation of TWIST by HIF-1alpha promotes metastasis. *Nat Cell Biol* 2008;10:295-305.
- [141] Schofield CJ, Ratcliffe PJ. Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004;5:343-54.
- [142] Imai T, Horiuchi A, Wang C, Oka K, Ohira S, Nikaido T, et al. Hypoxia attenuates the expression of E-cadherin via up-regulation of SNAIL in ovarian carcinoma cells. *Am J Pathol* 2003;163:1437-47.
- [143] Harten SK, Shukla D, Barod R, Hergovich A, Balda MS, Matter K, et al. Regulation of renal epithelial tight junctions by the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene involves occludin and claudin 1 and is independent of E-cadherin. *Mol Biol Cell* 2009;20:1089-101.
- [144] Simpson P. Maternal-Zygotic Gene Interactions during Formation of the Dorsoventral Pattern in *Drosophila* Embryos. *Genetics* 1983;105:615-32.
- [145] Miraoui H, Marie PJ. Pivotal role of Twist in skeletal biology and pathology. *Gene* 2010;468:1-7.
- [146] Howard TD, Paznekas WA, Green ED, Chiang LC, Ma N, Ortiz de Luna RI, et al. Mutations in TWIST, a basic helix-loop-helix transcription factor, in Saethre-Chotzen syndrome. *Nat Genet* 1997;15:36-41.
- [147] Spring J, Yanze N, Middel AM, Stierwald M, Groger H, Schmid V. The mesoderm specification factor twist in the life cycle of jellyfish. *Dev Biol* 2000;228:363-75.
- [148] Castanon I, Baylies MK. A Twist in fate: evolutionary comparison of Twist structure and function. *Gene* 2002;287:11-22.
- [149] Firulli BA, Krawchuk D, Centonze VE, Vargesson N, Virshup DM, Conway SJ, et al. Altered Twist1 and Hand2 dimerization is associated with Saethre-Chotzen syndrome and limb abnormalities. *Nat Genet* 2005;37:373-81.

- [150] Murre C, McCaw PS, Baltimore D. A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, daughterless, MyoD, and myc proteins. *Cell* 1989;56:777-83.
- [151] Vichalkovski A, Gresko E, Hess D, Restuccia DF, Hemmings BA. PKB/AKT phosphorylation of the transcription factor Twist-1 at Ser42 inhibits p53 activity in response to DNA damage. *Oncogene* 2010;29:3554-65.
- [152] Funato N, Twigg SR, Higashihori N, Ohyama K, Wall SA, Wilkie AO, et al. Functional analysis of natural mutations in two TWIST protein motifs. *Hum Mutat* 2005;25:550-6.
- [153] Singh S, Gramolini AO. Characterization of sequences in human TWIST required for nuclear localization. *BMC Cell Biol* 2009;10:47.
- [154] Firulli AB, Conway SJ. Phosphoregulation of Twist1 provides a mechanism of cell fate control. *Curr Med Chem* 2008;15:2641-7.
- [155] Hong J, Zhou J, Fu J, He T, Qin J, Wang L, et al. Phosphorylation of Serine 68 of Twist1 by MAPKs Stabilizes Twist1 Protein and Promotes Breast Cancer Cell Invasiveness. *Cancer Res* 2011.
- [156] Junttila MR, Puustinen P, Niemela M, Ahola R, Arnold H, Bottzauw T, et al. CIP2A inhibits PP2A in human malignancies. *Cell* 2007;130:51-62.
- [157] Thisse B, el MM, Perrin-Schmitt F. The twist gene: isolation of a Drosophila zygotic gene necessary for the establishment of dorsoventral pattern. *Nucleic Acids Res* 1987;15:3439-53.
- [158] Li L, Cserjesi P, Olson EN. Dermo-1: a novel twist-related bHLH protein expressed in the developing dermis. *Dev Biol* 1995;172:280-92.
- [159] Gitelman I. Twist protein in mouse embryogenesis. *Dev Biol* 1997;189:205-14.
- [160] Currie DA, Bate M. The development of adult abdominal muscles in Drosophila: myoblasts express twist and are associated with nerves. *Development* 1991;113:91-102.
- [161] Lister JA, Baron MH. Induction of basic helix-loop-helix protein-containing complexes during erythroid differentiation. *Gene Expr* 1998;7:25-38.
- [162] Murray SS, Glackin CA, Winters KA, Gazit D, Kahn AJ, Murray EJ. Expression of helix-loop-helix regulatory genes during differentiation of mouse osteoblastic cells. *J Bone Miner Res* 1992;7:1131-8.
- [163] Li L, Cserjesi P, Olson EN. Dermo-1: a novel twist-related bHLH protein expressed in the developing dermis. *Dev Biol* 1995;172:280-92.
- [164] Qin Q, Xu Y, He T, Qin C, Xu J. Normal and disease-related biological functions of Twist1 and underlying molecular mechanisms. *Cell Res* 2012;22:90-106.
- [165] Rosivatz E, Becker I, Specht K, Fricke E, Lubber B, Busch R, et al. Differential expression of the epithelial-mesenchymal transition regulators snail, SIP1, and twist in gastric cancer. *Am J Pathol* 2002;161:1881-91.
- [166] Pinho AV, Rooman I, Real FX. p53-dependent regulation of growth, epithelial-mesenchymal transition and stemness in normal pancreatic epithelial cells. *Cell Cycle* 2011;10:1312-21.
- [167] Maestro R, Dei Tos AP, Hamamori Y, Krasnokutsky S, Sartorelli V, Kedes L, et al. Twist is a potential oncogene that inhibits apoptosis. *Genes Dev* 1999;13:2207-17.
- [168] Lee TK, Poon RT, Yuen AP, Ling MT, Kwok WK, Wang XH, et al. Twist overexpression correlates with hepatocellular carcinoma metastasis through induction of epithelial-mesenchymal transition. *Clin Cancer Res* 2006;12:5369-76.

