

THESE

Présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

Pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE

Option : Sciences de la Vie et de la Santé

Par

Laurent DOLLE

**STIMULATION AUTOCRINE
DE LA CROISSANCE DES CELLULES DE CANCER DU SEIN
PAR LE NERVE GROWTH FACTOR**

Soutenue le 16 Juin 2003 devant la commission d'examen :

Président : Dr. Jean-Claude MICHALSKI
Rapporteurs : Dr. Marc BRACKE
Pr. Brian RUDKIN
Examineurs : Dr. Ikram EL YAZIDI- BELKOURA (co-encadrant)
Dr. Geneviève CHOQUET-KASTYLEVSKY
Dr. Gilles FREISS
Directeur de thèse : Pr. Hubert HONDERMARCK

*A ma Miss,
pour son amour et sa patience.*

*A mes Parents,
pour leur soutien, leur confiance et leurs sacrifices.*

Merci.

Les travaux présentés dans ce mémoire ont été réalisés sous la responsabilité scientifique de Monsieur le Professeur Hubert Hondermarck, qui dirige le groupe « facteur de croissance », et co-encadré avec Madame le Docteur Ikram El Yazidi-Belkoura, dans le Laboratoire de Biologie du Développement, IFR-118 de l'Université des Sciences et Technologies de Lille.

Pendant les trois premières années, un soutien à ces recherches a été apporté par une bourse de la Région Nord-Pas-de Calais et du Centre de Lutte Contre le Cancer de Lille, puis d'une bourse relais financée par la Ligue Nationale contre le Cancer (Comité du Nord) pour une durée de 6 mois, que je tiens ici à remercier.

Avant-propos

Je tiens à remercier Monsieur le Professeur Xavier Desbiens, qui dirige le Laboratoire de Biologie du Développement, pour son accueil au sein de son laboratoire. « Un grand merci pour cette confiance accordée ».

Je tiens à remercier une nouvelle fois Monsieur le Professeur Hubert Hondermarck pour m'avoir accueilli au sein de son équipe depuis le DEA et de m'avoir accordé la confiance pour mener à terme le sujet qui m'a été proposé. « Merci Hubert d'avoir dirigé ce travail avec qualité. Merci pour vos encouragements les plus souvent ponctués par votre optimisme. Que ce travail soit le témoin de ma gratitude et de toute ma reconnaissance ».

Je remercie encore une fois Madame le Docteur Ikram El Yazidi- Belkoura, sans qui, ce travail n'aurait pu se concrétiser. Plus de quatre années de travail mais aussi plus de quatre années d'amitiés. « Merci Ikram pour tout ce que tu m'as appris. Merci pour ton encadrement scientifique et technique, comme pour les discussions scientifiques ».

Je souhaite remercier vivement, pour l'honneur qu'ils me font :

Monsieur le Docteur Jean-Claude Michalski

en acceptant de présider ce jury.

Monsieur le Docteur Marc Bracke,

Monsieur le Professeur Brian Rudkin,

qui ont bien voulu juger ce mémoire.

Monsieur le Docteur Gilles Freiss,

Madame le Docteur Geneviève Choquet-Kastylevsky,

qui ont accepté d'examiner ce travail.

Je remercie également Monsieur le Docteur Jean-Philippe Peyrat qui dirige le Centre de Lutte contre le Cancer de Lille pour sa collaboration au cours des premières années.

J'exprime ma profonde reconnaissance à Monsieur le docteur Christian Rolando (UMR 8004) et à Mademoiselle Adeline Lepage pour leur collaboration dans l'élaboration d'un projet de détection du NGF dans les échantillons biologiques. Au même titre, j'adresse mes plus sincères remerciements au Professeur Jérôme Lemoine du Laboratoire de Chimie Biologique (UMR 8576) pour son soutien scientifique en spectrométrie de masse.

Je tiens tout particulièrement à remercier Madame Sylviane Derache, non seulement pour son aide administrative, sa bonne humeur quotidienne et sa gentillesse au cours de mes années de présence au Laboratoire, mais surtout pour son humilité. « Merci Sylviane. Merci. Toi aussi Robert. Merci du fond du cœur. »

Je tiens à adresser mes plus vifs remerciements à Franck Vandermoere pour ses conversations qui tournaient aux monologues (surtout ces derniers mois), ses réflexions sur mon travail et sa présence en tant que co-locataire de notre cagibi. « Merci pour tout ». « Simon, Anne-Sophie je vous dois ce que je sais et ce que je suis aujourd'hui. Merci ! » Je n'oublie pas Robert-Alain, Séverine et Eric pour leurs aides et leurs soutiens moraux comme amicaux.

Merci encore à toutes celles et ceux qui m'ont aidé et supporté durant ces dernières années : Valérie, Choan, Nathalie, Sylvain, Virginie, Alessandro, Fanny, Olivia, Christian, Sandrine, Etienne, et enfin, Bidule. « Merci ». Sans oublier les aides techniques, Yohann pour nos cafés au SNI, son travail et tous ses services, Isabelle pour les milliers de litres de milieux de culture, Loïc et Gilles pour leur assistance informatique et la réalisation de certaines planches de ce mémoire. « Merci à vous tous ».

Je remercie encore La ligue Nationale contre le Cancer (Comité du Nord), la Région Nord-Pas-de Calais, le Centre de Lutte Contre le Cancer de Lille, pour leurs soutiens financiers au cours de ces années sans qui ce travail n'existerait pas. Je remercie également le travail réalisé par l'équipe de l'imprimerie de l'université.

SOMMAIRE

**STIMULATION AUTOCRINE
DE LA CROISSANCE DES CELLULES DE CANCER DU SEIN
PAR LE NERVE GROWTH FACTOR**

	page
<i>Abréviations</i>	10
<i>Illustrations</i>	12
RESUME	15
INTRODUCTION	17
GENERALITES	20
<i>Chapitre I- Physiopathologie de la glande mammaire</i>	21
I- 1- LA GLANDE MAMMAIRE NORMALE	22
I- 1- a- Anatomie et structure de la glande mammaire.....	22
I- 1- b- Histologie.....	24
I- 1- c- Développement de la glande mammaire.....	26
I- 1- d- Evolutions de la glande mammaire durant la vie génitale.....	28
I- 1- e- La glande mammaire : un organe hautement contrôlé.....	30
I- 2- LA GLANDE MAMMAIRE TUMORALE	36
I- 2- a- Introduction à l'histoire naturelle du cancer du sein.....	36
I- 2- b- Les types de cancer du sein.....	37
I- 2- c- Marqueurs utilisés.....	39
I- 3- MECANISMES CELLULAIRES ET MOLECULAIRES DE LA CANCEROGENESE MAMMAIRE	40
I- 3- a- Une origine multifactorielle.....	41
I- 3- b- Les anomalies génétiques.....	43
I- 3- c- La croissance des cellules tumorales.....	49
I- 3- d- Interactions cellule-cellule et cellule-matrice au cours de la progression tumorale.....	54

I- 3- e- Modulations des grands systèmes de communication au cours de la progression tumorale.....	59
Chapitre II- Voies thérapeutiques basées sur l'inhibition de la signalisation des cellules de cancer du sein.....	63
II- 1- INTRODUCTION	64
II- 2- OBJECTIF: INTERROMPRE LE SIGNAL.....	66
II- 3- LES CIBLES MOLECULAIRES : L'ARSENAL D'AUJOURD'HUI ET DE DEMAIN.....	69
II- 3- a- Agents ciblant les cascades de signalisation des facteurs de croissance.....	75
II- 3- b- Modulateurs de l'apoptose.....	79
II- 3- c- Inhibition de l'angiogenèse tumorale.....	82
II- 3- d- Inhibition de l'invasion et des métastases.....	87
II- 4- CONCLUSION: LES ENJEUX DE CES NOUVELLES THERAPIES	89
Chapitre III- Nerve growth Factor : from neurons to breast cancer.....	89
III- 1- INTRODUCTION.....	92
III- 2- STRUCTURE AND BIOSYNTHESIS OF NGF.....	92
III- 3- NGF-RECEPTORS.....	93
III- 3- a- The tyrosine kinase receptor TrkA.....	93
III- 3- b- The common neurotrophin receptor p75 ^{NTR}	95
III- 4- NGF RECEPTORS SIGNALING	96
III- 4- a- p140 ^{TrkA} and p75 ^{NTR} signaling.....	96
III- 4- b- Interactions between p140 ^{TrkA} and p75 ^{NTR}	98
III- 5- NGF AND CANCERS.....	98
III- 5- a- In the nervous system.....	98
III- 5- b- Outside of the nervous system.....	100
III- 6- NGF AND BREAST CANCER.	101
III- 6- a- NGF is mitogenic and anti-apoptotic for breast cancer cells	101
III- 6- b- NGF signaling in breast cancer	102
III- 6- c- The prognostic value of both NGF-receptors in breast cancer.....	102

III- 7- CONCLUSION : NGF RECEPTORS AND SIGNALING AS POTENTIAL DRUG TARGETS IN BREAST CANCER	103
RESULTATS	124
<i>Article I</i> : Nerve Growth Factor Overexpression and Autocrine Loop in Breast Cancer Cells	125
<i>Article II</i> : Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Death Domain Protein (TRADD) is involved in the Neurotrophin Receptor (p75 ^{NTR})-Mediated Anti-Apoptotic Activity of Nerve Growth Factor in Breast Cancer Cells	152
<i>Article III</i> : 4-OH-tamoxifen Inhibits the Mitogenic Activity of Nerve Growth Factor through PTPL1/ FAP-1 in Breast Cancer Cells	158
Complément concernant cet article.....	186
<i>Article IV</i> : Functional Proteomics of Breast Cancer For Signal Pathway Profiling and Target Discovery	195
DISCUSSION	221
BIBLIOGRAPHIE	238
ANNEXE	275

Abréviations

ADN : Acide Désoxyribonucléique
ADNc : ADN complémentaire
ARN : Acide Ribonucléique
ARNm : ARN messenger
BDNF: Brain-derived neurotrophic factor
CNTF: Ciliary neurotrophic factor
EGF: Epidermal Growth Factor
ERE: estrogen response element
FADD: Fas-associated death domain
FAP-1: Fas-associated tyrosine phosphatase-1
FGF: Fibroblast Growth Factor
GH: Growth hormone
HAT: histone acétyl-transférase
HDAC: Histone déacétylase
HGF/SF: Hepatocyte growth factor/Scatter factor
HSP: Heat shock protein
IGF: Insulin-like Growth Factor
IGFBP: Insulin-like growth factor binding protein
IKK: I- κ B kinase
I- κ B: inhibiteur de NF- κ B
JNK: c-jun N-terminal kinase
Kb: kilobase
KDa: kilodalton
LOH: Loss of heterozygoty
MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase
MAPKAP kinase 2: MAPK-activated protein kinase 2
MEC: Matrix extracellulaire
MDGF: Mammary derived growth factor
MIF: Migration inhibitor factor
MMP: Métalloprotéinase matricielle
NGF: Nerve Growth Factor

NF- κ B: Nuclear Factor- κ B

NIK: NF- κ B inducing kinase

NRIF: NT receptor interacting factor

NT: Neurotrophin

Pb: paire de bases

PBS : Phosphate Buffer Saline

PDGF : Platelet Derived Growth Factor

PMSF: Phenyl Methyl Sulfonyl Fluorure

PRL: prolactine

PSD: post-synaptic density protein

Rb: Retinoblastoma Gene Product

RE: récepteur aux oestrogènes

RPg: Receptor à la progesterone

RSK : pp90 ribosomal S6 kinase

RTK : récepteurs tyrosine kinases

SDS: Sodium Dodecyl Sulfate

SDS-PAGE: électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS

SHP-2 : (SH-2containing tyr)-1 phosphatase

SNT: Sucl-associated neurotrophic factor target

SOS: son of sevenless

SVF: Serum de veau foetal

TBS: Tris Buffer Saline

TBS-T : Tris Buffer Saline-Tween

TGF : Transforming Growth Factor

TNF: Tumor Necrosis Factor

TRADD: TNFR associated death domain

TRAF: TNFR associated factor

Illustrations

GENERALITES

	page
Figure 1 : Anatomie et structure de la glande mammaire.....	23
Figure 2 : Schéma de l'arbre galactophorique.....	23
Figure 3 : Schéma de la paroi des canaux de la glande mammaire.....	24
Figure 4 : Histologie de la glande mammaire normale.....	25
Figure 5 : Le développement prénatal du sein.....	26
Figure 6 : Les différentes phases de la croissance et du fonctionnement de la glande mammaire.....	27
Figure 7 : Rôle de l'axe hypothalamo-hypophysaire dans le contrôle du développement et de l'activité de la glande mammaire.....	29
Table 1 : Principaux facteurs de croissance impliqués dans la régulation de la prolifération des cellules épithéliales mammaires normales.....	32
Figure 8 : Représentation schématique de l'organisation structurale et fonctionnelle des récepteurs aux oestrogènes (RE).....	33
Figure 9 : Action des oestrogènes sur la cellule épithéliale mammaire.	34
Figure 10 : Représentation schématique des relais ganglionnaires de la glande mammaire.....	36
Figure 11 : Représentation des différentes tumeurs de la glande mammaire.....	38
Figure 12 : La cancérogenèse mammaire est un processus d'accumulations d'altérations géniques qui transforme une cellule normale en cellule tumorale.....	41
Figure 13 : Schéma hypothétique des anomalies génétiques au cours de la cancérogenèse mammaire.....	44
Figure 14 : Régulation de la croissance de la cellule mammaire tumorale.....	50
Figure 15 : Les adhésions cellule-cellule et les interactions cellule-matrice dans la progression tumorale.....	56
Table 2 : Représentation schématique de la modulation des systèmes de communication cellulaire au cours de la transformation maligne.....	60
Figure 16 : Les différentes approches stratégiques dans la validation des cibles thérapeutiques.....	65
Figure 17 : L'interruption du signal : l'arme de demain ?.....	67
Figure 18 : La voie de signalisation des facteurs de croissance comme cible thérapeutique anti-cancéreuse.....	71

Figure 19 : Représentation schématique des protéines régulatrices de l'apoptose et des mécanismes de l'inhibition de ce phénomène dans les cellules cancéreuses.....	76
Figure 20 : Morphologies particulières adoptées par les cellules cancéreuses pour assurer leur mobilité.....	83
Figure 21 : Représentation schématique de la cascade de signalisation de l'activation des métalloprotéases (MMPs).....	86

RESULTATS

Figure 22 : Principe de l'analyse protéomique.....	188
Figure 23 : Gel 2D coloré au bleu colloïdal correspondant à un dépôt de protéines co-immunoprécipitées avec FAP-1.....	190
Table 3 : Caractéristiques des protéines identifiées par spectrométrie de masse.....	191

DISCUSSION

Figure 24 : Représentation schématique de la stimulation autocrine du NGF dans les cellules cancéreuses mammaires.....	223
Figure 25 : Représentation schématique du chromosome 1.....	224
Figure 26 Mécanismes d'action éventuels de FAP-1 sur la voie de signalisation p140 ^{TrkA} /MAPKs normalement induite par le NGF.....	231
Figure 27 : Représentations hypothétiques de l'implication de la surexpression de FAP-1 et de 14-3-3 σ dans la cellule normale mammaire.....	234

ANNEXE

Figure 28 : Représentation schématique de la méthodologie « TaqMan ».....	277
Table 4 : Séquences nucléotidiques des amorces et de la sonde du Nerve Growth Factor.....	278
Figure 29 : Optimisation des concentrations des composants réactionnels du mélange.....	279
Figure 30 : Séquence de l'ADNc du NGF.....	280
Figure 31 : Courbes d'amplification obtenues à partir de quantités décroissantes d'ARN standard NGF.....	281

Figure 32 : Droite standard.....	282
Figure 33 : Courbes d'amplification obtenues à partir de 500 ng d'ARN des lignées cancéreuses mammaires humaines.....	283
Figure 34 : Expression du NGF par RT-PCR quantitative en temps réel dans les lignées cancéreuses mammaires humaines.....	284
Figure 35 : Schéma récapitulatif de la préparation d'un standard par clonage d'un produit de PCR.....	285
Figure 36 : Carte circulaire du plasmide pGEM-T.....	287

RESUME

Plus d'un demi siècle d'études sépare la mise en évidence de l'effet neurotrophique du Nerve Growth Factor (NGF) sur les neurones de la découverte de ses effets stimulateurs de la croissance du cancer du sein. Notre laboratoire a précédemment montré que le NGF est mitogène et anti-apoptotique pour les cellules de cancer du sein *via* ses deux catégories de récepteurs membranaires : p140^{TrkA} (tyrosine kinase) et p75^{NTR} (membre de la famille du TNF-R).

Dans le présent travail, nous montrons pour la première fois que le NGF est synthétisé, puis libéré par les cellules cancéreuses. Ceci a été montré *in vitro*, en culture de cellules, et *in vivo*, dans les biopsies tumorales. Cette expression de NGF est spécifique des cellules cancéreuses, puisque les cellules épithéliales mammaires normales ne produisent pas ce facteur de croissance. Ceci indique la valeur marqueur potentielle du NGF dans le cancer du sein. De plus, nous montrons la présence du NGF dans des vésicules de sécrétion, indiquant l'existence d'un mécanisme de stockage et de libération de ce facteur de croissance. Enfin, à l'aide d'inhibiteurs spécifiques et d'anticorps, nous avons montré que le NGF libéré par les cellules de cancer du sein est biologiquement actif et qu'il stimule de façon autocrine la croissance des ces cellules. Nous avons aussi montré que le 4-OH-tamoxifène inhibe l'effet mitogène du NGF par induction d'une tyrosine phosphatase FAP-1/ PTPL1, en inhibant la phosphorylation de p140^{TrkA} et des MAPKs. Une analyse protéomique préliminaire nous a permis d'identifier des partenaires moléculaires potentiels de FAP-1. Nous avons ensuite démontré que la voie de signalisation de p75^{NTR} nécessite la fixation de TRADD (TNF-R associated death domain protein) pour l'obtention de l'effet stimulateur de la survie des cellules tumorales par le NGF.

En conclusion, nos résultats montrent que le NGF et sa signalisation sont des marqueurs et des cibles thérapeutiques potentielles dans le cancer du sein.

INTRODUCTION

Le Nerve Growth Factor (NGF), facteur de croissance neurotrophique par excellence, est surtout connu pour son implication dans le développement, la différenciation et la régulation du système nerveux (Lewin & Barde, 1996). Cependant, le NGF possède d'autres effets non neurotrophiques sur quelques types cellulaires, à savoir la régulation de la prolifération, de la migration et de la survie. La potentielle activité mitogène du NGF amène naturellement à se poser la question de son rôle éventuel dans les phénomènes de cancérisation. En dehors de son importance dans le cadre des maladies neurodégénératives, le NGF est également impliqué dans la prolifération de quelques tumeurs extérieures au système nerveux. Clairement démontrée dans les cellules prostatiques (Djakiew *et al.*, 1991 ; Pflug *et al.*, 1995), la production de NGF stimule la capacité d'invasion des cellules cancéreuses. De plus l'expression de p75^{NTR} (récepteur accessoire du NGF) diminue dans les cellules malignes et métastatiques, comparées aux cellules normales, suggérant que l'analyse des récepteurs pourraient présenter un intérêt pour le pronostic du cancer de la prostate. D'autres exemples peuvent illustrer l'implication du NGF dans les cancers, et notamment, notre laboratoire a montré que le NGF est un puissant mitogène pour les cellules cancéreuses mammaires, alors qu'il n'a aucun effet sur les cellules épithéliales normales (Descamps *et al.*, 1998). En outre, le NGF est aussi un facteur anti-apoptotique pour les cellules tumorales et cet effet est médié *via* l'activation de p75^{NTR} et de NF- κ B, alors que l'effet mitogène est conduit par l'activation de p140^{TrkA} et les MAPKs (Descamps *et al.*, 2001a). Pionniers, dans la démonstration du rôle du NGF dans la stimulation de la prolifération et de la survie des cellules malignes du sein, un certain nombre de question se sont posées quant à l'expression du ligand et à son rôle dans la physiopathologie de la glande mammaire. Après avoir montré la valeur pronostic des récepteurs p140^{TrkA} du NGF, (Descamps *et al.*, 2001b) un intérêt thérapeutique potentiel pour ce polypeptide s'est avéré être la source de l'ensemble de mon travail au cours de ma thèse. En effet, l'objet de mon DEA puis de ma thèse a été d'étudier l'éventuelle production de NGF par les cellules de cancer du sein elles-mêmes. Pour ce faire, je me suis intéressé à l'expression du NGF (au niveau de l'ARN et de la protéine) à la fois dans les lignées cancéreuses mammaires mais aussi dans les cellules épithéliales normales. En parallèle, nous avons étudié les voies de signalisation du NGF afin de découvrir des cibles thérapeutiques éventuelles.

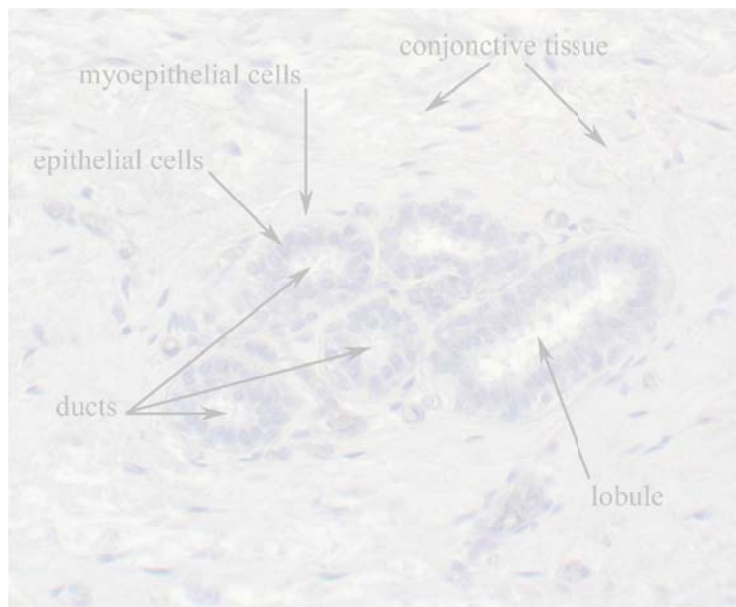
Ce travail est l'occasion de revoir des éléments d'anatomie, d'histologie et de régulation de la croissance du sein normal pour mieux comprendre le cancer du sein, ainsi que les principales étapes de la cancérogenèse mammaire et de l'histoire naturelle de cette pathologie. L'accent est mis sur le rôle majeur des facteurs de croissance dans le développement tumoral mammaire, ce qui en font des cibles prometteuses dans les nouvelles stratégies anticancéreuses explorées ou mises en place en essais clinique. Ce travail de revue générale est suivi de mes travaux, présentés sous la forme de publications, et s'articule autour des chapitres « Résultats », et « Discussion ».

GENERALITES



Généralités

CHAPITRE I



PHYSIOPATHOLOGIE DE LA GLANDE MAMMAIRE- CANCEROGENESE MAMMAIRE.

Dans ce chapitre, nous allons aborder rapidement la structure de la glande mammaire normale ainsi que la régulation de sa croissance par différents facteurs, notamment les hormones et les facteurs de croissance, puis nous détaillerons la tumorigenèse de la glande mammaire et tenterons d'approcher le pourquoi et le comment de cette pathologie.

I- 1 – LA GLANDE MAMMAIRE NORMALE.

I- 1- a- Anatomie et structure de la glande mammaire.

Le sein et la glande mammaire sont des formations de la peau. Le sein est une glande lactaire qui est, chez la femme, sous la dépendance des organes reproducteurs et dont la présence est constante chez les Mammifères. Trois parties constituent le sein, à savoir: la peau, la glande et la graisse. La peau est épaisse à la périphérie et devient mince au voisinage de la plaque aréolo-mamelonnaire (constituée par le mamelon et l'aréole ou auréole). La glande mammaire est une glande cutanée au même titre que les glandes sudoripares et sébacées. Cette glande est incluse entièrement dans le pannicule adipeux sous-cutané et rattachée à la peau par ses seuls canaux excréteurs. C'est une glande tubulo-acineuse de type composée puisqu'elle est formée de 15 à 20 unités glandulaires indépendantes (ou encore appelées lobes mammaires). Ces lobes sont disposés radialement à différentes profondeurs autour du mamelon. En réalité, chaque lobe constitue une glande à part entière car ces structures possèdent chacune un canal excréteur (canal galactophore) qui s'ouvre à l'extérieur par un orifice propre. Juste avant son extrémité mamelonnaire, le canal galactophore forme une dilatation appelée sinus lactifère (figure 1). La glande mammaire est une glande exocrine dont la fonction est la sécrétion lactée. Par ailleurs, ce corps glandulaire repose sur le fascia superficialis. Des tractus fibreux unissant la peau au fascia superficialis subdivisent le corps adipeux en loges. Sur le plan structural, la glande mammaire est constituée de lobes, de lobules et de canaux de plus ou moins grandes tailles, l'ensemble constituant l'arbre galactophorique. La hiérarchisation de cette structure est schématisée sur la figure 2. Les acini

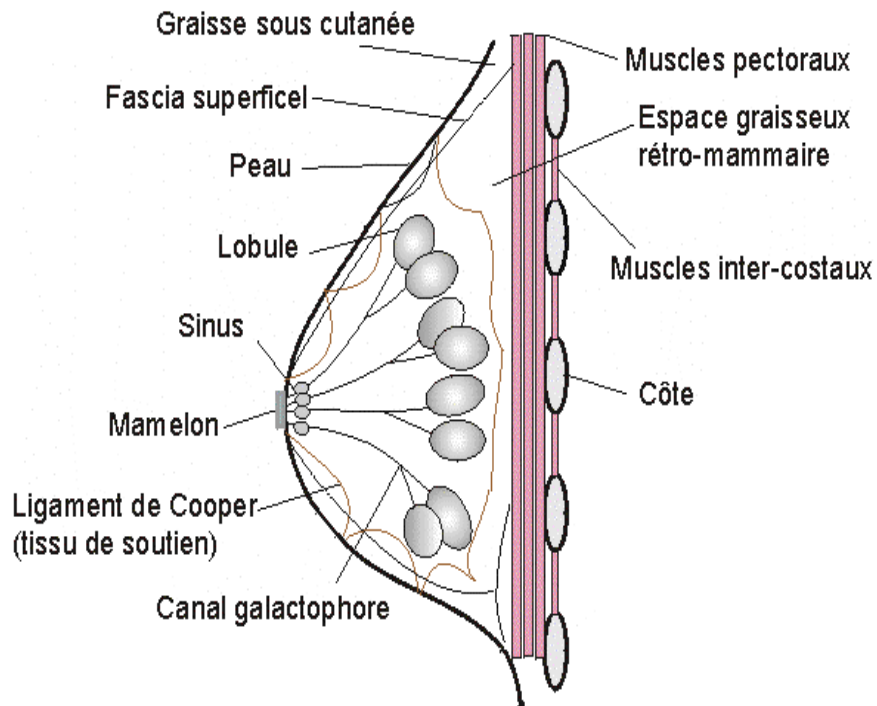


Figure 1: Anatomie et structure de la glande mammaire. Cette image proviennent d'un site Internet : <http://home.tiscali.be/salvatore.murgo/anatomie.htm>.

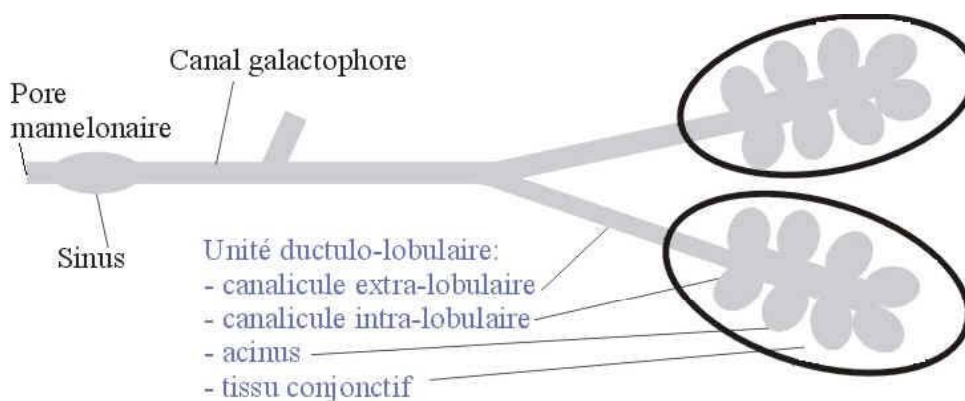


Figure 2: Schéma de l'arbre galactophorique. Cette image proviennent d'un site Internet : <http://home.tiscali.be/salvatore.murgo/anatomie.htm>.

sont regroupés de façon très dense autour d'un canal alvéolaire. Plusieurs canaux alvéolaires (ou canaux galactophores de 3^{ème} ordre ou encore canalicules intralobulaires se réunissent pour former un canal lobulaire (ou canal galactophore de 2^{ème} ordre ou encore canalicule extra-lobulaire). Cette structure forme alors ce que l'on nomme le lobule. A leurs tours, plusieurs canaux lobulaires se réunissent pour donner naissance à un canal galactophore de 1^{er} ordre. L'ensemble des lobules, que draine ce canal galactophore, forme un lobe glandulaire.

I- 1- b- Histologie.

Le sein est constitué de plusieurs types cellulaires distincts. Les cellules épithéliales, qui forment les alvéoles et les canaux, ont plutôt une forme cylindrique, et leur rôle est de synthétiser et sécréter le lait. A côté d'elles, les cellules myoépithéliales, de forme très allongée, ont la fonction de faire évacuer le lait en se contractant. La figure 3 schématise ces deux types cellulaires. Dans le tissu palléal ou mésenchyme ou encore stroma, les adipocytes fabriquent quant à eux les acides gras insaturés ainsi que leur dérivés (les prostaglandines) contribuant ainsi à la prolifération et à l'organisation des cellules épithéliales, augmentant la vascularisation de la glande mammaire et favorisant également la ramification des canaux mammaires.

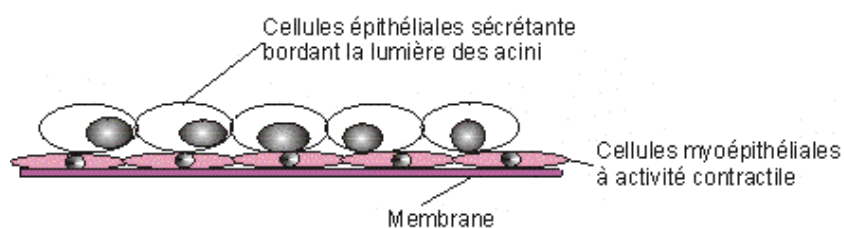


Figure 3: Schéma de la paroi des canaux de la glande mammaire. Cette image provient d'un site Internet : <http://home.tiscali.be/salvatore.murgo/anatomie.htm>.

Le système lobulo-canalair de la glande mammaire est constitué d'une assise continue de cellules épithéliales, doublée d'une couche externe discontinue de cellules myoépithéliales. Ces deux couches cellulaires reposent sur une lame basale recouverte d'un manchon

fibroblastique plus ou moins développé (figure 3). Les acini ou alvéoles sont composés de cellules épithéliales et de cellules myoépithéliales. Ces acini sont entourés d'un tissu conjonctif lâche tandis que le tissu conjonctif extra-lobulaire est dense et peu cellularisé. Sur la figure 4, nous pouvons voir les différents aspects histologiques abordés ci-dessus. A proximité des cellules épithéliales, se trouvent aussi les cellules fibroblastiques qui jouent un rôle important dans la formation et la différenciation de l'épithélium mammaire comme nous le verrons plus loin.

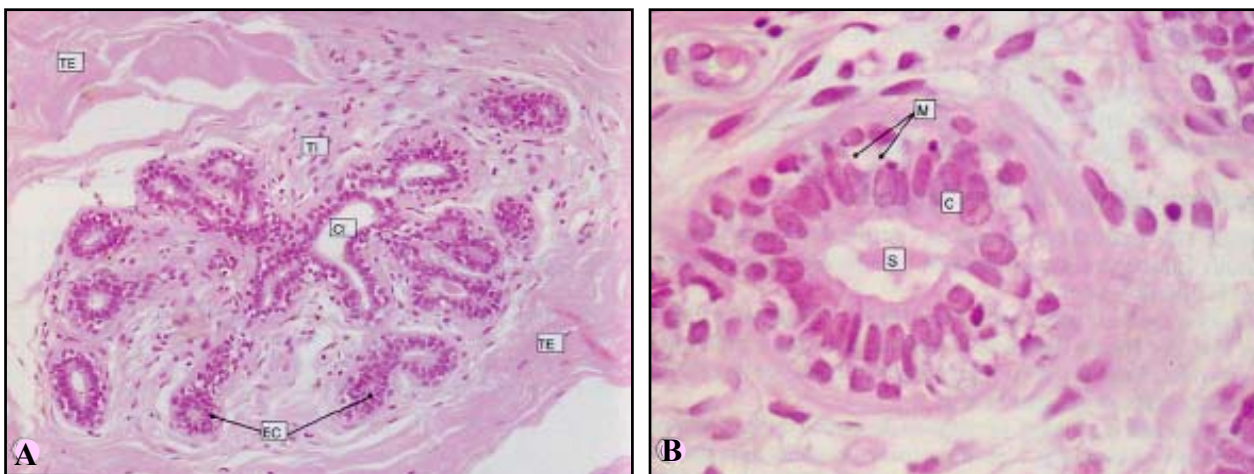


Figure 4: Histologie de la glande mammaire normale. **A.** Lobule mammaire. **B.** Canal terminal intralobulaire. La couche interne de l'épithélium a un aspect cubique (C), tandis que la couche externe est constituée de cellules myoépithéliales (M). CI : canal intralobulaire ; EC : extrémités canalaies ; TI : tissu de soutien intralobulaire ; TE : tissu de soutien extralobulaire ; S : sécrétion (d'après Stevens & Lowe, 1992).

La cellule épithéliale présente une immunoréactivité pour les différentes cytokératines. De plus, lorsque cette cellule a une activité sécrétoire, elle présente une réponse positive pour l'anticorps anti-alpha lactalbumine. Quant à la cellule myoépithéliale, elle montre une forte positivité pour l'anticorps anti-actine et une positivité variable pour les anticorps anti-protéine S100 et les diverses cytokératines. L'immunoréactivité à l'actine permet donc de distinguer les cellules épithéliales des cellules myoépithéliales. La membrane basale exprime de manière forte la laminine et le collagène de type IV.

Bien entendu, au même titre que ces quatre types cellulaires, nous devons souligner l'importance de la matrice extracellulaire avec ses multiples rôles dans l'intégrité de la glande

mammaire. Notamment, elle permet aux cellules épithéliales de s'organiser en alvéoles, les sensibilise aux hormones lactogènes et contrôle leur croissance.

I- 1- c- Développement de la glande mammaire.

La période de croissance de la glande mammaire (ou mammogenèse) débute au cours de la vie fœtale, se poursuit tout au long de l'existence et se fait en plusieurs étapes. Quatre étapes peuvent être décrites dans le développement de cette glande avec, pour chacune des transformations particulières du système lobulo-canalair, représentatives de l'âge et de l'état physiologique de la femme (puberté, menstruation, gestation ou ménopause). La période de fonctionnement, quant à elle, comprend la gestation et la lactation, au cours desquelles la différenciation de la glande est maximale.

➤ l'étape prénatale :

Le sein s'ébauche au cours de la 4^{ème} semaine du développement embryonnaire sous la forme d'une crête mammaire (ou ligne lactéale) correspondant à un épaississement de

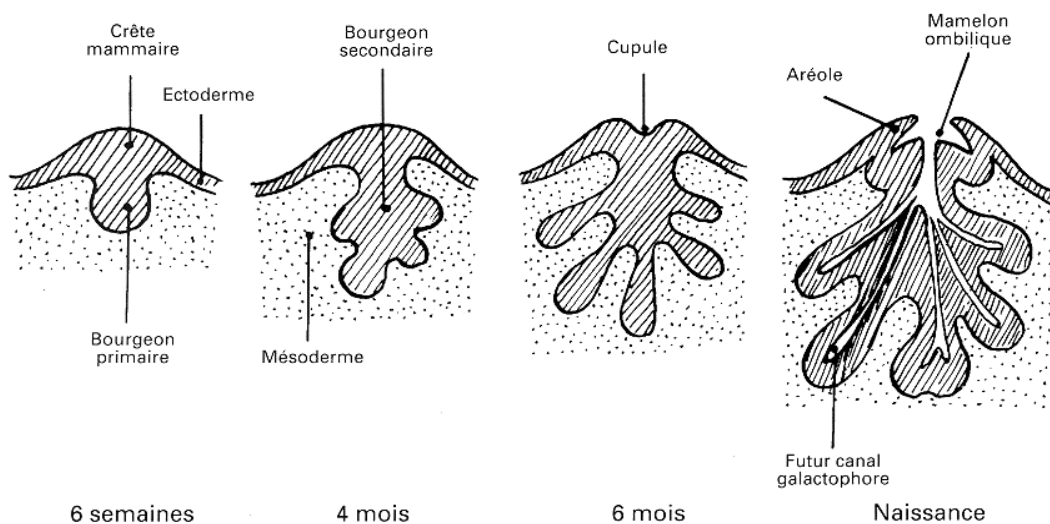


Figure 5 : Le développement prénatal du sein (d'après Espie & Gorins, 1995). A la naissance, il n'existe qu'une ébauche glandulaire qui restera telle quelle chez le garçon.

l'ectoderme (figure 5) qui s'étend de la future aisselle à la future aine. Le long de cette crête apparaît une paire symétrique d'épaississements notée bourgeons mammaires primitifs (ou bourgeons mammaires pectoraux). La crête mammaire disparaît ensuite à la 6^{ème} semaine et seuls subsistent les bourgeons mammaires. C'est la fin de la phase embryonnaire (environ à la 7^{ème} semaine). Au 5^{ème} mois, les bourgeons pectoraux émettent dans le mésoderme sous-jacent 15 à 20 prolongements cylindriques d'abord pleins qui se ramifient et se dilatent à leur extrémité, puis se creusent d'une lumière (7^{ème} – 8^{ème} mois) formant ainsi les futurs canaux galactophores. A la naissance, la glande mammaire est donc réduite à un cours système tubulaire et elle apparaît en surface sous la forme d'un léger relief (ou future mamelon) au sommet duquel s'ouvrent les 15 à 20 orifices des canaux galactophores. Lors de cette période, le mamelon fait saillie et l'aréole se pigmente légèrement. L'ébauche de la glande mammaire masculine correspond à celle de la femme, mais son développement demeure modeste et restera à ce stade toute sa vie.

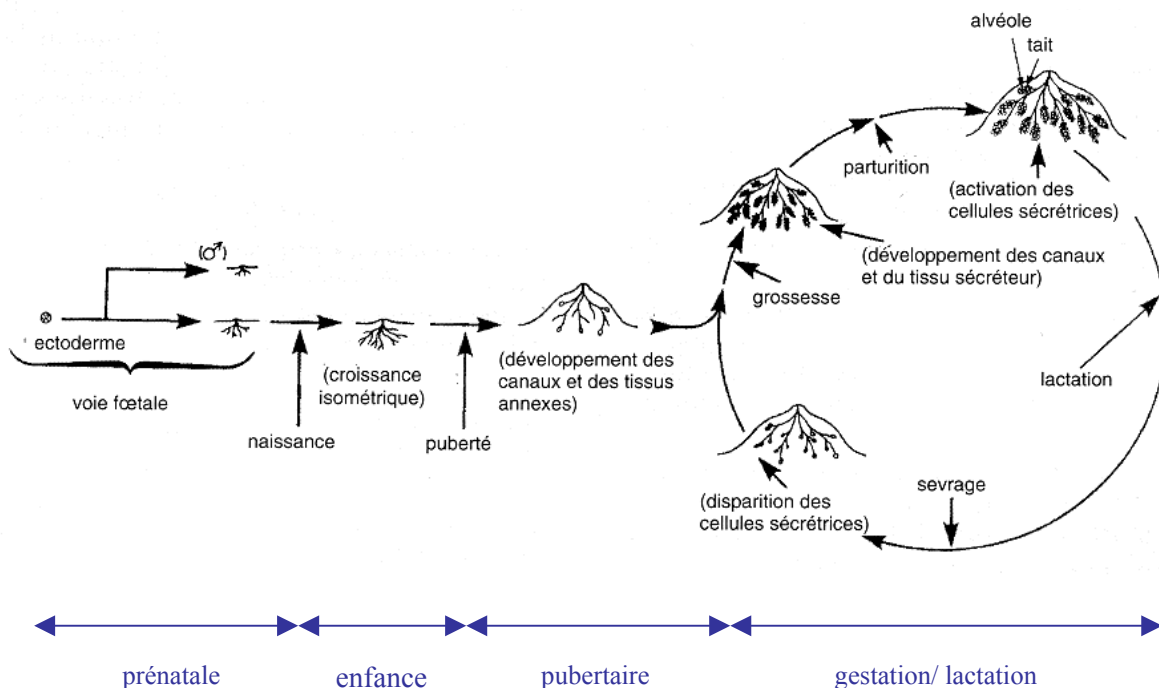


Figure 6: Les différentes phases de la croissance et du fonctionnement de la glande mammaire (d'après Espie & Gorins, 1995).

➤ l'étape pubertaire :

Pendant l'enfance, la croissance de la glande est lente et isométrique. De plus, les évolutions morphologiques et histologiques sont minimales (figure 6). À la puberté, sa croissance s'accélère et des modifications morphologiques ont lieu, dues à l'augmentation des adipocytes et au développement des canaux mammaires sous l'effet d'interactions épithélio-mésenchymateuses. Les lobules ne se forment qu'après la 1^{ère} ovulation (14 –15 ans) et le sein prend sa forme normale de nullipare. D'autres modifications sont observées telles que la saillie du mamelon, la pigmentation et la saillie de l'aréole.