- [169] Valsesia-Wittmann S, Magdeleine M, Dupasquier S, Garin E, Jallas AC, Combaret V, et al. Oncogenic cooperation between H-Twist and N-Myc overrides failsafe programs in cancer cells. *Cancer Cell* 2004;6:625-30.
- [170] Stasinopoulos IA, Mironchik Y, Raman A, Wildes F, Winnard P, Jr., Raman V. HOXA5-twist interaction alters p53 homeostasis in breast cancer cells. *J Biol Chem* 2005;280:2294-9.
- [171] Watanabe O, Imamura H, Shimizu T, Kinoshita J, Okabe T, Hirano A, et al. Expression of twist and wnt in human breast cancer. *Anticancer Res* 2004;24:3851-6.
- [172] Yang J, Mani SA, Donaher JL, Ramaswamy S, Itzykson RA, Come C, et al. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell* 2004;117:927-39.
- [173] Hoek K, Rimm DL, Williams KR, Zhao H, Ariyan S, Lin A, et al. Expression profiling reveals novel pathways in the transformation of melanocytes to melanomas. *Cancer Res* 2004;64:5270-82.
- [174] Kwok WK, Ling MT, Lee TW, Lau TC, Zhou C, Zhang X, et al. Up-regulation of TWIST in prostate cancer and its implication as a therapeutic target. *Cancer Res* 2005;65:5153-62.
- [175] Elias MC, Tozer KR, Silber JR, Mikheeva S, Deng M, Morrison RS, et al. TWIST is expressed in human gliomas and promotes invasion. *Neoplasia* 2005;7:824-37.
- [176] Yu Q, Zhang K, Wang X, Liu X, Zhang Z. Expression of transcription factors snail, slug, and twist in human bladder carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res* 2010;29:119.
- [177] Zhang Z, Xie D, Li X, Wong YC, Xin D, Guan XY, et al. Significance of TWIST expression and its association with E-cadherin in bladder cancer. *Hum Pathol* 2007;38:598-606.
- [178] Hosono S, Kajiyama H, Terauchi M, Shibata K, Ino K, Nawa A, et al. Expression of Twist increases the risk for recurrence and for poor survival in epithelial ovarian carcinoma patients. *Br J Cancer* 2007;96:314-20.
- [179] Kyo S, Sakaguchi J, Ohno S, Mizumoto Y, Maida Y, Hashimoto M, et al. High Twist expression is involved in infiltrative endometrial cancer and affects patient survival. *Hum Pathol* 2006;37:431-8.
- [180] Shibata K, Kajiyama H, Ino K, Terauchi M, Yamamoto E, Nawa A, et al. Twist expression in patients with cervical cancer is associated with poor disease outcome. *Ann Oncol* 2008;19:81-5.
- [181] Mironchik Y, Winnard PT, Jr., Vesuna F, Kato Y, Wildes F, Pathak AP, et al. Twist overexpression induces in vivo angiogenesis and correlates with chromosomal instability in breast cancer. *Cancer Res* 2005;65:10801-9.
- [182] Puisieux A, Valsesia-Wittmann S, Ansieau S. A twist for survival and cancer progression. *Br J Cancer* 2006;94:13-7.
- [183] Man TK, Chintagumpala M, Visvanathan J, Shen J, Perlaky L, Hicks J, et al. Expression profiles of osteosarcoma that can predict response to chemotherapy. *Cancer Res* 2005;65:8142-50.
- [184] Li QQ, Xu JD, Wang WJ, Cao XX, Chen Q, Tang F, et al. Twist1-mediated adriamycin-induced epithelial-mesenchymal transition relates to multidrug resistance and invasive potential in breast cancer cells. *Clin Cancer Res* 2009;15:2657-65.
- [185] Kwok WK, Ling MT, Yuen HF, Wong YC, Wang X. Role of p14ARF in TWIST-mediated senescence in prostate epithelial cells. *Carcinogenesis* 2007;28:2467-75.
- [186] Avantaggiati ML, Ogryzko V, Gardner K, Giordano A, Levine AS, Kelly K. Recruitment of p300/CBP in p53-dependent signal pathways. *Cell* 1997;89:1175-84.