➤ gestation et lactation :

C'est au cours de la gestation, puis de la lactation, que la glande achève son développement grâce aux signaux hormonaux. Ces signaux provoquent la prolifération des cellules souches, induisant l'extension des canaux galactophoriques (cela se produit pendant les 6^{iers} mois de la grossesse) et la différenciation des acini (ne se faisant qu'au cours des 3 derniers mois). La grossesse s'accompagne donc d'un développement des conduits lactifères aux dépens du tissu conjonctif : le sein augmente de volume (figure 5). Au cours du 5^{ème} mois, les bourgeons terminaux se transforment en alvéoles, la vascularisation de la glande s'intensifie. Au 9^{ème} mois, la sécrétion débute par la production du colostrum, liquide jaunâtre contenant des gouttelettes lipidiques et des débris cellulaires (dû à leur mode de sécrétion apocrine). La glande mammaire n'achève son développement qu'avec la 1^{ère} lactation, période pendant laquelle les acini sont parfaitement différenciés. Lorsque la lactation est terminée, la glande subit une involution avec une très nette diminution de volume, caractérisée notamment par une atrophie des structures épithéliales, un détachement des cellules sécrétrices de lait.

I- 1- d- Evolutions de la glande mammaire durant la vie génitale.

La prolifération et la différenciation des cellules épithéliales mammaires sont sous contrôle hormonal. Les hormones d'origine hypothalamo-hypophysaire, ovarienne, surrénalienne, placentaire et thyroïdienne jouent un rôle complexe dans le développement de la glande mammaire (figure 7A). Parmi elles, les œstrogènes et la progestérone ont un rôle clé dans le contrôle de la croissance. En effet, les œstrogènes, d'origine ovarienne, entraînent

la croissance des canaux alors que la progestérone également d'origine ovarienne stimule le développement des acini. Lors du cycle menstruel, la glande mammaire subit de légères modifications en fonction des phases du cycle et qui concernent surtout la morphologie de la glande. Ces variations ont été divisées en cinq phases par Vogel *et al.*, 1981, correspondant aux stades du cycle menstruel (figure 7B):

- phase proliférative (j3 à j7) : les cellules épithéliales se multiplient, le stroma est très dense et la lumière des acini est réduite,
- phase folliculaire (j8 à j14) : les lobules sont de petites tailles, peu de mitoses dans les cellules épithéliales,
- phase lutéale (j15 à j20) : elle est caractérisée par une dilatation de la lumière des acini, un épithélium quiescent,
- phase sécrétoire (j21 à j27): les cellules présentent une faible activité sécrétoire,
- phase menstruelle (j28 à j2) : elle se caractérise par la résorption de l'hypertrophie par apoptose des cellules épithéliales.

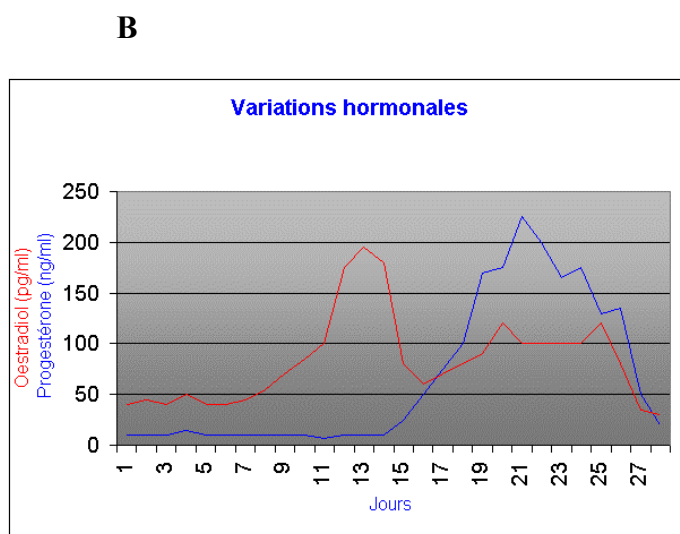
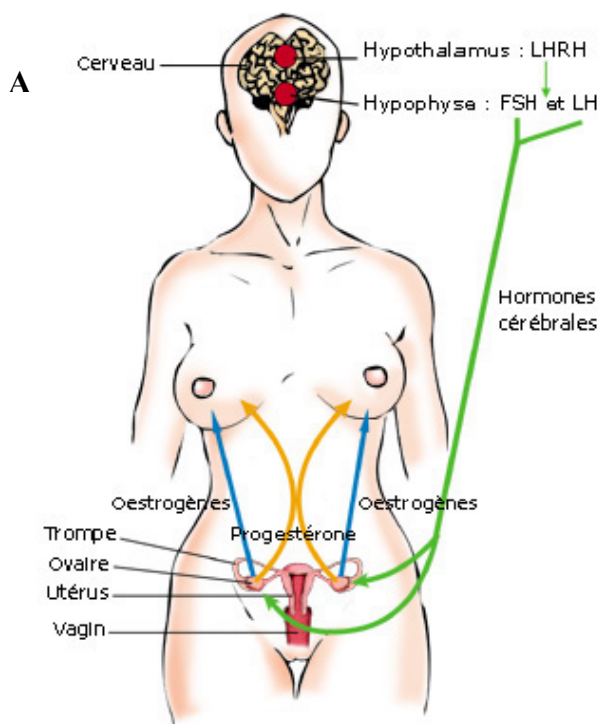


Figure 7: Rôle de l'axe hypothalamo-hypophysaire dans le contrôle du développement et de l'activité de la glande mammaire. **A.** Représentation schématique de certaines imprégnations hormonales au niveau du sein. **B.** Représentation schématique du cycle menstruel.

A chaque fin de cycle menstruel, la glande subit une involution, la conduisant à son aspect initial de glande non gestante.

Lors de la grossesse, l'activité proliférative est importante pendant les vingt premières semaines. En effet, la grossesse s'accompagne d'une importante sécrétion d'œstrogènes et de progestérone associée à celle de l'hormone placentaire lactogène et de l'hormone chorionique somatotrope. Au cours du dernier trimestre, on constate l'accumulation de granules de sécrétion dans les cellules épithéliales lobulaires. Le mésenchyme s'amenuise au fur et à mesure du développement de l'appareil sécrétoire. Après l'accouchement, sous l'action de la prolactine, les cellules épithéliales secrètent du lait. Les acini sont distendus par l'accumulation des sécrétions dans la lumière des canaux galactophores et dans les cellules épithéliales. L'arrêt de la lactation entraîne, par une accumulation du matériel sécrétoire, la régression de la glande mammaire et son retour à un aspect « normal » de glande non gestante. Lors du sevrage, une stase lactée se fait, entraînant la dilatation et l'éclatement d'alvéoles ; la sécrétion lactée se tarit. Des phagocytes éliminent les restes de lait et le tissu glandulaire involue partiellement. Cette atrophie des structures épithéliales est caractérisée par le rétrécissement des lumières des canalicules, l'épaississement de la membrane basale et le tissu palléal devient hyalin. Le tissu conjonctif subit lui aussi des remaniements involutifs touchant les fibres élastiques et collagène aboutissant à une perte du tissu conjonctif de soutien et à une augmentation du tissu adipeux. Ce processus d'involution n'est pas uniforme dans tout le sein cependant la glande mammaire devra subir une nouvelle différenciation avant d'être à nouveau fonctionnelle durant la lactation suivante.

La ménopause, quant à elle, se caractérise par une raréfaction des acini suite à une chute des taux d'œstrogène et de progestérone. Les cellules épithéliales et myoépithéliales s'atrophient alors que la membrane basale s'épaissit. Par ailleurs, le tissu conjonctif subit aussi une évolution avec altération des fibres élastiques et collagènes. Par conséquent, le sein va subir des phénomènes d'involution caractérisés par une atrophie des structures galactophoriques et une hyalinisation du tissu palléal.

I- 1- e- La glande mammaire : un organe hautement contrôlé.

Le tissu sécréteur mammaire n'a qu'une existence transitoire et cyclique. Cette fonction épisodique du sein avec ces phases successives de prolifération et d'involution, fait que cet organe est hautement contrôlé. La croissance de la glande mammaire est sous contrôle

d'hormones (les oestrogènes et la progestérone pour les essentielles) qui agissent de manière endocrine sur les cellules cibles, participant ainsi à l'homéostasie tissulaire du sein. De plus, il est maintenant bien établi que chaque organe synthétise une partie essentielle des facteurs de croissance dont il a besoin et qui agissent par des voies autocrines et paracrines et non plus endocrines. A l'heure actuelle, un certain nombre de ces facteurs de croissance a été identifié pour la glande mammaire. Enfin, la matrice extracellulaire est également essentielle à la croissance, à l'activité et à l'involution de la glande mammaire (Houdebine, 1997). Par conséquent, la croissance normale de cet organe est contrôlée par une balance d'activités biologiques entre facteurs stimulateurs et inhibiteurs de prolifération. Il s'agit de mécanismes complexes comprenant des interactions directes cellules-cellules, cellules-matrice extracellulaire et des interactions indirectes *via* les hormones et les facteurs de croissance. Pour mieux comprendre comment est régulé cet organe, nous allons aborder ci-dessous les différents éléments qui contribuent à cette homéostasie tissulaire, lesquels, nous le verrons plus loin, sont connus pour être les facteurs de la cancérogenèse mammaire. Notre attention sera plus particulièrement portée sur le rôle des hormones, quant aux facteurs de croissance, par souci de leurs interventions quasi permanentes au cours de la progression tumorale, ne seront abordés ici que de façon succincte.

➤ Les facteurs de croissance :

Les facteurs de croissance sont définis comme des polypeptides de faible poids moléculaire, qui se lient, sur les cellules cibles, à des récepteurs membranaires de hautes affinités. Il s'ensuit une cascade de réactions enzymatiques intracellulaires destinée à transmettre un signal au noyau. Puis la transcription des gènes nécessaires à la prolifération cellulaire est activée. Dans les conditions physiologiques, l'expression de ces facteurs de croissance dans la glande mammaire normale est finement régulée assurant l'homéostasie des tissus normaux. Nous avons ainsi choisi d'énumérer ces facteurs dans la table 1. Elle indique les principaux facteurs de croissance impliqués dans la régulation de la croissance mammaire. Ces facteurs jouant le rôle d'oncogène au cours de la progression tumorale, nous détaillerons de façon plus poussée leurs effets dans la partie « cancérogenèse mammaire ».

Nom du facteur	Cellule productrice	Effet
Epidermal Growth Factor (EGF)	cellule épithéliale	stimulateur de la prolifération
Insulin-like Growth Factor-I (IGF-I)	cellule myoépithéliale et épithéliale	stimulateur de la prolifération
Transforming Growth Factor-alpha (TGF- α)	cellule épithéliale	stimulateur de la prolifération
Fibroblaste Growth Factors (FGFs)	cellule myoépithéliale, épithéliale et fibroblaste	stimulateurs de la prolifération
Mammary Derived Growth Factor-1 (MDGF-1)	cellule épithéliale	stimulateur de la prolifération
Transforming Growth Factor-beta (TGF- β)	cellule épithéliale	inhibiteur de la prolifération
Insulin-like Growth Factor Binding Proteins (IGFBPs)	cellule épithéliale	inhibiteurs de la prolifération
Mammostatine	cellule épithéliale	inhibiteur de la prolifération

Table 1 : Principaux facteurs de croissance impliqués dans la régulation de la prolifération des cellules épithéliales mammaires normales. Etant donné que les IGFBPs sont capables de capturer les IGFs, modulant ainsi leur présence dans les alentours de la cellule, nous les avons classés avec les facteurs de croissance.

➤ Les hormones :

Nous venons de le voir dans le paragraphe C, les oestrogènes sont impliqués dans la stimulation de la croissance mammaire à la puberté et pendant la grossesse en stimulant la croissance des canaux et en augmentant les récepteurs à la progestérone (Hansen & Bissell, 2000). Il est clair, par ailleurs, que les oestrogènes eux-mêmes ne sont pas de véritables agents mitogènes pour les cellules épithéliales mammaires normales. Tout semble indiquer qu'ils agissent par l'intermédiaire de mécanismes multiples, plus ou moins indépendants et indirects. En effet, la synthèse d'ADN est un événement précoce qui survient après le traitement des cellules par l'oestradiol. Cette étape est précédée par l'activation de la transcription de plusieurs gènes précoces (comme fos, jun, myc, myb...) qui, à leur tour, vont permettre de réguler la transcription d'autres gènes. Cette signalisation hormonale passe par l'utilisation de récepteurs spécifiques. De nos jours, deux récepteurs aux oestrogènes (RE) sont connus : le RE α (Greene *et al.*, 1986 ; Green *et al.*, 1986) et le RE β (Kuiper *et al.*, 1996 ; Mosselman *et al.*, 1996). Ces récepteurs sont des membres de la superfamille des récepteurs nucléaires et ont des structures fortement homologues (revue Laudet & Stéhelin, 1993 ; Laudet *et al.*, 1993). Ils

sont constitués de six domaines (notés de A à F) (figure 8) où le domaine C est responsable de la liaison à l'ADN (96% d'homologie) et le domaine E, responsable de la liaison du ligand (58% d'homologie). On observe cependant une absence d'homologie au niveau du domaine de transactivation AF-1. Les RE α et RE β pourraient ainsi activer des gènes différents. Après liaison des oestrogènes, ces récepteurs sont capables de former des homodimères ou des hétérodimères. Ils activent alors la transcription de gènes cibles *via* leurs liaisons aux ERE (élément de réponse aux oestrogènes) (Cowley *et al.*, 1997 ; Pace *et al.*, 1997). Bien que la distribution et l'expression *in vivo* de RE α et RE β soient en partie différentes, les deux récepteurs sont colocalisés dans plusieurs tissus comme le sein, l'endomètre, la prostate, les testicules et les ovaires. De plus, le rapport RE α / RE β semble plus élevé dans le tissu tumoral que dans le tissu normal (Leygue *et al.*, 1998). Pour Pujol *et al.* (1998), ceci est à mettre en relation avec une diminution de l'expression de l'ARNm de RE β . Ces observations suggèrent que l'action des oestrogènes dans un tissu donné pourrait dépendre de l'expression relative de

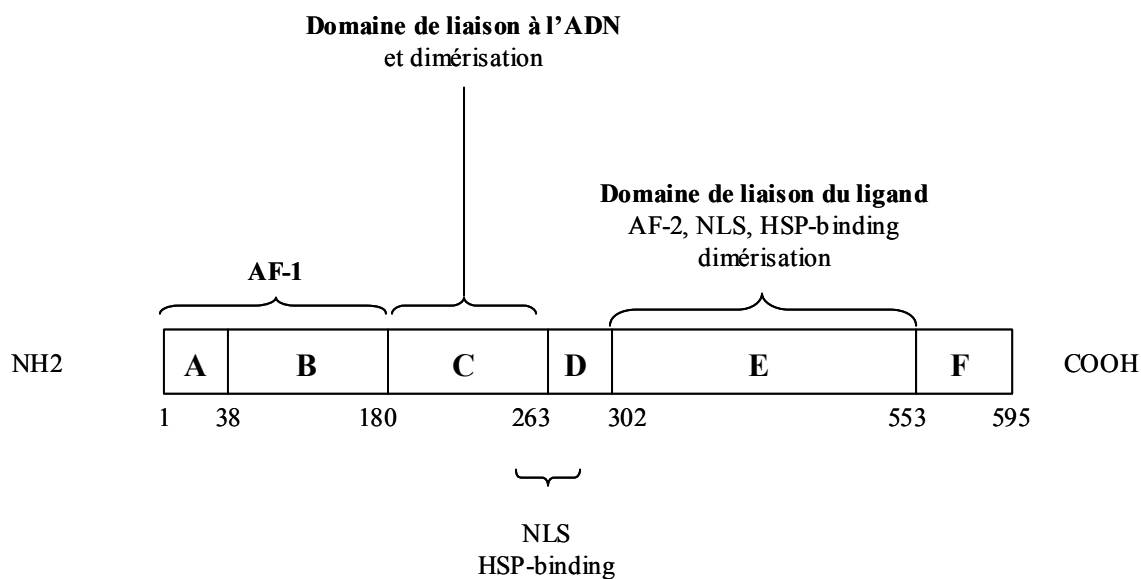


Figure 8: Représentation schématique de l'organisation structurale et fonctionnelle des récepteurs aux oestrogènes (RE). AF : fonction d'activation transcriptionnelle ; NLS : signal de localisation nucléaire ; HSP-binding : liaison aux protéines de choc thermique.

ces deux récepteurs. Ainsi, il est connu que l'oestradiol régule l'expression de gènes codant pour des facteurs de croissance, comme l'EGF (Dickson *et al.*, 1986), le TGF- β (Arrick *et al.*, 1990), TGF- α (Bates *et al.*, 1988), l'IGF-II (Osborne *et al.*, 1989), FGF-1 (El Yazidi *et al.*, 1998) et de leurs récepteurs (Dickson *et al.*, 1990 ; Peyrat *et al.*, 1991), de récepteurs des hormones stéroïdes, tel que le RE, ou encore de composants des voies de transduction du

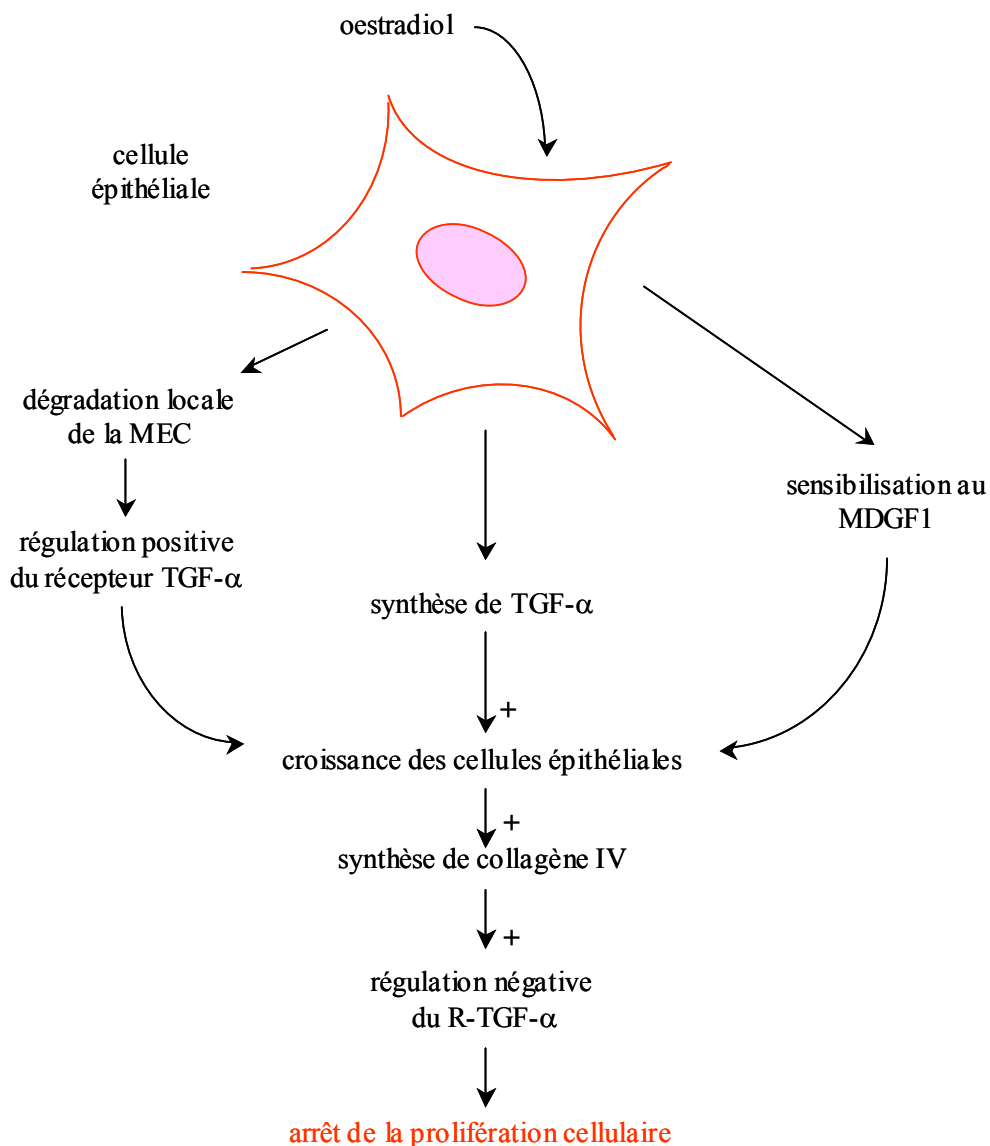


Figure 9 : Action des oestrogènes sur la cellule épithéliale mammaire. Ce dessin tente de montrer que, par des rétrocontrôles conduits par la cellule normale, l'homéostasie cellulaire est finement régulée. MEC : matrice extracellulaire ; MDGF1 : mammary derived growth factor 1 ; TGF- α : transforming growth factor alpha ; R-TGF α : receptor-TGF- α .

signal des facteurs de croissance (fos, cycline D1) (May & Westley, 1995). Par exemple, sous l'influence des oestrogènes, les cellules épithéliales synthétisent plus de TGF- α et le nombre de leurs récepteurs augmente (figure 9). Dans le même temps, les cellules épithéliales deviennent plus sensibles vis à vis d'un autre facteur de croissance spécifique de la glande mammaire, le MDGF1 (Mammary Derived Growth Factor 1). Le TGF- α , ainsi que l'EGF et le MDGF-1 induisent la synthèse locale de collagène IV par les cellules épithéliales. Ce type de collagène, lorsqu'il s'accumule, induit lui-même une régulation négative du récepteur du TGF- α . Un des rôles des oestrogènes pourrait donc être de provoquer une dégradation locale de la matrice extracellulaire qui, elle-même, permettrait aux récepteurs du TGF- α de s'accumuler. De cette manière, le système s'auto-limite puisqu'une augmentation de la sensibilité des cellules mammaires induite par les oestrogènes est suivie d'une désensibilisation. Par conséquent, ces hormones ont un rôle essentiel dans la régulation de la prolifération en provoquant l'accumulation de facteurs de croissance et de leurs récepteurs. En parallèle, les oestrogènes ont une action indirecte sur la prolifération des cellules en stimulant la synthèse de protéases (tels que uPA, Cathepsine D) qui, en dégradant localement la matrice extracellulaire, vont contribuer à la multiplication des cellules (Rocheffort, 1992 ; Rocheffort *et al.*, 2001). Comme nous le soulignerons plus loin, ces hormones stéroïdiennes sont souvent essentielles pour la croissance des cellules mammaires tumorales.

A côté des oestrogènes, la prolactine (ou PRL) est également un puissant facteur de prolifération des cellules épithéliales mammaires *in vivo* (Nicoll & Bern, 1972). *In vitro*, elle stimule la prolifération de la lignée cancéreuse mammaire T47D, mais elle n'est capable de la stimuler *in vivo* qu'en présence d'oestradiol. Les récepteurs de la prolactine appartiennent à une famille plus large comprenant le récepteur de l'hormone de croissance et des interleukines 2 et 4 et du GM-CSF (Kelly *et al.*, 1991). On retrouve les récepteurs de la PRL sur des membranes de cellules de cancer du sein dans environ 40% des cas, sans incidence pronostique (DePlacido *et al.*, 1990). L'insuline est aussi connue pour stimuler la prolifération des cellules épithéliales mammaires *in vitro* et *in vivo*. Elle agit par l'intermédiaire des récepteurs des IGFs (revue Strobl *et al.*, 1995).

I- 2- LA GLANDE MAMMAIRE TUMORALE.

I- 2- a- Histoire naturelle du cancer du sein.

Le cancer du sein est le premier cancer féminin dans la communauté européenne avec environ 130.000 nouveaux cas par an et il s'agit de loin du cancer le plus fréquent chez la femme. La fréquence du cancer du sein a justifié l'instauration à grande échelle de campagnes de dépistage de masse organisées, et son diagnostic est effectué par examen clinique, mammographie et biopsie. Le but du dépistage du cancer du sein est de poser le diagnostic de cancer le plus tôt possible, quand la tumeur est petite et localisée au sein. Cette pathologie est une maladie d'évolution relativement lente puisqu'il faut 6 à 8 ans pour qu'apparaisse, à partir d'une cellule, une tumeur d'un volume de 2 cm³. L'évolution de ce cancer est dominée par le risque d'apparition des métastases puisque, de nos jours, le cancer du sein métastatique est presque constamment mortel. En effet, pendant cette phase infraclinique, il existe des phénomènes d'invasion microscopique de la membrane basale qui font passer la tumeur d'un état de carcinome *in situ* à un état de carcinome invasif. Les cellules néoplasiques essaient de la tumeur primitive par voie lymphatique ou sanguine. De ce fait, les relais ganglionnaires (figure 10) atteints par ces cellules tumorales sont : l'axillaire (qui comprend les relais axillaires : inférieur, moyen, et supérieur), puis les chaînes mammaires internes, et enfin le

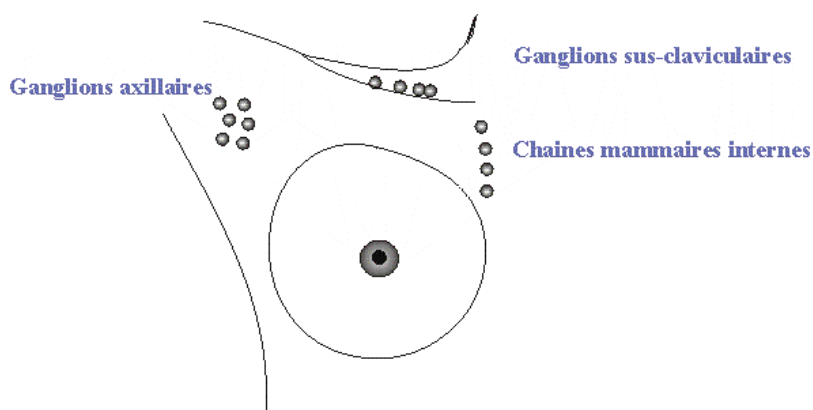


Figure 10 : Représentation schématique des relais ganglionnaires de la glande mammaire. Les ganglions axillaires sont les relais lymphatiques traversés par les troncs axillaires et mammaires qui drainent ainsi par voies lymphatiques les territoires du membre supérieur et du sein lui-même. Cette image provient d'un site Internet : <http://home.tiscali.be/salvatore.murgo/anatomie.htm>.

sus-claviculaire en cas de tumeur externe. Cet envahissement ganglionnaire est un reflet du potentiel métastatique et sa présence est corrélée à la taille de la tumeur et au grade histologique. Outre ces relais ganglionnaires, les cellules néoplasiques peuvent essaimer ailleurs, afin de donner ce que l'on appelle des métastases à distances. Aujourd'hui, les sites métastatiques les plus fréquents sont l'os, le foie, les poumons et la plèvre, la peau et le cerveau, différents tissus où l'irrigation est très riche.

I- 2- b- Les types de cancer du sein.

On distingue les tumeurs bénignes, qui sont bien limitées et dont la croissance est purement locale, des tumeurs malignes qui tendent à infiltrer et détruire les tissus adjacents (figure 11A). Parmi les tumeurs bénignes, existent l'adénofibrome et la tumeur phyllode (3 à 4%) qui sont des tumeurs développées aux dépens des éléments de la glande mammaire, le tissu conjonctif évoluant suivant le type fibreux. Quant à elles, la plupart des tumeurs malignes du sein sont des adénocarcinomes développés soit à partir de l'épithélium des lobules glandulaires (carcinomes lobulaires) soit à partir de l'épithélium des galactophores (carcinomes canauxiaux) et représentent environ 98% des carcinomes mammaires. Dans de rares cas, les cellules cancéreuses mammaires prolifèrent sans rupture de la lame basale, donc sans infiltration du tissu conjonctif environnant par opposition au carcinome infiltrant (Saglier & Antoine, 1996). Les tumeurs malignes ainsi formées sont appelées respectivement carcinomes lobulaires *in situ* et carcinomes canauxiaux *in situ*. Ces derniers sont définis comme des « carcinomes des galactophores n'infiltrant pas le tissu conjonctif ». Il existe 4 types architecturaux (massif, cribriforme, papillaire et comédo). Ils ne franchissent pas la lame basale et leur pronostic sont excellents. Pour le carcinome lobulaire *in situ*, on le définit comme un « carcinome intéressant les canalicules intralobulaires qui sont comblés et distendus par une prolifération de cellules peu jointives sans envahissement du tissu conjonctif voisin ». Il est volontiers bilatéral et évolue vers la forme infiltrante dans 20% des cas. Dans la majorité des cas, la lame basale est partiellement ou totalement détruite, on assiste alors à une infiltration du conjonctif. Les carcinomes les plus fréquents sont les carcinomes canauxiaux invasifs (85%) et les carcinomes lobulaires invasifs (5%). Il existe aussi des carcinomes infiltrants de formes particulières, plus rares, tels que les carcinomes médullaires, les carcinomes mucoïdes (ou colloïdes), carcinomes tubuleux, les carcinomes apocrines et maladie de Paget (tumeur du mamelon).

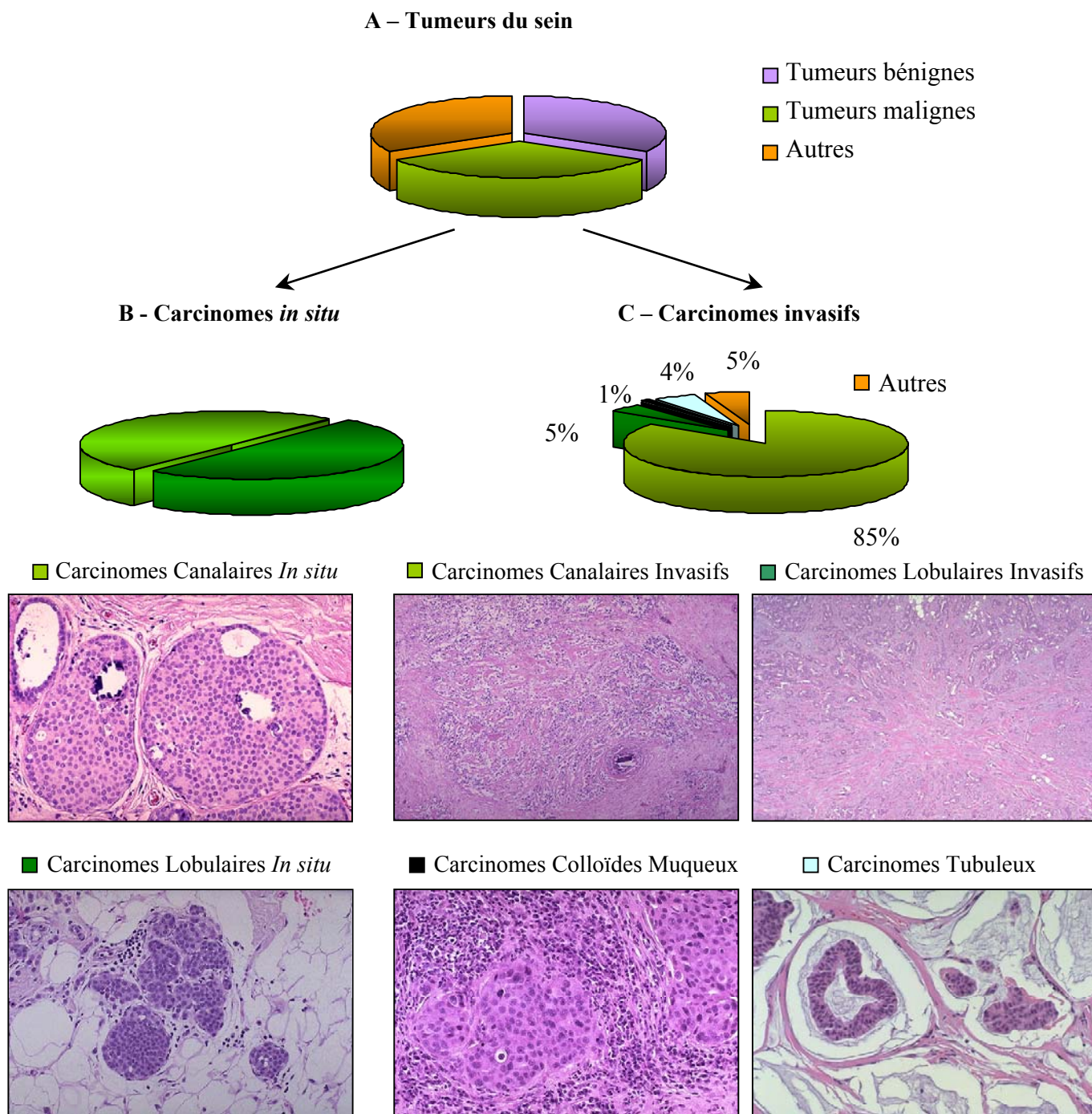


Figure 11 : Représentation des différentes tumeurs de la glande mammaire. **A.** Schéma des principales tumeurs observées chez les femmes. Cette représentation ne tient pas compte des proportions de chaque catégorie de tumeurs. **B.** Diagramme représentant les diverses classes des carcinomes *in situ*. **C.** Diagramme représentant en pourcentage les classes des carcinomes invasifs avec comme représentant majeur les carcinomes canauxiaux invasifs. Les photos d'immunohistologie proviennent d'un site Internet (Web Path) : <http://www-medlib.med.utah.edu/WebPath/TUTORIAL/BREAST/BREAST.html>

Les tumeurs malignes en dehors des carcinomes primitifs du sein sont rares, représentent moins de 1% de toutes les tumeurs malignes du sein et constituent un groupe de lésions disparates comportant les sarcomes phyllodes, les sarcomes mésoenchymateux, les angiosarcomes, les lymphomes malins non hodgkiniens primitifs du sien.

I- 2- c- Marqueurs utilisés.

Dans le cancer du sein, de très nombreux facteurs pronostiques sont disponibles et on peut les regrouper en 3 classes, en fonction de leur rattachement à la progression tumorale, à la prolifération ou à la capacité d'invasion et de dissémination. Devant l'abondance de données biologiques, il convient de distinguer les facteurs pronostiques utilisés en pratique quotidienne et les facteurs non encore validés (recherche clinique). Parmi les facteurs pronostiques, prédictifs de l'évolution métastatique, on distingue actuellement :

➤ Les facteurs cliniques et histologiques :

- l'âge (avant la ménopause, le pronostic est d'autant plus mauvais que la patiente est jeune);
- le diamètre de la tumeur;
- l'envahissement ganglionnaire axillaire (3 groupes sont généralement admis : pNo ou N-, 1-3 N+, > 4 N+);
- le type histologique;
- le grade histopronostique de la tumeur (SBR : Scarff Bloom et Richardson) : il est fondé sur le degré de différenciation de la tumeur, le pléiomorphisme de ses noyaux et l'activité mitotique. Chaque élément est coté de 1 à 3, la somme va donc de 3 à 9 et permet le classement en 3 catégories : I (3, 4,5), II (6, 7), III (8, 9).
- la présence d'embols tumoraux vasculaires.

➤ Les facteurs biologiques :

- le taux des récepteurs aux oestrogènes (RE) et à la progestérone (RP) présente une information pronostique et il est très utile en tant que facteur prédictif de réponse à la thérapie hormonale. On distingue les tumeurs négatives et positives pour les récepteurs aux oestrogènes et à la progestérone : <10 et > 10 fmol/ mg protéine, respectivement. Les taux de récepteurs hormonaux sont les seuls à être détectés en routine.

D'autres marqueurs tissulaires ont été proposés mais ne sont pas utilisés dans la pratique. On les classe comme suit :

- les marqueurs de développement précoce (récepteur de l'IGF ou du FGF),
- les marqueurs de développement tardif (récepteurs de l'EGF, erb-B2),
- les marqueurs de prolifération (phase S, Ki67, thymidine kinase, incorporation de bromodéoxyuridine (BrdU),
- les marqueurs de l'activité métastatique (protéases : cathepsine-D, activateur du plasminogène et l'un de ses inhibiteurs PAI-1 ; métalloprotéases : stromélysine III ; collagénases).

En pratique quotidienne, l'évaluation pronostique repose essentiellement sur le statut ganglionnaire (N), la taille tumorale (T), le grade histopronostique (GHP), l'âge et les récepteurs hormonaux (RE, RPg).

Vue l'importance des facteurs pronostiques pour la caractérisation de la tumeur mammaire et son traitement, la recherche de nouveaux facteurs est un point crucial dans le combat contre le cancer et l'appréciation de leur réelle valeur prédictive est essentielle (pour revue : Sidransky, 2002).

I- 3- MECANISMES CELLULAIRES ET MOLECULAIRES DE LA CANCEROGENESE MAMMAIRE .

Dans cette partie, nous tentons d'expliquer ce qu'est la cancérogénèse mammaire. Nous développerons donc les bases de ce processus et nous poursuivrons par les anomalies génétiques qui sont couramment retrouvées dans le cancer du sein et qui représentent une des causes de cette pathologie. La cellule cancéreuse maîtrise l'expression de certaines protéines qui lui autorisent de proliférer. L'homéostasie tissulaire est dérégulée et la cellule donne naissance à des clones. Nous mettrons essentiellement en avant le rôle des facteurs de croissance pour la cellule cancéreuse en dressant le bilan des principales activités connues. Mais s'adapter à son microenvironnement pour survivre n'est pas suffisant. Entre autre, le système immunitaire veille et la tumeur doit développer des stratégies pour y échapper. Nous parlerons consécutivement, de l'implication des interactions cellulaires au cours du devenir tumoral, et de la nécessité pour la tumeur, de moduler dans le temps et dans l'espace, les systèmes d'autocrinie et de paracrine.

I- 3- a- Une origine multifactorielle.

La cancérogenèse mammaire est un phénomène complexe, multifactoriel, impliquant plusieurs gènes, dans les formes héréditaires (anomalies génétiques constitutionnelles) comme dans les formes sporadiques (anomalies génétiques somatiques). Pour schématiser, on peut la décrire comme le résultat d'une succession d'étapes faisant évoluer une cellule normale en cellule cancéreuse (pour revues : Lakhani, 1999 ; Polyak, 2001 ; Fey, 2002 ; Sidransky, 2002) (figure 12). Ce processus d'évolution est permis par l'altération progressive de l'expression de

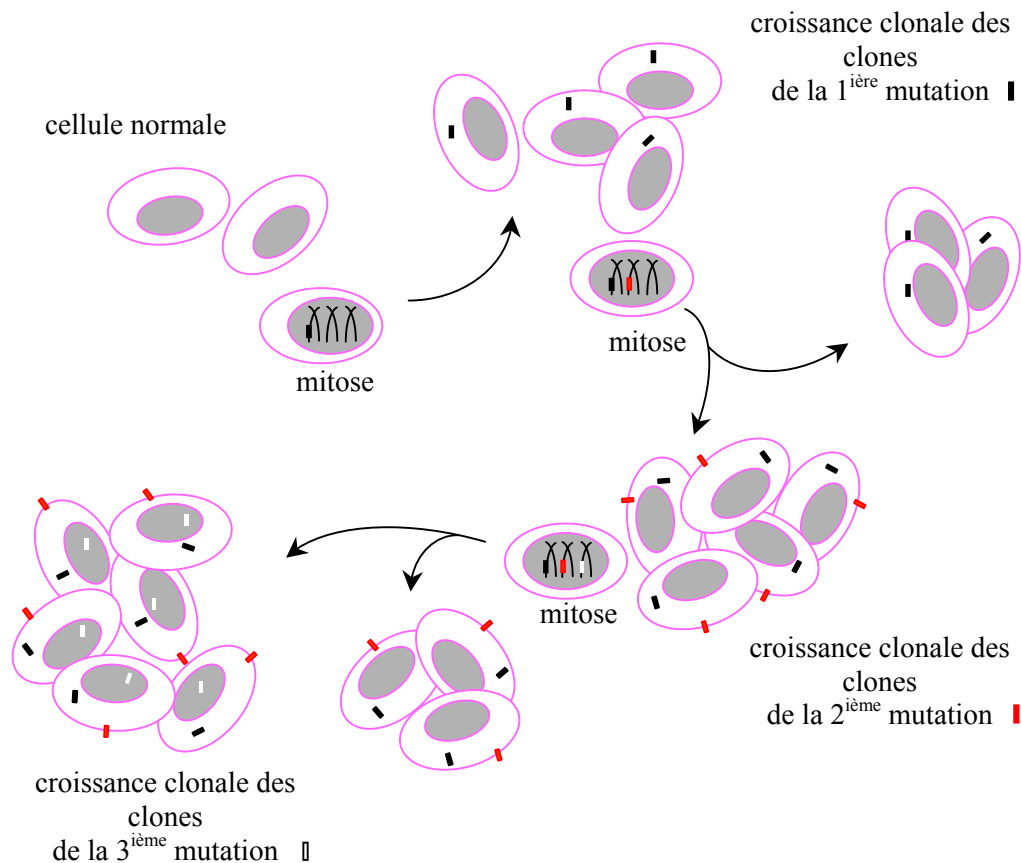


Figure 12 : La cancérogenèse mammaire est un processus d'accumulations d'altérations géniques qui transforme une cellule normale en une cellule tumorale. Une mutation (rectangle noir) peut apparaître lors de la mitose permettant ainsi à la cellule concernée un avantage (la production d'un facteur de croissance par exemple) vis à vis des voisines. Les cellules filles, issues de cette cellule, vont croître en clone et peuvent acquérir à nouveau d'autres avantages lors de mutations additionnelles (rectangles rouge et blanc) au cours de leurs futures mitoses.

gènes favorisant (oncogènes) ou au contraire empêchant (anti-oncogènes ou suppresseurs de tumeurs) le développement cancéreux (Macleod, 2000). Ainsi, toutes ces altérations dans une cellule peuvent lui permettre d'acquérir des avantages vis à vis de ces voisines. Ces acquis vont être transmis de cellule fille en cellule fille favorisant la croissance clonale de cette parenté de façon plus efficace par exemple par rapport aux autres. Les mutations peuvent toucher les chromosomes (nombre de copies aberrant, translocations, délétions, perte d'hétérozygotie, extension des télomères), l'ADN (mutations ponctuelles, altérations des microsatellites, évènements épigénétiques), l'ARN (sous ou surexpression, mutations), et les protéines (altérations ou modifications structurales, changement d'activité enzymatique, localisation, altération du pattern d'expression). Par ailleurs, comme nous le verrons plus loin, les modifications génétiques les plus fréquemment observées sont les pertes d'hétérozygotie (LOH) concernant soit le chromosome ou un bras du chromosome (1, 3p, 6q, 7q, 8p, 11, 13q, 16q, 17, 18p et 22q) (Bièche & Lidereau, 1995 ; Bièche *et al.*, 1999). Les modifications les plus fréquemment observées dans le cancer du sein sont des amplifications d'oncogènes, et des mutations ou des délétions de suppresseurs de tumeurs. Cependant de nombreuses modifications géniques ont été décrites dans les cancers du sein (Oudard, 1997). Le nombre d'oncogènes et d'anti-oncogènes recensé ne cesse d'augmenter ; ils codent des protéines impliquées dans de nombreuses cascades de transduction telles que les ligands et les récepteurs aux facteurs de croissance, les facteurs de transcription ou encore des protéines régulatrices du cycle cellulaire. L'hétérogénéité des cancers du sein aux niveaux clinique, histologique, biologique et évolutif implique qu'il n'existe pas une seule voie menant à la carcinogenèse mammaire, mais probablement plusieurs chemins, avec des étapes différentes. Le cancer n'est donc pas un état statique, mais un processus pathologique évolutif, perpétré par un clone ou plusieurs clones de cellules ayant acquis des altérations moléculaires leur permettant d'échapper aux règles régissant l'organisation tissulaire normale (figure 12).