- [187] Hamamori Y, Sartorelli V, Ogryzko V, Puri PL, Wu HY, Wang JY, et al. Regulation of histone acetyltransferases p300 and PCAF by the bHLH protein twist and adenoviral oncoprotein E1A. *Cell* 1999;96:405-13.
- [188] Cheng GZ, Chan J, Wang Q, Zhang W, Sun CD, Wang LH. Twist transcriptionally up-regulates AKT2 in breast cancer cells leading to increased migration, invasion, and resistance to paclitaxel. *Cancer Res* 2007;67:1979-87.
- [189] Wang X, Ling MT, Guan XY, Tsao SW, Cheung HW, Lee DT, et al. Identification of a novel function of TWIST, a bHLH protein, in the development of acquired taxol resistance in human cancer cells. *Oncogene* 2004;23:474-82.
- [190] Zhang X, Wang Q, Ling MT, Wong YC, Leung SC, Wang X. Anti-apoptotic role of TWIST and its association with Akt pathway in mediating taxol resistance in nasopharyngeal carcinoma cells. *Int J Cancer* 2007;120:1891-8.
- [191] Hermeking H, Eick D. Mediation of c-Myc-induced apoptosis by p53. *Science* 1994;265:2091-3.
- [192] El G, V, Le MM, Perrin-Schmitt F, Lajeunie E, Benit P, Renier D, et al. Mutations of the TWIST gene in the Saethre-Chotzen syndrome. *Nat Genet* 1997;15:42-6.
- [193] Vesuna F, Winnard P, Jr., Glackin C, Raman V. Twist overexpression promotes chromosomal instability in the breast cancer cell line MCF-7. *Cancer Genet Cytogenet* 2006;167:189-91.
- [194] Dupont J, Fernandez AM, Glackin CA, Helman L, LeRoith D. Insulin-like growth factor 1 (IGF-1)-induced twist expression is involved in the anti-apoptotic effects of the IGF-1 receptor. *J Biol Chem* 2001;276:26699-707.
- [195] Shiota M, Izumi H, Onitsuka T, Miyamoto N, Kashiwagi E, Kidani A, et al. Twist promotes tumor cell growth through YB-1 expression. *Cancer Res* 2008;68:98-105.
- [196] Wu CY, Hung JJ, Wu KJ. Linkage between Twist1 and Bmi1: molecular mechanism of cancer metastasis/stemness and clinical implications. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2012;39:668-73.
- [197] Yang MH, Hsu DS, Wang HW, Wang HJ, Lan HY, Yang WH, et al. Bmi1 is essential in Twist1-induced epithelial-mesenchymal transition. *Nat Cell Biol* 2010;12:982-92.
- [198] Karreth F, Tuveson DA. Twist induces an epithelial-mesenchymal transition to facilitate tumor metastasis. *Cancer Biol Ther* 2004;3:1058-9.
- [199] Eckert MA, Lwin TM, Chang AT, Kim J, Danis E, Ohno-Machado L, et al. Twist1-induced invadopodia formation promotes tumor metastasis. *Cancer Cell* 2011;19:372-86.
- [200] Okamura H, Yoshida K, Haneji T. Negative regulation of TIMP1 is mediated by transcription factor TWIST1. *Int J Oncol* 2009;35:181-6.
- [201] Singh S, Mak I, Cowan RW, Turcotte R, Singh G, Ghert M. The role of TWIST as a regulator in giant cell tumor of bone. *J Cell Biochem* 2011.
- [202] Yuen HF, Kwok WK, Chan KK, Chua CW, Chan YP, Chu YY, et al. TWIST modulates prostate cancer cell-mediated bone cell activity and is upregulated by osteogenic induction. *Carcinogenesis* 2008;29:1509-18.
- [203] Jin-Lu M, Su-Xia H, Qing Z, Jing Z, Dan Z, Li W, et al. Role of Twist in vasculogenic mimicry formation in hypoxic hepatocellular carcinoma cells in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 2011;408:686-91.
- [204] Li J, Dong XG, Liu T. [Experimental study of Twist siRNA to inhibit the formation of retinal neovascularization in mice.]. *Zhonghua Yan Ke Za Zhi* 2011;47:217-22.

- [205] Niu RF, Zhang L, Xi GM, Wei XY, Yang Y, Shi YR, et al. Up-regulation of *Twist* induces angiogenesis and correlates with metastasis in hepatocellular carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res* 2007;26:385-94.
- [206] Cheng GZ, Zhang WZ, Sun M, Wang Q, Coppola D, Mansour M, et al. *Twist* is transcriptionally induced by activation of *STAT3* and mediates *STAT3* oncogenic function. *J Biol Chem* 2008;283:14665-73.
- [207] Menchon C, Edel MJ, Izpisua Belmonte JC. The cell cycle inhibitor p27 (*Kip1*) controls self-renewal and pluripotency of human embryonic stem cells by regulating the cell cycle, Brachyury and *Twist*. *Cell Cycle* 2011;10:1435-47.
- [208] Martin GS. The hunting of the *Src*. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2:467-75.
- [209] Kim LC, Song L, Haura EB. *Src* kinases as therapeutic targets for cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 2009;6:587-95.
- [210] Irby RB, Yeatman TJ. Role of *Src* expression and activation in human cancer. *Oncogene* 2000;19:5636-42.
- [211] Aligayer H, Boyd DD, Heiss MM, Abdalla EK, Curley SA, Gallick GE. Activation of *Src* kinase in primary colorectal carcinoma: an indicator of poor clinical prognosis. *Cancer* 2002;94:344-51.
- [212] Masaki T, Igarashi K, Tokuda M, Yukimasa S, Han F, Jin YJ, et al. pp60c-src activation in lung adenocarcinoma. *Eur J Cancer* 2003;39:1447-55.
- [213] Playford MP, Schaller MD. The interplay between *Src* and integrins in normal and tumor biology. *Oncogene* 2004;23:7928-46.
- [214] Owens DW, McLean GW, Wyke AW, Paraskeva C, Parkinson EK, Frame MC, et al. The catalytic activity of the *Src* family kinases is required to disrupt cadherin-dependent cell-cell contacts. *Mol Biol Cell* 2000;11:51-64.
- [215] Avizienyte E, Frame MC. *Src* and FAK signalling controls adhesion fate and the epithelial-to-mesenchymal transition. *Curr Opin Cell Biol* 2005;17:542-7.
- [216] Thomas SM, Brugge JS. Cellular functions regulated by *Src* family kinases. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1997;13:513-609.
- [217] Sicheri F, Moarefi I, Kuriyan J. Crystal structure of the *Src* family tyrosine kinase *Hck*. *Nature* 1997;385:602-9.
- [218] Zhang S, Yu D. Targeting *Src* family kinases in anti-cancer therapies: turning promise into triumph. *Trends Pharmacol Sci* 2012;33:122-8.
- [219] Silverman L, Sigal CT, Resh MD. Binding of pp60v-src to membranes: evidence for multiple membrane interactions. *Biochem Cell Biol* 1992;70:1187-92.
- [220] Johnson FM, Gallick GE. SRC family nonreceptor tyrosine kinases as molecular targets for cancer therapy. *Anticancer Agents Med Chem* 2007;7:651-9.
- [221] Fecchi K, Travaglione S, Spadaro F, Quattrini A, Parolini I, Piccaro G, et al. Human melanoma cells express FGFR/*Src*/Rho signaling that entails an adhesion-independent caveolin-1 membrane association. *Int J Cancer* 2012;130:1273-83.
- [222] Tatosyan AG, Mizenina OA. Kinases of the *Src* family: structure and functions. *Biochemistry (Mosc)* 2000;65:49-58.
- [223] Summy JM, Gallick GE. Treatment for advanced tumors: SRC reclaims center stage. *Clin Cancer Res* 2006;12:1398-401.

- [224] Yeatman TJ. A renaissance for SRC. *Nat Rev Cancer* 2004;4:470-80.
- [225] Talamonti MS, Roh MS, Curley SA, Gallick GE. Increase in activity and level of pp60c-src in progressive stages of human colorectal cancer. *J Clin Invest* 1993;91:53-60.
- [226] Puls LN, Eadens M, Messersmith W. Current status of SRC inhibitors in solid tumor malignancies. *Oncologist* 2011;16:566-78.
- [227] Xu W, Harrison SC, Eck MJ. Three-dimensional structure of the tyrosine kinase c-Src. *Nature* 1997;385:595-602.
- [228] Mayer EL, Krop IE. Advances in targeting SRC in the treatment of breast cancer and other solid malignancies. *Clin Cancer Res* 2010;16:3526-32.
- [229] Lee JM, Dedhar S, Kalluri R, Thompson EW. The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *J Cell Biol* 2006;172:973-81.
- [230] Frame MC. Newest findings on the oldest oncogene; how activated src does it. *J Cell Sci* 2004;117:989-98.
- [231] Jones RJ, Avizienyte E, Wyke AW, Owens DW, Brunton VG, Frame MC. Elevated c-Src is linked to altered cell-matrix adhesion rather than proliferation in KM12C human colorectal cancer cells. *Br J Cancer* 2002;87:1128-35.
- [232] Fincham VJ, Chudleigh A, Frame MC. Regulation of p190 Rho-GAP by v-Src is linked to cytoskeletal disruption during transformation. *J Cell Sci* 1999;112 (Pt 6):947-56.
- [233] Avizienyte E, Wyke AW, Jones RJ, McLean GW, Westhoff MA, Brunton VG, et al. Src-induced de-regulation of E-cadherin in colon cancer cells requires integrin signalling. *Nat Cell Biol* 2002;4:632-8.
- [234] Avizienyte E, Fincham VJ, Brunton VG, Frame MC. Src SH3/2 domain-mediated peripheral accumulation of Src and phospho-myosin is linked to deregulation of E-cadherin and the epithelial-mesenchymal transition. *Mol Biol Cell* 2004;15:2794-803.
- [235] Irby RB, Yeatman TJ. Increased Src activity disrupts cadherin/catenin-mediated homotypic adhesion in human colon cancer and transformed rodent cells. *Cancer Res* 2002;62:2669-74.
- [236] Schaller MD, Hildebrand JD, Shannon JD, Fox JW, Vines RR, Parsons JT. Autophosphorylation of the focal adhesion kinase, pp125FAK, directs SH2-dependent binding of pp60src. *Mol Cell Biol* 1994;14:1680-8.
- [237] Schlaepfer DD, Hunter T. Signal transduction from the extracellular matrix--a role for the focal adhesion protein-tyrosine kinase FAK. *Cell Struct Funct* 1996;21:445-50.
- [238] Datta A, Huber F, Boettiger D. Phosphorylation of beta3 integrin controls ligand binding strength. *J Biol Chem* 2002;277:3943-9.
- [239] Brunton VG, MacPherson IR, Frame MC. Cell adhesion receptors, tyrosine kinases and actin modulators: a complex three-way circuitry. *Biochim Biophys Acta* 2004;1692:121-44.
- [240] Hynes RO. Specificity of cell adhesion in development: the cadherin superfamily. *Curr Opin Genet Dev* 1992;2:621-4.
- [241] Arthur WT, Burridge K. RhoA inactivation by p190RhoGAP regulates cell spreading and migration by promoting membrane protrusion and polarity. *Mol Biol Cell* 2001;12:2711-20.
- [242] Chang JH, Gill S, Settleman J, Parsons SJ. c-Src regulates the simultaneous rearrangement of actin cytoskeleton, p190RhoGAP, and p120RasGAP following epidermal growth factor stimulation. *J Cell Biol* 1995;130:355-68.