En schématisant à l'extrême, pour que la vie d'une cellule se déroule de façon harmonieuse, il faut que l'intégrité des gènes (supports passifs de l'information) soit garantie et que la synthèse et la maturation des protéines (principes actifs) soient finement régulées. Or, dans le processus de cancérogenèse, c'est justement le dérèglement de ces mécanismes qui conduit à la mort de l'individu. La nature des gènes impliqués dans la progression tumorale confert aux cellules certaines capacités (Hanahan & Weinberg, 2000) qui sont :

- de croître en l'absence de stimulus externe,
- d'échapper à la mort par apoptose (ou mort cellulaire programmée),
- de se répliquer de façon indéfinie (immortalité cellulaire),
- de favoriser l'angiogenèse de la tumeur,
- d'envahir les tissus adjacents et de métastaser,
- d'être insensibles aux rétrocontrôles qui visent à modérer la prolifération cellulaire.
- d'échapper à la surveillance immunitaire

I- 3- b- Les anomalies génétiques.

➤ Amplification et surexpression d'oncogènes :

Il existe quatre types d'altérations génétiques : les mutations (échange d'un ou de plusieurs nucléotides), les délétions (perte d'une partie d'un gène), les amplifications (multiplication d'une partie d'un gène) et les translocations chromosomiques (assemblage chimérique de deux gènes). Les altérations génétiques peuvent concerner la partie régulatrice ou la partie codante du gène. Dans les cancers du sein, l'activation des oncogènes par amplification génique a été fréquemment décrite (Bièche & Lidereau, 1997) ; les mutations ponctuelles, les insertions ou les réarrangements géniques ont été moins observés. Une amplification génique est généralement associée à des niveaux élevés d'expression d'ARNm et de protéine. Cependant, il existe des cas de surexpression sans amplification du gène. Les amplifications les plus fréquentes concernent 3 oncogènes. L'oncogène *myc* est l'un des premiers proto-oncogène étudié. Il est localisé en 8q24, et code pour un facteur de transcription impliqué à la fois dans la croissance, la différenciation et l'apoptose (revue Nass & Dickson, 1997). Sa fréquence d'amplification varie de façon importante (de 4 à 40% des cas, 15% en moyenne) (Varley *et al.*, 1987 ; Berns *et al.*, 1992). Elle semble plus fréquente en cas d'atteinte ganglionnaire axillaire, ou de grade histopronostique élevé. Cependant, il semble que des événements additionnels à l'amplification de *myc* soient nécessaires à la tumorigenèse mammaire. En effet, des souris transgéniques ne développent des tumeurs clonales qu'après une longue période de latence (Stewart *et al.*, 1984). Le deuxième oncogène, le plus souvent amplifié dans les tumeurs mammaires, est *ccdn1*. Ce gène code pour une protéine appartenant à la famille des cyclines : la cycline D1 (ou Bcl1 ou encore PRAD1) et il est localisé en 11q13. Il s'agit d'une famille de protéines qui agissent comme élément central du cycle cellulaire, en régulant l'activité de leurs partenaires, les kinases

cyclines dépendantes, avec pour conséquence, le passage en phase G1/S ou G2/M (Bartkova *et al.*, 1994). Ce gène est amplifié dans 20% des carcinomes mammaires (Gillet *et al.*, 1994 ; Buckley *et al.*, 1993) mais la protéine peut également se trouver surexprimée (revue

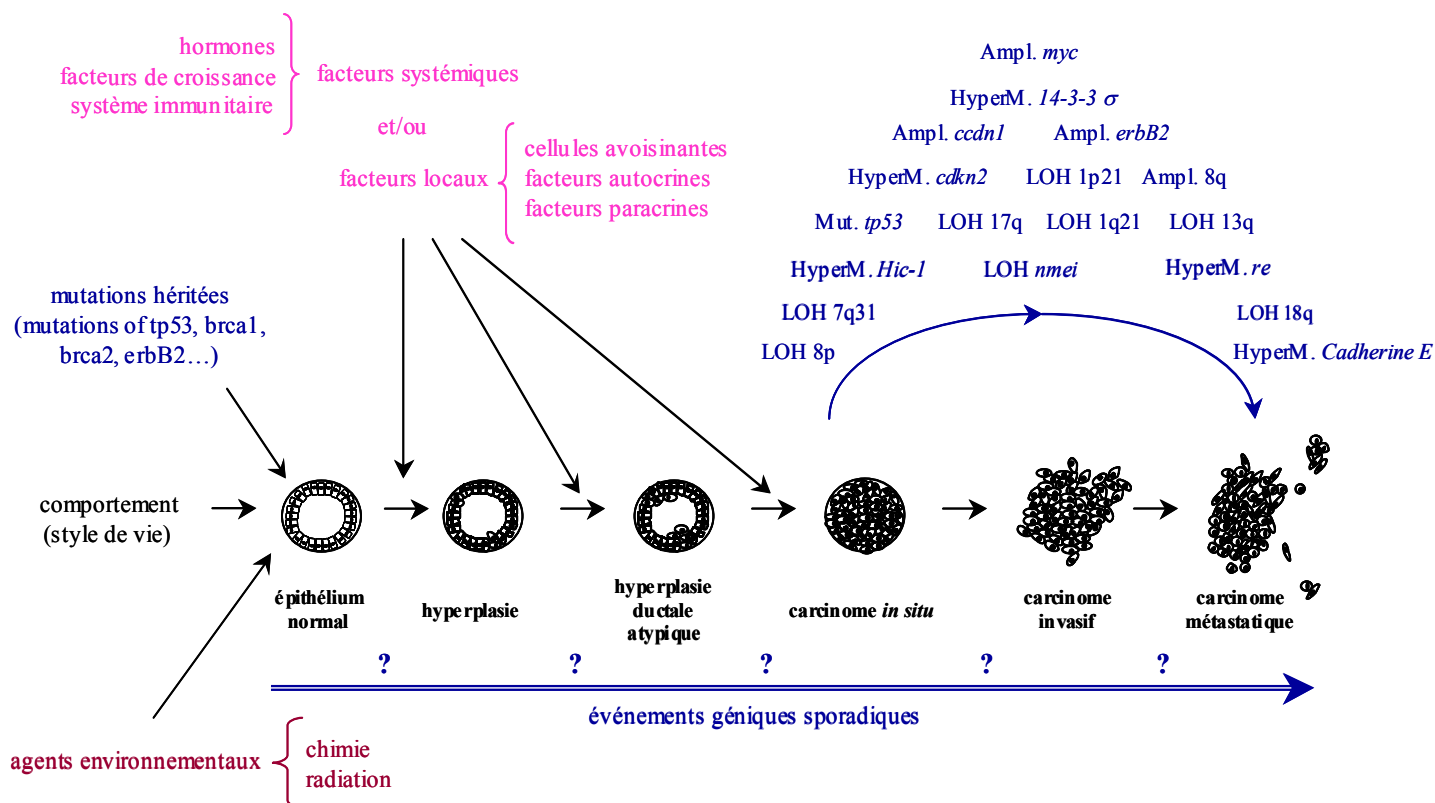


Figure 13 : Schéma hypothétique des anomalies génétiques au cours de la cancérogenèse mammaire (figure résumant les revues : Bièche & Lidereau, 1997 ; Lakhani, 1999 ; Polyak, 2001). HyperM. : hyperméthylation ; Ampl. : amplification ; LOH : loss of heterozygoty.

Hosokawa & Arnold, 1998). Le proto-oncogène c-erbB2 (ou encore HER2) est l'homologue humain du gène *neu* isolé de cellules de neuroblastomes induites chez le rat, et représente le troisième oncogène le plus fréquemment amplifié dans les tumeurs mammaires. Il fait partie de la famille des gènes des récepteurs de facteurs de croissance de type I à laquelle appartient le récepteur de l'EGF (Erb-B1). Erb-B2, a été isolé en 1992 et appartient d'ailleurs à la famille de l'EGF (Holmes *et al.*, 1992). Il est localisé en 17q21-22 et joue un rôle important dans le développement et la progression des tumeurs mammaires. Il est amplifié et ou

surexprimé dans 10 à 46% des cas. Cette amplification est accompagnée d'une surexpression de l'ARNm et de la protéine (Révillion *et al.*, 1998). Les études ont montré que cette amplification était corrélée à des paramètres histologiques ou biologiques d'agressivité, tels qu'un grade histologique élevé, l'absence de récepteurs à l'estradiol. Cette amplification semble plus fréquente dans les cancers canauxaires *in situ* (42-45%) par contre elle n'existe pratiquement jamais en cas de forme lobulaire (invasive ou *in situ*).

Nous venons de montrer, que des modifications au niveau de ces oncogènes se traduit par des sites d'expression aberrants ou des niveaux d'expression anormalement élevés, et en conséquence, par des gains de fonction tendant à favoriser la prolifération cellulaire pour les cellules tumorales. La mise en évidence et l'étude des gènes suppresseurs de tumeurs sont plus récentes, et tendent à montrer leur intervention dans la carcinogenèse au même titre que les oncogènes.

➤ Inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs :

Les gènes suppresseurs de tumeurs agissent à différents niveaux de la vie de la cellule. Communément, on les subdivise selon leur fonction, en garants de la stabilité du génome (*caretakers*), les inhibiteurs de la croissance cellulaire au sens large (*gate-keepers*) et les modulateurs du microenvironnement cellulaire (*landscapers*). Ces gènes comme le gène *rb*, ou le gène *p53* agissent de manière récessive puisque leurs inactivations nécessitent l'altération des deux allèles (Knudson, 1993). Plusieurs mécanismes peuvent être à l'origine de cette inactivation. Actuellement, les LOH, les mutations et les altérations épigénétiques représentent les 3 événements les plus observés dans le cancer du sein lors de l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs. Certaines pertes d'hétérozygotie (ou perte d'allèles) ont été mises en évidence sur l'ensemble du génome des cellules cancéreuses mammaires. Cependant, certaines régions semblent plus fréquemment concernées, parmi lesquelles on peut citer les bras longs des chromosomes 1, 6, 7, 8, 11, 16, 17, 18 et 22 et les bras courts des chromosomes 1, 3, 11 et 17 (Bièche & Liderau, 1995, 1997). Il existe souvent plusieurs régions délétées sur un même bras de chromosome ce qui implique vraisemblablement la participation de plusieurs gènes suppresseurs.

Des mutations ponctuelles sont également impliquées dans le processus de cancérisation inactivant les *caretakers* par exemple. Ainsi des mutations du gène *p53* (localisé dans la région 17q13), considéré comme l'un des gardiens du génome, sont retrouvées dans environ 15 à 60% des cancers du sein (Hollstein *et al.*, 1991 ; Bautista *et al.*, 1997 ; Ashcroft &

Vousden, 1999). La mutation ponctuelle conduit au remplacement d'un acide aminé par un autre dans la séquence de la protéine p53. Cette mutation est retrouvée le plus souvent quand le deuxième allèle a disparu par délétion. Ceci entraîne une perte de fonction normale de p53. Cette protéine joue un rôle majeur dans le contrôle du cycle cellulaire, de la réparation et de la synthèse de l'ADN, de la différenciation et de la mort programmée. Son inactivation peut augmenter le pool de cellules en phase de prolifération ainsi que la probabilité de leur transformation maligne par inhibition du processus de l'apoptose. La transfection du gène *p53* normal dans des cellules cancéreuses mammaires, inhibe leurs divisions, démontrant son rôle suppresseur (Greenblatt *et al.*, 1994). Par ailleurs, un niveau d'expression élevé de cette protéine est de mauvais pronostic (Peyrat *et al.*, 1998). De plus, une perte d'hétérozygotie au niveau de la région 17q13, où se situe le gène *p53*, est retrouvée dans plus de la moitié des cas étudiés.

Le gène *rb* (localisé au niveau de la région 13q14), premier gène suppresseur de tumeur découvert, est impliqué dans le rétinoblastome de l'enfant. Il code pour une protéine de 105 à 110 kDa, impliquée dans le contrôle de la croissance cellulaire et du cycle cellulaire et qui peut se lier à différentes protéines cellulaires, dont les cyclines D. On retrouve une perte d'hétérozygotie au niveau de la région 13q14 ou au niveau du gène *rb* lui-même dans environ 30% des cas. Dans environ 20% des cas, on retrouve une anomalie structurale du gène, sous forme de microdélétion ou de mutation. De plus, une perte d'expression de la protéine dans 15 à 30% des cas est également constatée.

Parmi les *land-scapers*, la cadhérine E et le CD44 sont les exemples les plus couramment usités. La cadhérine E est une molécule d'adhérence intercellulaire des tissus épithéliaux. CD44 est quant à elle, en plus, impliquée dans de nombreux processus de signalisation (Naot *et al.*, 1997). L'expression de la cadhérine E, dans les adénocarcinomes, est inversement corrélée à l'invasivité de ces tumeurs (Heimann *et al.*, 2000). Des mutations du gène ont été décrites dans des lignées de cancers du sein, comme dans des tumeurs, en particulier de forme lobulaire. Ce gène est localisé en 16q22, région qui présente assez fréquemment des pertes d'hétérozygotie (revue Berx *et al.*, 1998). Pour CD44 il est aussi montré de hauts taux d'expression dans de nombreuses cellules tumorales (Naot *et al.*, 1997).

Les protéines $p16^{\text{INK4a}}$ et $p27^{\text{KIP1}}$, dont les gènes sont localisés en 9p21 et 12p12 respectivement, sont des inhibiteurs spécifiques de kinases dépendantes des cyclines et sont impliquées dans la régulation du cycle cellulaire faisant ainsi partie des *gate-keepers* (pour revue Sandhu & Slingerland, 2000). Il existe des délétions du gène $p16^{\text{INK4a}}$ dans 46% des lignées étudiées (revue Tsihlias *et al.*, 1999) de même pour le gène $p27$.

Comme l'illustre la figure 13, les altérations génétiques (mutations, délétions, amplifications et translocations chromosomiques) développeraient le cancer, et favoriseraient la progression tumorale. Le plus souvent, ces altérations touchent les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs conduisant la cellule tumorale vers un statut de plus en plus agressif. Ces altérations mènent à des désordres protéiques d'ordre qualitatif et/ou quantitatif au sein des cellules cancéreuses, se traduisant par des gains et des pertes de fonctions biologiques. Mais lors du processus de cancérogenèse, d'autres altérations peuvent avoir lieu, et en particulier des altérations épigénétiques. En effet, l'empaquetage de l'ADN dans le noyau, sous forme de chromatine, joue un rôle essentiel dans la régulation de l'expression génique (revue Davie *et al.*, 1999), et tend à montrer son rôle dans les modifications de l'ADN observées dans les cellules cancéreuses, expliquant ainsi la levée d'inhibition pour certains gènes ou l'effet inverse pour d'autres. Nous allons étudier successivement et succinctement l'exemple de l'acétylation et de la méthylation comme étant les altérations épigénétiques les plus fréquemment retrouvées dans les tumeurs mammaires.

Le degré d'acétylation des histones (protéines impliquées dans la structure de la chromatine) influence la compaction de la chromatine, et régule ainsi l'accès des facteurs généraux de transcription à l'ADN et, par conséquent, l'activité génique (Kouzarides, 2000 ; Rountree *et al.*, 2001). Les histones acétyl-transférases (HAT) et les histones déacétylases (HDAC) sont respectivement les enzymes impliquées dans ces processus, de façon positive et négative. Dans une cellule normale, plus les histones sont acétylées et plus cette acétylation crée une configuration accessible de l'ADN facilitant ainsi l'activité transcriptionnelle des gènes cibles des HATs. Par contre, la déacétylation des histones, se trouvant proches de régions promotrices, facilite la compaction de l'ADN au détriment de la transcription.

L'autre mécanisme de régulation épigénétique est la méthylation des cytosines regroupées sous la forme d'îlots CpG dans des zones d'activation (promoteurs) de la transcription de certains gènes (Counts & Goodman, 1995 ; Rountree *et al.*, 2001 ; revue Davie *et al.*, 1999 ; Yang *et al.*, 2001 ; Widschwendter & Jones, 2002). A l'aide d'un exemple connu, nous allons illustrer l'importance de l'état de méthylation dans les cancers. Il a été montré que la perte de l'expression du gène *14-3-3 σ* est l'événement moléculaire le plus commun observé dans les biopsies tumorales (Nacht *et al.*, 1999). De plus, Ferguson *et al.* (2000) ont montré que cette perte d'expression n'était pas majoritairement attribuée au LOH ou à des mutations au niveau de ce gène, mais était le fruit d'une hyperméthylation de ce locus. La protéine cytoplasmique *14-3-3 σ* , est responsable du point de contrôle en G2/M. Lors des dommages à l'ADN, elle séquestre le complexe cdc2-cycline B1 ; ceci empêche ce complexe cdc2-cycline B1 d'entrer

dans le noyau, lieu où cette machinerie protéique débiterait la mitose, permettant ainsi de réparer l'ADN. Par conséquent, la perte d'expression de ce gène joue un rôle important dans le cancer, puisqu'il peut faciliter l'accumulation de dommages à l'ADN conduisant à la transformation maligne. A côté de cet exemple, aujourd'hui d'autres gènes, dont la perte d'expression va de paire avec l'état de méthylation, sont identifiés, tels que : cadhérine E, RE, cycline D2, p16, MDGI, BRCA1.

Avec cette vue d'ensemble, on constate que les données scientifiques suggèrent que la perte de l'expression d'un gène est associée à l'évolution du cancer. Néanmoins, les mécanismes par lesquels les altérations épigénétiques ont lieu sont encore peu connus. Cependant, les protéines intervenant dans ces modifications d'empaquetage de l'ADN semblent représenter un nouvel aspect thérapeutique pour lutter contre les cancers. Outre les altérations observées au niveau des gènes suppresseurs de tumeurs, d'autres gènes sont, eux aussi modifiés au cours de la cancérogenèse mammaire. L'immortalisation est la capacité d'une cellule à surmonter les étapes de sénescence. Une cellule normale est mortelle puisqu'elle ne peut se diviser *in vitro* qu'un certain nombre de générations données selon le type cellulaire. Par contre, les cellules tumorales ne connaissent pas cette limite. L'une des molécules impliquées dans ce processus est la télomérase qui assure le maintien de la longueur et de l'intégrité des télomères des chromosomes. Quasiment absente dans les cellules normales, elle est exprimée voire surexprimée dans la plupart des tumeurs (Autexier & Greider, 1996 ; Campisi, 2001). Les cancers peuvent être dus à un défaut de la régulation de la synthèse des protéines. Cette synthèse s'effectue en deux étapes : la transcription qui conduit de l'ADN génomique à l'ARNm. A ce niveau, interviennent les facteurs généraux de la machinerie transcriptionnelle et tout un ensemble d'activateurs et de répresseurs spécifiques d'un type cellulaire ou d'un tissu donné. L'ensemble des ARN transcrits (le transcriptome) à partir des gènes d'une cellule est ensuite traduit en protéines au cours du processus de traduction (donnant le protéome). Enfin, certaines protéines doivent être activées par des modifications post-traductionnelles (repliements particuliers, glycosylation, phosphorylation...). Dans tous ces processus, des altérations peuvent, par conséquent, modifier les différents phénomènes biologiques. C'est en fonction du cumul de ces phénomènes que le cancer se limitant, tout d'abord, à quelques cellules tumorales (carcinomes *in situ*), peut s'étendre aux tissus adjacents (invasion locale) puis gagner éventuellement tout l'organisme (invasion à distance, formation de métastases).

I- 3- c- La croissance des cellules tumorales.

Dans la première partie, nous avons essentiellement accordé de l'importance aux hormones dans leur rôle de régulateur de la croissance des cellules normales et abordé succinctement celui des facteurs de croissance. Ainsi, pour cette cellule normale, ces 2 molécules lui sont indispensables pour vivre et sont soumises à une régulation fine pour l'équilibre de l'homéostasie tissulaire. Pour la cellule cancéreuse, ce n'est pas le même scénario. Ils sont tout aussi nécessaires, mais leur exigence, leur expression et la sensibilité à ces facteurs, diffèrent dans le temps et dans l'espace, pour une tumeur donnée. Dans cette partie, nous développerons uniquement les facteurs de croissance. A côté de ces facteurs, le microenvironnement, aux alentours de la tumeur, joue également un rôle non négligeable au cours de la progression tumorale et terminera ce paragraphe.

Depuis longtemps les oestrogènes ont été considérés comme les principales hormones impliquées dans la tumorigenèse de la glande mammaire (Gardner *et al.*, 1959), néanmoins, on sait aujourd'hui que de nombreux facteurs de croissance (tels l'EGF, les IGFs, les FGFs) sont aussi impliqués dans ce processus (figure 14) (Ethier, 1995). Parmi ces facteurs de croissance, on distingue ceux qui régulent positivement la croissance des cellules épithéliales (Dickson *et al.*, 1992) de ceux qui ont un effet inhibiteur sur la prolifération (revue Rouayrenc, 1997 ; Le Bourhis *et al.*, 2000).

➤ Les facteurs de croissance inhibiteurs :

Les Transforming Growth Factor β (TGF β 1, β 2 et β 3) sont des facteurs de croissance impliqués dans la prolifération et la différenciation cellulaires. Les lignées cellulaires MCF-7, T47D et MDA-MB-231 sécrètent le TGF β , et dans les cellules hormono-sensibles, cette sécrétion est inhibée par les oestrogènes et activée par les anti-oestrogènes (Mirza, 1991 ; Benson *et al.*, 1996). Cependant, la plupart des lignées cellulaires dérivées de tumeurs mammaires humaines invasives sont plus ou moins sensibles, voire même résistantes à l'effet inhibiteur du TGF β alors que celui-ci est capable de stimuler la croissance des fibroblastes (Knabbe *et al.*, 1987 ; Arteaga *et al.*, 1988 ; Zugmaler *et al.*, 1989). De plus, le TGF β semble contrôler la communication paracrine entre cellules tumorales et fibroblastes en stimulant la synthèse de protéases par les fibroblastes (collagénases, uPA, stromélysine) facilitant ainsi la dégradation de la matrice extracellulaire (Basset *et al.*, 1990 ; Wolf *et al.*, 1993). Le TGF β appartient à la même famille que l'EGF et il est sécrété par les lignées de cellules de cancer

du sein, agissant de manière autocrine sur les cellules productrices, ou de manière paracrine sur les cellules voisines.

Les Insulin-like Growth Factors (IGFs) sont des mitogènes potentiels pour les cellules cancéreuses du sein dont la disponibilité est régulée par les Insulin-like Growth Factor Binding Proteins (IGFBPs). *In vitro*, toutes les cellules cancéreuses mammaires sécrètent des

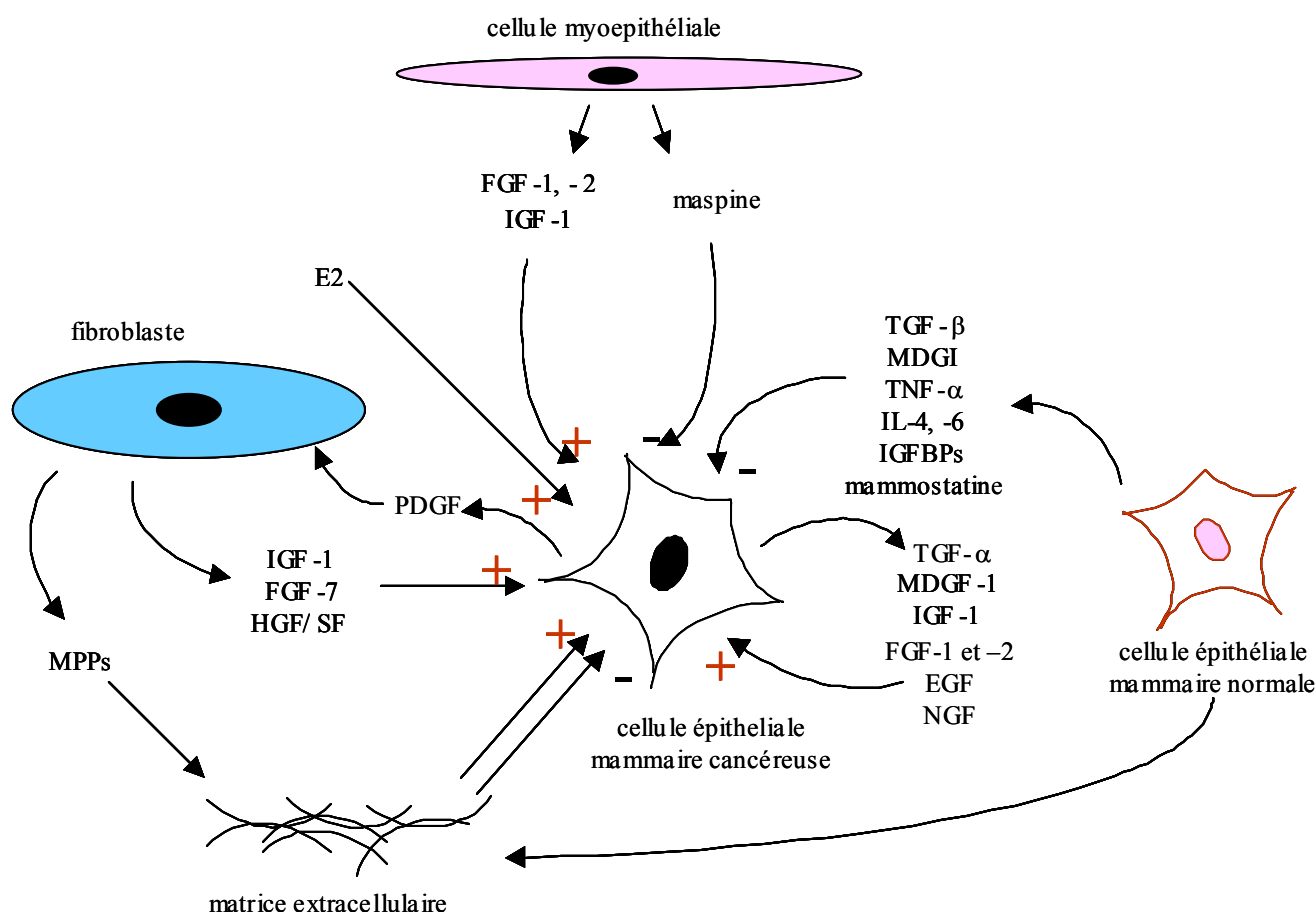


Figure 14: Régulation de la croissance de la cellule mammaire tumorale. Ce schéma résume les diverses interventions des principaux facteurs impliqués dans la prolifération maligne. A savoir : les oestrogènes, les facteurs de croissance et le microenvironnement symbolisé par la cellule mammaire normale, le fibroblaste, la cellule myoépithéliale et la matrice extracellulaire. Cet ensemble cellulaire et moléculaire est le site primitif des cellules transformées, toutefois, il devient nécessaire de le remodeler pour survivre.

IGF-BPs alors que dans les tumeurs sont exprimées préférentiellement les IGFBP-1 et -7 (Figuroa *et al.*, 1992 ; Burger *et al.*, 1998). La fonction de ces protéines dans la régulation de

la prolifération des cellules tumorales mammaires est encore mal comprise, mais ces protéines semblent pouvoir agir d'une manière dépendante et indépendante des IGFs (revue Le Bourhis *et al.*, 2000).

Le Mammary Derived Growth Factor Inhibitor (MDGI) est fortement exprimé lors de la lactation dans les cellules épithéliales au niveau desquelles il serait impliqué dans le processus de différenciation. *In vitro*, il inhibe la croissance des cellules épithéliales humaines normales et tumorales (Lehmann *et al.*, 1989).

Il existe d'autres molécules responsables de l'inhibition de la prolifération des cellules épithéliales telles que les mammostatines qui ne sont sécrétées que par les cellules épithéliales normales et qui agissent sur les cellules cancéreuses mammaires. Une autre molécule connue pour inhiber la prolifération est le TNF α (Tumor Necrosis Factor-alpha) qui est cytotoxique pour les cellules épithéliales malignes alors qu'il affecte peu la viabilité des cellules normales. Certaines interleukines (IL) sont classées dans cette liste d'inhibiteurs de prolifération, comme les IL-1, -4, -6 et -8. Elles sont produites par les cellules normales et tumorales, et, par exemple, l'IL-6 inhibe seulement la croissance des lignées cellulaires de cancer du sein hormono-sensibles (revue Le Bourhis *et al.*, 2000).

➤ Les facteurs de croissance activateurs :

Les Insulin-like Growth Factors comme IGF-I et IGF-II sont de puissants mitogènes pour les lignées cellulaires tumorales mammaires hormono-sensibles ou non qui expriment leur récepteur (Peyrat *et al.*, 1990). L'IGF-I sécrété par les fibroblastes du stroma agit de manière paracrine sur les cellules épithéliales et sa présence dans le plasma augmente chez les patientes atteintes d'une tumeur mammaire primaire par rapport aux sujets sains (Peyrat *et al.*, 1993). L'IGF-II peut être sécrété par les lignées cellulaires tumorales hormono-dépendantes T47D et MCF-7 sous l'influence des oestrogènes (Yee *et al.*, 1989).

Le Platelet-derived Growth Factor (PDGF) est synthétisé par les plaquettes, mais aussi par les fibroblastes. Il présente deux sous unités protéiques : la sous unité A et la sous unité B, et il agit sous forme d'homodimères (AA, BB) et d'hétérodimères (AB). Les cellules tumorales humaines T47D expriment les récepteurs du PDGF (α et β) et sont stimulées par le PDGF-AA et le PDGF-AB. Contrairement aux cellules mammaires normales qui sécrètent préférentiellement le PDGF-AA, les cellules tumorales sécrètent surtout le PDGF-BB (Bronzert *et al.*, 1987).

L'Epidermal Growth Factor (EGF) régule le développement de la glande mammaire de souris *in vivo* et *in vitro* (Vonderhaar, 1987 ; Coleman & Daniel, 1990) et stimule la prolifération des cellules épithéliales mammaires tumorales *in vitro*. L'EGF et le TGF- α agissent par l'intermédiaire du récepteur tyrosine kinase de l'EGF, l'EGF-R, dont l'expression est détectée ou élevée dans 20 à 40% des tumeurs mammaires.

La famille des Fibroblast Growth Factors (FGFs) comprend plus d'une vingtaine de membres qui présentent 40 à 50% d'homologie. Les gènes de FGF les plus souvent exprimés dans les cellules tumorales mammaires sont le FGF-1 et le FGF-2 (Peyrat *et al.*, 1991). Les cellules MCF-7 surexprimant le FGF-4 acquièrent la capacité de former des tumeurs après transplantation dans des souris immunodéprimées sans supplémentation par des oestrogènes, et on note une augmentation de fréquence des micrométastases. La surexpression du FGF-4 induit dans les lignées cellulaires de cancer du sein une résistance aux effets anti-prolifératifs du tamoxifène (Kern *et al.*, 1994). Certaines lignées tumorales mammaires sécrètent du FGF-1 et 2 (El Yazidi & Boilly-Marer, 1995 ; El yazidi *et al.*, 1998). Le FGF-2 stimule la prolifération des cellules épithéliales mammaires tumorales MCF-7 et T47D (Dickson *et al.*, 1992).

L'Hepatocyte Growth Factor/ Scatter Factor (HGF/ SF) est un facteur de croissance formé de deux chaînes polypeptidiques glycosylées de 62 kDa et 30- 32 kDa, il se lie à un récepteur de type tyrosine kinase composé de deux sous unités formant un hétérodimère. L'HGF/ SF est angiogène, motogène, mitogène et anti-apoptotique. Ainsi, il a été reporté que les cellules cancéreuses de poumon sécrètent du FGF-2 et du PDGF qui entraînent une augmentation de la synthèse d'HGF/ SF par les fibroblastes. L'HGF/ SF sécrété par les fibroblastes stimule alors la prolifération et l'invasion des cellules cancéreuses ainsi que l'angiogenèse en agissant sur les cellules endothéliales (Nakamura *et al.*, 1997). Dans les cancers du sein, la quantité d'HGF/ SF est plus importante dans la tumeur que dans le tissu adjacent et le taux d'HGF/ SF circulant est augmenté chez 60% des patientes présentant des métastases (Yamashita *et al.*, 1994). L'augmentation de l'HGF/ SF est par ailleurs corrélée à un mauvais pronostic (Toi *et al.*, 1998).

Récemment le Nerve Growth Factor (NGF) a été découvert dans notre laboratoire comme un facteur de croissance agissant sur la glande mammaire ; il y a 2 activités biologiques distinctes : un effet mitogène (Descamps *et al.*, 1998) et un effet anti-apoptotique (Descamps *et al.*, 2001a). De plus amples détails sont définis dans le chapitre 3.

➤ Importance du microenvironnement :

Outre les hormones et les facteurs de croissance, le microenvironnement joue un rôle fondamental dans la croissance des cellules malignes (figure 14). En effet, il a été démontré que les interactions entre cellules tumorales et cellules normales influencent la croissance, l'invasion et la métastase des cellules tumorales (Hanahan & Weiberg, 2000 ; Matrisian *et al.*, 2001 ; Imagawa *et al.*, 2002 ; Toillon *et al.*, 2000, 2002). Un exemple est illustré par la leptine. Cette protéine est produite par les adipocytes, et stimule l'invasion des cellules cancéreuses coliques *via* la signalisation de la phosphoinositide 3-kinase (PI3-K) (Attoub *et al.*, 2000). De même, les cellules myoépithéliales peuvent elles aussi agir sur les cellules tumorales, plus exactement, ces cellules agissent sur le pouvoir invasif des cellules cancéreuses et sur l'angiogenèse autour de la tumeur. En effet, il est montré que ces cellules myoépithéliales produisent et secrètent la maspine, qui inhibe à son tour l'invasion tumorale (Sternlicht *et al.*, 1997). Elles sont également capables de relarguer dans le milieu les parties solubles et tronquées des récepteurs CD44 qui inhibent l'angiogenèse (Sternlicht *et al.*, 1997 ; Xiao *et al.*, 1999 ; Alpaugh *et al.*, 2000 ; Nguyen *et al.*, 2000). Les molécules les plus connues sont l'activine (Liu *et al.*, 1996), la relaxine (Bani *et al.*, 1994), et la maspine (Zou *et al.*, 1994). Dans les cancers du sein, les cellules tumorales induisent une activation des fibroblastes en myofibroblastes, à l'aide du TGF β , qu'elles libèrent dans le microenvironnement. En effet, durant la progression tumorale, le pourcentage et la localisation des myofibroblastes changent avec une tumeur donnée. Dans les tumeurs mammaires invasives, ces cellules sont trouvées en plus grandes proportions que dans les tumeurs mammaires *in situ*. En retour, les myofibroblastes sécrètent de nombreux facteurs tels que des protéines de la matrice extracellulaire, des protéases et des facteurs de croissance qui favorisent le développement cancéreux (Tlsty & Hein, 2001 ; Elenbaas & Weinberg, 2001 ; De Wever & Mareel, 2002). Par ailleurs, de nombreux signaux inhibiteurs sont produits par les cellules normales pouvant maintenir l'homéostasie tissulaire et inhiber le développement tumoral (Toillon *et al.*, 2000, 2002).

I- 3- d- Interactions cellule-cellule et cellule-matrice au cours de la progression tumorale.

Nous venons de le décrire, le développement tumoral est causé par une accumulation d'altérations génétiques conduisant à l'hétérogénéité des cellules cancéreuses dans une même tumeur. De plus, à ces modifications géniques viennent s'ajouter les modifications épigénétiques. Outre l'implication des facteurs de croissance et des hormones, la constitution d'un cancer requiert non seulement qu'une cellule devienne cancéreuse, mais encore qu'elle bénéficie d'un environnement favorable à son développement et à sa progression vers un phénotype métastatique, qui résulterait d'une communication aberrante entre les cellules tumorales et leur microenvironnement (Ronnov-Jenssen *et al.*, 1996 ; Park *et al.*, 2000 ; Liotta & Khon, 2001). Cette progression tumorale ne dépend pas uniquement des cellules cancéreuses elles-mêmes, ou encore des cellules environnantes avec leurs facteurs sécrétés, mais elle est également sous l'influence de la matrice extracellulaire (MEC) et des mécanismes d'adhérence entre les cellules (revue Bissell & Radisky, 2001 ; Chrenek *et al.*, 2001). La cellule tumorale doit donc jouer sur ces deux tableaux pour acquérir un phénotype « mobile » afin d'envahir le tissu sous jacent. Pour schématiser, les molécules d'adhérence intercellulaire sont regroupées en 4 familles : les cadhérines, les I-CAMs, les intégrines et les sélectines (Humphries & Newham, 1998). Toutes ont des rôles bien définis, mais ne seront pas détaillés dans ce travail. L'accent sera mis sur la seule expression des cadhérines et des intégrines dans le cadre de la cellule tumorale au cours de la progression tumorale (revue Pignatelli, 1998). Quant à la MEC, elle comprend différents types de collagènes associés entre eux et interagissant avec des glycoprotéines (fibronectine, laminine...) et des protéoglycannes (syndécan, perlécan...) (Judware & Culp, 1997 ; Praillet *et al.*, 1998 ; Serenella *et al.*, 2002). Cet ensemble, MEC et molécules d'adhérence (cadhérines et intégrines), joue un rôle critique dans la maintenance de l'intégrité du tissu et de son organisation normale. Il est à noter que la dégradation de cette MEC, par des enzymes spécialisées, est considérée comme une étape nécessaire pour l'invasion et les métastases des cellules malignes. En effet, une corrélation existe entre la quantité d'enzymes protéolytiques exprimée par les tumeurs et leur comportement invasif. Ainsi, une expression élevée de ces enzymes reflète l'agressivité d'invasion de la tumeur vis à vis des tissus sous jaccents. Outre son rôle dans le maintien de l'intégrité de l'organisation des tissus, il a été montré que la matrice extracellulaire joue le rôle de substrat et de signal pour l'invasion des cellules cancéreuses (Van Hoorde *et al.*,

2000). Par exemple, le collagène de type I et III, constituants majeurs de la matrice, permettent les métastases des cellules tumorales prostatiques par une baisse de l'expression de la cadhérine E *via* la voie de signalisation src (Menke *et al.*, 2001). Ainsi, en modulant l'expression de certaines molécules d'adhérence, la cellule tumorale, à l'aide de cascades de signalisation spécifiques à ces protéines, développera la possibilité de migrer vers des sites secondaires. Par ailleurs, les fibroblastes produisent de nombreux composants de la MEC tels que la laminine, du collagène de type IV et des protéoglycannes héparanes sulfatés. Or, les composés de cette matrice sont connus pour activer, *via* leur fixation à des récepteurs membranaires, des signaux de survie et de prolifération dans les cellules cancéreuses (revue Judware & Culp, 1997 ; Pupa *et al.*, 2002). Par conséquent, en fonction de la qualité de la matrice, le comportement de la cellule cancéreuse sera différent. Il devient donc intéressant pour la cellule tumorale de pouvoir agir sur cette MEC, afin de favoriser l'envahissement des tissus sous jacents ou sa prolifération. En plus des rôles précédemment cités, la matrice extracellulaire contrôle également la biodisponibilité des facteurs de croissance, tels que les FGFs (Taipale & Keski-Oja, 1997). C'est ce que l'on nomme : la crinopexie (Feige & Baird, 1992). En effet, les fibroblastes sont capables de produire de nombreuses protéases (revues Duffy *et al.*, 2000 ; DeClerck *et al.*, 2000), dont les stromélysines-1 et -3, les gélatinases, les métalloprotéinases matricielles (MMP)-2 et -9 (Heppner *et al.*, 1996). Ces protéases induisent alors la libération par la matrice, et la maturation, de nombreux facteurs de croissance, tels le PDGF et l'EGF favorisant ainsi le développement tumoral.