- [243] Playford MP, Schaller MD. The interplay between Src and integrins in normal and tumor biology. *Oncogene* 2004;23:7928-46.
- [244] Niu G, Wright KL, Huang M, Song L, Haura E, Turkson J, et al. Constitutive Stat3 activity up-regulates VEGF expression and tumor angiogenesis. *Oncogene* 2002;21:2000-8.
- [245] Niu G, Wright KL, Ma Y, Wright GM, Huang M, Irby R, et al. Role of Stat3 in regulating p53 expression and function. *Mol Cell Biol* 2005;25:7432-40.
- [246] Haura EB, Turkson J, Jove R. Mechanisms of disease: Insights into the emerging role of signal transducers and activators of transcription in cancer. *Nat Clin Pract Oncol* 2005;2:315-24.
- [247] Yang J, Chatterjee-Kishore M, Staugaitis SM, Nguyen H, Schlessinger K, Levy DE, et al. Novel roles of unphosphorylated STAT3 in oncogenesis and transcriptional regulation. *Cancer Res* 2005;65:939-47.
- [248] Buettner R, Mora LB, Jove R. Activated STAT signaling in human tumors provides novel molecular targets for therapeutic intervention. *Clin Cancer Res* 2002;8:945-54.
- [249] Byers LA, Sen B, Saigal B, Diao L, Wang J, Nanjundan M, et al. Reciprocal regulation of c-Src and STAT3 in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2009;15:6852-61.
- [250] Levy DE, Darnell JE, Jr. Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3:651-62.
- [251] Bromberg J, Chen X. STAT proteins: signal transducers and activators of transcription. *Methods Enzymol* 2001;333:138-51.
- [252] Balzer EM, Whipple RA, Thompson K, Boggs AE, Slovic J, Cho EH, et al. c-Src differentially regulates the functions of microtentacles and invadopodia. *Oncogene* 2010;29:6402-8.
- [253] Whipple RA, Cheung AM, Martin SS. Detyrosinated microtubule protrusions in suspended mammary epithelial cells promote reattachment. *Exp Cell Res* 2007;313:1326-36.
- [254] Glinsky VV, Glinsky GV, Glinskii OV, Huxley VH, Turk JR, Mossine VV, et al. Intravascular metastatic cancer cell homotypic aggregation at the sites of primary attachment to the endothelium. *Cancer Res* 2003;63:3805-11.
- [255] Mego M, De GU, Broglio K, Dawood S, Valero V, Andreopoulou E, et al. Circulating tumour cells are associated with increased risk of venous thromboembolism in metastatic breast cancer patients. *Br J Cancer* 2009;101:1813-6.
- [256] Matrone MA, Whipple RA, Balzer EM, Martin SS. Microtentacles tip the balance of cytoskeletal forces in circulating tumor cells. *Cancer Res* 2010;70:7737-41.
- [257] Kanda S, Miyata Y, Kanetake H, Smithgall TE. Non-receptor protein-tyrosine kinases as molecular targets for antiangiogenic therapy (Review). *Int J Mol Med* 2007;20:113-21.
- [258] Trevino JG, Summy JM, Gray MJ, Nilsson MB, Lesslie DP, Baker CH, et al. Expression and activity of SRC regulate interleukin-8 expression in pancreatic adenocarcinoma cells: implications for angiogenesis. *Cancer Res* 2005;65:7214-22.
- [259] Lesslie DP, Summy JM, Parikh NU, Fan F, Trevino JG, Sawyer TK, et al. Vascular endothelial growth factor receptor-1 mediates migration of human colorectal carcinoma cells by activation of Src family kinases. *Br J Cancer* 2006;94:1710-7.
- [260] Hennequin LF, Allen J, Breed J, Curwen J, Fennell M, Green TP, et al. N-(5-chloro-1,3-benzodioxol-4-yl)-7-[2-(4-methylpiperazin-1-yl)ethoxy]-5-(tetrahydro-2H-pyran-4-yloxy)quinazolin-4-amine, a novel, highly selective, orally available, dual-specific c-Src/Abl kinase inhibitor. *J Med Chem* 2006;49:6465-88.

- [261] Hennequin LF, Allen J, Breed J, Curwen J, Fennell M, Green TP, et al. *N*-(5-chloro-1,3-benzodioxol-4-yl)-7-[2-(4-methylpiperazin-1-yl)ethoxy]-5-(tetrahydro-2H-pyran-4-yloxy)quinazolin-4-amine, a novel, highly selective, orally available, dual-specific c-Src/Abl kinase inhibitor. *J Med Chem* 2006;49:6465-88.
- [262] Johnson FM, Gallick GE. SRC family nonreceptor tyrosine kinases as molecular targets for cancer therapy. *Anticancer Agents Med Chem* 2007;7:651-9.
- [263] Green TP, Fennell M, Whittaker R, Curwen J, Jacobs V, Allen J, et al. Preclinical anticancer activity of the potent, oral Src inhibitor AZD0530. *Mol Oncol* 2009.
- [264] Herynk MH, Beyer AR, Cui Y, Weiss H, Anderson E, Green TP, et al. Cooperative action of tamoxifen and c-Src inhibition in preventing the growth of estrogen receptor-positive human breast cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2006;5:3023-31.
- [265] Mitchell C, Hamed HA, Cruickshanks N, Tang Y, Bareford MD, Hubbard N, et al. Simultaneous exposure of transformed cells to SRC family inhibitors and CHK1 inhibitors causes cell death. *Cancer Biol Ther* 2011;12.
- [266] Yang JC, Bai L, Yap S, Gao AC, Kung HJ, Evans CP. Effect of the specific Src family kinase inhibitor saracatinib on osteolytic lesions using the PC-3 bone model. *Mol Cancer Ther* 2010;9:1629-37.
- [267] Bai L, Yang JC, Ok JH, Mack PC, Kung HJ, Evans CP. Simultaneous targeting of Src kinase and receptor tyrosine kinase results in synergistic inhibition of renal cell carcinoma proliferation and migration. *Int J Cancer* 2012;130:2693-702.
- [268] Schweppe RE, Kerege AA, French JD, Sharma V, Grzywa RL, Haugen BR. Inhibition of Src with AZD0530 reveals the Src-Focal Adhesion kinase complex as a novel therapeutic target in papillary and anaplastic thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94:2199-203.
- [269] Gwanmesia PM, Romanski A, Schwarz K, Bacic B, Ruthardt M, Ottmann OG. The effect of the dual Src/Abl kinase inhibitor AZD0530 on Philadelphia positive leukaemia cell lines. *BMC Cancer* 2009;9:53.
- [270] Ngo HT, Azab AK, Farag M, Jia X, Melhem MM, Runnels J, et al. Src tyrosine kinase regulates adhesion and chemotaxis in Waldenstrom macroglobulinemia. *Clin Cancer Res* 2009;15:6035-41.
- [271] Arcaroli JJ, Touban BM, Tan AC, Varella-Garcia M, Powell RW, Eckhardt SG, et al. Gene array and fluorescence in situ hybridization biomarkers of activity of saracatinib (AZD0530), a Src inhibitor, in a preclinical model of colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2010;16:4165-77.
- [272] Bertotti A, Bracco C, Girolami F, Torti D, Gastaldi S, Galimi F, et al. Inhibition of Src impairs the growth of met-addicted gastric tumors. *Clin Cancer Res* 2010;16:3933-43.
- [273] De LA, Lamura L, Strizzi L, Roma C, D'Antonio A, Margaryan N, et al. Expression and functional role of CRIPTO-1 in cutaneous melanoma. *Br J Cancer* 2011;105:1030-8.
- [274] Kanou T, Oneyama C, Kawahara K, Okimura A, Ohta M, Ikeda N, et al. The transmembrane adaptor Cbp/PAG1 controls the malignant potential of human non-small cell lung cancers that have c-src upregulation. *Mol Cancer Res* 2011;9:103-14.
- [275] Purnell PR, Mack PC, Tepper CG, Evans CP, Green TP, Gumerlock PH, et al. The Src inhibitor AZD0530 blocks invasion and may act as a radiosensitizer in lung cancer cells. *J Thorac Oncol* 2009;4:448-54.
- [276] Dong M, Rice L, Lepler S, Pampo C, Siemann DW. Impact of the Src inhibitor saracatinib on the metastatic phenotype of a fibrosarcoma (KHT) tumor model. *Anticancer Res* 2010;30:4405-13.

- [277] Ammer AG, Kelley LC, Hayes KE, Evans JV, Lopez-Skinner LA, Martin KH, et al. Saracatinib Impairs Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Invasion by Disrupting Invadopodia Function. *J Cancer Sci Ther* 2009;1:52-61.
- [278] Mitchell C, Hamed HA, Cruickshanks N, Tang Y, Bareford MD, Hubbard N, et al. Simultaneous exposure of transformed cells to SRC family inhibitors and CHK1 inhibitors causes cell death. *Cancer Biol Ther* 2011;12:215-28.
- [279] Pohorelic B, Singh R, Parkin S, Koro K, Yang AD, Egan C, et al. Role of Src in breast cancer cell migration and invasion in a breast cell/bone-derived cell microenvironment. *Breast Cancer Res Treat* 2012;133:201-14.
- [280] Mitchell C, Hamed HA, Cruickshanks N, Tang Y, Bareford MD, Hubbard N, et al. Simultaneous exposure of transformed cells to SRC family inhibitors and CHK1 inhibitors causes cell death. *Cancer Biol Ther* 2011;12:215-28.
- [281] Yang JC, Ok JH, Busby JE, Borowsky AD, Kung HJ, Evans CP. Aberrant activation of androgen receptor in a new neuropeptide-autocrine model of androgen-insensitive prostate cancer. *Cancer Res* 2009;69:151-60.
- [282] Chang YM, Bai L, Liu S, Yang JC, Kung HJ, Evans CP. Src family kinase oncogenic potential and pathways in prostate cancer as revealed by AZD0530. *Oncogene* 2008;27:6365-75.
- [283] Rajeshkumar NV, Tan AC, De OE, Womack C, Wombwell H, Morgan S, et al. Antitumor effects and biomarkers of activity of AZD0530, a Src inhibitor, in pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 2009;15:4138-46.
- [284] Pham NA, Magalhaes JM, Do T, Schwock J, Dhani N, Cao PJ, et al. Activation of Src and Src-associated signaling pathways in relation to hypoxia in human cancer xenograft models. *Int J Cancer* 2009;124:280-6.
- [285] Serrels B, Serrels A, Mason SM, Baldeschi C, Ashton GH, Canel M, et al. A novel Src kinase inhibitor reduces tumour formation in a skin carcinogenesis model. *Carcinogenesis* 2009;30:249-57.
- [286] Ferguson J, Arozarena I, Ehrhardt M, Wellbrock C. Combination of MEK and SRC inhibition suppresses melanoma cell growth and invasion. *Oncogene* 2012.
- [287] Herynk MH, Beyer AR, Cui Y, Weiss H, Anderson E, Green TP, et al. Cooperative action of tamoxifen and c-Src inhibition in preventing the growth of estrogen receptor-positive human breast cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2006;5:3023-31.
- [288] Hiscox S, Jordan NJ, Smith C, James M, Morgan L, Taylor KM, et al. Dual targeting of Src and ER prevents acquired antihormone resistance in breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 2009;115:57-67.
- [289] Gangadhar TC, Clark JI, Karrison T, Gajewski TF. Phase II study of the Src kinase inhibitor saracatinib (AZD0530) in metastatic melanoma. *Invest New Drugs* 2012.
- [290] Chen Y, Guggisberg N, Jorda M, Gonzalez-Angulo A, Hennessy B, Mills GB, et al. Combined Src and aromatase inhibition impairs human breast cancer growth in vivo and bypass pathways are activated in AZD0530-resistant tumors. *Clin Cancer Res* 2009;15:3396-405.
- [291] Chen Y, Alvarez EA, Azzam D, Wander SA, Guggisberg N, Jorda M, et al. Combined Src and ER blockade impairs human breast cancer proliferation in vitro and in vivo. *Breast Cancer Res Treat* 2011;128:69-78.
- [292] Dalton RN, Chetty R, Stuart M, Iacona RB, Swaisland A. Effects of the Src inhibitor saracatinib (AZD0530) on renal function in healthy subjects. *Anticancer Res* 2010;30:2935-42.