Certes, modifier à son grès la matrice est un atout pour la cellule tumorale, mais cela n'est pas suffisant pour développer des métastases à longue distance. Pour que quelques cellules malignes se détachent de la tumeur primitive afin de migrer loin, celles-ci se doivent de changer leur phénotype (figure 15). Entre autre, elles doivent effectuer un changement dans leurs molécules d'adhérence afin de migrer et d'acquérir une morphologie plus adaptée à l'invasion du tissu sous-jacent. Elles doivent également, en parallèle, changer leur jonctions de communication afin de limiter les passages de solutés indispensables à leur survie pour leur seul fin. Et enfin, elles doivent savoir contrer et échapper au système immunitaire environnant. Durant la cancérogenèse, ces mécanismes sont primordiaux pour permettre à la tumeur d'avoir de meilleures chances de survie. Un des phénomènes caractéristiques des cellules tumorales est la perte de leur polarité (ou perte de l'inhibition de contact) permettant

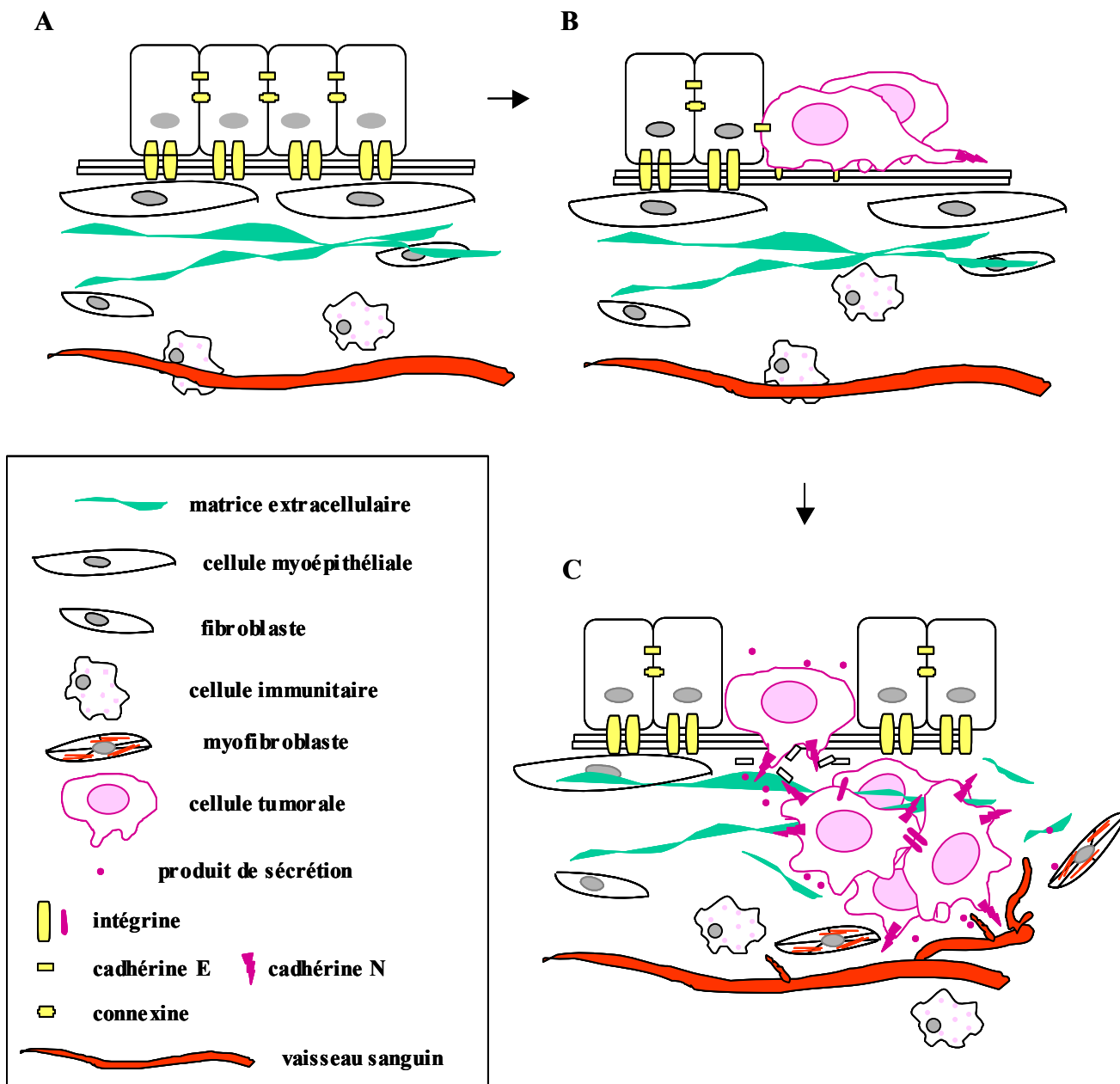


Figure 15 : Les adhésions cellule-cellule et les interactions cellule-matrice dans la progression tumorale. **A.** L'homéostasie tissulaire au niveau de l'épithélium mammaire normal. **B.** Au cours de la progression tumorale, les cellules doivent modifier leurs molécules d'adhérence afin de quitter le site primaire et d'acquérir un phénotype mobile pour se mouvoir vers des sites secondaires. **C.** La synthèse et la libération des métalloprotéases vont participer également aux remaniements du microenvironnement des cellules tumorales. Les dégradations de la matrice et de la lame basale laissent place aux infiltrations tumorales. Ainsi, par voie sanguine ou lymphatique, les cellules malignes gagnent des sites secondaires très richement vascularisés.

l'entassement des cellules de façon anarchique. La cadhérine E est une molécule d'adhérence cellulaire transmembranaire qui participe aux jonctions cellule-cellule, et donc à la cohésion de l'épithélium (jonctions adhérentes). La cadhérine E interagit par sa partie intracellulaire avec les caténines α et β , qui elles-mêmes peuvent interagir avec le suppresseur de tumeur APC (adenomatous polyposis coli). Dans les tumeurs, une perte de cadhérine E et d'APC, ainsi qu'une activation de la caténine β , sont couramment observées, impliquant ces molécules dans les phénomènes de cancérogenèse (Berx *et al.*, 1995 ; Perl *et al.*, 1998 ; Christofori & Semb, 1999 ; revue Van Aken *et al.*, 2001 ; Hajra & Fearon, 2002). De plus, la restauration de l'expression de la cadhérine E conduit à la suppression de la transformation cellulaire. Ainsi, la perte de l'expression de cette protéine est une des composantes de la transition phénotypique des cellules cancéreuses. Par ailleurs, la perte de la cadhérine E peut être accompagnée par une augmentation d'expression d'isoformes de la protéine cadhérine permettant ainsi d'accélérer la transition au phénotype « fibroblastique mobile » (Hazan *et al.*, 2000). Cependant, l'ensemble des réponses cellulaires sont tissus spécifiques, est par conséquent aucune généralisation ne peut être faite comme le montre le fait que le gain de la fonction de la cadhérine E est un événement précoce dans le cancer de l'ovaire (Auersperg *et al.*, 1999).

D'autres contacts intercellulaires sont altérés au cours de la progression tumorale, comme les jonctions GAP qui sont composées de protéines de la famille des connexines et qui permettent le passage de petites molécules solubles d'une cellule à l'autre. Ces jonctions GAP sont sujettes à une régulation fine et dynamique, et sont essentielles pour la régulation de processus cellulaires normaux (tel le cycle cellulaire, la différenciation, la signalisation cellulaire). Certaines connexines sont considérées comme des suppresseurs de tumeurs, dont l'absence dans les cancers entraîne une perte de cohésion intercellulaire. En effet, des études antérieures indiquent que l'expression des connexines est inversement corrélée au potentiel métastatique de la tumeur (revue Carystinos *et al.*, 2001 ; Locke, 1999). Ceci semble dû à la perte de la coopération entre les cellules voisines, conduisant à l'hétérogénéité cellulaire et la dissociation cellulaire observées dans les tumeurs. En outre, on constate que la restauration, dans les carcinomes mammaires, de l'expression de la connexine 26 et 43 supprime le phénotype tumoral (Hirshi *et al.*, 1996). De plus, il est décrit que les cellules tumorales mammaires surexpriment la connexine 32 alors que l'on observe une perte de cette connexine dans les carcinomes hépatiques (Saunders *et al.*, 2001). Ce qui peut être généralisé est que le pattern d'expression des connexines est tissu dépend et qu'il change durant la progression tumorale. Bien entendu, la perte de communication entre les cellules, durant la cancérogenèse

au niveau de ces molécules de communication, n'est pas uniquement le résultat d'altérations géniques de ces gènes. D'autres mécanismes peuvent être activés dans la cellule tumorale pour moduler l'expression des connexines et la formation des jonctions GAP. Les oncogènes ras et c-erbB2 sont respectivement mutés ou surexprimés dans les cancers du sein, or il a été montré que ces oncogènes modulent négativement l'ARNm (kératinocytes de rat) et la protéine (hépatocytes de rat) de la connexine 46 (Brissette *et al.*, 1991 ; Jou *et al.*, 1995). Il est décrit également, au même titre que les précédents oncogènes, que la perte de molécules permettant l'adhérence cellulaire (comme la cadhérine E) est un mécanisme qui va de paire avec une diminution de l'expression des connexines (Jansen *et al.*, 1996) au cours du développement et de la progression du phénotype malin. Aujourd'hui, il semblerait que les jonctions GAP constituent des cibles thérapeutiques pour lutter contre le cancer du sein (Trosko & Ruch, 2002) enrichissant encore l'arsenal thérapeutique.

La surveillance de l'immunité est une réelle menace pour la tumeur puisque c'est le mécanisme par lequel le système immunitaire cible et détruit les tumeurs en développement. Bien que les cellules T semblent être les principaux effecteurs de la surveillance de l'immunité, le système immunitaire dit inné (qui inclue les cellules « natural killer », les macrophages, les monocytes) est aussi impliqué. A l'heure actuelle, on sait que l'IFN γ (Interféron gamma) est la cytokine nécessaire à la migration des cellules T aux sites tumoraux (Kaplan *et al.*, 1998), pour effectuer la destruction de ce tissu malin. Les cellules tumorales doivent donc développer une stratégie pour faire face à cette menace. On sait aujourd'hui qu'elles échappent à cette immunosuppression en diminuant leur immunogénicité intrinsèque (Beatty & Paterson, 2000 ; Gati *et al.*, 2001) leur permettant de dresser leur premier rempart contre l'action offensive du système immunitaire. Par ailleurs, la formation de l'arborescence vasculaire, induite par les interactions cellule-cellule et cellule-microenvironnement, contribue aussi à cette immunosuppression en empêchant l'extravasation des cellules T antitumorales, tout en continuant à favoriser le passage des cellules du système inné (Ganss & Hanahan, 1998). Ainsi, les cellules cancéreuses, par ce « système de filtre sélectif », empêchent le système immunitaire de sortir de la circulation et d'accomplir son rôle. En effet, les expériences actuelles tendent à montrer que ces cellules du système inné favorisent la tumorigenèse par la production de MMPs, qui est associée à la production des mêmes enzymes par les cellules du stroma et à l'activation des MMPs latentes, lesquelles sont présentes dans la MEC (Lin *et al.*, 2001). En parallèle, le Migration Inhibitor Factor (MIF), autre modulateur du système immunitaire, est associé avec la progression tumorale. D'ailleurs, cette cytokine est surexprimée par les cellules malignes contribuant ainsi à la

néoangiogenèse, à la prolifération cellulaire et aussi à la suppression de la surveillance immunitaire (Mitchell & Bucala, 2000). De plus, MIF aussi pourrait contribuer à l'instabilité du génome dans les tumeurs, puisqu'il supprime la fonction de p53 participant à cette occasion à l'accumulation de mutations additionnelles (Shao *et al.*, 2000). L'ensemble de ces événements augmentent donc l'activité protéolytique aux alentours de la tumeur participant alors à la progression tumorale, en dégradant encore plus la matrice extracellulaire, en activant les fibroblastes en myofibroblastes et en augmentant l'angiogenèse.

I- 3- e- Modulations des grands systèmes de communication au cours de la progression tumorale.

Les cellules sont continuellement exposées à divers stimuli, s'étendant des facteurs solubles endocrines et paracrines aux facteurs autocrines. La nature de ces facteurs peut se résumer aux facteurs de croissance et aux hormones. Par ailleurs, il est connu que les récepteurs de la famille tyrosine kinase, entre autres, jouent un rôle prépondérant dans l'intégration et l'interprétation de ces stimuli externes, autorisant une cellule à répondre de façon appropriée à son environnement. L'activation de ces récepteurs est finement contrôlée, ce qui permet à une cellule normale d'intégrer correctement son environnement externe avec ses voies de signalisations internes. Au contraire, du fait de nombreuses altérations moléculaires qui se produisent au cours de la progression tumorale, une tumeur est caractérisée par une réponse anormale face à son environnement, ce qui permet aux cellules tumorales d'échapper aux mécanismes qui contrôlent et régissent la prolifération cellulaire. Nous l'avons vu avec les altérations précédemment citées, quelque soit le niveau, elles ont des rôles considérables dans le devenir de l'intégrité du « statut normal » d'une cellule. A ce même titre, une altération de l'ordre dans l'environnement, entraîne la cellule à répondre de façon inappropriée à son environnement remodelé. Ainsi, face à des stimuli externes anormalement exprimés ou modifiés, la cellule, surexposée à ces facteurs paracrines ou autocrines, intègre de multiples signaux, conduisant par exemple à une prolifération accrue. La progression des cellules cancéreuses vers les phénotypes hautement malins, qui envahissent et métastasent vers des sites distants ou proches, nécessite que ces cellules métastatiques répondent aux signaux mitogènes dans leurs nouveaux environnements. Cependant, la croissance des métastases est due à leurs capacités, à la fois de répondre aux

facteurs de croissance locaux et aux inhibiteurs, et aussi de produire et de répondre à ces facteurs de croissance autocrines (Nicolson, 1993). Il est montré que le gain de certaines fonctions de communication cellulaire est modulé au cours de la transformation maligne (table 2). Portier *et al.* (2002) ont montré des changements dans les taux et les fréquences des hormones endocrines au cours de certains cancers, comme celui du sein (œstrogène, prolactine), de la prostate (œstrogène, testostérone)

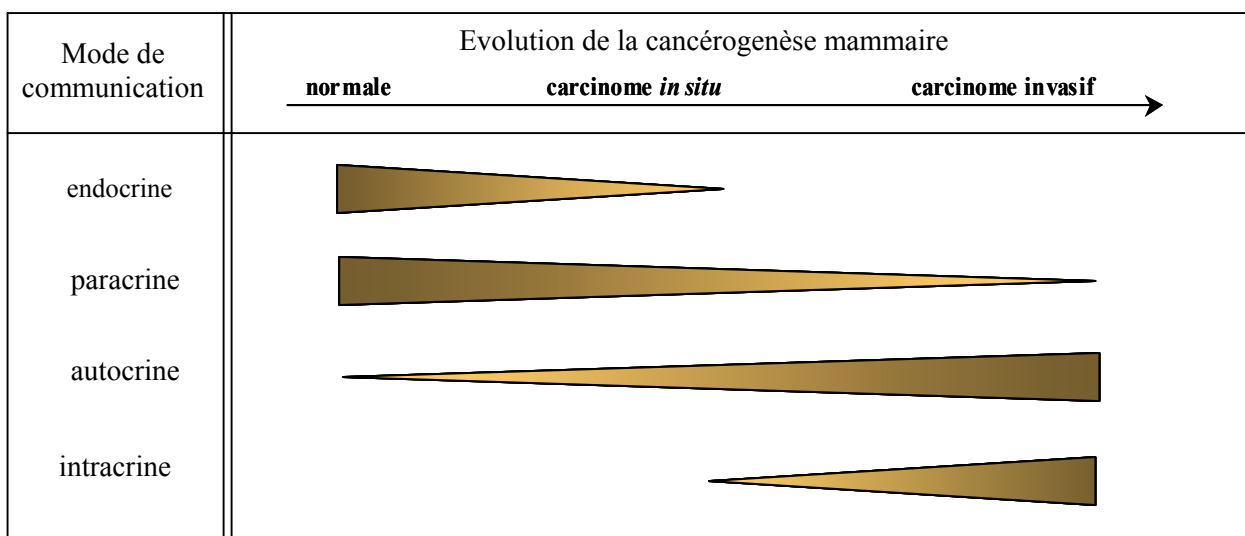


Table 2: Représentation schématique de la modulation des systèmes de communication cellulaire au cours de la transformation maligne. Ce schéma illustre la perte (▶) ou le gain (◀) des 4 principaux moyens de communication cellulaire qui entraîne une cellule normale vers l'acquisition d'un phénotype cancéreux.

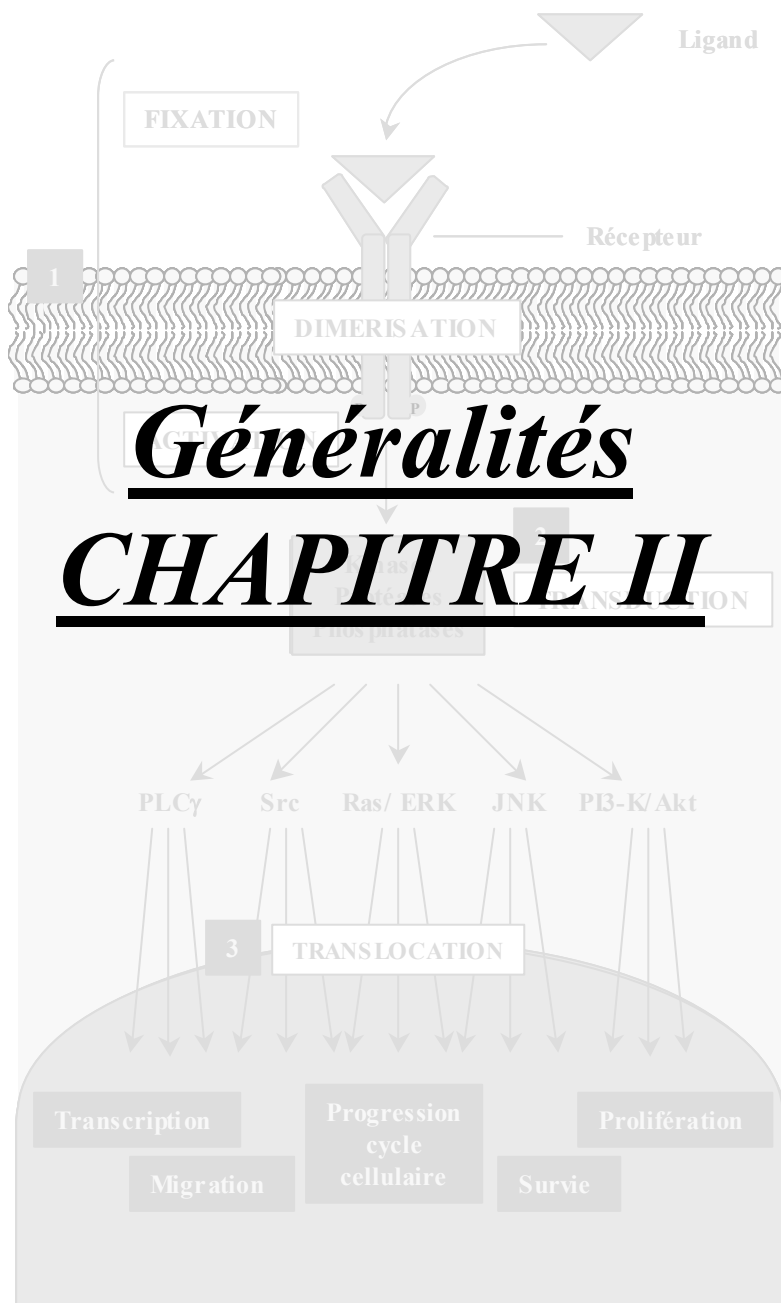
et de la thyroïde (T3, T4). Ces dérégulations de la fonction endocrine ont été alors définies comme des contributeurs majeurs de ces cancers. Les modulations de la fonction autocrine et paracrine sont les plus communément décrites lors des transformations malignes et concernent des hormones, comme l'hormone de croissance (GH) (Kaulsay *et al.*, 2000) et la prolactine (PRL) (Clevenger *et al.*, 1995), et surtout des facteurs de croissance, comme les FGFs (Gomm *et al.*, 1991, 1997; Souttou *et al.*, 1994; El Yazidi & Boilly-Marer, 1995), l'IGF-I (Freed & Herington., 1989), l'IGF-II (Osborne *et al.*, 1989), le TGF α (Clarke *et al.*, 1989) et l'HGF/ SF (Nakamura *et al.*, 1997).

Il a été montré aux stades précoces de la dissémination tumorale, qu'une tendance s'installe pour certains cancers à métastaser et à croître préférentiellement en des sites particuliers, suggérant que les mécanismes de croissance paracrine dominent les signaux de croissance libérés par les cellules métastatiques (Nicolson, 1993). Au contraire, aux stades tardifs de la progression tumorale, lorsque la dissémination s'est produite, les mécanismes de croissance autocrine dominent les signaux de croissance positifs effectués par les cellules métastatiques, tout en développant une stratégie pour ne plus répondre aux facteurs inhibiteurs de croissance (Nicolson, 1993). Au stade ultime, la progression de ces cellules cancéreuses, avec un stade de croissance complètement autonome, peut se produire et la prolifération de ces cellules pourrait alors être indépendante de facteurs de croissance activateurs ou inhibiteurs.

De plus, les signaux systémiques ou locaux, perçus par la cellule, sont connus pour être des effecteurs dans les systèmes de régulation en boucle (feedbacks ou rétrocontrôles). En effet, récemment, des études ont montré l'implication de tels mécanismes dans le cancer mammaire humain. Par exemple, le dysfonctionnement du feedback négatif par la transformation maligne peut résulter, dans la perte du contrôle de la croissance ou dans la progression du comportement agressif des cellules tumorales. Au contraire, une dérégulation du feedback positif peut développer la croissance tumorale et l'invasion par une libération excessive de facteurs stimulateurs (Singer *et al.*, 2000). Par exemple, la PRL, connue comme agent différenciateur de la glande mammaire, sécrétée par les cellules de l'hypophyse, peut voir son expression inhibée par la sécrétion de PIF (Prolactin inhibitory factor) *via* les cellules tumorales. La conséquence de cette chute d'expression de PRL est la diminution de la pression de différenciation facilitant ainsi la dédifférenciation des cellules tumorales (Singer *et al.*, 2000).

En conclusion, pour transformer le phénotype « statique » d'une cellule mammaire en un phénotype « mobile », capable d'acquiescer à l'extrême un comportement hautement agressif, le schéma est simple. Nous avons tenté de montrer que ce développement résulte d'une succession d'altérations génétiques qui permettent à la cellule tumorale de croître de façon indéfinie puis de s'affranchir progressivement de son environnement (Hanahan & Weinberg, 2000). Néanmoins d'autres facteurs sont tout autant impliqués dans cette pathologie mais le degré de leur intervention comme de leur coopération potentielle n'est pas connu à l'heure actuelle. Aujourd'hui, on distingue différents stades dans le développement tumoral qui reflètent l'agressivité des cellules cancéreuses en fonction des mutations

d'oncogènes et d'anti-oncogènes acquises par les cellules. Mais définir une succession précise d'altérations dans le temps et dans l'espace pour une tumeur donnée n'est encore qu'un schéma hypothétique. Outre les hormones et les facteurs de croissance, nous avons montré aussi que le développement tumoral est influencé par les interactions entre les cellules cancéreuses et leur environnement (Ethier, 1995, 1996 ; Weaver *et al.*, 1996). De plus, en fonction des stades du développement cancéreux, les cellules tumorales sont soumises à l'action paracrine de facteurs produits par les cellules voisines. Finalement, le destin des tumeurs mammaires est par conséquent non seulement déterminé par le potentiel malin de l'épithélium ainsi transformé, mais dépend aussi d'un trafic complexe des mécanismes d'auto-, de para-, et d'endocrinie, où les facteurs de croissance, comme leurs récepteurs, jouent un rôle prépondérant. Par conséquent, l'identification et la découverte de facteurs de croissance entrant dans le cadre de l'autocrinie est un des axes de la recherche actuelle, afin d'étoffer la compréhension des mécanismes impliqués dans la progression tumorale mais également d'augmenter le nombre de cibles thérapeutiques potentielles.



VOIES THERAPEUTIQUES BASEES SUR L'INHIBITION DE LA SIGNALISATION DES CELLULES DE CANCER DU SEIN.

Bien que les traitements actuellement utilisés soient relativement efficaces, le cancer du sein demeure, du fait de sa fréquence, et est reconnue comme la pathologie tumorale causant le plus grand nombre de décès chez les femmes. Dans ce contexte, la recherche s'applique à définir de nouveaux marqueurs tumoraux permettant un diagnostic plus précoce et un suivi de traitement plus efficace. De même, de nombreuses études visent à une meilleure compréhension du fonctionnement des cellules cancéreuses et des mécanismes du développement tumorale, afin de définir des cibles plus précises pour de nouveaux traitements. Par conséquent, le développement et l'application de nouvelles tactiques thérapeutiques ont une part très importante dans la recherche contre le cancer au cours de ce XXI^{ème} siècle. Dans ce chapitre, nous nous focaliserons sur ces nouvelles approches qui ciblent les mécanismes moléculaires de la conversion maligne et de la progression tumorale, à savoir la modulation de l'activité des facteurs de croissance, de l'angiogenèse, de l'apoptose, de l'invasion ainsi que des métastases. L'accent sera mis surtout sur les voies de signalisation des facteurs de croissance.

II- 1- INTRODUCTION.

Auparavant, l'identification d'agents thérapeutiques avec des bénéfices cliniques certains ressemblait plutôt à une approche empirique, et était basée sur les expériences de cytotoxicité en culture cellulaire et sur les modèles de tumeurs animales, avant d'être évaluée en clinique. Cependant ces approches non sélectives, qui n'étaient pas nécessairement le reflet des syndromes du cancer, étaient fréquemment accompagnées d'effets toxiques. Au cours des vingt dernières années, de nouvelles stratégies de lutte contre le cancer se sont développées. Elles reposent sur deux aspects fondamentaux : d'une part les perfectionnements quotidiens de l'immunothérapie, qui vise à détruire les tumeurs en manipulant le système immunitaire, et d'autre part par l'utilisation des biothérapies, définies comme les traitements qui emploient une classe de médicaments directement ciblés sur l'inhibition d'une voie biochimique donnée.

En règle générale, et c'est ce que nous nous efforcerons de montrer dans les parties suivantes, ces médicaments sont dirigés soit vers un récepteur de facteur de croissance ou son ligand, soit vers les mécanismes d'action mis en jeu par la stimulation du récepteur (à savoir les molécules faisant partie de la signalisation intracellulaire). L'originalité des biothérapies provient en partie de la chronologie de leur mise au point. Tout d'abord, on cherche à identifier un mécanisme cellulaire qui pourrait être par exemple une voie de prolifération des

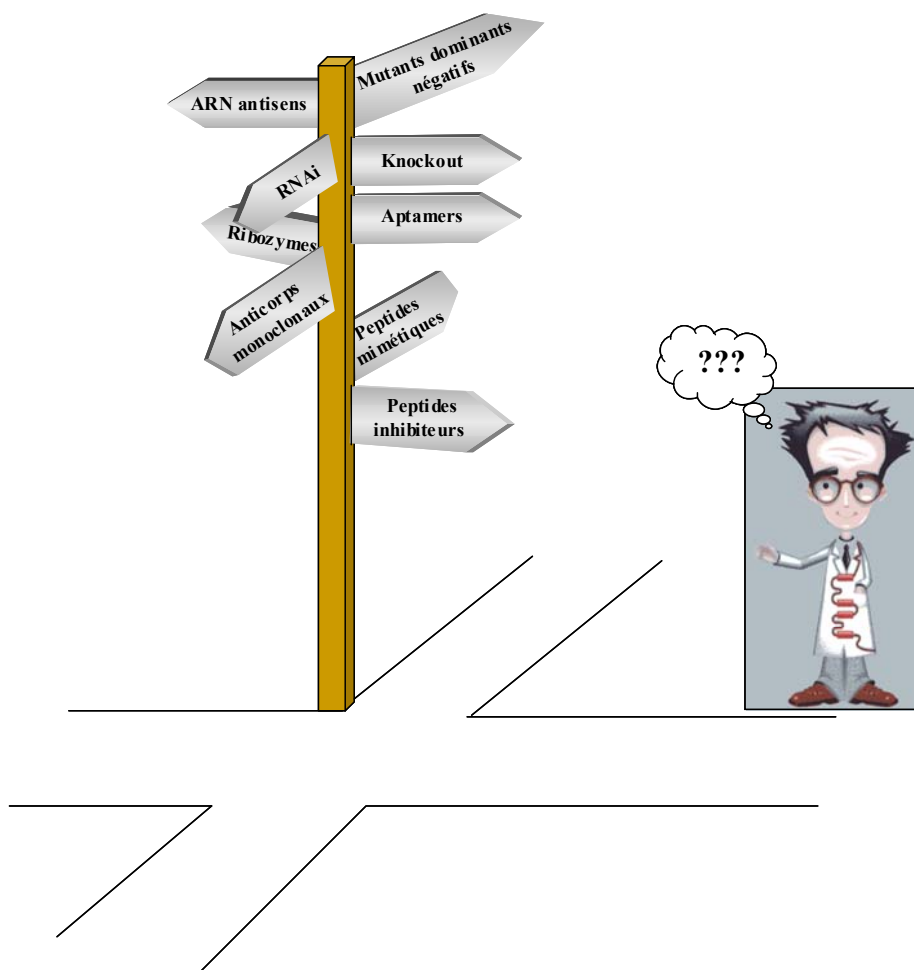


Figure 16: Les différentes approches stratégiques dans la validation des cibles thérapeutiques.

cellules cancéreuses. Puis, on détermine dans ces mécanismes des molécules qui pourraient constituer des cibles thérapeutiques. Et enfin, on caractérise des médicaments qui pourraient interagir avec ces cibles thérapeutiques. Comme le montre la figure 16, les diverses approches stratégiques utilisées contre la cellule tumorale sont très variées, et portent soit sur des

modifications géniques induites (RNAi, ARN antisens, ribozymes) ou soient sur la qualité et/ou la quantité des protéines ou/et leur interaction à d'autres protéines (anticorps monoclonaux, peptides inhibiteurs). Les enjeux de ces nouvelles stratégies, comme nous le verrons, et en particulier dans la thérapie anticancéreuse, sont de concevoir des molécules capables d'inhiber sélectivement les voies de signalisation d'une cellule cancéreuse et d'induire un bénéfice thérapeutique pour les patients (pour revues : Hynes, 2000 ; Bange *et al.*, 2001 ; Zwick *et al.*, 2001). Dans cette approche, il devient alors nécessaire de comprendre comment on peut interrompre le signal pour abolir un effet biologique de la cellule cancéreuse.

II- 2- OBJECTIF : INTERROMPRE LE SIGNAL.

La prolifération ou la survie des cellules dépendent de signaux détectés, en règle générale, par des récepteurs de surface, puis transduits à l'intérieur des cellules et communiqués dans un second temps au noyau, où des gènes impliqués dans le contrôle de la prolifération ou de la survie cellulaire vont être alors activés ou inhibés. Cette signalisation s'effectue *via* des cascades de réactions en chaîne faisant intervenir des protéines qui, pour être actives, sont phosphorylées sur certains de leurs résidus tyrosines par des enzymes, nommées les tyrosines kinases. Ces kinases, comme il a été précédemment décrit dans le chapitre 1, sont le plus souvent le siège d'une dérégulation au cours du développement tumoral (revue Kumar & Wang, 2002). Il est à noter que certains récepteurs membranaires sont eux-mêmes doués d'activité kinasique et s'autophosphorylent une fois leur ligand fixé (Pawson, 1995 ; Schlessinger, 2000 ; Simon, 2000). Une fois phosphorylés, d'autres protéines viennent se fixer *via* leur domaine SH2 (Src homology 2) aux tyrosines ainsi phosphorylées et permettent ainsi la transduction du signal. D'autres protéines avec d'autres domaines de reconnaissance, tels que les domaines SH3 ou les domaines d'homologie à la plekstrine, interviennent au cours de ce processus de transduction. Ces interactions protéine-protéine définissent la spécificité dans le processus de transduction intracellulaire. Dans la cellule cancéreuse, ces interactions peuvent être générées de façon inappropriée ce qui peut être dû, entre autre, à des dysfonctionnements du génome, conduisant ainsi à la progression maligne (revues Pawson & Scott, 1997; Pawson & Nash, 2000 ; Robertson *et al.*, 2000).

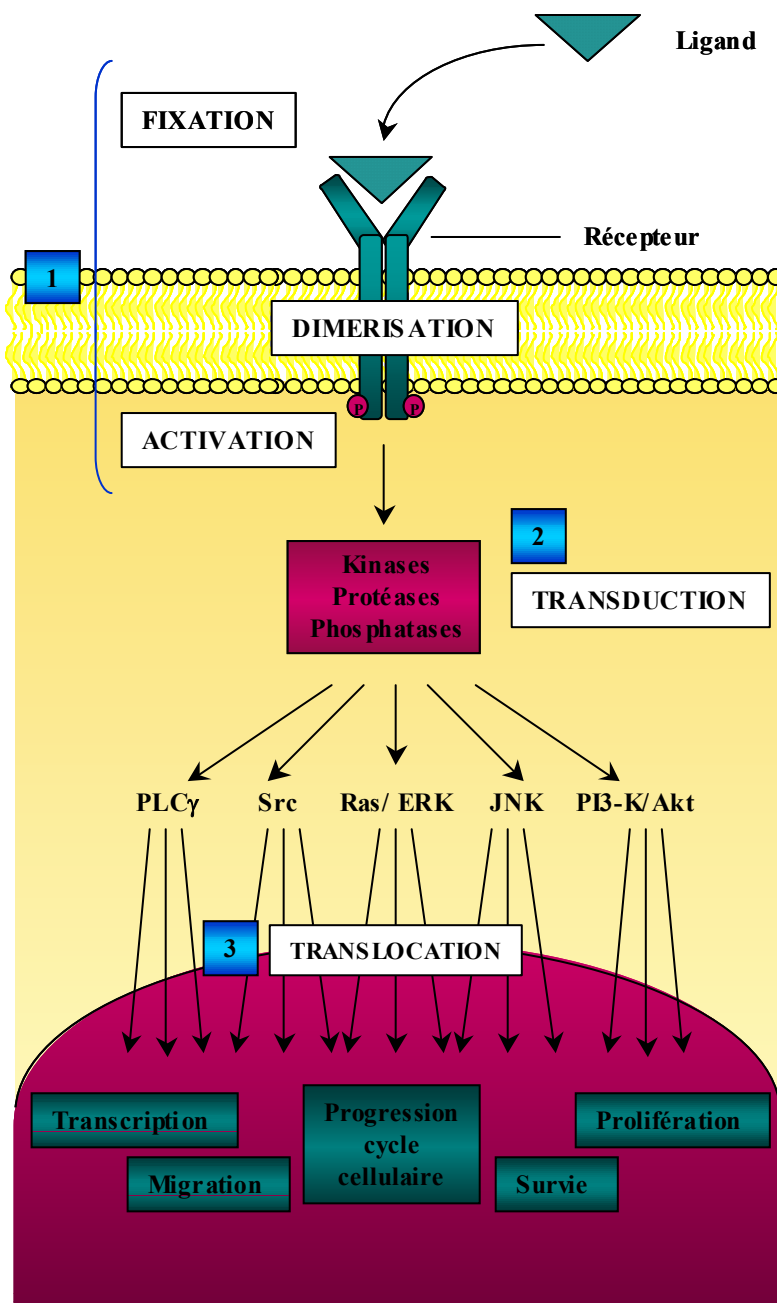


Figure 17 : L'interruption du signal : l'arme de demain ? Cette figure représente de façon générale la voie de signalisation des récepteurs-tyrosine kinase (RTKs) prise comme cible pour les stratégies anti-cancéreuses, qui ont pour objectif de bloquer l'interprétation de l'information externe à laquelle est soumise la cellule. Cette voie symbolise les grands points stratégiques connus et utilisés afin de lutter contre la transformation maligne et la progression tumorale. Les stratagèmes sont représentés avec des cadres bleus. Abréviations : Src : kinase derived from rous sarcoma virus ; ERK : extracellular-regulated kinase ; JNK : c-Jun terminal kinase ; PI3-K : phosphatidylinositol-3 kinase ; PLC γ : phospholipase C γ .

La plupart du temps ces altérations incluent des délétions ou des mutations dans le domaine extracellulaire ou des altérations dans le domaine catalytique (spécialement dans le motif qui porte l'ATP), permettant ainsi une activation constitutive des RTKs. L'inactivation des voies de transduction recrutées s'effectue par l'intermédiaire d'une autre catégories d'enzymes, les phosphatases, qui déphosphorylent les tyrosines (Petrone & Sap, 2000). Aujourd'hui, beaucoup de voies de transduction ont été décryptées, et de nombreuses kinases ou phosphatases ont été isolées et caractérisées, de même que des anomalies à un niveau ou un autre de ces voies de transduction ont été mises en évidence dans les cellules cancéreuses (pour revues : Plowman *et al.*, 1994 ; Dickson *et al.*, 2000 ; Zhang & Yee, 2000). Désormais, par cette recherche fondamentale s'ouvre la voie d'un nouveau type d'intervention thérapeutique (pour revues : Hynes, 2000 ; Kairouz & Daly, 2000 ; Zwick *et al.*, 2001). La figure 17 résume la signalisation des RTKs qui, peut lorsqu'elle est perturbée, conduire la cellule au phénotype malin au cours de la cancérogenèse. Après fixation du ligand à son récepteur, celui-ci se dimérise et s'active par des boucles de phosphorylations. Ces modifications vont permettre à d'autres protéines cytoplasmiques ou juxta-membranaires de prendre le relais, et d'amener le signal, perçu par le récepteur, vers l'intérieur de la cellule. Dans les stratégies actuelles, les molécules thérapeutiques visent à inhiber cette voie de transduction selon 4 moyens possibles. Trois d'entre elles sont notées sur la figure 17 (encadrés bleus avec chiffres noirs). La dernière possibilité étant d'agir sur le statut transcriptionnel (acétylation des histones, méthylation du promoteur) de certains gènes recrutés lors de la transmission du message en augmentant ou en inhibant leur transcription. Empêcher ou prévenir le ligand de se fixer sur son récepteur, éviter la dimérisation du récepteur ou encore l'activation de celui-ci sont les premières offensives qui se dressent pour déjouer les effets biologiques de la cellule maligne. Nous le verrons plus loin, les outils d'aujourd'hui les plus développés concernent cette tactique offensive. Comme l'indique la figure 17, nous pouvons également lutter contre les cellules cancéreuses en bloquant la transduction du signal de la membrane au cytoplasme. Nous allons le voir, les molécules utilisées et dirigées dans cette intention sont nombreuses et concernent essentiellement des petites molécules. Par ailleurs, prévenir la translocation du message représente aussi une stratégie efficace contre la cellule tumorale, mais concerne encore trop peu de molécules impliquées dans les transductions intracellulaires. Aujourd'hui, l'attention des chercheurs est surtout tournée sur les facteurs de transcription puisqu'ils sont l'aboutissement final et commun d'un grand nombre de voies de transduction (Darnell, 2002), inhibant ainsi un plus grand panel d'effets biologiques des cellules cancéreuses. Cependant, les protéines qui se trouvent sur l'enveloppe

nucléaire et qui permettent d'effectuer le trafic, pourraient être, d'ici quelques années, une autre réplique à l'inhibition du phénotype tumoral.

II- 3- LES CIBLES MOLECULAIRES : L'ARSENAL D'AUJOURD'HUI ET DE DEMAIN.

De nos jours, de nombreuses molécules sont connues pour inhiber la transformation et la progression tumorale. Par exemple, la stratégie la plus utilisée pour tuer de façon sélective les cellules cancéreuses repose sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre le domaine extracellulaire des RTKs, lesquels sont impliqués dans le cancer et voire surexprimés à la surface de ces cellules tumorales (Fan & Mendelsohn, 1998). Le cas le plus décrit dans le cancer du sein est l'utilisation de l'Herceptine, anticorps monoclonaux anti-HER-2, qui inhibe la prolifération tumorale. Par ailleurs, de nouvelles drogues sont aussi en cours de validation thérapeutique dans les essais cliniques et seraient à même de renforcer la panoplie d'armes développées contre le cancer. Nous allons développer, dans un premier temps, les agents thérapeutiques qui ciblent la voie de signalisation des facteurs de croissance. Ensuite, les modulateurs de l'apoptose et de l'angiogenèse seront énumérés montrant ainsi la quantité d'armes développées dans cette stratégie de lutte contre le cancer. Enfin, l'invasion et les métastases seront abordées afin de conclure sur les différents agents validés en clinique.

II- 3 -a Agents ciblant les cascades de signalisation des facteurs de croissance.