- [293] Puls LN, Eadens M, Messersmith W. Current status of SRC inhibitors in solid tumor malignancies. *Oncologist* 2011;16:566-78.
- [294] Baselga J, Cervantes A, Martinelli E, Chirivella I, Hoekman K, Hurwitz HI, et al. Phase I safety, pharmacokinetics, and inhibition of SRC activity study of saracatinib in patients with solid tumors. *Clin Cancer Res* 2010;16:4876-83.
- [295] Fujisaka Y, Onozawa Y, Kurata T, Yasui H, Goto I, Yamazaki K, et al. First report of the safety, tolerability, and pharmacokinetics of the Src kinase inhibitor saracatinib (AZD0530) in Japanese patients with advanced solid tumours. *Invest New Drugs* 2012.
- [296] Hannon RA, Clack G, Rimmer M, Swaisland A, Lockton JA, Finkelman RD, et al. Effects of the Src kinase inhibitor saracatinib (AZD0530) on bone turnover in healthy men: a randomized, double-blind, placebo-controlled, multiple-ascending-dose phase I trial. *J Bone Miner Res* 2010;25:463-71.
- [297] Trarbach T, Schultheis B, Gauler TC, Schneider V, Strumberg D, Eberhardt WE, et al. Phase I open-label study of cediranib, an oral inhibitor of VEGF signalling, in combination with the oral Src inhibitor saracatinib in patients with advanced solid tumours. *Invest New Drugs* 2012;30:1962-71.
- [298] Lara PN, Jr., Longmate J, Evans CP, Quinn DI, Twardowski P, Chatta G, et al. A phase II trial of the Src-kinase inhibitor AZD0530 in patients with advanced castration-resistant prostate cancer: a California Cancer Consortium study. *Anticancer Drugs* 2009;20:179-84.
- [299] Fury MG, Baxi S, Shen R, Kelly KW, Lipson BL, Carlson D, et al. Phase II study of saracatinib (AZD0530) for patients with recurrent or metastatic head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). *Anticancer Res* 2011;31:249-53.
- [300] Mackay HJ, Au HJ, McWhirter E, Alcindor T, Jarvi A, MacAlpine K, et al. A phase II trial of the Src kinase inhibitor saracatinib (AZD0530) in patients with metastatic or locally advanced gastric or gastro esophageal junction (GEJ) adenocarcinoma: a trial of the PMH phase II consortium. *Invest New Drugs* 2012;30:1158-63.
- [301] Gucalp A, Sparano JA, Caravelli J, Santamauro J, Patil S, Abbruzzi A, et al. Phase II trial of saracatinib (AZD0530), an oral SRC-inhibitor for the treatment of patients with hormone receptor-negative metastatic breast cancer. *Clin Breast Cancer* 2011;11:306-11.
- [302] Renouf DJ, Moore MJ, Hedley D, Gill S, Jonker D, Chen E, et al. A phase I/II study of the Src inhibitor saracatinib (AZD0530) in combination with gemcitabine in advanced pancreatic cancer. *Invest New Drugs* 2012;30:779-86.
- [303] Kaye S, Aamdal S, Jones R, Freyer G, Pujade-Lauraine E, de Vries EG, et al. Phase I study of saracatinib (AZD0530) in combination with paclitaxel and/or carboplatin in patients with solid tumours. *Br J Cancer* 2012;106:1728-34.
- [304] Zhuo WL, Wang Y, Zhuo XL, Zhang YS, Chen ZT. Short interfering RNA directed against TWIST, a novel zinc finger transcription factor, increases A549 cell sensitivity to cisplatin via MAPK/mitochondrial pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;369:1098-102.
- [305] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods* 2001;25:402-8.
- [306] Rieger KM, Little AF, Swart JM, Kastrinakis WV, Fitzgerald JM, Hess DT, et al. Human bladder carcinoma cell lines as indicators of oncogenic change relevant to urothelial neoplastic progression. *Br J Cancer* 1995;72:683-90.
- [307] Wallerand H, Cai Y, Wainberg ZA, Garraway I, Lascombe I, Nicolle G, et al. Phospho-Akt pathway activation and inhibition depends on N-cadherin or phospho-EGFR expression in invasive human bladder cancer cell lines. *Urol Oncol* 2010;28:180-8.

- [308] Baumgart E, Cohen MS, Silva NB, Jacobs MA, Wotkowicz C, Rieger-Christ KM, et al. Identification and prognostic significance of an epithelial-mesenchymal transition expression profile in human bladder tumors. *Clin Cancer Res* 2007;13:1685-94.
- [309] Cooper MJ, Haluschak JJ, Johnson D, Schwartz S, Morrison LJ, Lippa M, et al. p53 mutations in bladder carcinoma cell lines. *Oncol Res* 1994;6:569-79.
- [310] Yu Q, Zhang K, Wang X, Liu X, Zhang Z. Expression of transcription factors snail, slug, and twist in human bladder carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res* 2010;29:119.
- [311] Xue Y, Li L, Zhang D, Wu K, Chen Y, Zeng J, et al. Twisted epithelial-to-mesenchymal transition promotes progression of surviving bladder cancer T24 cells with hTERT-dysfunction. *PLoS One* 2011;6:e27748.
- [312] Yang MH, Chen CL, Chau GY, Chiou SH, Su CW, Chou TY, et al. Comprehensive analysis of the independent effect of twist and snail in promoting metastasis of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2009;50:1464-74.
- [313] Hung JJ, Yang MH, Hsu HS, Hsu WH, Liu JS, Wu KJ. Prognostic significance of hypoxia-inducible factor-1alpha, TWIST1 and Snail expression in resectable non-small cell lung cancer. *Thorax* 2009;64:1082-9.
- [314] van Nes JG, de Kruijf EM, Putter H, Faratian D, Munro A, Campbell F, et al. Co-expression of SNAIL and TWIST determines prognosis in estrogen receptor-positive early breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 2012;133:49-59.
- [315] Kajiyama H, Shibata K, Umezu T, Mizuno M, Suzuki S, Yamamoto E, et al. Expression of Twist enhances risk of poor oncologic outcome in patients with stage Ib to II cervical carcinoma with lymphovascular space involvement. *Hum Pathol* 2012.
- [316] Yin K, Liao Q, He H, Zhong D. Prognostic value of Twist and E-cadherin in patients with osteosarcoma. *Med Oncol* 2012;29:3449-55.
- [317] Shen CH, Wu JD, Jou YC, Cheng MC, Lin CT, Chen PC, et al. The correlation between TWIST, E-cadherin, and beta-catenin in human bladder cancer. *J BUON* 2011;16:733-7.
- [318] Fondreville ME, Kantelip B, Reiter RE, Chopin DK, Thierry JP, Monnier F, et al. The expression of Twist has an impact on survival in human bladder cancer and is influenced by the smoking status. *Urol Oncol* 2009;27:268-76.
- [319] de Herreros AG, Peiro S, Nassour M, Savagner P. Snail family regulation and epithelial mesenchymal transitions in breast cancer progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2010;15:135-47.
- [320] Rosivatz E, Becker I, Bamba M, Schott C, Diebold J, Mayr D, et al. Neoexpression of N-cadherin in E-cadherin positive colon cancers. *Int J Cancer* 2004;111:711-9.

Résumé :

Le cancer de la vessie représente le 7^{ième} cancer en terme d'incidence mondiale. La mortalité de ce cancer est principalement due à la formation de métastases secondaires. Actuellement, aucun des médicaments disponibles sur le marché ne permet d'éviter la rechute ni de contrôler la dissémination métastatique. L'enjeu thérapeutique principal dans ce cancer est donc le contrôle de la dissémination métastatique. Le mécanisme de formation des métastases est connu et implique la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) qui permet aux cellules épithéliales d'acquérir les caractéristiques des cellules mésenchymateuse, ainsi que la capacité d'invasion. Dans ce travail, nous nous sommes posés 2 questions. Twist1 protéine connue comme régulateur central dans l'EMT, peut-elle être une cible pronostique et pharmacologique dans le cancer de la vessie ? L'utilisation d'un nouvel anti-invasif le saracatinib, peut il être un nouveau traitement dans le cancer de la vessie. Pour répondre à ces questions, nous avons caractérisé nos lignées de cancer de vessie, pour la protéine Twist1, mais aussi pour les principaux marqueurs de l'EMT (E-cadhérine, N-cadhérine, vimentine). Puis nous avons testé pharmacologiquement (cytotoxicité et invasivité) nos lignées pour le saracatinib. L'expression de la molécule Twist1 a été décevante, seulement une lignée exprime Twist1, de manière faible, et non homogène. Twist n'est donc pas une cible potentielle dans le cancer de la vessie. La sensibilité d'un point de vue cytotoxique au saracatinib est liée à l'expression de la E-cadhérine. Cependant il n'existe pas de relation entre l'expression de la E-cadhérine et l'action anti-invasive du saracatinib. Toutes les lignées sont sensibles. Dans la lignée SD48 (E-cadhérine positive), il y a une augmentation de la protéine E-cadhérine, ainsi qu'une nette relocalisation à la membrane sous traitement saracatinib. La voie du saracatinib semble passer par la E-cadherine, mais cette dernière n'explique pas en totalité son action.

Mots clés : EMT, saracatinib, vessie

Abstract

Bladder cancer is the seventh most common cancer in the world. Mortality is principally caused by metastatic dissemination. No drugs currently available can control relapse and metastatic dissemination. The principal therapeutic strategy is the control of dissemination. The mechanism of metastatic development is known, and implicates the epithelial to mesenchymal transition (EMT) that transforms epithelial cells into mesenchymal cells that thus acquire the capacity of invasion. Two questions are addressed in this project: Can the Twist1 protein that is a central regulator of EMT be a new prognostic, diagnostic, and therapeutic target in bladder cancer? Can the use of a new anti-invasive drug Saracatinib, be a new treatment in bladder cancer? To answer these questions, we characterise cells lines for Twist1 and main EMT markers (E-cadherin, N-cadherin, vimentine). Then we test pharmacology responses (cytotoxicity and anti-invasivity) of cells lines for saracatinib. Twist1 expression is very disappointing; only one cell line expresses Twist1, poorly, and non homogenously. Twist1 is not a good target in bladder cancer. The cytotoxic sensitivity is linked to E-cadherin expression. However, there is no relation between E-cadherin expression and anti-invasive action for saracatinib. All cells lines are sensitive. In the cells line SD48 (E-cadherin-positive), there is an increase of the E-cadherin protein, and a localisation at the membrane under saracatinib treatment. Saracatinib thus seems to use the E-cadherin pathway, but this pathway cannot completely explain its action.

Key words: EMT, saracatinib, bladder.