La famille des récepteurs de croissance de type I comprend : le récepteur de l'EGF (R-EGF ou c-erbB1 ou HER-1), c-erbB2 (ou HER-2), c-erbB3 (HER-3) et c-erbB4 (HER-4), et constitue une des 20 sous-familles de récepteurs dotés d'une activité tyrosine kinase (Fantl *et al.*, 1993 ; Ullrich et Schlessinger, 1990). Les surexpressions des récepteurs de facteurs de croissance R-EGF (environ dans 45% des cas) et c-erbB2 (dans 27% des cas) étant associées à des paramètres de mauvais pronostic dans le cancer du sein, ces récepteurs semblent être des cibles logiques pour le traitement de ces cancers (Prenzel *et al.*, 2000 ; Stern, 2000). La surexpression du gène provoque la transformation de monomères inactifs de HER-2 en dimères actifs. Cette surexpression de c-erbB2 entraîne, *via* l'activation de la voie des MAP kinases et de la voie PI3-K/ Akt, une augmentation de la prolifération et une résistance à l'apoptose. Plusieurs approches expérimentales, basées sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux, d'oligonucléotides antisens ou encore d'inhibiteurs de tyrosine kinase, ont été

développées pour tenter de contrer spécifiquement l'expression de ces gènes. Les anticorps monoclonaux sont des molécules capables de reconnaître une zone particulière naturellement présente à la périphérie des cellules tumorales, ou bien résultant de l'hyperexpression de certains gènes. La technologie pour la fabrication d'anticorps recombinants a fait d'énormes progrès dans la sélection et la production de nouveaux anticorps. En effet, il est possible de générer des anticorps humanisés, chimériques ou bispécifiques (Farah *et al.*, 1998 ; Hudson *et al.*, 1999). L'exemple le plus connu est celui des anticorps monoclonaux anti-HER-2 (ou Herceptine^R ou encore Trastuzumab), qui ont été montrés comme inhibiteur de la croissance de lignées cellulaires et de xénogreffes de cancers du sein surexprimant ce gène *c-erbB2* (figure 3) (Carter *et al.*, 1992 ; Yip et Ward, 2002). La commercialisation de ce médicament a été autorisée aux Etats-Unis en septembre 1998 et dans l'Union européenne en août 2000. A l'heure actuelle, le mécanisme d'action de ces anticorps monoclonaux n'est pas totalement connu, mais on sait que leurs liaisons déclenchent des événements similaires à ceux induits par la liaison d'un ligand spécifique. On observe une diminution du nombre de récepteurs à la surface de cellules, qui se traduit par une internalisation rapide du récepteur et une accumulation des anticorps monoclonaux à l'intérieur de la cellule ; puis une diminution de l'autophosphorylation du récepteur (Park *et al.*, 1991). De plus, il a été montré que ces anticorps monoclonaux sont capables de potentialiser les effets antiprolifératifs de certaines drogues comme le cisplatine, le paclitaxel et le tamoxifène, à la fois sur les lignées cellulaires humaines et sur les xénogreffes (Baselga *et al.*, 1998 ; Pietras *et al.*, 1994 ; Witters *et al.*, 1997). En parallèle, des couplages de ces anticorps monoclonaux avec des toxines ont été réalisés afin de convertir leurs effets cytostatiques en effets cytolytiques (Wels et al., 1995 ; Frankel *et al.*, 2000). Ces immunotoxines sont composées de toxines provenant des plantes ou des bactéries qui vont être fusionnées ou conjuguées chimiquement aux anticorps ou aux facteurs de croissance (Kreitman, 1999). Les toxines couramment utilisées sont l'exotoxine A ou la toxine diphtérique (provenance bactérienne) ou encore la ricine A ou clavine (pour les plantes). Des anticorps bispécifiques sont également à l'étude, et pourraient ainsi se fixer d'un côté, sur les cellules tumorales à l'aide de la reconnaissance d'une molécule de surface exprimée par celles-ci, et d'un autre côté sur une cellule effectrice (cellule de l'immunité) afin de la rapprocher de sa cible et relarguer les éléments nécessaires à son élimination (Segal *et al.*, 1999) de façon locale. Par ailleurs, des enzymes convertissant des pro-drogues non toxiques en drogues cytotoxiques ont été aussi réalisées. Ces dernières manipulations provoquent une régression tumorale (Eccles *et al.*, 1994) et visent à minimiser la toxicité systémique, et à concentrer les drogues dans les tumeurs.

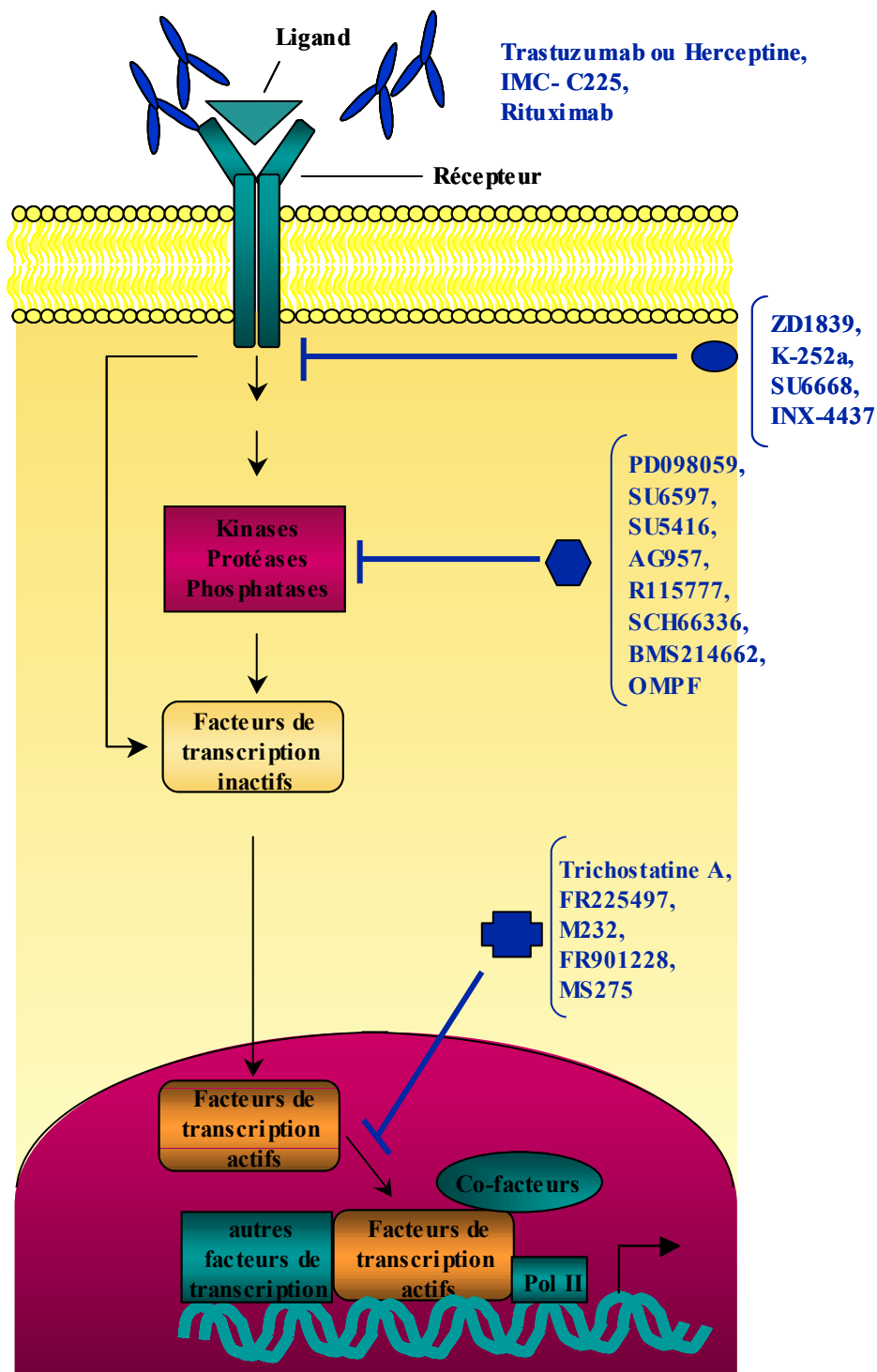


Figure 18: La voie de signalisation des facteurs de croissance comme cible thérapeutique anti-cancéreuse. La signalisation intracellulaire a été très bien étudiée et peut se résumer comme ci-dessus. Les éléments et les traits bleus symbolisent les différentes molécules connues pour être capable de parer la transduction du signal, induite normalement par la fixation du ligand sur son récepteur (flèches noires).

Dans une approche similaire à celle du récepteur c-erbB2, les recherches s'étendent sur le bénéfice clinique potentiel d'un autre anticorps monoclonal humanisé (le IMC- C225) qui se fixe sur le domaine riche en cystéine de l'EGF-R (figure 18). Les premières données expérimentales montrent le blocage de l'activité tyrosine kinase normalement induite par le ligand, et inhibent la transduction du signal médiée par les MAPK. Bien entendu, l'utilisation de tels outils immunologiques ne s'est pas cantonnée à bloquer l'activité des récepteurs de la famille de l'EGF. Un autre exemple d'utilisation d'anticorps monoclonaux anticancéreux est l'anticorps monoclonal anti-CD20 (ou rituximab^R) employé dans certaines catégories de lymphomes malins non hodgkiniens (figure 3). Le blocage de cet antigène CD20 par cet anticorps permet, là aussi, une destruction de ces cellules tumorales (Coiffier, 2000). Les anticorps monoclonaux peuvent aussi être utilisés pour agir sur l'environnement des cellules tumorales. L'un des grands mécanismes par lesquels les cellules tumorales s'installent, assurent leur croissance et leur dissémination, est la création de nouveaux vaisseaux sanguins. Là encore (comme nous le verrons dans la prochaine partie), le développement de ces anticorps monoclonaux dirigés contre des facteurs de croissance des vaisseaux permet d'envisager de bloquer ce processus. En parallèle avec le développement des anticorps monoclonaux, celui de molécules de faibles masses moléculaires inhibant le domaine tyrosine kinase de l'EGF-R (qui porte le domaine de liaison à l'ATP) sont en cours et complète une nouvelle fois l'arsenal thérapeutique. Ces molécules interfèrent avec l'activité tyrosine kinase intrinsèque du récepteur bloquant l'autophosphorylation de ce dernier et les protéines de transduction (Levitzki & Gazit, 1995 ; Levitzki, 1999). De façon plus précise, elles compétent avec l'ATP pour le site de fixation de l'ATP dans le domaine tyrosine kinase du récepteur (Al-Obeidi & Lam, 2000). Les cibles de ces inhibiteurs sont variées, ainsi le ZD1839 (ou Iressa^R) bloque la phosphorylation de l'EGF-R agissant donc très en amont de la cascade de signalisation activée par ce récepteur (figure 18) (Ciardiello, 2000). Cet inhibiteur cause la diminution significative de la prolifération de lignées cellulaires humaines, suggérant que le turnover cellulaire dans les tumeurs mammaires pourrait être la cible du ZD1839 *in vivo*. D'autres inhibiteurs spécifiques de tyrosine kinase peuvent aussi être utilisés comme agents thérapeutiques pour inhiber c-erbB2. C'est le cas de l'herbimycine A (Miller *et al.*, 1994) et de l'émoline (Zhang *et al.*, 1995). Une étude récente montre que l'émoline, en plus de son action inhibitrice de la croissance des tumeurs surexprimant c-erbB2, sensibilise ces tumeurs au paclitaxel (Zhang *et al.*, 1999). D'autres molécules (SU5416, SU6597, AG957, AG490...) sont actuellement à l'étude. En outre, l'utilisation des oligonucléotides antisens représente une autre approche pour inhiber l'activation des RTKs (Marcusson *et al.*, 1999). Ces

oligonucléotides antisens sont des petites pièces d'ADN synthétique ou d'ARN qui sont désignées à interagir avec l'ARNm pour bloquer la transcription et par conséquent, l'expression de la protéine cible (Pawlak *et al.*, 2000). Ils constituent de nouveaux agents potentiels pour le traitement du cancer du sein surexprimant l'EGF-R ou c-erbB2 par exemple. Plusieurs études ont déjà mis en évidence une diminution de la croissance et de l'expression de ces gènes dans des lignées de cellules de cancers du sein sous l'effet d'oligonucléotides antisens (Bertram *et al.*, 1994 ; Colomer *et al.*, 1994 ; Fan *et al.*, 1998 ; Witters *et al.*, 1999). A ce même titre, pour inhiber la voie de signalisation de l'IGF-I, l'INX-4437 (oligonucléotide antisens ciblant l'IGF-RI) constitue l'arme de choix pour abroger la progression tumorale, alors que pour celle du FGF, l'emploi du SU6668 permettra d'inhiber l'activité tyrosine kinase du récepteur (Laird *et al.*, 2000).

D'autres efforts de recherche se sont focalisés sur la transduction du signal des facteurs de croissance au-delà du récepteur lui-même, et qui constituent la deuxième vague offensive développée dans les thérapies anticancéreuses. L'exemple le plus connu est le protooncogène ras, qui se trouve être muté dans la plupart des cancers. Ras appartient à la famille des protéines fixant les molécules de GTP. Son activité fonctionnelle est dépendante de sa modification post-transcriptionnelle avec des groupes farnésyls hydrophobes (qui sont transférés par des enzymes spécifiques nommées les farnésyls transférases) qui permettent à ras de s'attacher du côté cytoplasmique de la membrane plasmique de la cellule. L'observation du blocage de l'action de ras est la plupart du temps accompagnée par l'inhibition des autres voies de transduction, ce qui peut contribuer positivement à un effet thérapeutique. De nombreux inhibiteurs des farnésyls transférases (FTIs) sont à l'heure actuelle en évaluation clinique : c'est le cas de R115777, SCH66336, BMS214662 (Adjei *et al.*, 2000 ; Ashar *et al.*, 2001) (figure 18). Sur le plan clinique, le R115777 a montré une activité antitumorale importante sur les patientes atteintes du cancer du sein. Bien que ces agents ont été développés pour cibler spécifiquement les mutants de ras dans cette pathologie, ils inhibent également la prolifération des cellules MCF-7 qui possèdent quand à elles un ras sauvage, suggérant que les effets antiprolifératifs ne peuvent s'expliquer que par la seule inhibition de ras. Dans un essai clinique de phase III, les patientes avec un cancer du sein avancé, qui étaient réfractaires à des modalités différentes de traitement systémique, ont été traitées avec le R115777 et montrent une réponse partielle ou une stabilité de la maladie après 3 mois. Au même titre que ras, la protéine Src a été trouvée surexprimée ou activée dans de nombreux cancers humains et plusieurs études ont mis en évidence son rôle dans le cancer du

sein (revue dans Biscardi *et al.*, 1999). Par conséquent Src constitue une cible thérapeutique de choix (il en est de même pour les protéine raf, les protéines de la famille des GTPases).

D'autres efforts se sont focalisés sur l'emploi potentiel de modulateurs de l'état de l'ADN en amont du promoteur des gènes stimulés par les facteurs de croissance. Nous l'avons vu dans le chapitre précédent, la cellule tumorale en maîtrisant le niveau d'acétylation ou de méthylation au niveau de certains gènes peut favoriser leur activité transcriptionnelle. Les inhibiteurs des histones déacétylases (HDACs) sont des inducteurs importants de l'arrêt de croissance dans les tumeurs, et de ce fait, sont les nouvelles molécules utilisées contre le cancer. Nous ne nous cantonnerons ici qu'à quelques exemples de ces inhibiteurs des HDACs. Certaines de ces molécules sont en essais cliniques de phase I ou II chez les patients atteints de cancers (Marks *et al.*, 2001) : Trichostatine A, des tétrapeptides cycliques (FR225497), des analogues des tétrapeptides (M232), des depsipeptides (FR901228) et des benzamides (MS275) sont les plus courants.

La phosphorylation est l'un des mécanismes utilisés par la cellule pour transmettre une information externe vers sa machinerie nucléaire pour transcrire puis traduire les outils nécessaires afin de répondre et d'adapter son comportement à l'information perçue. Il est alors intéressant de noter que 30% des protéines cellulaires sont des phosphoprotéines principalement phosphorylées sur résidus sérine et thréonine, alors que la phosphorylation sur résidus tyrosine représente moins de 0.1% du total des phosphorylations des protéines (Cohen, 2000). L'état de phosphorylation et l'activité de signalisation des RTKs sont déterminés non seulement par l'activité kinase des RTKs mais aussi par les activités des phosphatases (Ostman & Bohmer, 2001). Cependant, il est maintenant établi que ce type de modification post-traductionnelle joue un rôle important dans la croissance cellulaire, la différenciation, le métabolisme, l'adhérence, la motilité, la transcription, la réponse immunitaire et la survie (Fischer, 1999). La structure, la classification ou le processus de catalyse ne seront aucunement abordés ici. Seul, l'intérêt à des fins thérapeutiques de la description succincte d'inhibiteurs de phosphatases sera rapporté dans ce paragraphe (voir revue : Burke & Zhang, 1998 ; Pestell *et al.*, 2000). Une des caractéristiques de la transformation oncogénique est la dérégulation du contrôle du cycle cellulaire. La phosphorylation est un mécanisme de régulation important pour les complexes cdk/cyclines puisque ce phénomène les inactive. Cdc25 est la phosphatase qui restaure l'activité de ces complexes, et fait important, elle est souvent surexprimée dans les tumeurs humaines. Ainsi, de nombreux inhibiteurs de cdc25 sont développés, comme OMFP, FDP, vanadate, des dérivés des quinones (Nocardione A), des analogues de la vitamine K (Pestell *et al.*, 2000).

Cependant, les recherches ne se sont pas centralisées uniquement sur cdc25, d'autres inhibiteurs des phosphatases tels les dérivés de produits naturels, comme la déphostatine, la nornuciférine ou la sulfircine, sont utilisés (Burke & Zhang, 1998).

II- 3- b- Modulateurs de l'apoptose.

L'apoptose désigne une forme particulière de mort cellulaire qui joue un rôle important dans le développement embryonnaire (dans la sculpture des organes, l'élimination des ébauches embryonnaires, l'ajustement du nombre de cellules...) et le maintien de l'homéostasie tissulaire (élimination des cellules indésirables...) (Jacobson *et al.*, 1997). Il n'est donc pas étonnant que des dérégulations de l'apoptose aboutissent à l'émergence de pathologies (Hanahan & Weinberg, 2000 ; Sauer *et al.*, 2002). Dans le cas des cancers, la diminution de l'apoptose est souvent observée et résulte d'altérations héritées ou acquises de l'expression de gènes régulant l'apoptose (Kumar *et al.*, 2000). Nous allons développer dans un premier temps le mécanisme de l'apoptose de façon succincte pour comprendre dans un second temps comment la cellule maligne détourne à son profit ce mécanisme de mort. Enfin nous discuterons des molécules qui sont actuellement utilisées dans la thérapie anticancéreuse.

L'exécution de l'apoptose requiert, dans une grande majorité des cas, l'activation de cystéine protéases particulières : les caspases (voie de signalisation fléchée en noire sur la figure 19). Les protéines substrats de ces caspases sont nombreuses, actuellement plus de 100 d'entre-elles sont connues (Nicholson, 1999). Celles-ci sont principalement activées par les récepteurs de mort et/ou la mitochondrie qui intègre les signaux anti- et pro-apoptogènes. Les récepteurs de mort appartiennent à la superfamille des récepteurs au TNF (Tumor Necrosis Factor). Ces récepteurs sont des protéines transmembranaires, caractérisées par la présence de domaines extracellulaires riches en cystéines (CDRs). Ces domaines CDRs sont responsables de la liaison du récepteur avec le ligand, et dans leurs parties intracellulaires, on note des domaines de mort qui permettent de recruter des protéines adaptatrices particulières pour transduire le signal de la membrane aux protéines cibles (Schmitz *et al.*, 2000). Aujourd'hui, on dénombre 8 récepteurs de mort, dont 5 capables d'induire l'apoptose (Fas, TNF-R1, LARD, TRAIL-R1, TRAIL-R2 ; et les récepteurs de leurre : DcR1, DcR2, DcR3). En règle générale (voir figure 19), la fixation du ligand sur les CDRs du récepteur de mort induit la trimérisation et

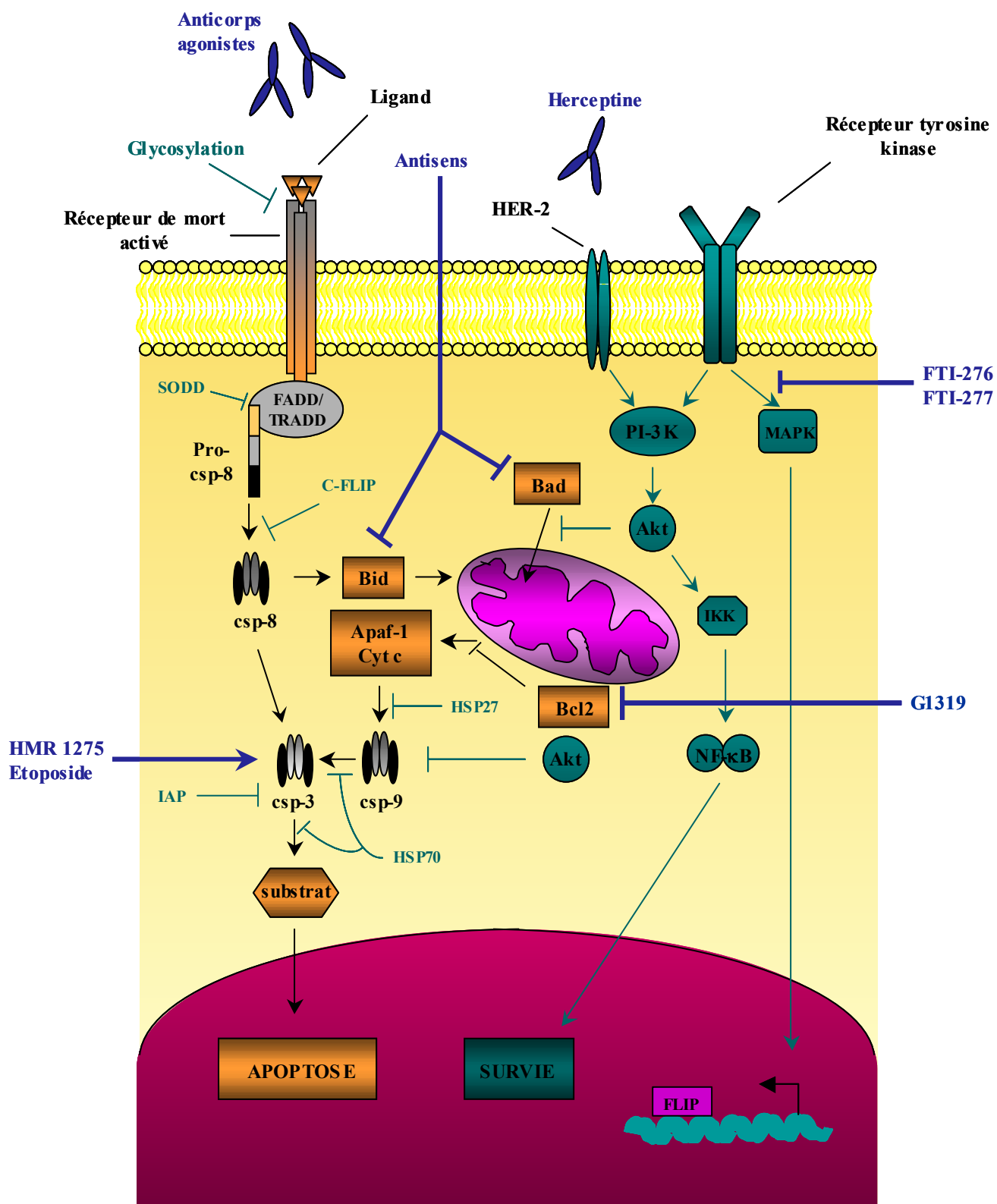


Figure 19: Représentation schématique des protéines régulatrices de l'apoptose (voie de signalisation fléchée en noire avec les différentes protéines en orangé) et des mécanismes de l'inhibition de ce phénomène dans les cellules cancéreuses (voie de signalisation et protéines impliquées en vert). → effets positifs ; —| effets négatifs. Les drogues ou molécules capables de contrebalancer les effets des cellules tumorales dans l'apoptose

sont représentées en bleues (+ : \rightarrow ; - : \dashv). Le choix stratégique est double : viser les molécules pro-apoptotiques classiques ou inhiber les voies utilisées par la cellule tumorale pour survivre. SODD: Silencer of death domains ; FLIP : Fas-associated death-domain-like IL-1 β -converting enzyme-inhibitory Protein; IAP : Inhibitor of Apoptosis Protein ; HSP :Heat shock protein; PI3K: Phosphatidylinositol 3-kinase; IKK: I- κ B kinase ; NF κ B: nuclear Factor-kappa B; MAPK : Mitogen activated protein kinase.

l'activation du récepteur, entraînant le recrutement de protéines de transduction comme FADD (Fas-Associated death Domain protein) et/ou TRADD (TNFR-Associated Death Domain), qui à leur tour activent des cascades de caspases, ou la libération de facteurs mitochondriaux (cytochrome c, AIF) sous le contrôle des protéines de la famille Bcl-2 (Bcl-2, Bax, Bid), ou la voie des céramides ou encore la voie de JNK (Jun N-terminal kinase). Le traitement de toutes ces informations par la cellule, ainsi que l'intervention de l'environnement particulier qui l'entoure, la cellule va survivre ou mourir. Le développement tumoral est lié, entre autre, à une diminution de l'apoptose. Cette diminution aboutit quant à elle, aux dysfonctionnements de nombreuses protéines régulatrices de l'apoptose (figure 19). Le premier « phénomène d'échappement » est la diminution de l'interaction ligand-récepteur. Dans de nombreux cancers, l'expression des récepteurs de mort est diminuée, voire abolie. Cette diminution est sous le contrôle de l'oncogène *p53* qui diminue l'expression des récepteurs et/ou leur translocation sur la membrane de la cellule. Ainsi, la tumeur échappe aux contrôles du système immunitaire ou à l'action de drogues anticancéreuses (Sheikh & Fornace, 2000a). Entre, dans ces « phénomènes d'échappement », l'hyperglycosylation de Fas, qui permet ainsi de diminuer l'affinité du ligand (Fas L) pour son récepteur (Peter *et al.*, 1995 ; Keppler *et al.*, 1999). Enfin, jouer sur l'expression des récepteurs de leurre (DcR), peut permettre à la cellule tumorale de diminuer la biodisponibilité du ligand pour son récepteur (Sheikh & Fornace, 2000b). Outre le dysfonctionnement de l'interaction ligand-récepteur, la trimérisation des récepteurs de mort est également un biais utilisé par la cellule maligne pour échapper aux signaux extérieurs. *In vitro*, les expériences réalisées montrent qu'une surexpression de la protéine SODD (Silencer Of Death Domains) dans les cellules de mélanome inhibe la liaison de TRADD aux récepteurs de mort supprimant ainsi l'apoptose (Jiang *et al.*, 1999). Un autre « phénomène d'échappement » pour la cellule cancéreuse consiste en la surexpression de certaines protéines qui inhibent le passage du signal de la

membrane au cytoplasme *via* l'inhibition des cascades d'activation. L'exemple le plus couramment retrouvé dans les cancers est la surexpression des FLIPs (Fas-associated death-domain-like IL-1 β -converting enzyme-inhibitory Protein) (Ryu *et al.*, 2001). En effet, ces protéines FLIPs sont caractérisées, entre autre, par la présence d'un domaine homologue aux sites actifs des caspases, mais ces protéines ne possèdent pas de site de clivage fonctionnel. Ainsi, la liaison des FLIPs à FADD, par exemple, empêche le recrutement des pro-caspases-8 en aval des récepteurs de mort (Scaffidi *et al.*, 1999). Aujourd'hui, l'activation des MAPK et celle de la voie de survie PI3-kinase/Akt seraient les mécanismes de régulation de l'expression de ces FLIPs dans les cellules tumorales (Panka *et al.*, 2001). On note aussi que la surexpression des IAPs (Inhibitor of Apoptosis Protein), de même, que la surexpression des HSPs (Heat Shock Protein) inhibent l'apoptose en inhibant les caspases ou en activant NF- κ B permettant aux cellules tumorales de survivre (exemple de la survivine avec Tamm *et al.*, 1998 ; exemple de l'HSP70 avec Lazaris *et al.*, 1997). Le Flavopiridol (ou HMR 1275), drogue usuellement utilisée dans les thérapies du cancer, inhibe la croissance et induit l'apoptose dans un grand nombre de lignées mammaires tumorales. Un des mécanismes par lequel cette molécule induit l'apoptose est l'activation de la caspase-3 (figure 19) (Li *et al.*, 2000). Cette molécule inhibe également les cdks, lesquelles sont nécessaires à la progression dans le cycle cellulaire, induisant ainsi l'apoptose. Une même activation de cette caspase-3 est observée lors du traitement par l'étoposide conduisant à l'induction de l'apoptose dans la lignée MCF-7 (Benjamin *et al.*, 1998). Après l'identification d'oncogènes activés comme suppresseurs de l'apoptose, l'ensemble de ces molécules, et spécialement Bcl-2, ont été considérées comme des cibles thérapeutiques intéressantes dans le cancer. Le G1319 est un oligonucléotide antisens qui se fixe sur l'ARNm de *bcl-2* permettant ainsi d'initialiser la digestion par une ribonucléase de l'ARNm piégé, diminuant par conséquent le niveau d'expression de la protéine. Dans les essais cliniques de phase I, le couplage de G1319 avec une drogue couramment employée dans le traitement du cancer du sein (docetaxel), montre que cette « down-régulation » de Bcl-2 agit de façon synergique avec la molécule afin d'induire l'apoptose, probant son efficacité dans le traitement de cette pathologie (Chen *et al.*, 2000). Par ailleurs, des molécules ciblant les farnésyl transférases (ex : la protéine ras) sont également utilisées afin de contrer la stratégie adoptée par les cellules tumorales pour survivre. C'est le cas des FTI-276 et -277. Les voies p38MAPK et JNK sont également impliquées dans l'inhibition de l'apoptose et sont donc les cibles d'inhibiteurs (SB2035801, SB202190 pour p38 MAPK ; et CEP-1347 pour JNK). D'autres cibles moléculaires sont à l'étude et en essai clinique, en particulier les molécules ciblant la signalisation PI3-

kinase/Akt, et les HSPs (figure 19). Aujourd'hui des traitements à base d'héréguline (un ligand stimulant le récepteur HER-2) pourrait être un choix supplémentaire pour contrebalancer la survie des cellules tumorales dans les nouvelles thérapies (Mazumdar, 2001) (figure 19). Par ailleurs, les études sont tournées de plus en plus vers le niveau d'acétylation des histones qui semble être une cible d'intervention thérapeutique potentielle. On sait que l'expression des protéines de la famille Bcl-2 est influencée par l'oestradiol (Kandouz *et al.*, 1996), par conséquent, le niveau d'hormones pourrait avoir des implications importantes sur le ratio des protéines pro- et anti-apoptotiques (Krajewski *et al.*, 1999) dans les cellules malignes. De plus, il est montré que l'oestradiol en augmentant l'expression de la protéine Bcl-2 protège la cellule de l'apoptose, et que ces effets sont réversés par l'utilisation d'anti-oestrogènes (Wang & Phang, 1995). De ce fait, le tamoxifène (drogue couramment utilisée en hormonothérapie pour lutter contre le cancer du sein) pourrait à nouveau induire ces cellules en apoptose *via* la « down-régulation » de Bcl-2 (Zhang *et al.*, 1997, 1999). Pour conclure, il ne faut pas oublier de citer l'intérêt des cytokines (Fas, TNF α , IFN γ , TRAIL) ciblant les cellules tumorales afin de les induire en apoptose *in vitro* (revue Baetu & Hiscott, 2002 ; Timmer *et al.*, 2002).

II- 3- c- Inhibition de l'angiogenèse tumorale.

L'angiogenèse autour de la tumeur est un processus complexe permettant la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de ceux qui sont présents, à l'aide de molécules appropriées, et cela à proximité de la tumeur. Ils assurent alors l'approvisionnement des tumeurs en oxygène et en nutriments. La cellule cancéreuse est ainsi capable d'induire la synthèse de telles molécules par des cellules adjacentes non cancéreuses et de détourner à son profit des mécanismes biologiques qui vont lui permettre de survivre dans un compartiment cellulaire grâce aux apports véhiculés par les vaisseaux nouvellement formés. Ces molécules sont nommées facteurs angiogéniques, et le facteur le plus couramment décrit, est le Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF). Il est intéressant de noter que la croissance, l'invasion et les métastases de nombreux cancers dépendent de ce processus angiogénique. Il est décrit que le VEGF est exprimé sous l'effet de l'hypoxie des cellules cancéreuses (Marxsen *et al.*, 2001). En effet, lors de la croissance tumorale la taille de la tumeur augmentant, les cellules en profondeur sont en hypoxie. Ce stress conduit alors les cellules tumorales à produire du VEGF. De même, l'expression du VEGF est aussi augmentée lors de mutations conduisant

soit à la transformation cellulaire soit à la progression tumorale sous l'influence d'hormones oestrogènes ou androgènes (Ruohola *et al.*, 1999). Par conséquent, l'altération de l'expression et/ou de la fonction de ces molécules angiogéniques apparaît être responsable du pouvoir angiogénique accru des cellules tumorales. Par conséquent, la progression sur un plan histologique, d'une hyperplasie à un carcinome invasif est associée au développement de structures vasculaires et à une augmentation de facteurs angiogéniques dans la tumeur.

Auparavant, la stratégie utilisée pour lutter contre l'angiogenèse tumorale reposait sur l'inhibition de la biodisponibilité des facteurs angiogéniques sécrétés par les cellules tumorales. En effet, la majorité des facteurs de croissance se lient aux glycosaminoglycanes polysaccharides de la surface cellulaire et de la matrice extracellulaire (héparane sulfate, héparine, ...). De ce fait, cela a donné lieu à de nombreux essais d'inhibition de leur activité par des composés dérivés de l'héparine (Smorenburg & Van Nordeen, 2001). Cependant en raison de la toxicité des produits, les essais précliniques et cliniques ont été abandonnés. Depuis quelques années, les recherches ont montré que le VEGF est un des acteurs majeurs du processus angiogénique. La famille de ce facteur de croissance contient 6 membres : le VEGF lui-même et les VEGF-B à -E et le facteur de croissance du placenta. Trois récepteurs pour le VEGF ont été identifiés : VEGF-R1 à -R3. Ces récepteurs sont des récepteurs à activité tyrosine kinase qui transduisent le signal *via* leur trans-autophosphorylation lors de la fixation du ligand. Récemment, de nombreuses stratégies visant la signalisation du VEGF ont été développées et ont débuté avec l'inhibition de l'autocrinie du VEGF. En effet, une première approche a consisté à inhiber l'expression du VEGF lui-même par l'utilisation d'oligonucléotides antisens ou à l'aide de l'expression d'un construit qui cible l'ARNm du VEGF (Oku *et al.*, 1998 ; Belletti *et al.*, 1999). Une autre approche a consisté à produire des anticorps monoclonaux anti-VEGF-R (Bevacizumab^R et IMC-1C11) et les recherches tendent à montrer que leur utilisation affecte la croissance tumorale dans de nombreux modèles de xénogreffes (Rosen, 2002 ; Zhu *et al.*, 2002). De plus, des essais cliniques de phase I et II avec ces anticorps monoclonaux ont montré que les doses d'anticorps utilisées étaient très bien tolérées par les patientes atteintes d'un cancer du sein et qu'une réponse clinique partielle était observée dans la plupart des cas (Goldman *et al.*, 1998 ; Sledge *et al.*, 2000). L'utilisation de récepteurs solubles et recombinants du VEGF sont également à l'étude pour capturer le ligand avant sa fixation aux récepteurs membranaires. Une autre manière de bloquer la signalisation du VEGF, est d'utiliser des inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase du récepteur. Le SU5416 (dérivé de l'indoline) est l'inhibiteur de référence pour le VEGF. Il

inactive le récepteur VEGF-R2 bloquant ainsi la croissance tumorale, les métastases et la formation de micro-vaisseaux sanguins (Fong *et al.*, 1999 ; Smolich *et al.*, 2001). Cependant cet inhibiteur ne bloque pas l'activité des récepteurs aux FGFs et des autres tyrosine ou sérine kinases qui interviennent également dans l'angiogenèse. Aujourd'hui, d'autres inhibiteurs du VEGF-R2 sont en cours d'essais cliniques (PTK787, ZK22584).

Outre le VEGF, d'autres facteurs sont aussi synthétisés par les cellules endothéliales dans l'environnement des tumeurs, favorisant ainsi l'angiogenèse tumorale. De nombreuses protéases en particulier les métalloprotéases matricielles (MMP) -2, -4 et -9 y sont surexprimées. Dans une stratégie anti-angiogénique des inhibiteurs de spécificité plus ou moins étroite pour la métalloprotéase-2 (MMP-2) sont déjà en essais cliniques de phase III. Cette voie anti-angiogénique, consistant à détruire sélectivement les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins tumoraux, fait appel à d'autres molécules. En effet, il a été montré que les intégrines $\alpha\beta3$ et $\alpha\beta5$ sont spécifiquement synthétisées par les cellules endothéliales angiogéniques. Des antagonistes de ces intégrines, constitués par des anticorps ou des peptides cyclisés obtenus par synthèse chimique, inhibent l'angiogenèse tumorale (Brooks *et al.*, 1994). C'est le cas du composé EMD121974 qui se lie à l'intégrine $\alpha\beta3$ et provoque ainsi l'apoptose des cellules endothéliales angiogéniques. D'autres marqueurs des vaisseaux tumoraux ont été décrits et pourraient servir de cibles à d'autres composés comme le EMD121974: l'endosialine, l'endogline, le collagène VIII. Citons aussi les 2 composés extraits du cartilage de requin, qui ont des actions multiples à la fois sur les échangeurs sodium-proton, sur les MMPs de la matrice extracellulaire et la voie de signalisation du VEGF (Gingras *et al.*, 2001 ; Beliveau *et al.*, 2002). Plusieurs molécules à activité antiangiogénique constituent une nouvelle classe de molécules thérapeutiques. Ces molécules, à la différence des facteurs angiogéniques, sont circulants et capables d'inhiber l'angiogenèse nécessaire au développement des métastases à distance de leur lieu de synthèse. Les plus connues sont l'angiostatine et l'endostatine (Yamaguchi *et al.*, 1999). Toujours dans le but de détruire les vaisseaux tumoraux, une approche consiste à diriger des toxines à l'aide d'anticorps sur les seules cellules endothéliales intratumorales en épargnant ainsi les cellules endothéliales saines (Huang *et al.*, 1997). C'est le cas d'un anticorps bispécifique dirigé contre un antigène spécifiquement exprimé par l'endothélium tumoral et dirigé aussi contre le facteur tissulaire humain (l'un des facteurs majeurs de la chaîne de coagulation du sang) permet d'obtenir une thrombose des vaisseaux tumoraux.

Enfin, une autre approche a consisté à développer des ligands ayant un mimétisme pour le VEGF. La stratégie pour produire ce genre de molécules est l'utilisation des anticorps anti-idiotypes. Parmi ces molécules, des agonistes du VEGF-R2 se sont révélés capables *in vitro* et *in vivo* de déclencher la prolifération des seules cellules endothéliales. Ainsi l'anticorps anti-idiotype agoniste, couplé à une toxine permet de réduire l'angiogenèse (Ortega *et al.*, 1996).

II- 3- d- Inhibition de l'invasion et des métastases.

La progression tumorale, définie comme une séquence d'événements qui autorise la cellule maligne à devenir invasive et éventuellement métastatique, est l'un des plus grands problèmes dans la biologie du cancer (Fearon, 1999 ; Hanahan & Weinberg, 2000). L'invasion et les métastases sont les étapes qui permettent à la cellule tumorale de se disséminer pour atteindre des cibles secondaires, comme les poumons ou encore les os dans le cancer du sein. La lutte contre ces propriétés, acquises par la cellule maligne, fait l'objet de grandes investigations dans les thérapies anti-cancéreuses. Ici, seront surtout développées les stratégies antitumorales qui ciblent les Métalloprotéines matricielles (MMPs). Il est connu que les cellules épithéliales normales sont presque incapables de migrer, par contre, les cellules tumorales acquièrent une certaine motilité (Tamura *et al.*, 1998). Pour cela les cellules tumorales doivent opérer une transition dans leur phénotype. D'abord, modifier la nature et la quantité des protéines du cytosquelette. Ensuite, modifier le type de jonctions intercellulaires et également favoriser des contacts illégitimes entre elles et les cellules du microenvironnement. Et enfin, modeler leur environnement pour permettre l'invasion des tissus sous jacents, l'intravasation dans les vaisseaux sanguins avoisinants ou encore leur nidation dans les sites secondaires. Cette transition du phénotype épithélial « statique » au phénotype fibroblastique « mobile » (nommé aussi caractère mésenchymateux) nécessite en effet des modifications moléculaires des filaments intermédiaires du cytosquelette permettant ainsi aux cellules cancéreuses d'émettre des expansions cytoplasmiques pour leur locomotion (figure 20). Ces modifications morphologiques s'accompagnent le plus souvent par des remplacements des kératines en vimentines et des surexpressions de tenascines (Hendrix *et al.*, 1996 ; Thomas *et al.*, 1999 ; Dandachi *et al.*, 2001).

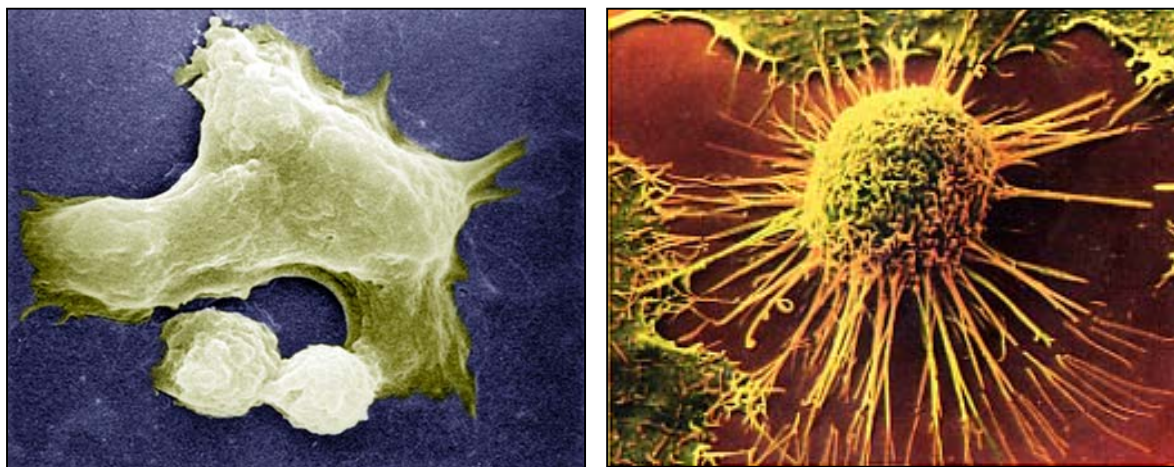


Figure 20 : Morphologies particulières adoptées par les cellules cancéreuses pour assurer leur mobilité. **A.** Cellule cancéreuse mammaire en cours de migration. **B.** Cellule d'un carcinome de l'utérus (photo de Rio MC, 2001). L'armada d'expansions cytoplasmiques (lamellipodes) émanant de la cellule tumorale sont des piliers nécessaires à la progression dans ses intentions colonisatrices. Ces morphologies sont le reflet des remaniements des molécules du cytosquelette accompagnées des redistributions des intégrines et des cadhérines. Chaque intervenant a un rôle, et chaque rôle est interprété à la lettre, le tout devant les chefs d'orchestre que sont les voies de signalisation.

Participent, aussi à ces mécanismes d'invasion et de métastases, les intégrines et les cadhérines. Les intégrines sont essentielles pour la progression tumorale, non seulement pour leur capacité de médier des interactions physiques avec la matrice extracellulaire (MEC), mais aussi pour leur capacité de réguler les voies de signalisation qui contrôlent la dynamique de l'actine et les mouvements cellulaires, ainsi que la croissance et la survie (pour revue Shaw, 1999 ; Mercurio *et al.*, 2001). D'un côté, la migration est un processus dynamique qui nécessite une formation et un désassemblage rapides des contacts adhérents au substrat. De l'autre, les intégrines sont à la fois présentes dans les lamellipodes pour la locomotion de la cellule et dans les héli-desmosomes pour l'adhérence. Par un jeu de construction et de remodelage, les intégrines parviennent à être des partenaires dans ces 2 actions. Par exemple, la redistribution de l'intégrine $\alpha6\beta4$ avec les cytokératines ou l'actine F est primordiale pour la cellule tumorale mammaire au cours de la migration (Mercurio *et al.*, 2001). Il est alors logique de prendre pour cible les intégrines pour lutter contre la tumeur. Aujourd'hui, on trouve : des anticorps (Vitaxine) (Gutheil *et al.*, 2000), des peptides cycliques (Schraa *et al.*,

2002) et des antisens (MacDonald & Ladisch, 2001). Les cadhérines, déjà développées au chapitre 1 (pour revue Bracke *et al.*, 1996; Mareel *et al.*, 1997), sont également cibles des thérapies anticancer. Liao *et al.* (2000) montrent que le blocage de la cadhérine VE, par une administration systémique d'un anticorps monoclonal dirigé contre cette protéine, inhibe l'angiogenèse, la croissance tumorale et les métastases ce qui valide cette cadhérine comme cible thérapeutique potentielle. Il ne faut pas omettre l'intervention des Focal Adhesion Kinase (FAK) (Weiner *et al.*, 1993 ; Hanks & Polte, 1997) et de NF- κ B (Andela *et al.*, 2000) dans la signalisation de ces processus et leurs potentielles utilisations comme stratégies dans les biothérapies.

Une particularité marquante a lieu lors des processus d'invasion et de métastases : c'est la désorganisation tissulaire. Lors de ces remaniements, la MEC et la membrane basale sont dégradées grâce à des enzymes appartenant à la famille des MMPs (Rudolph-Owen & Matrisian, 1998) et des activateurs du plasminogène (PA) (Stephens *et al.*, 1998). De ce fait, l'inhibition de ces protéines pourrait permettre à la fois la prévention du développement du cancer et l'inhibition de la dissémination. A l'heure actuelle, le processus de métastase est couramment subdivisé en différentes étapes séquentielles, qui sont :

- dissociation des cellules tumorales et détachement à partir de la tumeur primitive (« switch phénotypique ») ;
- infiltration active du stroma environnant (invasion) ;
- entrée dans les vaisseaux sanguins ou lymphatiques (intravasation) ;
- transport vers des organes distants et adhérence à l'organe cible (transport et ciblage) ;
- départ des vaisseaux (extravasation) ;
- invasion des cellules tumorales dans l'organe cible (invasion).

La MEC est constituée de deux composés principaux : la membrane basale et le tissu interstitiel (Judware & Culp, 1997). Les composants de la membrane basale sont : le collagène IV, la laminine, les protéoglycannes, l'entactine, l'ostéonectine. De ce fait, les MMP-2 et-9 pourraient jouer un rôle important dans la transformation d'un cancer *in situ* en un cancer invasif. Le tissu interstitiel contient quant à lui, du collagène de type I, II, III, des glycoprotéines, des protéoglycanes et l'acide hyaluronique. Au cours de la dissémination, le tissu interstitiel est connu pour être dégradé principalement par les collagénases et quelques stromélysines. De nombreuses études ont démontré une corrélation entre la quantité

d'enzymes protéolytiques exprimées par les cellules tumorales et leur comportement invasif *in vitro* et leur pouvoir métastatique *in vivo*. Des études par Hybridation *In Situ* (HIS) et Immunohistochimie (IHC) révèlent que, bien que de nombreuses cellules malignes produisent les MMPs, ces protéases sont souvent abondamment exprimées par les cellules stromales localisées à proximité de ces cellules invasives. De plus, le pattern d'expression de ces MMPs dans les tumeurs varie en fonction de la nature de la MMP concernée et aussi en fonction du type de cancer. Par exemple, dans les carcinomes colorectaux, la MMP-7 est exprimée sélectivement par les cellules épithéliales malignes alors que les cellules stromales avoisinantes expriment les stromélysines 1 et 3 et la gélatinase A (Newell *et al.*, 1994). Dans le cancer du sein, la stromélysine 3 et la MMP-1 et -3 sont exprimées préférentiellement par les cellules stromales alors que la MMP-2 est trouvée dans les deux types cellulaires, tumorales ou non (Uria *et al.*, 1997).

Puisque l'invasion des cellules cancéreuses commence par la traversée de la matrice extracellulaire, il a été montré que de nombreuses cellules tumorales expriment de hauts taux de MMPs (Scorilas *et al.*, 2001). De plus, il est connu que dans une cellule, l'activation des MMPs est contrebalancée par l'expression d'inhibiteurs spécifiques de ces protéines, appelés TIMPs (Tissue Inhibitors of Metalloproteinases) (Brew *et al.*, 2000). Par conséquent, les deux types de molécules sont considérés comme des cibles attractives dans les biothérapies actuelles (revue Sauer *et al.*, 2002). L'inhibition de l'activité des MMPs a été très étudiée comme approche pouvant inhiber la croissance et l'invasion des cellules malignes (figure 21). Aujourd'hui, dans les thérapies anti-cancéreuses, les inhibiteurs des MMPs sont nombreux et sont en essais cliniques de phase II voire de phase III (Nelson *et al.*, 2000 ; Vihinen & Kähäri, 2002). Ces inhibiteurs peuvent être des molécules naturelles ou non, peptidiques, des peptides synthétiques ou des dérivés de la tétracycline ou encore de bisphosphanate. Parmi eux, les inhibiteurs peptidomimétiques sont les plus couramment rencontrés : ce sont des molécules qui miment la structure des substrats des MMPs et fonctionnent comme des inhibiteurs compétitifs réversibles (exemples : Batimastat, Marimastat, Solimastat). Ainsi, le Batimastat (ou BB-94), inhibiteur spécifique de MMP, a été montré comme inhibant la croissance tumorale dans des modèles animaux (Aparicio *et al.*, 1999) et un essai clinique de phase I a confirmé son effet inhibiteur sur des effusions pleurales tumorales chez des patientes atteintes d'un cancer du sein. Les résultats tendent à suggérer que les MMPs sont impliquées dans la plupart des phases de la carcinogenèse mammaire (du stade d'initiation au processus

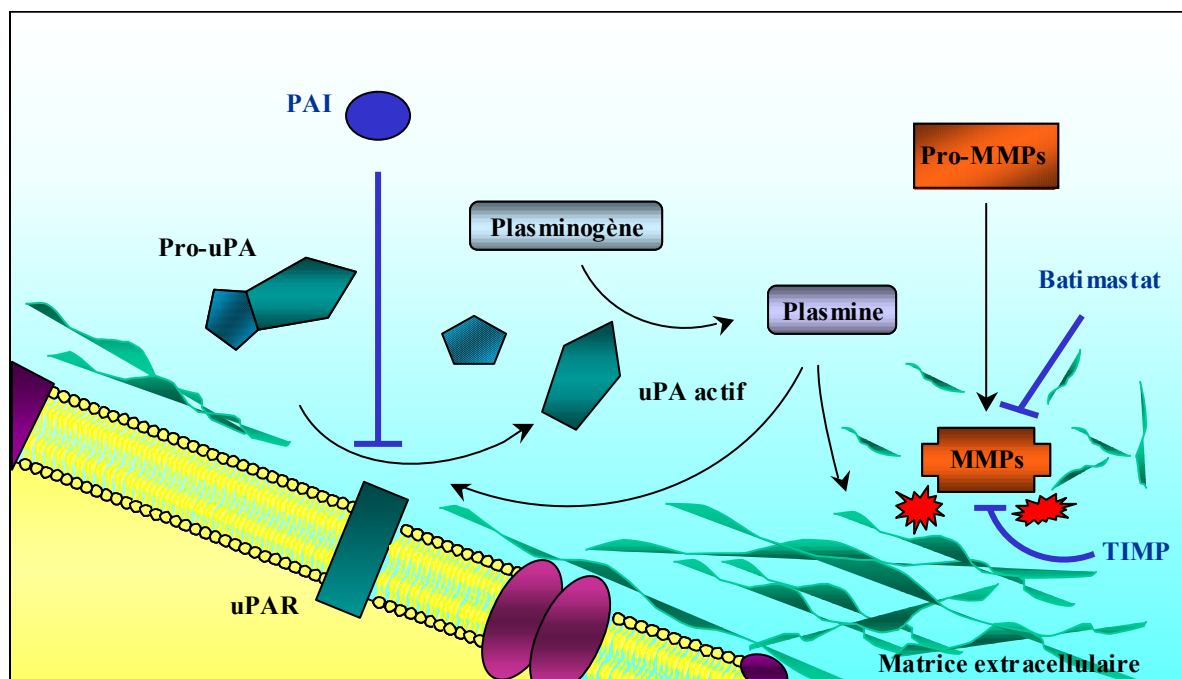


Figure 21 : Représentation schématique de la cascade de signalisation de l'activation des métalloprotéases (MMPs). Les effets inhibiteurs des composés utilisés sont indiqués en bleu. Pro-uPA: Pro- urokinase Plasminogen Activator; uPA : urokinase Plasminogen Activator; PA: Plasminogen Activator; PAI : Plasminogen Activator Inhibitor ; Pro-MMPs: Pro-Metalloproteinases ; MMPs : Metalloproteinases ; TIMP : Tissue Inhibitor of MMP.

métastatique). Les inhibiteurs non peptidiques ont été synthétisés sur la base de la conformation tridimensionnelle du site de fixation des MMPs et sont plus spécifiques que les précédents (exemples : Prinomastat, BAY 12-9566, BMS-27529, CGS27023A). L'inhibiteur naturel le plus utilisé est le Neovastat, molécule extraite du cartilage de requin. Son effet est surtout basé sur l'inhibition de l'angiogenèse par son action sur le VEGF-R2 et sa capacité à induire l'apoptose des cellules endothéliales. Le Metastat, dérivé de la tétracycline, a une activité anti-métastatique. Quant aux bisphosphanates, ils sont utilisés essentiellement dans les traitements des cancers du sein avec métastases osseuses, puisqu'ils ont été développés comme inhibiteurs de la résorption osseuse.

II- 4- Conclusion : les enjeux de ces nouvelles thérapies.

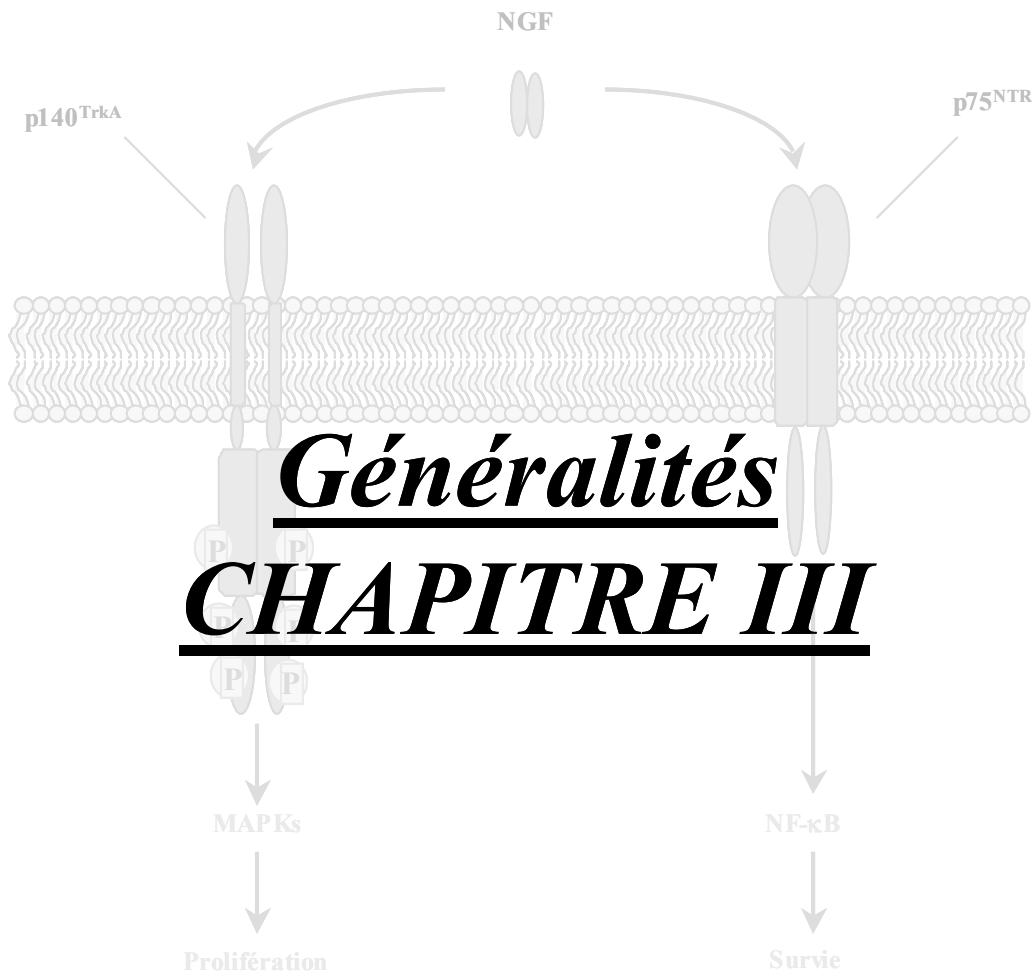
Nous n'avons abordé que quelques mécanismes possibles pour ces biothérapies telles qu'elles viennent d'être décrites, mais il est clair que toutes les voies biochimiques de la cellule peuvent être la cible de ce type de molécules. De plus, les résultats prometteurs de certaines molécules ne doivent cependant pas faire oublier les problèmes à résoudre pour optimiser ces approches thérapeutiques. A savoir, la difficulté de l'apport des inhibiteurs aux sites tumoraux, et la rencontre des problèmes de mise en place de mécanismes d'échappement par les cellules tumorales. L'amélioration de la distribution des drogues et l'étude des mécanismes de résistance, sont à présent en plein essor. Nous venons de le montrer, ces nouvelles thérapies agissent par des mécanismes d'action assez spécifiques sur des cibles clairement identifiées. Par conséquent, il est important que ces cibles thérapeutiques soient présentes sur les tumeurs, afin de permettre une activité de ces drogues. Il devient donc nécessaire de définir des stratégies qui visent à identifier, de façon simple, reproductible, efficace et non envahissante pour les patients, l'éventuelle présence de ces cibles. Deux stratégies peuvent alors être envisagées : l'une, ne s'adressant qu'à la population tumorale exprimant la cible, et à fortiori, ne traiter que ces patients. L'exemple typique en est la surexpression d'ErbB2 et le traitement par l'Herceptine. Un test immunologique de mise en évidence de la surexpression de Erb-B2 permettrait de proposer un traitement avec l'anticorps. L'autre stratégie consiste à traiter toute la population malade dans laquelle on sait que la cible est représentée avec une grande fréquence sans chercher à discriminer individuellement l'absence ou la présence de la cible.

Le cancer a une base multifactorielle et polygénique, qui confère à chaque tumeur un potentiel évolutif propre, mal appréhendé par les systèmes de classifications existants. La classification des tumeurs repose encore sur des observations cliniques (taille de la tumeur, envahissement ganglionnaire, présence de métastases) et histologiques (origine tissulaire, type, grade histopronostique). Ce manque de résolution est l'une des raisons des échecs thérapeutiques actuels. Aujourd'hui, le développement de techniques d'analyse du génome, du transcriptome et du protéome rend possible des études biologiques systématiques, débouchant en particulier, sur le choix de cibles thérapeutiques spécifiques et efficaces.

Un autre problème du développement de ces molécules est soulevé par des critères de toxicité ou de réponse. En effet, les modèles animaux, précédemment développés pour tester les agents cytotoxiques classiques, sont mal adaptés à ces médicaments. Il faut par conséquent

imaginer des critères de jugements sur le plan pharmacologique qui permettront de prédire l'efficacité de ces nouvelles approches thérapeutiques. La perspective future étant à la fois la guérison et le dépistage précoce d'un état cancéreux. Le typage des tumeurs devient alors indispensable et nécessaire à la réalisation de ces ciblage thérapeutiques. Aujourd'hui, ou dans les jours à venir, la carte d'identité de chaque tumeur, représentant l'emprunte maligne d'un patient, sera en mesure d'indiquer l'inefficacité d'un traitement ou de modifier le traitement inapproprié. Demain, en fonction des évolutions technologiques et de la recherche, la tumeur sous code barre n'est peut être pas si inimaginable qu'il puisse paraître.

Nous avons encore beaucoup à apprendre des facteurs de croissance qui sont sollicités lors de la progression tumorale mais la recherche actuelle avance à grands pas. L'identification de nouveaux facteurs de croissance, accompagnée du décryptage de leurs voies de signalisation, va permettre non seulement d'agrandir la famille de ces polypeptides, mais surtout apporter un choix supplémentaire dans la stratégie anticancer.



COMPLEMENT

Analyse Protéomique des Partenaires de PTPL1/ FAP-1 dans les Cellules de Cancer du Sein

Nous avons montré que le 4-OH-tamoxifène inhibe l'effet mitogène du NGF par induction de PTPL1/ FAP-1, en inhibant la tyrosine phosphorylation de p140^{TrkA} et des MAPKs, normalement activés lors de la stimulation du NGF. Nous avons donc recherché le mécanisme de cette inhibition, mais à ce jour aucune interaction physique potentielle entre FAP-1 et p140^{TrkA} n'a pu être détectée. Nous avons alors utilisé l'approche protéomique pour identifier les partenaires potentiels interagissant avec FAP-1. Ces résultats préliminaires sont montrés dans la partie suivante.

**ANALYSE PROTEOMIQUE
DES PARTENAIRES DE FAP-1
DANS LES CELLULES DE CANCER DU SEIN.**

I- INTRODUCTION.

Nos travaux montrent que FAP-1 inhibe l'effet mitogène induit par le NGF au niveau de la phosphorylation du récepteur p140^{TrkA} et des MAPKs. Se pose alors la question du mécanisme de cette inhibition et des partenaires moléculaires de FAP-1. Pour répondre à cette question, nous avons utilisé l'analyse protéomique, que notre laboratoire développe depuis plusieurs années pour l'analyse de cellules de cancer du sein (Vercoutter-Edouart *et al.*, 2001 ; Hondermarck *et al.*, 2001). Notre laboratoire a d'ailleurs été pionnier dans l'installation de la plateforme d'analyse protéomique de la Génopôle de Lille (http://www.genopole-lille.fr/fr/plateaux_techniques/proteomique/).

II- MATERIEL ET METHODES.

Les applications de l'analyse protéomique reposent sur une méthodologie résumée dans la figure 22.

II- 1- Extraction des protéines et immunoprécipitation de FAP-1 et de ses partenaires.

Les tampons de lyse cellulaire utilisés sont les mêmes que ceux de nos études précédentes (Vercoutter-Edouart *et al.*, 2001). L'immunoprécipitation de FAP-1 nécessite l'anticorps anti-FAP-1 (sc-1138) fourni par Santa Cruz. Nous avons utilisé le principe décrit par Dynal Biotech en employant de la protéine G couplée à des billes magnétiques. Brièvement, après incubation des lysats cellulaires avec l'anticorps anti-FAP-1 pendant une nuit à 4°C, les billes magnétiques (Dynabeads) ont été ajoutées pendant 2h. Seules les parties constantes des anticorps vont se fixer sur la protéine G magnétisée. Avec un racle magnétique nous avons immunoprécipité les billes couplées aux anticorps, et par conséquent FAP-1 et ses partenaires. Enfin, 3 rinçages successifs ont été nécessaires pour laver les immunoprécipitats.

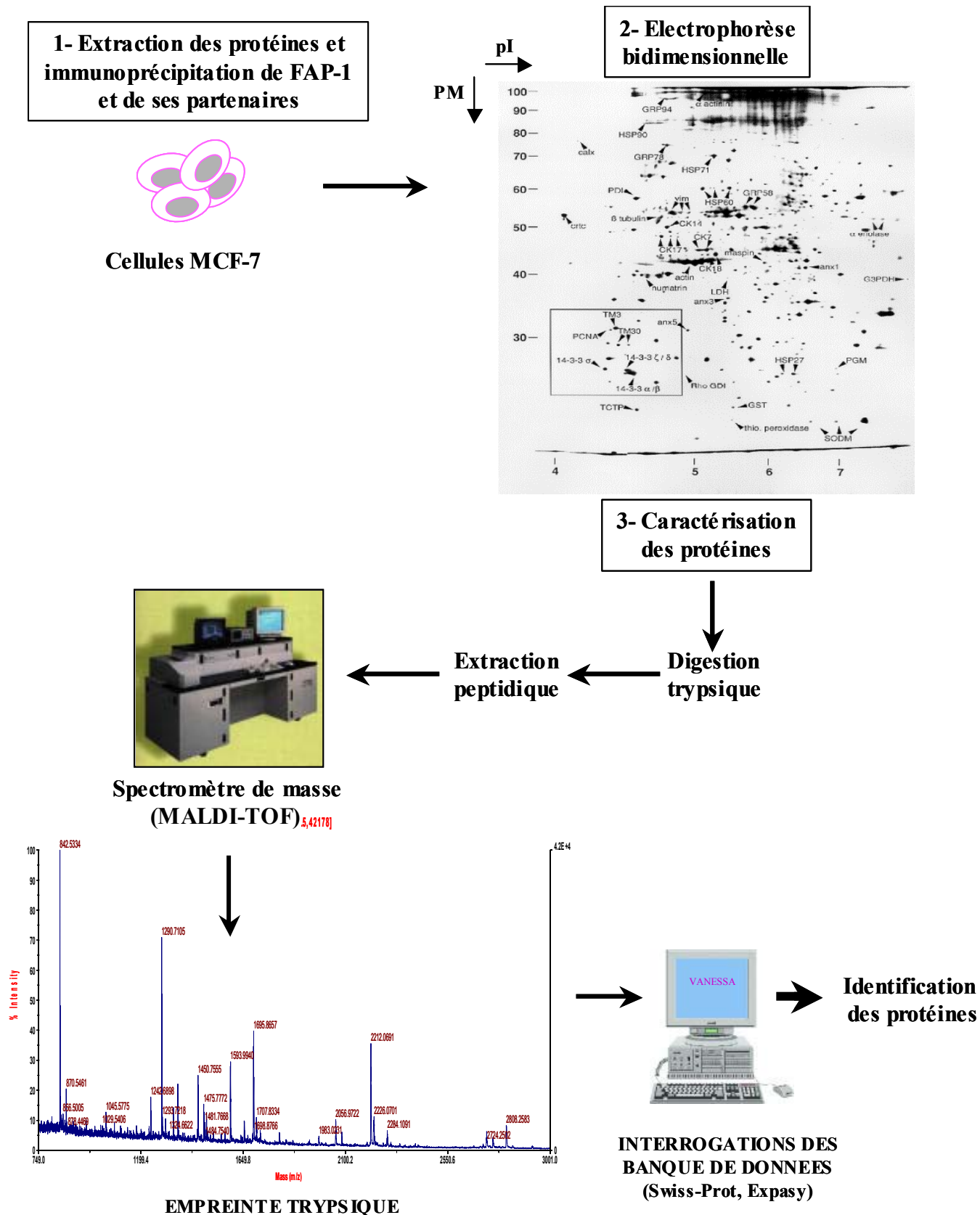


Figure 22 : Principe de l'analyse protéomique. Après extraction des protéines totales provenant de la lignée cancéreuse MCF-7, nous avons immunoprécipité FAP-1. La séparation des protéines s'effectue par électrophorèse bidimensionnelle couplant, d'une part, leur séparation en fonction de leur charge (pI : point

isoélectrique) et de leur masse moléculaire (PM). La détection des protéines se réalise par la coloration au bleu colloïdal. Elles apparaissent sous forme de spots. Ensuite, chaque spot a été découpé puis digéré par la trypsine. Enfin, chaque digestat a été dessalé et analysé en spectrométrie de masse en mode MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation- Time of Flight). L'empreinte peptidique représente le type de spectre MALDI-TOF obtenu pour un spot. L'interrogation des banques de données nous permet d'identifier la protéine à la fois avec l'aide du spectre MALDI-TOF mais aussi avec le pI et le PM caractérisés en électrophorèse 2D.

Enfin, le tampon de Laemmli ajouté, les immunoprécipitations sont mises à 100°C pendant 5 min.

II- 2- Electrophorèse bidimensionnelle.

L'électrophorèse bidimensionnelle est basée sur l'utilisation séquentielle d'une isoélectrofocalisation (IEF) et d'une séparation en gel de polyacrylamide en présence de SDS (sodium dodecyl sulfate). Ce principe permet alors de séparer les protéines en fonction de leur point isoélectrique (pI) et de leur poids moléculaire (PM). Les conditions utilisées ont été décrites dans Vercoutter-Edouard *et al.* (2001) et Hondermarck *et al.* (2001). Dans la première dimension, les protéines sont soumises à une électrophorèse présentant un gradient de pH continu (de 4 à 10). Au moment où le pH est égal à leur pI, les protéines ne migrent plus. Dans la deuxième dimension, réalisée dans un gel réticulé constitué de polyacrylamide (10%), les protéines entourées de SDS migrent selon leur masse moléculaire, indépendamment de leur charge. Dans nos travaux, la détection des protéines s'est faite par coloration au bleu colloïdal.

II- 3- Identification des protéines par spectrométrie de masse.

L'identification des protéines présentes dans les gels 2D repose sur l'utilisation combinée de la spectrométrie de masse et des bases de données. La spectrométrie de masse a permis la réduction considérable des quantités de protéines nécessaires à l'identification (revue Matsuo & Seyama, 2000). Quant aux progrès de l'informatique, combinés à la génomique, ils ont permis l'élaboration des banques de données où se compilent des sommes croissantes d'informations. Dans nos travaux nous avons utilisés les protocoles décrits Vercoutter-Edouard *et al.* (2001) et Hondermarck *et al.* (2001). Avant l'utilisation du

spectromètre de masse, les protéines séparées par la 2D sont digérées directement dans le gel par la trypsine. Pour nos travaux, nous avons utilisés le spectromètre de masse en mode MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation- Time of Flight) pour l'étude des composés peptidiques.

III- RESULTATS.

III- 1- Electrophorèse 2D des protéines co-immunoprécipitées avec FAP-1.

Nos expériences de mise en évidence des partenaires de FAP-1 ont été réalisées avec le protocole précédemment décrit. Les gels 2D ont été colorés au bleu colloïdal (figure 23). Chaque spot est représenté par un numéro et est défini par son pI et son PM.

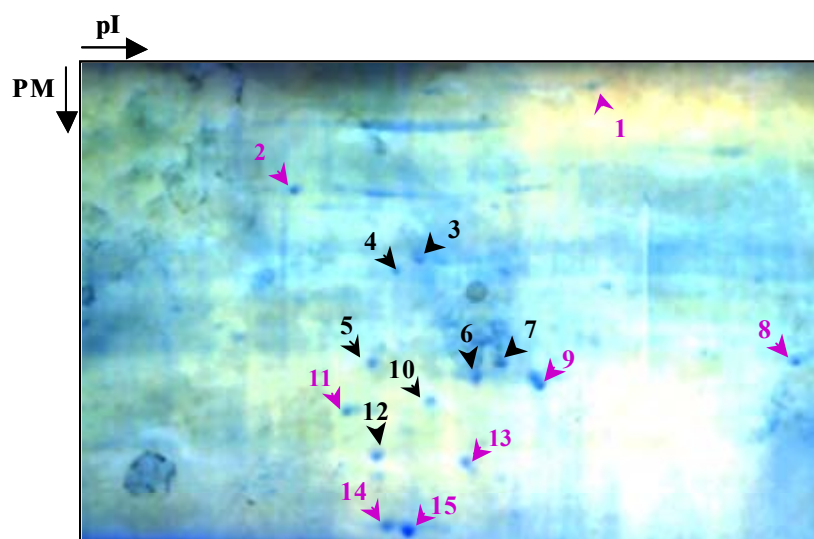


Figure 23 : Gel 2D coloré au bleu colloïdal correspondant à un dépôt de protéines co-immunoprécipitées avec FAP-1. Les flèches rouges indiquent les protéines caractérisées, et les flèches noires les protéines non identifiées.

III- 2- Identification des protéines co-immunoprécipitées avec FAP-1.

Après l'extraction du gel et digestion tryptique, chaque spot a été analysé en spectrométrie de masse en mode MALDI-TOF. Les protéines correspondantes aux numéros 1, 2, 8, 9, 11, 12, 13 et 14 ont été caractérisées et sont représentées dans la table 3. Chaque

MALDI-TOF	soumises	“matched”	delta (ppm)	Protéines identifiées
	1242.6878 1290.7012 1361.7705 1450.7489 1593.0020 1694.8842	1242.6806 1290.6806 1361.7429 1450.7178 1592.9528 1694.8502	5.8 16 20 21 31 20	Mortaline (HSP70) 21264428
	1410.6484 1607.7976 1800.8494 2519.1882 2870.3752 2960.3267	1410.6290 1607.7746 1800.8404 2519.1942 2870.4035 2960.2936	14 14 5.0 -2.4 -9.8 11	Calréticuline 4757900
	1039.6250 1130.6354 1143.6688 1229.6447 1245.6178 1319.7218 1620.8857	1039.5940 1130.5958 1143.6349 1229.5989 1245.5938 1319.7033 1620.8361	30 35 30 37 19 14 31	Tubuline β 7106439
	897.4242 913.4001 1307.7172 1323.6857	897.4140 913.4089 1307.6782 1323.6731	11 -9.7 30 9.5	Cytokératine 9 4557705

Table 3

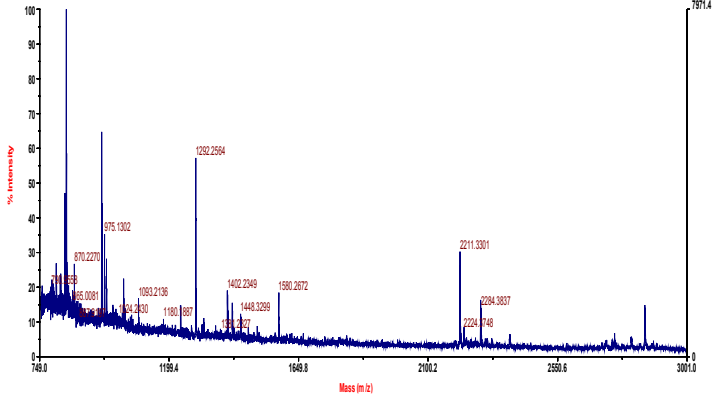
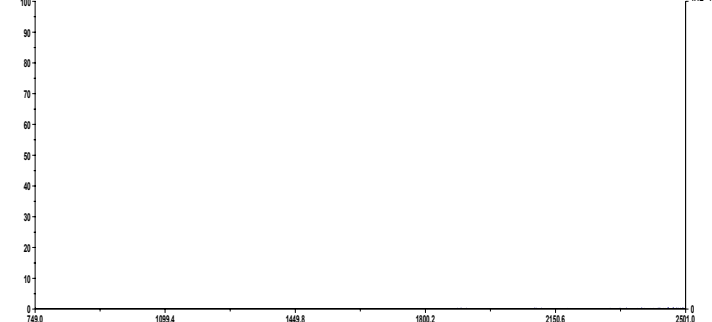
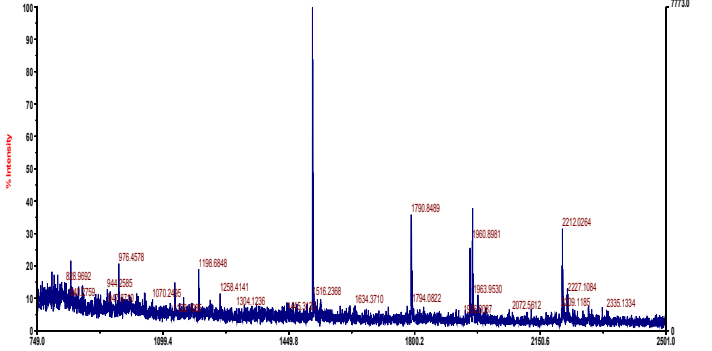
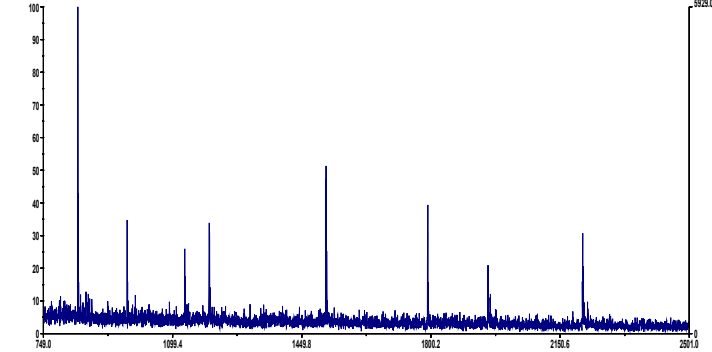
MALDI-TOF	soumises	"matched"	delta (ppm)	Protéines identifiées
	965.4836 975.4691 1093.5864 1239.6439 1292.7001 2854.4042	965.4692 975.4536 1093.5642 1239.6407 1292.7484 2854.4084	15 16 20 2.6 -16 -1.5	<u>Cytokératine</u> 18 106851
	827.4322 1030.5599 1129.6626 1419.7838	827.4303 1030.5686 1129.6217 1419.7484	2.3 -8.4 36 25	<u>Cytokératine</u> 8 87303
	976.4401 1198.6709 1515.7485 1790.8685 1954.0612	976.4488 1198.7061 1515.7497 1790.8925 1954.0650	-8.9 -29 -0.8 -13 -1.9	<u>Actine β</u> 14250401
	976.4509 1132.5344 1198.7115 1515.7640 1790.9188 1954.1300	976.4488 1132.5275 1198.7061 1515.7497 1790.8925 1954.0650	2.1 6.1 4.5 9.4 15 33	<u>Actine γ</u> 7441428

Table 3 : Caractéristiques des protéines identifiées par spectrométrie de masse. Chaque protéine a son empreinte trypsique, les masses des fragments trypsiques (masses soumises), les masses peptidiques de la digestion théorique (MH+ matched), l'écart par rapport à la masse théorique en ppm, le nom de la protéine suivi en dessous de son numéro d'accèsion trouvé dans MS-Fit Search.

protéine est alors identifiée par son empreinte trypsique, son pI et son PM. Au cours de ces travaux, nous avons utilisé « MS-Fit Search » comme banque de données afin d'identifier les protéines partenaires de FAP-1. Les spots 3, 4, 5, 6, 7, 10 et 12 n'ont donné jusqu'à présent aucun résultat. Dans la table 3, chaque protéine identifiée est caractérisée par son empreinte trypsique (masses des fragments trypsiques) obtenue par les analyses MALDI-TOF, soumises à la recherche informatique ; par les empreintes peptidiques contenues dans les banques de données protéiques et issues de la digestion enzymatique théorique des protéines correspondantes (MH+ « matched »), l'écart par rapport à la masse théorique (delta en ppm) et enfin le nom de la protéine ainsi identifiée suivi de son numéro d'accèsion.

IV- CONCLUSION.

Nos travaux apporte l'identification de protéines éventuelles, appartenant au du cytosquelette (tubuline β , actine β et γ , calréticuline et les cytokératines 8, 9 et 18), co-immunoprécipitées avec FAP-1. Ces expériences préliminaires suggèrent une localisation submembranaire de FAP-1, ce qui est en accord avec Bompard *et al.* (2003). Néanmoins, à ce stade, d'autres expériences sont nécessaires pour valider ces candidats potentiels. Mais il est intéressant de noter qu'une interaction de FAP-1 et de la tubuline alpha a déjà été observée (Pasquali *et al.*, 2000). Dans nos expériences, sur une vingtaine de protéines visualisées sous forme de spot au bleu colloïdal, 1/3 n'a pas permis une identification après digestion trypsique. Ces spots correspondaient aux intensités de coloration les plus faibles, suggérant que la quantité de matériel était insuffisante pour une détection au MALDI-TOF. Encore 1/3 des spots, après digestion peptidique, suivi de l'analyse par MALDI-TOF n'a pas fournit d'identification dans les banques de données, même après l'utilisation de la spectrométrie de masse en tandem. Le 1/3 restant nous informe que nous avons identifier des protéines du cytosquelette et deux protéines chaperonnes (calréticuline et HSP70). D'autres étapes limitantes de l'analyse protéomique s'ajoutent, à savoir le caractère hydrophobe et insoluble

de certaines protéines, et en particulier de p140^{TrkA}, ce qui rend leur étude par électrophorèse 2D incertaine. Pour éviter ces difficultés, notre laboratoire développe actuellement des méthodes off-gel, telle que la technique ICAT (Isotope-coded affinity tagging) qui utilise uniquement la spectrométrie de masse (Aebersold & Mann, 2003).

Revue 2

**Functional Proteomics of Breast Cancer for signal Pathway
Profiling and Target Discovery**

Sous presse dans **The Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia.**

DISCUSSION

Les résultats des travaux présentés dans cette thèse montrent pour la première fois que :

- Le NGF est surexprimé dans les cellules tumorales mammaires. En effet, son expression est retrouvée dans toutes les lignées cancéreuses mammaires que nous avons étudiées. Cette expression est spécifique des lignées tumorales puisque le NGF n'est pas détecté dans les cellules épithéliales mammaires normales.
- Le NGF stimule de façon autocrine la croissance des cellules tumorales mammaires.
- Le 4-OH-tamoxifène inhibe l'effet mitogène du NGF par induction de la tyrosine phosphatase FAP-1/PTPL-1. En effet, FAP-1 inhibe la tyrosine phosphorylation de p140^{TrkA} et des MAPKs.
- La voie de signalisation de p75^{NTR} nécessite la protéine TRADD pour l'obtention de l'effet anti-apoptotique du NGF. La stimulation de la survie des cellules cancéreuses par le NGF implique la fixation de TRADD. De plus, nous avons montré que cette interaction p75^{NTR}/ TRADD met en jeu le domaine de mort de TRADD.

La croissance des cellules de cancer du sein est régulée par différents facteurs de croissance qui stimulent ou inhibent leur prolifération, différenciation et migration (revues dans Ethier, 1995 ; Le Bourhis *et al.*, 2000), parmi lesquels nous pouvons inscrire le NGF comme facteur autocrine. L'identification de nouvelles molécules capables de moduler la croissance des cellules mammaires et la connaissance de leurs mécanismes de signalisation constituent un élément important pour la compréhension de la cancérogenèse mammaire, ainsi que pour la conception de stratégies innovantes contre cette pathologie. L'ensemble de nos résultats s'intègre entièrement dans ce contexte et ouvre de nouvelles perspectives pour le traitement de cette pathologie. Notre discussion s'articule autour de trois axes:

I- La production du NGF par les cellules tumorales mammaires.

II- La signalisation du NGF dans ces mêmes cellules.

III- L'intérêt pratique du NGF dans le cancer du sein.

I- LA PRODUCTION DU NGF.

I- 1- Pourquoi une dérégulation de la production de NGF dans les cellules tumorales mammaires ?

Plus d'un demi siècle d'études sépare l'effet neurotrophique du NGF sur les neurones de la découverte de son implication dans le cancer du sein. L'effet du NGF sur les cellules épithéliales mammaires n'ayant pas été suspecté jusqu'à présent, l'expression de ce facteur de croissance dans cet organe n'avait fait l'objet que de peu d'études. Les seules indications montrant la présence du NGF dans la glande mammaire reposaient essentiellement sur l'immunodétection (Murphy *et al.*, 1977) et l'activité biologique (Grueters *et al.*, 1985) de ce facteur dans le lait de souris. Quant à l'espèce humaine, une immunoréactivité anti-NGF avait été rapportée au niveau d'implants mammaires (Lossing & Hansson, 1993). Cependant, aucune de ces études n'avait replacé l'origine du NGF présent dans la glande mammaire. La provenance de ce NGF pouvait être la circulation générale ou provenir d'une production locale, puisque le sein est un organe richement vascularisé, et que la présence de NGF avait déjà été rapportée dans la circulation sanguine (Bonini *et al.*, 1996). Nous avons montré que le NGF est surexprimé par les cellules épithéliales cancéreuses alors qu'il n'est pas produit par les normales. De plus, Le NGF stimule de façon autocrine la croissance des cellules

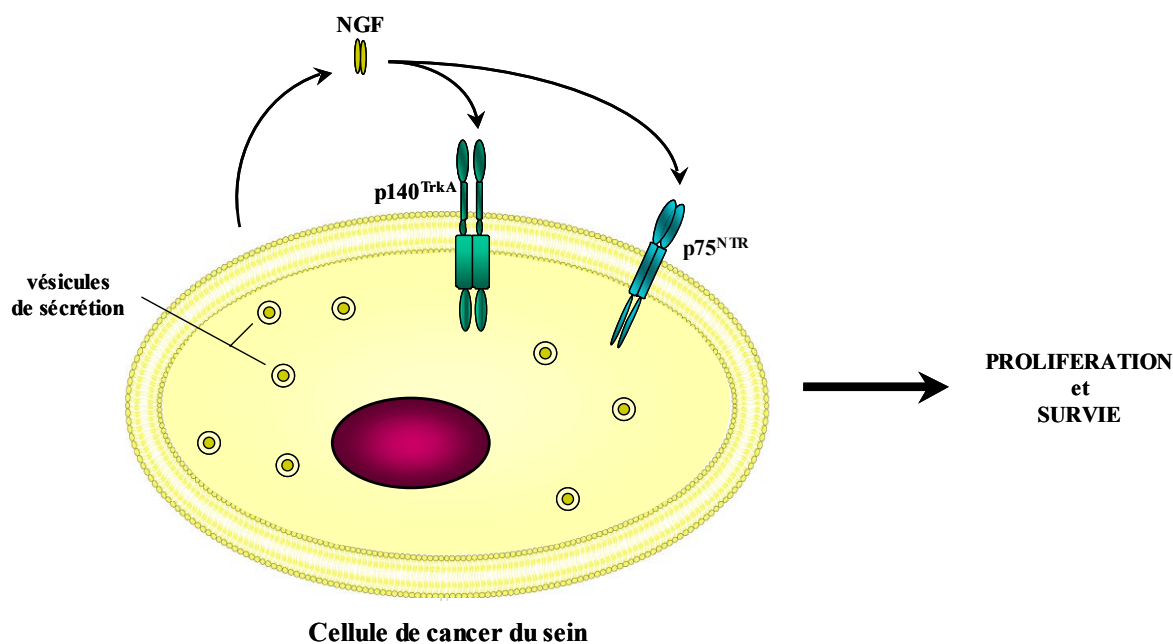


Figure 24 : Représentation schématique de la stimulation autocrine du NGF dans les cellules cancéreuses mammaires.

tumorales mammaires (figure 24). La surexpression de facteurs de croissance et de leurs récepteurs avait déjà été démontrée (Bange & Zwick, 2001), comme les FGFs/ FGF-Rs, l'IGF-I/ IGF-RI et erb-B2. Néanmoins, contrairement aux FGFs, l'expression du NGF apparaît être plus tissu spécifique, puisque seulement quelques types cellulaires produisent et libèrent cette neurotrophine. Il est largement admis qu'avant l'émergence clinique du cancer, plusieurs mutations ont eu lieu, entre l'exposition à un carcinogène (phase d'initiation), la promotion d'un clone transformé (phase de promotion), et l'indépendance de ce clone vis-à-vis des facteurs de régulation physiologiques (pouvoirs d'invasion et de métastase) (phase de progression). Par les analyses de cytogénétique classique comme l'hybridation génomique comparative (CGH) et l'étude du polymorphisme de taille des fragments de restriction ont conduit à l'identification de « gènes de cancer ». Ainsi, les pertes d'allèles inactivent des gènes suppresseurs de cancer, quant aux amplifications, elles sont responsables de l'activation d'oncogènes. Le gène du *ngf* se localise sur le bras court du chromosome 1 (figure 25) : 1p13.1 (Francke *et al.*, 1983; Scott *et al.*, 1983). Nous notons que les altérations du chromosome 1 sont l'une des anomalies les plus régulièrement observées dans le cancer du sein (Hainsworth *et al.*, 1992 ; Bièche *et al.* 1993, 1999 ; Tanaka *et al.*, 1993 ; Schwab *et al.*, 1996). Par conséquent, on peut imaginer qu'au cours de la progression tumorale la mutation du *ngf* pourrait être une étape nécessaire pour ce processus de transformation. Par exemple, une amplification du locus serait éventuellement responsable de la synthèse accrue de NGF par les cellules tumorales touchées par cette mutation.

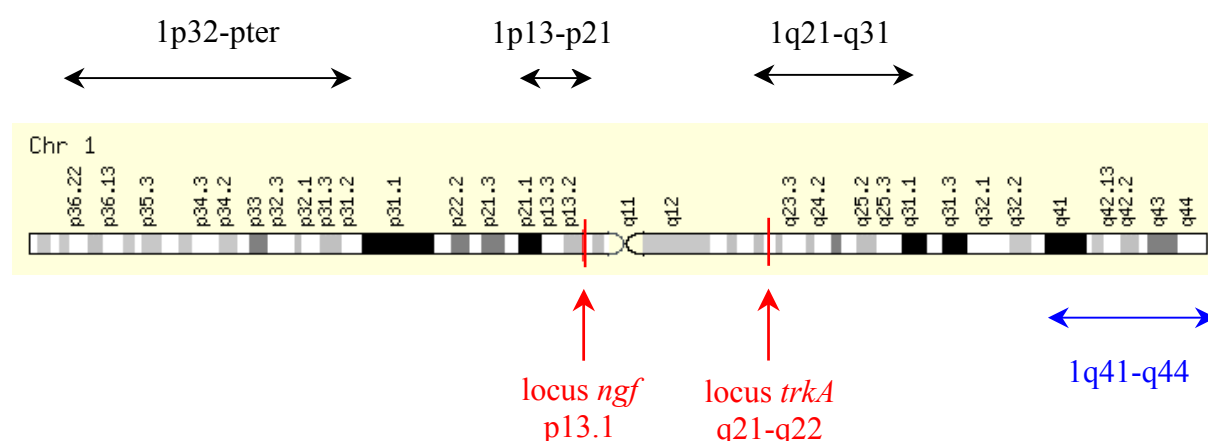


Figure 25: Représentation schématique du chromosome 1. Les flèches rouges indiquent les loci des gènes *ngf* et *trkA*. Les doubles flèches noires montrent les LOH connus du chromosome 1 alors que les doubles flèches bleues désignent les amplifications. p: bras court; q: bras long.

Il est intéressant de noter que, dans les cellules normales, certaines protéines sont surexprimées par rapport aux cellules tumorales, et que ce fait soit corrélé avec l'existence de modifications épigénétiques (pour revue Hanahan & Weinberg, 2000 ; Widschwendter & Jones, 2002). En effet, l'importance d'expression des protéines 14-3-3 σ (Ferguson *et al.*, 2000) et cycline D2 (Evron *et al.*, 2001), dans les cellules normales versus cancéreuses, réside dans l'hyperméthylation du promoteur de ces gènes dans les cellules malignes, expliquant alors leur absence respective dans ces dernières. Des modifications épigénétiques similaires pourraient alors expliquer la surexpression du NGF dans les cellules tumorales versus sa non expression dans les cellules épithéliales mammaires normales.

De même, une stabilité de l'ARNm du NGF pourrait être responsable d'une expression élevée dans les cellules malignes. Au même titre, une augmentation de l'instabilité de l'ARNm du NGF dans les cellules normales répondrait également à ces différences d'expression.

Au sein de la cellule tumorale mammaire, le problème pourrait résider au niveau des facteurs de transcription qui permettent au gène *ngf* d'être transcrit. En effet, une surexpression de facteurs de transcription dans les cellules ainsi transformées pourrait, en se fixant sur leur sites consensus au niveau de l'ADN, situés en amont du gène *ngf*, permettre une transcription accrue du NGF. Cependant, aujourd'hui, l'identité de ces facteurs de transcription reste inconnue. Il serait donc primordial de se lancer dans l'identification de sites consensuels de fixation pour connaître les facteurs de transcription qui activent le gène *ngf*. Nous avons mené une approche préliminaire en utilisant des programmes informatiques nommés « TFSEARCH » et « ALIBABA » qui compilent l'ensemble des données (« TRANSFAC ») concernant les sites consensuels des facteurs de transcription et leur potentielle présence dans les séquences soumises à la recherche (Wingender, 1994). Après introduction de la séquence en amont du promoteur du *ngf* dans cette banque de données, nous trouvons entre autre un site potentiel pour le facteur de transcription NF- κ B. D'un côté, nous montrons la surexpression de NGF dans les cellules tumorales et de l'autre nous trouvons que NF- κ B pourrait induire la transactivation du NGF. Nous pouvons alors nous interroger sur l'incidence des suractivations de NF- κ B fréquemment retrouvées dans les tumeurs mammaires dans cette surexpression de NGF. En effet, il est connu que les mutations des voies anti-apoptotiques permettent une survie accrue des cellules en inhibant l'apoptose. D'autre part, l'activation constitutive de NF- κ B est observée dans la lignée MDA-MB-231 qui représente un stade plus avancé du cancer du sein (Nakhastrri *et al.*, 1997). Nous pouvons

émettre l'hypothèse que NF- κ B en se fixant sur le promoteur du *ngf* augmente la transactivation du gène *ngf* ce qui conduit à une surexpression du NGF. Néanmoins, des études de liaison et de transactivation de NF- κ B et d'autres facteurs de transcription sur le promoteur du *ngf* sont nécessaires pour valider cette hypothèse. Cependant, la découverte de l'action de NF- κ B sur la transactivation du *ngf* a un intérêt double. Non seulement, on montrerait l'intervention de NF- κ B comme étant un des facteurs de transcription du NGF, mais en plus, cela affirmerait la boucle d'autocrinie du NGF observée dans les cellules tumorales mammaires. Néanmoins, pour vérifier la présence réelle de ces sites, des études d'analyses du promoteur et de la séquence en amont et en aval de la séquence codante sont nécessaires.

I- 2- Sécrétion constitutive ou régulée du NGF dans les cellules cancéreuses mammaires ?

Il est démontré qu'au cours de la progression tumorale, le gain d'une autocrinie pour un facteur de croissance est élevé (voir « Généralités, Chapitre 1) (Bange & Zwick, 2001). L'acquisition par les cellules tumorales mammaires de l'autocrinie du NGF s'avère être un avantage. Il est connu que le NGF peut également agir par voie autocrine ou paracrine sur d'autres types cellulaires. En effet, dans l'épiderme, le NGF est produit par les kératinocytes et stimule leur prolifération selon une boucle autocrine (Di Marco *et al.*, 1993), et la prolifération des mélanocytes par voie paracrine (Yaar *et al.*, 1991). Par ailleurs, le NGF joue un rôle important dans le système immunitaire. Il est produit par une variété de cellules immunocompétentes : les lymphocytes T (Ehrhard *et al.*, 1993) et B (Torcia *et al.*, 1996) et les macrophages (Barouch *et al.*, 2001). Bien que l'autocrinie du NGF semble être un moyen pour la cellule tumorale de proliférer activement, ou, par exemple, de permettre une différenciation pour les cellules de l'immunité, les connaissances sur le mécanisme par lequel les cellules produisent et libèrent le NGF s'avèrent quasi-inexistantes. D'ailleurs, de façon générale, peu de choses sont connues sur la libération des neurotrophines (NTs), contrairement aux avancées significatives dans l'identification des signalisations de ces polypeptides.

Il a été montré que les NTs utilisent à la fois la sécrétion constitutive et régulée (Blochl & thoenen, 1995 ; Goodman *et al.*, 1996 ; Heymach *et al.*, 1996). Communément, il

est admis que les cellules non neuronales libèrent les neurotrophines par une sécrétion constitutive, contrairement aux cellules neuronales qui ont en plus une sécrétion régulée (Kelly, 1991 ; McAllister *et al.*, 1999). Les NTs sont initialement synthétisées sous la forme d'un précurseur (« préproprotéine »), puis converties en une forme mature par différents clivages enzymatiques. En parallèle à cette maturation, Heymach *et al.* (1996) se sont demandés si le signal « pro- » était également nécessaire au mécanisme de libération du NGF, puisqu'il a été montré que ce signal « pro- » joue un rôle pour d'autres protéines dans leur sécrétion régulée (Journet *et al.*, 1993 ; Fortenberry & Chirgwin, 1995; Scheiffele *et al.*, 1995). Les mutants des précurseurs du NGF, ainsi que ceux du BDNF et de la NT-3, dans les domaines « pro », indiquent que ces signaux n'interviennent pas dans la sécrétion régulée de ces NTs. Il semblerait que le signal nécessaire à cette sécrétion régulée soit portée par la NT mature (Heymach *et al.*, 1996). La sécrétion régulée des NTs est dépendante de l'augmentation des concentrations calciques intracellulaires (Blochl *et al.*, 1995 ; Goodman *et al.*, 1996). Les interactions des NTs avec leurs récepteurs activent la signalisation conduisant à l'augmentation de calcium (Kaplan & Miller, 1997). Ces résultats suggèrent que les NTs pourraient induire la sécrétion contrôlée de NTs. En effet, la libération de NGF et de BDNF induites par les NTs, ont récemment été montrées dans certains neurones, de même dans les cellules PC12 (Canossa *et al.*, 1997). Ce processus a été décrit comme dépendant de l'activation des récepteurs Trks concomitante à la mobilisation de calcium, à partir de réserves cytoplasmiques. En comparant nos expériences utilisant l'ionomycine, et celles de libération du BDNF (Fawcett *et al.*, 1997 ; Moller *et al.*, 1998) et de NT-4/5 (Wang & Poo, 1997), nous sommes tentés de poser l'hypothèse d'une voie de sécrétion du NGF qui pourrait être fonctionnellement régulée dans les cellules tumorales mammaires. Nous connaissons peu les mécanismes de sécrétion du NGF puisque ce facteur est exprimé à des taux extrêmement faibles dans les neurones ou dans les autres cellules productrices. En parallèle aux travaux de Canossa *et al.* (1996), Krüttgen *et al.* (1997) ont observé une libération similaire de BDNF dans les cellules PC12, mais ont noté en plus de p140^{TrkA}, l'intervention de p75^{NTR} dans ce processus. Ensuite, ils ont montré, que le BDNF et le NGF induisent la sécrétion régulée de BDNF, NT-3 et NT-4/5 (Krüttgen *et al.*, 1998). Ainsi, l'effet du BDNF sur la libération de NT-3 peut être abolie par l'anticorps bloquant de p75^{NTR}, et non par le K-252a. Alors que le NGF libère la NT-3 *via*, à la fois, p140^{TrkA} et p75^{NTR}. Dans notre modèle cellulaire, nous ne pouvons affirmer l'implication de p140^{TrkA} et/ou de p75^{NTR} dans la sécrétion du NGF. En effet, nous n'avons pas vérifié si, sous l'influence du NGF, il y a ou non remodelage de la présence des vésicules de sécrétion. Dans la compréhension des processus de sécrétion de

NTs, des études récentes tentent de donner un rôle aux voies des céramides (Blochl & Sirrenberg, 1996 ; Casaccia-Bonnet *et al.*, 1996) et de PLC γ et d'IP3 *via* p75^{NTR} et p140^{TrkA} respectivement (Vetter *et al.*, 1991 ; Finkbeiner *et al.*, 1997).

Dans notre modèle de la cellule cancéreuse mammaire, nous avons pu détecter de grande quantité de NGF au sein de leur cytoplasme et dans le milieu. Nos travaux suggèrent donc d'utiliser les cellules de cancer du sein comme modèle privilégié pour l'étude de ces mécanismes de sécrétion des neurotrophines, et du NGF en particulier.

I- 3- Rôle neurotrophique du NGF dans le cancer du sein ?

L'innervation de la glande mammaire comprend trois grandes composantes : la principale correspond aux fibres afférentes somatiques (2^e au 6^e nerfs thoraciques) fournissant de nombreuses terminaisons nerveuses au niveau du mamelon. La seconde, aux fibres nerveuses sympathiques pour la stimulation des muscles lisses, essentiellement présents dans le mamelon, mais aussi dans les vaisseaux sanguins. Et enfin, la dernière est représentée par quelques fibres nerveuses sympathiques à destination des canaux (Mitchell *et al.*, 1994 ; Sarhadi *et al.*, 1996). Le sein est donc un organe bien innervé. Les neurotrophines (NTs), dont le NGF fait parti, sont des molécules de signalisation importantes à la fois pour le développement mais aussi pour le maintien de l'intégrité structurale des systèmes nerveux central et périphérique (Levi-Montalcini, 1987 ; Thoenen, 1991). En outre, les NTs sont impliquées dans la plasticité synaptique du système nerveux (Thoenen, 1995 ; Lu & Figurov, 1997 ; McAllister *et al.*, 1999 ; Poo, 2001), ce qui en fait de bons candidats comme agents thérapeutiques dans les maladies neurodégénératives, telle qu'Alzheimer. En effet, outre leurs rôles majeurs dans la différenciation et la survie des neurones, les NTs agissent aussi comme des modulateurs de l'activité synaptique et dans les modifications structurales des connexions synaptiques (revue Mendell & Arvanian, 2002). Il a été montré chez des patientes atteintes du cancer du sein que, les fibres nerveuses sont plus volontiers présentes au sein même des tumeurs qu'aux alentours de celles-ci (Taylor & Norris, 1967 ; Mitchell *et al.*, 1994 ; Schumacher *et al.*, 1994). En effet, lors de la progression tumorale, les cellules malignes ont besoin de plus de nutriments, lesquels sont distribués *via* la circulation sanguine avoisinante et celle créée pour pallier à la demande. L'innervation de ces vaisseaux tumoraux est donc importante pour leur activité vasodilatatrice qui permet un afflux plus important de nutriments aux cellules tumorales. Il apparaît, à priori cohérent, que dans les tumeurs la présence des

fibres nerveuses se trouve au niveau des vaisseaux sanguins où la tumeur a pris naissance. Peu d'articles apportent des informations concernant l'innervation des vaisseaux, néanmoins, il est montré que les artérioles sont abondamment innervées en comparaison des veinules et des capillaires (Gabella *et al.*, 1976). Cette innervation s'effectue avec les fibres nerveuses résidentes dans l'adventice des vaisseaux sanguins et avec les muscles lisses périphériques (Burnstock & Costa, 1975). Cette proximité de ces fibres nerveuses de la surface luminale pourrait les sensibiliser aux médiateurs contenus dans les vaisseaux. En considérant la localisation des cellules épithéliales dans la glande mammaire, il n'est pas exclu que la production de NGF par les cellules tumorales conduise à la diffusion du NGF dans la circulation sanguine. Ainsi, le NGF *via* la voie sanguine pourrait agir sur les fibres nerveuses pour moduler l'activité des muscles lisses des vaisseaux sanguins.

Dans le système nerveux périphérique, on attribue, entre autre, au NGF : le relargage de neurotransmetteurs et de neuropeptides (comme la substance P) (Lindsay & Harmar, 1989 ; Donnerer *et al.*, 1992) connus comme molécules impliquées dans le développement de la douleur. Par conséquent, la production de NGF est un régulateur majeur pour le système nerveux, au moyen duquel de nombreux tissus influencent la densité et la distribution de leur innervation sympathique. Dans le cancer du sein, la présence d'une douleur est observée dans environ 10% des cas, et pourrait s'expliquer par l'implication des fibres nerveuses associées à la tumeur, ou par une augmentation de la stimulation des fibres nerveuses préexistantes qui conduirait la douleur. Aujourd'hui, en ce qui concerne le cancer du pancréas, l'hypothèse d'une activation de telles fibres nerveuses semblent être le cas. En effet, Zhu *et al.* (1999) ont montré que la douleur est associée avec l'augmentation de l'expression de NGF dans les cellules cancéreuses pancréatiques et de p140^{TrkA} dans les fibres nerveuses proches de la tumeur. Jusqu'à présent, peu d'informations sont disponibles dans le cadre de la douleur et le cancer du sein. Par conséquent, nous pouvons émettre l'hypothèse que le NGF libéré par les cellules tumorales puisse interagir avec les fibres nerveuses et conduire à la douleur. Cette hypothèse peut être supportée par le fait que les NTs ont déjà été montrées comme jouant un rôle dans la transmission de la douleur physiologique et pathologique (Anand, 1995 ; Apfel, 2000). Les travaux de Mendell *et al.* (1999) vont également dans ce sens, en montrant l'implication du NGF dans la survie et la sensibilisation des neurones nocicepteurs. Ainsi, la présence de NGF ne serait pas exclusive pour les effets observés sur les cellules mammaires tumorales, mais pourrait provoquer une conduction de la douleur *via* l'augmentation de l'activité du système nerveux sympathique.

II- LA SIGNALISATION DU NGF.

II- 1- Mécanisme de l'inhibition de l'effet mitogène du NGF par FAP-1 ?

Mon travail de thèse démontre que FAP-1 est un modulateur de la voie de signalisation du NGF, et qui plus est, cette protéine tyrosine phosphatase est induite par le 4-OH-tamoxifène, anti-œstrogène couramment employé en clinique pour les patientes atteintes du cancer du sein. Les anti-oestrogènes sont capables de moduler spécifiquement l'expression de certains gènes, principalement en antagonisant l'effet des oestrogènes bien que des effets pro-oestrogéniques secondaires ont également été décrits (Huynh *et al.*, 1996). Il n'est donc pas étonnant que le 4-OH-tamoxifène régule l'expression de FAP-1, et qu'elle soit dépendante du récepteur aux oestrogènes (article 3). De plus, cette induction de FAP-1, par le 4-OH-tamoxifène, a déjà été montrée dans d'autres laboratoires (Freiss *et al.*, 1998). Les tyrosines phosphorylations résultent d'une balance entre l'activité des protéines tyrosines kinases (PTKs) et les protéines tyrosines phosphatases (PTPs). A ce jour, peu de mécanismes sont connus et démontrés pour tenter d'expliquer comment les PTPs sont régulées, contrairement aux multiples connaissances de la régulation des PTKs. Cependant, il est admis que la localisation des PTPs joue un rôle majeur dans la spécificité des substrats. Globalement, la localisation de ces enzymes dépend de domaines non catalytiques, dits structuraux, qui pourraient définir et limiter l'activité des PTPs à un nombre restreint de substrats. Parmi eux, les domaines FERMs (Four-point 1 Ezrine Radixine Moésine), et PDZ sont les plus connus. FAP-1 possède un domaine FERM, localisé dans la partie N-terminale de la protéine, et 5 domaines PDZ. Il est largement admis que les protéines possédant un domaine FERM sont localisées entre la membrane et le cytosquelette. De plus, les travaux de Bompard *et al.* (2003b) ont montré que la localisation de FAP-1 était submembranaire. Puisque nous observons une inhibition de phosphorylation sur p140^{TrkA}, nous pouvons émettre l'hypothèse que FAP-1 soit également localisée au niveau submembranaire. En conséquence, cette localisation submembranaire de FAP-1 serait en accord avec son action anti-proliférative face au stimulus NGF, permettant la « déphosphorylation » de p140^{TrkA}.

Par ailleurs, Bompard *et al.* (2003b) ont démontré que cette localisation particulière de FAP-1 était dépendante du domaine FERM, pour son adressage à la membrane, *via* deux sites de fixation du PIP₂ (phosphatidylinositol 4,5-biphosphate). Quant aux domaines PDZs, ils pourraient jouer un rôle dans la stabilisation de FAP-1 à la membrane (Bompard *et al.*, 2003b). Nous pouvons alors émettre les hypothèses suivantes : FAP-1 *via* son interaction

directe ou indirecte avec $p140^{\text{TrkA}}$ pourrait déphosphoryler les résidus tyrosines de $p140^{\text{TrkA}}$ (figure 26A). Cependant, aucune publication ne mentionne l'existence d'une telle interaction entre FAP-1 et $p140^{\text{TrkA}}$. De même, aucun résultat ne montre l'implication d'une protéine adaptatrice entre $p140^{\text{TrkA}}$ et FAP-1. Par contre, comme FAP-1 a été montrée interagissant avec $p75^{\text{NTR}}$ *via* ses domaines PDZs (Sato *et al.*, 1995), la potentielle implication de FAP-1

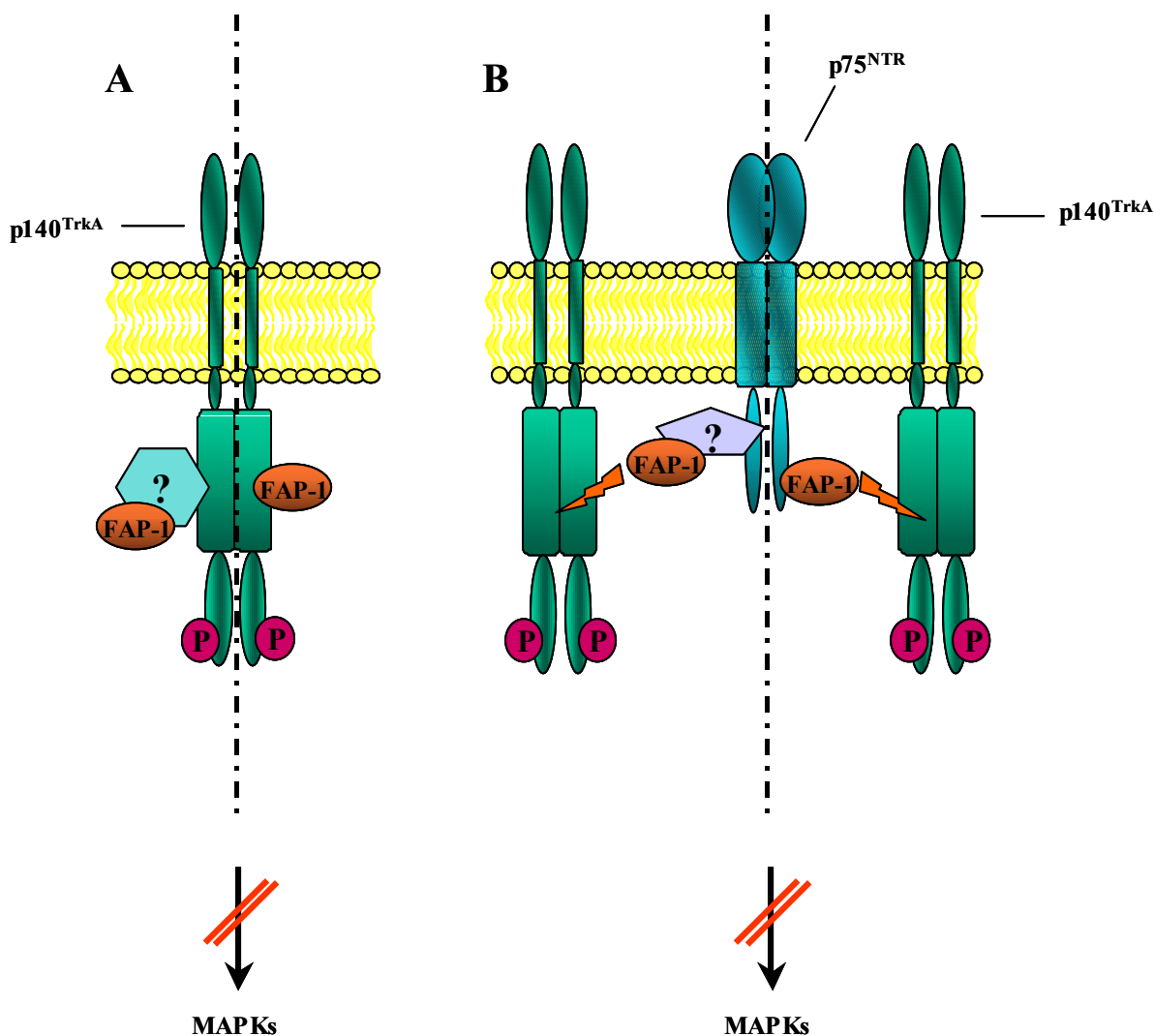


Figure 26: Mécanismes d'action éventuels de FAP-1 sur la voie de signalisation $p140^{\text{TrkA}}$ /MAPKs normalement induite par le NGF. L'action de FAP-1 sur cette signalisation pouvait s'expliquer de 2 façons différentes (A et B). La ligne en pointillés sépare chaque possibilité en 2 éventuelles interventions de FAP-1. **A.** FAP-1 inhibait l'effet mitogène du NGF *via* son action directe ou indirecte sur $p140^{\text{TrkA}}$ (protéine intermédiaire en turquoise). **B.** FAP-1 inhibait l'action mitogénique du NGF *via* sa fixation sur $p75^{\text{NTR}}$ ou encore par une protéine intermédiaire (en mauve) faisant relais entre $p140^{\text{TrkA}}$ et $p75^{\text{NTR}}$.

dans la modulation de la signalisation $p140^{\text{TrkA}}$ /MAPK pourrait requérir $p75^{\text{NTR}}$. En effet, il est largement connu que des interactions entre $p140^{\text{TrkA}}$ et $p75^{\text{NTR}}$ puissent avoir lieu (revue

Dollé *et al.*, 2003). *Via* son interaction avec p75^{NTR}, FAP-1 pourrait bénéficier du rapprochement de p140^{TrkA} avec p75^{NTR} pour déphosphoryler le récepteur tyrosine kinase (figure 26B), aboutissant à l'inhibition de l'effet mitogène du NGF. Pour vérifier ces hypothèses, des expériences de co-immunoprécipitations, de microscopie confocale et de transfection cellulaire, associées à l'analyse protéomique, sont en cours de réalisation au laboratoire, afin de déterminer quel mécanisme d'action est utilisé dans les cellules du cancer du sein.

II- 2- TRADD : une protéine « switch » dans la stimulation pro versus anti-apoptotique de p75^{NTR}?

Le NGF favorise la croissance des cellules de cancer du sein par la stimulation de la prolifération et de la survie. Pour assurer ces deux activités, ce facteur de croissance emprunte deux voies de signalisation distinctes : p140^{TrkA}/ MAPK pour conduire à l'effet mitogène, et p75^{NTR}/ NF-κB pour l'effet anti-apoptotique (Descamps *et al.*, 2001a). Le récepteur p75^{NTR} fait partie de la famille des TNF-Rs (Tumor necrosis factor-receptor), dont le récepteur prototype est TNF-RI. De plus, l'une des protéines recrutées par le TNF-RI est la protéine TRADD (TNF-RI-associated death domain protein) qui peut servir comme plateforme pour le recrutement d'autres protéines telles que les TRAFs (TNF-R-associated factors). Nos résultats montrent que TRADD est impliqué dans l'effet de survie du NGF dans les cellules tumorales mammaires en interagissant avec p75^{NTR} par l'intermédiaire de son domaine de mort (article 2). Dans la signalisation du TNF-RI, TRADD est connu comme étant la protéine adaptatrice, qui conduit à l'activation de NIK (NF-κB-inducing kinase), puis de IKK (I-κB kinase) pour permettre la translocation de NF-κB dans le noyau (Jones, 2000). Il semble donc que l'activation de p75^{NTR} implique une interaction similaire avec TRADD, semblable à celle observée pour le TNF-RI, suggérant une voie de signalisation identique. Néanmoins, des expériences de mise en évidence de l'intervention successive de NIK et IKK devraient être menées pour montrer leur implication dans la signalisation p75^{NTR}/ NF-κB dans notre modèle. A ce même titre, nous avons montré que le rôle des protéines TRAF-2 et TRAF-6 sont impliquées dans la signalisation p75^{NTR}/ NF-κB. Outre ce rôle de « protéine relais », TRADD pourrait également se voir attribuer le rôle de « protéine switch » entre les voies de signalisation pro et anti-apoptotique. Une sorte d'interrupteur qui permettrait, en fonction des types de stimuli, de faire vivre ou mourir la cellule. En effet, il a été montré que p75^{NTR} peut

moduler à la fois positivement et négativement l'apoptose selon le type cellulaire étudié (Mamadipudi & Wooten, 2002). Dans certains cas, p75^{NTR} est un inducteur d'apoptose (Rabizadeh *et al.*, 1993), alors que dans d'autres cas, l'activation de p75^{NTR} conduit à un effet protecteur (Gentry *et al.*, 2000). Nous posons l'hypothèse que TRADD puisse jouer un rôle dans le contrôle de la stimulation pro versus anti-apoptotique de p75^{NTR}.

II- 3- Pourquoi les cellules épithéliales mammaires normales sont-elles insensibles au NGF ?

Les résultats précédemment obtenus dans le laboratoire, complétés par mon travail de thèse, soulèvent un fait important : le NGF ne stimule pas les cellules épithéliales mammaires normales à proliférer, bien qu'il induise la phosphorylation de p140^{TrkA}, que le récepteur provienne des cellules épithéliales mammaires normales ou tumorales. Par ailleurs, le NGF ne déclenche pas l'activation de la voie des MAP-kinases dans les cellules épithéliales mammaires normales, alors que celle-ci est normalement induite par l'EGF. Nous pouvons émettre deux hypothèses pour comprendre cette différence de sensibilité au NGF. Ces cellules pourraient manquer d'un élément de transduction du signal entre p140^{TrkA} et les MAP-kinases. Ou bien, elles seraient soumises à un mécanisme particulier d'inhibition de cette transmission. Nous pouvons déjà écarter la possibilité d'une différence d'expression des récepteurs, puisque les cellules normales expriment à la fois p140^{TrkA} et p75^{NTR} (Descamps *et al.*, 1998). Il est montré que p140^{TrkA} non glycosylé n'atteint pas la surface cellulaire (Watson *et al.*, 1999), de même que p75^{NTR} (Breuza *et al.*, 2002). Il apparaît alors que les glycosylations de ces récepteurs semblent réguler leur localisation membranaire et leur activité. Néanmoins, la visualisation de ces protéines par Western Blot montre que leur masse moléculaire relative est bien de 140 et 75 kDa, que les protéines proviennent d'une cellule normale ou tumorale. Nous pouvons donc, à priori, écarter la possibilité d'une glycosylation différente pour expliquer la non stimulation des cellules normales par le NGF. La distinction des effets du NGF, entre les cellules tumorales et normales, pourrait faire intervenir une lacune dans la transmission du signal. Il est possible que les effets du NGF soient modulés par des interactions avec les récepteurs p140^{TrkA} ou p75^{NTR} et d'autres récepteurs de facteurs de croissance, qui ont lieu dans les cellules tumorales et n'existeraient pas dans les cellules normales. L'activation de la voie Ras/MAPKs est essentielle à l'activité du NGF (Descamps *et al.*, 1998). Cependant, cette activité semble pouvoir être modulée par d'autres molécules

n'appartenant pas uniquement à la cascade décrite pour $p140^{\text{TrkA}}$. C'est le cas du récepteur $p185^{\text{HER2}}$ ou $c\text{-erbB2}$ qui est activé par simple interaction avec $p140^{\text{TrkA}}$ en présence de NGF (Tagliabue *et al.*, 2000). Par ailleurs, ce manque de sensibilité des cellules épithéliales mammaires normales au NGF, pourrait impliquer un dérèglement dans les protéines connues pour être engagées dans la transduction du signal. Dès lors, ce bouleversement pourrait empêcher la fixation de certaines protéines sur les récepteurs du NGF, rendu alors responsable de la non stimulation de ces dernières au NGF. Une autre protéine, FRS2 (FGF receptor substrate-2), pourrait aussi faire partie des cibles qui expliquent l'inactivité du NGF sur les cellules épithéliales mammaires

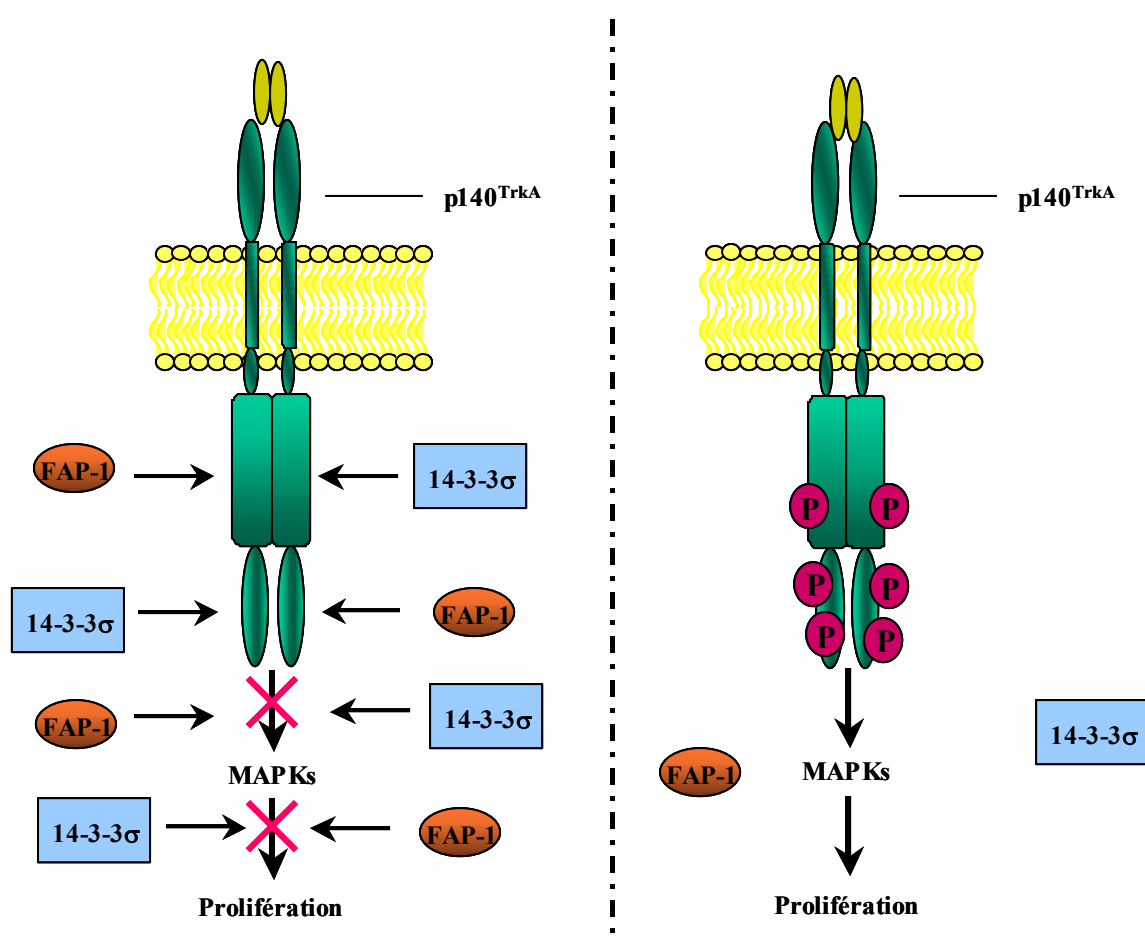


Figure 27: Représentations hypothétiques de l'implication de la surexpression de FAP-1 et de 14-3-3 σ dans la cellule normale mammaire. Les cellules normales surexprimant ces deux protéines (à gauche du trait en pointillé) par rapport aux cellules tumorales (à droite), le NGF reste incapable de stimuler leur prolifération.

normales. Il est décrit que l'activation des récepteurs aux NGF et FGF par leurs ligands respectifs, conduit à la liaison et à la phosphorylation de FRS-2 (Kouhara *et al.*, 1997). Une fois activée par tyrosine phosphorylation, FRS2 sert de pont entre le récepteur et la voie des Ras/MAPK en recrutant le complexe Grb2-Sos soit directement *via* le domaine SH2 de Grb2 ou soit indirectement par l'intermédiaire de Shc. Ayant un substrat commun, l'interaction de FRS-2 avec l'un peut moduler la signalisation de l'autre. La différence de sensibilité observée dans les cellules épithéliales mammaires normales pourrait être due à l'inexistence de tels crosstalks.

Nous avons montré que le 4-OH-tamoxifène inhibe l'effet mitogène du NGF en impliquant l'inhibition de la tyrosine phosphorylation de la voie p140^{TrkA}/MAPK par l'induction de FAP-1 (article 3). Il est donc possible d'émettre l'hypothèse qu'une surexpression de FAP-1 dans les cellules épithéliales mammaires normales puisse les conduire vers une incapacité à répondre au NGF (figure 27). Cependant, même si l'effet mitogène du NGF ne s'observe pas, p140^{TrkA} est phosphorylé sous l'effet du NGF dans les cellules épithéliales mammaires normales. En conséquence, puisque FAP-1 inhibe la phosphorylation de p140^{TrkA}, il apparaîtrait à priori une inhibition de phosphorylation de p140^{TrkA} dans les cellules épithéliales mammaires normales. Une surexpression de FAP-1 ne semblent pas être l'explication de l'insensibilité au NGF dans ces cellules.

Laronga *et al.* (2000) ont montré que la transfection de 14-3-3 σ dans les cellules cancéreuses mammaires inhibe leur progression dans le cycle, suggérant son implication dans la tumorigenèse. Notre laboratoire a montré par analyse protéomique que la sous-expression de 14-3-3 σ est corrélée avec la transformation maligne des cellules épithéliales mammaires (Vercoutter-Edouart *et al.*, 2001). De plus, Fergusson *et al.* (2000) ont montré que les ARNm de la 14-3-3 σ sont très faiblement exprimés, voir indétectables dans des échantillons de cancer du sein, à cause d'une hyperméthylation du gène qui le rend silencieux. Ainsi, l'ensemble de ces résultats suggèrent que le dysfonctionnement de l'expression de la protéine 14-3-3 σ contribue à la dérégulation de la croissance observée dans les cellules cancéreuses (figure 27). Aujourd'hui, nous pensons que dans les cellules épithéliales mammaires normales, la surexpression de la protéine 14-3-3 σ , pourrait expliquer l'insensibilité de ces dernières au NGF. Cette hypothèse est corroborée par les premières expériences de transfections de 14-3-3 σ dans les cellules tumorales mammaires, qui montrent que ces cellules deviennent insensibles au NGF. Ces travaux font actuellement l'objet de la préparation d'un DEA dans notre laboratoire (Fanny Dubois, soutenance en Juillet 2003).

III- INTERET PRATIQUE DU NGF DANS LE CANCER DU SEIN ?

III- 1- Le NGF : marqueur de diagnostic et/ ou pronostic ?

Nous avons montré que les cellules cancéreuses mammaires produisent le NGF et que ce facteur n'est pas synthétisé par les cellules épithéliales mammaires normales. Ces résultats indiquent la valeur marqueur potentielle du NGF dans le cancer du sein. Pour valider cette hypothèse et envisager une application pratique, il s'avère nécessaire de quantifier le NGF (aussi bien au niveau ARNm que protéique) dans une plus large population de biopsies tumorales ou bénignes. En effet, établir des corrélations entre des paramètres utilisés quotidiennement en clinique (comme le grade histopronostique, la survie, le type de cancer, le récepteur des oestrogènes ou de la progestérone, ou encore l'expression du p140^{TrkA} et p75^{NTR}) et la présence du NGF, pourraient s'avérer être révélateur de l'intérêt du NGF comme marqueur diagnostic et/ ou pronostic. Suite à mon travail de thèse, nous pouvons détecter le NGF par Western Blot et RT-PCR quantitative en temps réel (voir annexe). Afin de pouvoir quantifier à terme le taux de NGF, trouver un moyen de détection spécifique, sensible, reproductible et non envahissant pour les patients, pourrait s'avérer riche d'applications. Nous avons réalisé des tests ELISA, et nous les avons développés pour des échantillons protéiques totaux à partir des lignées cellulaires tumorales. L'utilisation de ces tests immunologiques en clinique pourrait être alors envisagée afin d'avoir une idée globale de la présence du NGF. Actuellement, une collaboration avec le Dr. Christian Rolando et Adeline Lepage (UMR CNRS 8009) est mise en place pour tenter de détecter le NGF par spectrométrie de masse et appliquer ce protocole sur des échantillons comme le sérum, le plasma ou l'urine des patientes atteintes de cancer du sein. Au préalable, nos études ont nécessité la mise en place d'une détection du NGF par spectrométrie en utilisant le facteur de croissance commercialisé pour obtenir le spectre de masse de NGF dit de référence. L'ultime objectif sera la détection d'un tel spectre dans les échantillons biologiques comme le sérum et le plasma.

III- 2- Ciblage des voies de signalisation du NGF ?

Les améliorations récentes des traitements du cancer du sein, provenant d'une meilleure compréhension des bases moléculaires de la croissance cellulaire, sont actuellement en émergence (Bange *et al.*, 2001). Le meilleur exemple est certainement le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques basées sur l'inhibition du récepteur tyrosine kinase Erb-

B2, un membre de la famille du récepteur à l'EGF. L'inhibition spécifique de Erb-B2 par l'Herceptine (un anticorps bloquant tronqué), est entrée en clinique avec succès, et à ce jour donne des résultats prometteurs (Colomer *et al.*, 2001). Mon travail de thèse montre que le NGF autocrine est indispensable pour la croissance des cellules de cancer du sein, ouvrant ainsi la voie à des développements de nouvelles approches stratégiques. En effet, le ciblage des deux récepteurs du NGF par des inhibiteurs pharmacologiques (comme le K-252a pour bloquer p140^{TrkA} et le PD98059 pour inhiber les MAPKs) ou des anticorps monoclonaux bloquant spécifiques (sur le même schéma de l'Herceptine), pourraient conduire à l'inhibition de la croissance des cellules tumorales mammaires. De façon similaire, l'inhibition de NF-κB par transfection de l'inhibiteur IκB, régulerait la voie de signalisation de p75^{NTR} conduisant à l'inhibition de l'effet de survie du NGF sur les cellules cancéreuses. En définitive, nos résultats démontrent la possibilité d'une approche de ciblage de la signalisation du NGF pour le traitement du cancer du sein, sur un modèle analogue à ce qui a été développé pour Erb-B2.

L'ensemble de nos résultats contribue à améliorer la compréhension des mécanismes de régulation de la croissance des cellules de cancer du sein, et ouvre de nouvelles perspectives pour le pronostic et le traitement de cette pathologie. De plus, le NGF et ses voies de signalisation apparaissent maintenant être des cibles potentielles ce qui pourrait déboucher sur de nouvelles perspectives pour le traitement du cancer du sein. Tout commence par des rêves...

I

Descamps S, Le Bourhis X, Delehedde M, Boilly B, and Hondermarck H (1998). Nerve growth factor is mitogenic for cancerous but not normal human breast epithelial cells. *J. Biol. Chem.*, 273: 16659- 16662.

Descamps, S., Pawlowski, V., Revillion, F., Hornez, L., Hebbar, M., Boilly, B., Hondermarck, H., and Peyrat, J.P. (2001a). Expression of nerve growth factor receptors and their prognostic value in human breast cancer. *Cancer Res*, 61: 4337- 4340.

S

BIBLIOGRAPHIE

Descamps, S., Toillon, R.A., Adriaenssens, E., Pawlowski, V., Cool, S.M., Nurcombe, V., Le Bourhis, X., Boilly, B., Peyrat, J.P., and Hondermarck, H. (2001b). Nerve growth factor stimulates proliferation and survival of human breast cancer cells through two distinct signaling pathways. *J. Biol. Chem.* , 276: 17864- 17870.

Dollé L, El Yazidi- Belkoura I, Adriaenssens E, and Hondermarck H. (2003). Nerve growth factor: from neurons to breast cancer. *Research Advances Cancer, sous presse.*

El Yazidi I, Renaud F, Laurent M, courtois Y, and Boilly-Marer Y. (1998). Production and oestrogen regulation of FGF1 in normal and cancer breast cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 00: 1- 14.

S

El Yazidi I, Boilly-Marer Y. (1995). Production of acidic and basic fibroblast growth factor by the hormone-independent breast cancer cell line MDA-MB-231. *Anticancer Res.*, 15: 783- 790.

Hondermarck H, Le Bourhis X, Boilly B, and Descamps S. (1998). Le NGF fait son entrée dans le cancer du sein. *Méd. Sci.*, 14 : 1125- 1126.

Bradshaw RA, and Hondermarck H. (1996). Nerve growth factor receptors. *Biomembranes*, 6: 177- 196.

A

Aebersold R and Mann M (2003). Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*, 422: 198- 207.

Adjei AA, Erlichman C, Davies JN, Culter DL, Sloan JA, Marks RS, Hanson LJ, Svingen PA, Atherton P, Bishop WR, Kirschmeier P, and Kaufmann SH (2000). A phase I trial of the farnesyl transferase inhibitor SCH6636: evidence for biological and clinical activity. *Cancer Res.*, 60: 1871-1877.

Al-Obeidi FA and Lam KS (2000). Development of inhibitors for protein tyrosine kinases. *Oncogene*, 19: 5690- 5701.

Alpaugh ML, Lee MC, Nguyen M, Deato M, Dishakjian L, and Barsky SH (2000). Myoepithelial-specific CD44 shedding contributes to the anti-invasive and anti-angiogenic phenotype of myoepithelial cells. *Exp. Cell. Res.*, 261: 150- 158.

Anand P (1995). Nerve growth factor regulates nociception in human health and disease. *Br. J. Anaesth.*, 75: 201- 208.

Andela VB, Schwartz EM, Puzas JE, O'Keefe RJ, and Rosier RN (2000). Tumor metastasis and the reciprocal regulation of prometastatic antimetastatic factors by nuclear factor kappa B. *Cancer Res.*, 60: 6557- 6562.

Aparicio T, Kermorgant S, Dessirier V, Lewin MJ, and Lebry T (1999). Matrix metalloproteinase inhibition prevents colon cancer peritoneal carcinogenesis development and prolongs survival in rats. *Carcinogenesis*, 20: 1445- 1451.

Apfel SC (2000). Neurotrophic factors and pain. *Clin. J. Pain*, 16: S7- 11.

Arrick BA, Korc M, and Derynck R (1990). Differential regulation of expression of three transforming growth factor β species in human breast cancer cell lines by estradiol. *Cancer Res.*, 50: 299- 303.

Arteaga CL, Tandon AK, Von Hoff DD, and Osborne CK (1988). Transforming growth factor β : potential inhibitor of estrogen receptor-negative human breast cancer cells. *Cancer Res*, 48: 3898-3904.

Ashar HR, James L, Gray K, Carr D, McGuirk M, Maxwell E, Black S, Armstrong L, doll RJ, Taveras AG, Bishop WR, and Kirschmeier P (2001). The farnesyl transferase inhibitor SCH66336 induces a G2/M or G1 pause in sensitive human tumor cell lines. *Exp. Cell Res.*, 262: 17- 27.

Ashcroft M, and Vousden KH (1999). Regulation of p53 stability. *Oncogene*, 18: 7637- 7643.

Attoub S, Noel V, Pirola L, Bruyneel E, Chastre E, Mareel M, Wymann MP, and Gespach C (2000). Leptin promotes invasiveness of kidney and colonic epithelial cells *via* phosphoinositide 3 kinase, Rho and Rac-dependent signaling pathways. *FASEB J.*, 14: 2329- 2338.

Auersperg N, Pan J, Grove BD, Peterson T, Fisher J, Maines-Bandiera S, Somasiri A, and Roskelley CD (1999). E-cadherin induces mesenchymal-to-epithelial transition in human ovarian surface epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96: 6249- 6554.

Autexier C, and Greider CW (1996). Telomerase and cancer: revisiting the telomere hypothesis. *Trends Biochem. Sci.*, 21: 387- 391.

B

Baetu TM and Hiscott J (2002). On the TRAIL to apoptosis. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 13: 199- 207.

Bange J, Zwick E, and Ullrich A (2001). Molecular targets for breast cancer therapy and prevention. *Nat. Med.*, 7: 548- 551.

Bani D, Riva A, Bigazzi M, and sacchi BT (1994). Differentiation of breast cancer cells *in vitro* is promoted by the concurrent influence of myoepithelial cells and relaxin. *Br. J. Cancer*, 70: 900- 904.

Bartkova J, Lukas J, Strauss M, and Bartek J (1994). Cell cycle related variation and tissue restricted expression of human cyclin D1 protein. *J. Pathol.*, 172: 237- 245.

Barouch R, Kazimirsky G, Appel E, and Brodie C (2001). Nerve growth factor regulates TNF- α production in mouse macrophages via MAP kinase activation. *J. Leukocyte Biol.*, 69: 1019- 1026.

Baselga J, Norton L, Albanell J, Kim YM, and Mendelsohn J (1998). Recombinant humanized anti-HER2 antibody (Herceptin) enhances the antitumor activity of paclitaxel and doxorubicin against HER/ neu overexpressing human breast cancer xenografts. *Cancer Res.*, 58: 2825- 2831.

Basset P, Bellocq JP, Wolf C, Stoll I, Hutin P, Limacher JM, Podhaicer OL, Chenard MP, Rio MC, and Chambon P (1990). A novel metalloproteinase gene specially expressed in stromal cells of breast carcinomas. *Nature*, 348: 699-704.

Bates S, Davidson NE, Valverius EM, Freter CE, Dickson RB, Tam JP, Kudlow JE, Lippman ME, and Salomon DS (1986). Expression of transforming growth factor α and its messenger ribonucleic acid in human breast cancer: its regulation by oestrogen and its possible significance. *Mol. Endocrinol.*, 2: 543- 555.

Bautista S, and Theiller C (1997). P53 mutations in breast cancer: incidence and relations to tumor aggressiveness and evolution of the disease. *Pathol. Biol.*, 10: 882- 892.

Beatty GL, and Paterson Y (2000). IFN γ can promote tumor evasion of the immune system *in vivo* by down-regulating cellular levels of an endogenous tumor antigen. *J. Immunol.*, 165: 5502- 5508.

Beliveau R, Gingras D, Kruger EA, Lamy S, Sirois P, Simard B, Sirois MG, Tranqui L, Baffert F, Beaulieu E, Dimitriadoa V, Pepin MC, Courjal F, Ricard I, Poyat P, Falardeau P, Figg WD and Dupont E (2002). The antiangiogenic agent neovastat AE941 inhibits vascular endothelial growth factor-mediated biological effects. *Clin. Cancer Res.*, 8: 1242- 1250.

Belletti B, Ferraro P, Arra C, Baldassarre G, Bruni P, staibano S, DeRosa G, Salvatore G, Fusco A, Persico MG, and Viglietto G (1999). Modulation of *in vivo* growth thyroid tumor-derived cell lines by sense and antisense vascular endothelial growth factor gene. *Oncogene*, 18: 4860- 4869.

Benjamin CW, Hiebsch RR, and Jones DA (1998). Caspase activation in MCF-7 cells responding to etoposide treatment. *Mol. Pharmacol.*, 53: 446- 450.

Benson JR, Baum M, and Coletta AA (1996). Role of TGF β in the anti-estrogen response/resistance of human breast cancer. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*, 1: 381- 389.

Berns EMJJ, Klijn JGM, van Putten WLJ, van Straveren IL, Portengen H, and Foekens JA (1992). C-myc amplification is a better prognostic factor than HER-2 amplification in primary breast cancer. *Cancer Res.*, 52: 1107- 1113.

Bertram J, Killian M, Brysch W, Schlingensiepen KH, and Kneba M (1994). Reduction of erbB2 product in mamma carcinoma cell lines by erbB2 mRNA-specific and tyrosine kinase consensus phosphorothionate antisense oligonucleotides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 200: 661- 667.

Berx G, Cleton-Jansen AM, Nollet F, de Leeuw WJF, van de Vijver MJ, Cornelisse C, and van Roy F (1995). E-cadherin is a tumor/ invasion suppressor gene mutated in human lobular breast cancers. *EMBO J.*, 24: 6107- 6115.

Berx G, Nollet, F, and van Roy F (1998). Dysregulation of E-cadherin/catenin complex by irreversible mutations in human carcinomas. *Cell. Adhes. Commun.*, 6: 171- 184.

Bièche I, Khodja A, and Lidereau R (1999). Deletion mapping of chromosomal region 1p32-pter in primary breast cancer. *Genes Chromosomes & Cancer*, 24: 255- 263.

Bièche I, and Lidereau R (1997). Génétique somatique du cancer du sein. *Bull. Cancer*, 84 : 83- 96.

Bièche I, and Lidereau R (1995). Genetic alterations in breast cancer. *Genes Chromosomes & Cancer*, 14: 227- 251.

Bièche I, Champème MH, Matifas F, Cropp CS, Callahan R, and Lidereau R (1993). Two distinct regions involved in 1p deletion in human primary breast cancer. *Cancer Res.*, 53: 1990- 1994.

Biscardi JS, Tice DA and Parsons SJ (1999). C-Src, receptor tyrosine kinases, and human cancer. *Adv. Cancer Res.*, 76: 61- 119.

Bissell MJ and Radisky D (2001). Putting tumours in context. *Nat. Rev.*, 1: 46- 54.

Bloch I A and Sirrenberg C (1996). Neurotrophins stimulate the release of dopamine from rat mesencephalic neurons via Trk and p75NTR. *J. Biol. Chem.*, 271: 21100- 21107.

Bloch I A & Thoenen H (1995). Characterization of nerve growth factor release from hippocampal neurons: evidence for a constitutive and an unconventional sodium-dependent regulated pathway. *Eur. J. Neurosci.*, 7 : 1220- 1228.

Bompard G, Puech C, Prébois C, Vignon F, and Freiss G (2003a). Protein tyrosine phosphatase PTPL1/ FAP-1 triggers apoptosis in human breast cancer cells. *J. Biol. Chem.*, 277: 47861- 47869.

Bompard G, Martin M, Roy C, Freiss G, and Vignon F (2003b). Membrane targeting of protein tyrosine phosphatase PTPL1 through its FERM domain via phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate-binding motifs. *J. Cell Sci.*, in press.

Bonini S, Lambiase A, Bonini S, Angelucci F, Magrini L, Manni L, and Aloe L (1996). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 10955- 10960.

Bracke ME, Van Roy FM, and Mareel MM (1996). The E cadherin/catenin complex in invasion and metastasis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 213: 123- 161.

Bradshaw RA, and Hondermarck H (1996). Nerve growth factor receptors. *Biomembranes*, 6: 177- 196.

Breuzza L, Garcia M, Delgrossi MH, and LeBivic A (2002). Role of the membrane-proximal O-glycosylation site in sorting of the human receptor for neurotrophins to the apical membrane of MDCK cells. *Exp. Cell Res.*, 273: 178- 186.

Brew K, Dinakarandian D, and Nagase H (2000). Tissue Inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochem. Biophys. Acta*, 1477: 267- 283.

Brissette JL, Kumar NM, Gilula NB, and Dotto GP (1991). The tumor promoter 12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate and the ras oncogene modulate expression and phosphorylation of GAP junction proteins. *Mol. Cell. Biol.*, 11: 5364- 5371.

Bronzert DA, Pantazis P, Antoniadis HN, Kasid A, Davidson N, Dickson RB, and Lippman ME (1987). Synthesis and secretion of PDGF-like growth factor by human breast cancer cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 5763- 5767.

Brooks PC, Montgomery AM, Rosenfeld RA, Hu T, Klier G and Cheresh DA (1994). Integrin alpha v beta 3 antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. *Cell*, 79: 1157- 1164.

Buckley MF, Sweeney KJ, Hamilton JA, Sini RL, Manning DL, Nicholson RI, de Fazio A, Watts CK, Musgrove EA, and Sutherland RL (1993). Expression and amplification of cyclin genes in human breast cancer. *Oncogene*, 17: 1395- 1413.

Burger AM, Zhang X, Li H, Ostrowski JL, Beatty B, Venanzoni M, Papas T, and Seth A (1998). Down-regulation of T1A12/mac25, a novel insulin-like growth factor binding protein related gene, is associated with disease progression in breast carcinomas. *Oncogene*, 16: 2459- 2467.

Burke TR and Zhang ZY (1998). Protein-tyrosine phosphatases: structure, mechanism, and inhibitor discovery. *Biopolymers*, 47: 225- 241.

Burnstock G, and Costa M (1975). Adrenergic neurons- their organization, function and development in the peripheral nervous system. *Chapman and Hall*, 101- 104.

C

Campisi J (2001). Cellular senescence as a tumor-suppressor mechanism. *Trends Cell Biol.*, 11: S27-S31.

Canossa M, Griesbeck O, Berninger B, Campana G, Kolbeck R and Thoenen H (1997). Neurotrophin release by neurotrophins: implications for activity-dependent neuronal plasticity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 13279- 13286.

Carter P, Presta L, Gorman CM, Ridgway JB, Henner D, Wong WL, Rowland AM, Kotts C, Carver ME and Shépard HM (1992). Humanized of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 4285- 4289.

Carystinos GD, Bier A, and Batist G (2001). The role of connexin-mediated cell-cell communication in breast cancer metastasis. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*, 6: 431- 440.

Casaccia-Bonnet P, Carter BD, Dobrowsky RT and Chao MV (1996). Death of oligodendrocytes mediated by the interaction of nerve growth factor with its receptor p75. *Nature*, 383: 716- 720.

Chen HX, Marshall JL, and Trocky N (2000). A phase I study of bcl-2 antisense G1319 (GENTA) and weekly docetaxel in patients with advanced breast cancer and other solid tumors. *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.*, 19: 692a.

Christofori G, and Semb H (1999). The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene. *Trends Biochem.*, 24: 73- 76.

Chrenek MA, Wong P, and Weaver VM (2001). Tumour-stromal interactions. Integrins and cell adhesions as modulators of mammary cell survival and transformation. *Breast Cancer Res.*, 3: 224-229.

Ciardiello F (2000). Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors as anticancer agents. *Drugs*, 60: 25- 32.

Clarke R, Brunner N, Katz D, Glanz P, Dickson RB, Lippman ME, and Kern FG (1989). The effects of a constitutive expression of transforming growth factor- α on the growth of MCF-7 human breast cancer cells in vitro and in vivo. *Mol. Endocrinol.*, 3: 372- 380.

Clevenger CV, Chang WP, Ngo W, Pasha TL, Montone KT, and Tomaszewski JE (1995). Expression of prolactin and prolactin receptor in human breast carcinoma. Evidence for an autocrine/ paracrine loop. *Am. J. Pathol.*, 146: 695- 705.

Cohen P (2000). The regulation of protein function by multisite phosphorylation: a 25 year update. *Trends Biochem. Sci.*, 25: 596- 601.

Coiffier B (2000). Monoclonal antibodies in the treatment of neoplastic hematologic diseases. *Bull. Cancer*, 87: 839- 845.

Coleman S, and Daniel CW (1990). Inhibition of mouse mammary ductal morphogenesis and down-regulation of the EGF-receptor by EGF. *Dev. Biol.*, 137: 425- 433.

Colomer R, Shamon LA, Tsai MS, Lupu R (2001). Herceptin: from the bench to the clinic. *Cancer Invest.*, 19, 49-56.

Colomer R, Lupu R, Bacus SS, and Gelman EP (1994). ErbB2 antisense oligonucleotides inhibits the proliferation of breast carcinoma cells with erbB2 oncogene amplification. *Br. J. Cancer*, 70: 819- 825.

Counts JL, and Goodman JI (1995). Alterations in DNA methylation may play a variety of roles in carcinogenesis. *Cell*, 83: 13- 15.

Cowley SM, Hoare S, Mosselman S, and Parker MG (1997). Estrogen receptors α and β form heterodimers on DNA. *J. Biol. Chem.*, 272: 19858- 19862.

D

Dabelsteen E (1996). Cell surface carbohydrates as a prognostic markers in human carcinomas. *J. Pathol.*, 179: 359- 369.

Dandachi N, Hauser-Kronberger C, More E, Wiesener B, Hacker GW, Dietze O, and Wirl G (2001). Co-expression of tenascin-C and vimentin in human breast cancer cells indicates phenotypic

transdifferentiation during tumour progression: correlation with histopathological parameters, hormone receptors, and oncoproteins. *J Pathol* , 193: 181-189.

Darnell JE (2002). Transcription factors as targets for cancer therapy. *Nat. Rev.*, 2: 740- 749.

Davie JR, Samuel SK, Spencer VA, Holth LT, Chadee DN, Peltier CP, Sun JM, Chen HY, and Wright JA (1999). Organization of chromatin in cancer cells: role of signaling pathways. *Biochem. Cell Biol.*, 77: 265- 275.

De Wever O, and Mareel M (2002). Role of myofibroblasts at the invasion front. *Biol. Chem.*, 383: 55- 67.

DeClerck YA (2000). Interactions between tumour cells and stromal cells and proteolytic modification of the extracellular matrix by metalloproteases in cancer. *Eur. J. Cancer*, 36: 1258- 1268.

DePlacido S, Gallo C, Perrone R, Marinelli A, Pagliarado C, Carlomagno C, Petrella G, D'Istria M, decio G, and Bianco AR (1990). Prolactin receptors does not correlate with estradiol and progesterone receptors in primary breast cancer and lacks prognostic significance. Ten years results of the naple adjuvant (GUN) study. *Br. J. Cancer*, 62: 643- 646.

Descamps S, Pawlowski V, Revillion F, Hornez L, Hebbar M, Boilly B, Hondermarck H, and Peyrat JP (2001a). Expression of nerve growth factor receptors and their prognostic value in human breast cancer. *Cancer Res*, 61: 4337- 4340.

Descamps S, Toillon RA, Adriaenssens E, Pawlowski V, Cool SM, Nurcombe V, Le Bourhis X, Boilly B, Peyrat JP, and Hondermarck H (2001b). Nerve growth factor stimulates proliferation and survival of human breast cancer cells through two distinct signaling pathways. *J. Biol. Chem.* , 276: 17864- 17870.

Descamps S, Le Bourhis X, Delehedde M, Boilly B, and Hondermarck H (1998). Nerve growth factor is mitogenic for cancerous but not normal human breast epithelial cells. *J. Biol. Chem.*, 273: 16659- 16662.

Dickson C, Spencer-Dene B, Dillon C, and Fantl V (2000). Tyrosine kinase signalling in breast cancer. Fibroblast growth factor and their receptors. *Breast Cancer Res.*, 2: 191- 196.

Dickson RB, Johnson MD, Bano M, Shi E, Kurebayashi J, Ziff B, Martinez-Lacaci I, Amundadottir LT, and Lippman ME (1992). Growth factors in breast cancer: mitogenesis to transformation. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 43: 69- 78.

Dickson RB, Thompson EW, and Lippman ME (1990). Regulation of proliferation, invasion and growth factor synthesis in breast cancer by steroids. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 37: 305- 316.

Dickson RB, Huff KK, Spencer EM, and Lippman ME. (1989). Induction of epidermal growth factor-related peptides by 17 β -estradiol in MCF-7 human breast cancer cells. *Endocrinol.*, 118: 138- 142.

Di Marco E, Mathor M, Bondanza S, Cutuli N, Marchisio PC, Cancedda R, De Luca M. (1993). *J. Biol. Chem.*, 268: 22838- 22846.

Djakiew D, Delsite R, Pflug B, Wrathall J, Lynch J and Onoda M (1991). Regulation of growth by a nerve growth factor-like protein which modulates paracrine interactions between a neoplastic epithelial cell line and stromal cells of the human prostate. *Cancer Res.*, 51: 3304- 3310.

Dollé L, El Yazidi- Belkoura I, Adriaenssens E, and Hondermarck H (2003). Nerve growth factor: from neurons to breast cancer. *Res. Adv. Cancer*, sous presse.

Donnerer J, Schuligoi R and Stein C (1992). Increased content and transport of substance P and calcitonin gene-related peptide in sensory nerves innervating inflamed tissues: evidence for a regulatory function of nerve growth factor in vivo. *Neurosci.*, 49: 693- 698.

Duffy MJ, Maguire TM, Hill A, McDermott E, and O'Higgins N (2000). Metalloproteases: role in breast carcinogenesis, invasion and metastasis. *Breast Cancer Res.*, 2: 252- 257.

E

Eccles SA, Court WJ, Box GA, Dean CJ, Melton RG, and Springer CJ (1994). Regression of established breast carcinoma xenografts with antibody-directed enzyme prodrug therapy against c-erbB2p185. *Cancer Res.*, 54: 5171- 5177.

Ehrhard PB, Erb P, Graumann U, and Otten U (1993). Expression of nerve growth factor and nerve growth factor receptor tyrosine kinase Trk in activated CD-4 positive T-cell clones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 10987- 10988.

Elenbass B, and Weinberg RA (2001). Heterotypic signaling between epithelial tumor cells and fibroblasts in carcinoma formation. *Exp. Cell. Res.*, 264: 169- 184.

El Yazidi I, Renaud F, Laurent M, courtois Y, and Boilly-Marer Y (1998). Production and oestrogen regulation of FGF1 in normal and cancer breast cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 00: 1- 14.

El Yazidi I, and Boilly-Marer Y (1995). Production of acidic and basic fibroblast growth factor by the hormone-independent breast cancer cell line MDA-MB-231. *Anticancer Res.*, 15: 783- 790.

Espie M and Gorins A (1995). Le sein. *Editions ESKA*, Paris.

Ethier SP (1996). Human breast cancer cell lines as models of growth regulation and disease progression. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*, 1: 111- 121.

Ethier SP (1995). Growth factor synthesis and human breast cancer progression. *J. Nat. Cancer Instit.*, 87: 964- 972.

Evron E, Umbricht CB, Korz D, Raman V, Loeb DM, Niranjana B, Buluwela L, Weitzman SA, Marks J and Sukumar S (2001). Loss of cyclin D2 expression in the majority of breast cancer is associated with promoter hypermethylation. *Cancer Res.*, 61: 2782- 2787.

F

Fan Z and Mendelsohn J (1998). Therapeutic application of anti-growth factor receptor antibodies. *Curr. Opin. Oncol.*, 10: 67- 73.

Fan WH, Lu YL, Deng F, Ge XM, Liu S, and Tang PH (1998). EGFR antisense RNA blocks expression of the epidermal growth factor receptor and partially reverse the malignant phenotype of human breast cancer MDA-MB-231 cells. *Cell Res.*, 8: 63- 71.

Fantz WJ, Johnson DE, and Williams LT. (1993). Signaling by receptor tyrosine kinases. *Annu. Rev. Biochem.*, 62: 453- 481.

Farah RA, Clinchy B, Herrera L and Vitetta ES (1998). The development of monoclonal antibodies for the therapy of cancer. *Crit. Reviews Eukaryo. Gene Expression*, 8: 321- 345.

Fawcett JP, Aloy R, McLean JH, Pareek S, Miller FD, McPherson PS, and Murphy RA. (1997). *J. Biol. Chem.*, 272: 8837- 8840.

Fearson ER. (1999). Cancer progression. *Curr. Biol.*, 9 : 873- 875.

Feige JJ, and Baird A (1992). La crinopexie: un modèle décrivant les mécanismes qui régissent la biodisponibilité des facteurs de croissance. *Méd. Sci.*, 8 : 805- 810.

Fergusson AT, Evron E, Umbricht CB, Pandita TK, Chan TA, Hermeking H, Marks JR, Lambers AR, Futreal PA, Stampfer MR, and Sukumar S (2000). High frequency of hypermethylation at the 14-3-3s locus leads to gene silencing in breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97: 6049- 60543.

Fey MF (2002). Impact of the human genome project on the clinical management of sporadic cancers. *The LANCET Oncol.*, 3: 349- 356.

Figuroa JA, and Yec D (1992). The insulin-like growth factor binding proteins in human breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.*, 22: 381- 390.

Finkbeiner S, Tavazoie SF, Maloratsky A, Jacobs KM, Harris KM, and Greenberg ME (1997). CREB: a major mediator of neuronal neurotrophin responses. *Neuron*, 19: 1031- 1047.

Fischer EH. (1999). Cell signaling by protéine tyrosine phosphorylation. *Adv. Enzyme Regul.*, 39: 359- 369.

Fong TA, Shower LK, Sun L, Tang C, App H, Powell TJ, Kim YH, Schreck R, Wang X, Risau W, Ullrich A, Hirth KP, and McMahon G. (1999). SU5416 is a potent and selective inhibitor of the vascular endothelial growth factor receptor (Flk-1/KDR) that inhibits tyrosine kinase catalysis, tumor vascularization and growth of multiple tumor types. *Cancer Res.*, 59: 99- 106.

Fortenberry SC and Chirgwin JM (1995). The propeptide is non essential for the expression of human cathepsinD. *J. Biol. Chem.*, 270: 9778- 9782.

Francke U, De Martinville B, Coussen L, and Ullrich A (1983). The human gene for the beta subunit of nerve growth factor is located on the proximal short arm of chromosome 1. *Science*, 222: 1248- 1251.

Frankel AE, Kreitman RJ, and Sausville EA (2000). Targeted toxins. *Clin. Cancer Res.*, 18: 1191- 1195.

Freed KA, and Herington AC (1989). Insulin-like growth factor-I and its autocrine role in MCF-7 human breast cancer cells in culture. *J. Mol. Endocrinol.*, 3: 183- 190.

G

Gabella G (1976). Structure of the autonomic nervous system. *Chapman and Hall*, 156- 157.

Ganss R and Hanahan D (1998). Tumor microenvironment can restrict the effectiveness of activated antitumor lymphocytes. *Cancer Res.*, 58: 4673- 4681.

Gardner WU, Pfeiffer CA, and Trenton JT (1959). The physiopathology of cancer. F Homburger Ed, NY: Paul B Hoeber, 152- 237.

Gati A, Guerra N, Giron-Michel J, Azzarone B, Angevin E, Moretta A, Chouaib S, and Caignard A (2001). Tumor cells regulate the lytic activity of tumor-specific cytotoxic T lymphocytes by modulating the inhibitory natural killer receptor function. *Cancer Res.*, 61: 3240- 3244.

Gentry JJ, Casaccia-Bonnet P, and Carter BD. (2000). Nerve growth factor activation of nuclear factor kappa B through its p75 receptor is an antiapoptotic signal in RN22 schwannoma cells. *J. Biol. Chem.*, 275: 7558- 7565.

Gillett C, Fantl V, and Fisher C (1994). Amplification and overexpression of cyclin D1 in breast cancer detected by immunohistochemical staining. *Cancer Res.*, 54: 1812- 1817.

Gingras D, Renaud A, Mousseau N, Beaulieu E, Kachra Z, and Beliveau R. (2001). Matrix proteinase inhibition by AE941, a multifunctional antiangiogenesis compound. *Anticancer Res.*, 21: 145- 155.

Goldman CK, Kendall RL, Cabrera G, Soroceanu L, Heike Y, Gillespie GY, Siegal GP, Mao X, Bett AJ, Huckle WR, Thomas KA, and Curiel DT. (1998). Paracrine expression of a soluble vascular endothelial growth factor receptors inhibits tumor growth, metastasis, and mortality rate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 8795- 8800.

Gomm JJ, Browne PJ, Coope RC, Yiangou , Bansal GS, Yiangou C, Johnston CL, Mason R, and Coombes RC. (1997). A paracrine role for myoepithelial cell-derived FGF-2 in the normal human breast. *Exp. Cell. Res.*, 234: 165- 173.

Gomm JJ, Smith J, Ryall GK, Baillie R, Turnbull L, and Coombes RC. (1991). Localization of basic fibroblast growth factor and exhibits a high level of sequence identity to a chicken fibroblast growth factor receptor. *Cancer Res.*, 51: 4685- 4692.

Goodman LJ, Valverde J, Lim F, Geschwind MD, Federoff HJ, Geller AI and Hefti, F. (1996). Regulated release and polarized localization of brain-derived neurotrophic factor in hippocampal neurons. *Mol. Cell Neurosci.*, 7 : 222- 238.

Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, and Harris CC (1994). Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res.*, 54: 4855- 4878.

Greene GL, Gilna P, Waterfield M, Baker A, Hort Y, and Shine J (1986). Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA. *Science*, 231: 1150- 1154.

Green S, Walter P, Kumar V, Kurst A, Bornert JM, Argos P, and Chambon P (1986). Human estrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature*, 320: 134- 139.

Grueters A, Lakshmanan RT, Tarris R, Alm J, and Fisher DA. (1985). Nerve growth factor in mouse milk during early lactation: lack of dependency on submandibular salivary glands. *Pediatr. Res.*, 19: 934- 937.

Grunicke H, and Powis G (1998). Cell signaling and cancer treatment. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 124: 462- 469.

Gutheil JC, Campbell TN, Pierce PR, Watkins JD, Huse WD, Bodkin DJ, and Chersesh DA. (2000). Targeted antiangiogenic therapy for cancer using vitaxin: a humanized monoclonal antibody to the integrin $\alpha v \beta 3$. *Clin. Cancer Res.*, 6: 3056- 3061.

H

Hainsworth PJ, Raphael KL, Stillwell RG, Bennett RC, and Garson OM. (1992). Rearrangement of chromosome 1p in breast cancer correlates with poor prognostic features. *Br. J. Cancer*, 66: 131- 135.

Hajra KM, and Fearon ER (2002). Cadherin and catenin alterations in human cancer. *Genes Chromosomes & Cancer*, 34: 255- 268.

Hanahan D, and Weinberg RA (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100: 57- 70.

Hanks SK and Polte TR. (1997). Signaling through focal adhesion kinase. *Bioessays*, 19: 137- 145.

Hansen RK, and Bissell MJ (2000). Tissue architecture and breast cancer: the role of extracellular matrix and steroid hormones. *Endocrine- Related Cancer*, 7: 95- 113.

Hattori A, Tanaka E, Murase K, Ishida N, Chatani Y, Tsujimoto M, Hayashi K, and Kohno M. (1993). Tumor necrosis factor stimulates the synthesis and secretion of biologically active nerve growth factor in non-neuronal cells. *J. Biol. Chem.*, 268: 2577- 2582.

Hattori A, Hayashi K, and Kohno M. (1996). Tumor necrosis factor stimulates the production of nerve growth factor in fibroblasts via the 55-kDa type 1 TNF receptor. *FEBS*, 379: 157- 160.

Hazan RB, Phillips GR, Qiao RF, Norton L, and Aaronson SA (2000). Exogenous expression of N-cadherin in breast cancer cells induces cell migration, invasion, and metastasis. *J. Cell Biol.*, 148: 779- 790.

Heimann R, Lan F, McBride R, and Hellman S (2000). Separating from unfavorable prognostic markers in breast cancer: the role of E cadherin. *Cancer Res.*, 60: 298- 304.

Hendrix MJ, Seftor EA, Chu YW, Trevor KT, and Seftor RE. (1996). Role of intermediate filaments in migration, invasion and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.*, 15: 507- 525.

Heppner KJ, Matrisian LM, Jensen RA, and Rodgers WH (1996). Expression of most matrix metalloprotease family members in breast cancer represents a tumor-induced host response. *Am. J. Pathol.*, 149: 273- 282.

Heymach JV, Kruttgen A, Suter U and Shooter EM. (1996). The regulated secretion and vectorial targeting of neurotrophins in neuroendocrine and epithelial cells. *J. Biol. Chem.*, 271: 25430- 25437.

Hirshi KK, Xu C, Tsukamoto T, and Sager R (1996). GAP junction genes Cx26 et Cx43 individually suppress the cancer phenotype of human mammary carcinoma cells and restore differentiation potential. *Cell Growth Diff.*, 7: 861- 870.

Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, and Harris CC (1991). P53 mutations in human cancers. *Science*, 253: 49- 53.

Holmes WE, Sliwkowski MX, Akita RW, Henzel WJ, Lee J, Park JW, Yansura D, Abadi N, Raab H, Lewis GD (1992). Identification of heregulin, a specific activator of p185HER2. *Science*, 256: 1205-1210.

Hondermarck H, Vercoutter-Edouard AS, Revillion F, Lemoine J, El- Yazidi- Belkourha I, Nurcombe V, and Peyrat JP (2001); Proteomics of breast cancer for marker discovery and signal pathway profiling. *Proteomics*, 1: 1216- 1232.

Hondermarck H, Le Bourhis X, Boilly B, and Descamps S (1998). Le NGF fait son entrée dans le cancer du sein. *Méd. Sci.*, 14 : 1125- 1126.

Hosokawa Y, and Arnold A (1998). Mechanism of cyclin D1 overexpression in human cancer cells: analysis of allele-specific expression. *Genes Chromosomes & Cancer*, 22: 66- 71.

Hosokawa Y, and Arnold A (1998). Mechanisms of cyclin D1 (CCDN1, PRAD1) overexpression in human cancer cells: analysis of allele-specific expression. *Genes Chromosomes & Cancer*, 22: 66- 71.

Houdebine LM (1997). Biologie de la lactation. In: gynécologie/obstétrique, *Encycl. Med Chir* (Elsevier, Paris), 5-008-A-30, 15.

Huang X, Molema G, King S, Watkins L, Edgington TS, and Thorpe PE (1997). Tumor infarction in mice by antibody-directed targeting of tissue factor to tumor vasculature. *Science*, 275: 547- 550.

Hudson PJ (1999). Recombinant antibody constructs in cancer therapy. *Curr. Opini. Immunol.*, 11: 548- 557.

Humphries MJ, and Newham P (1998). The structure of cell-adhesion molecules. *Trends Cell Biol.*, 8: 78- 83.

Huynh H, Yang X, and Pollak M. (1996). Estradiol and antiestrogens regulate a growth inhibitory insulin-like growth factor binding protein 3 autocrine loop in human breast cancer cells. *J. Biol. Chem.*, 271: 1016- 1021.

Hynes NE (2000). Tyrosine kinase signalling in breast cancer. *Breast Cancer Res.*, 2: 154- 157.

I

Imagawa W, Pedchenko VK, Helber J, and Zhang H (2002). Hormone/growth factor interactions mediating epithelial/stromal communication in mammary gland development and carcinogenesis. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 80: 213- 230.

J

Jacobson, MD, Weil, M, and Raff, MC (1997). Programmed cell death in animal development. *Cell*, 88: 347- 354.

Jansen LA, Mesnil M, and Jongen WM (1996). Inhibition of gap junctional intercellular communication and delocalization of the cell adhesion molecule E-cadherin by tumor promoters. *Carcinogenesis*, 17: 1527- 1531.

Jiang Y, Woronicz JD, Liu W, and Goeddel DV (1999). Prevention of constitutive TNF receptor 1 signaling by silencer of death domains. *Science*, 283: 543- 546.

Jones EY (2000). The tumor necrosis factor receptor family: life or death choices. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 10: 644- 648.

Journet AM, Saffaripour S, Cramer EM, Tenza D and Wagner DD (1993). Von Willebrand factor storage requires intact prosequence cleavage site. *Eur. J. Cell Biol.*, 60: 31- 41.

Jou YS, Layhe B, Matesic DF, Chang CC, de Feijter AW, Lockwood L, Welsch CW, Klaunig JE, and Trosko JE (1995). Inhibition of gap junctional intercellular communication and malignant transformation of rat liver epithelial cells by neu oncogene. *Carcinogenesis*, 16: 311- 317.

Judware R, and Culp LA (1997). Extracellular matrix and matrix receptors: alterations during tumor progression. *Encyclopedia of cancer*, vol1: 660- 679.

K

Kairouz R, and Daly RJ (2000). Tyrosine kinase signalling in breast cancer. Modulation of tyrosine kinase signaling in human breast cancer through altered expression of signaling intermediates. *Breast Cancer Res.*, 2: 197- 202.

Kandouz M, Siromachkova M, Jacob D, Chretien M, Therwath A, and Gompel A (1996). Antagonism between estradiol and progestin on bcl-2 expression in breast cancer cells. *Int. J. Cancer*, 68: 120- 125.

Kaplan DH, Shankaran V, Dighe AS, Stockert E, Ageret M, Old LJ, and Schreiber RD (1998). Demonstration of an interferon γ dependent tumor surveillance system in immunocompromised mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 7556- 7561.

Kaplan DR and Miller FD (1997). Signal transduction by neurotrophin receptors. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 9: 213- 221.

Kaulsay KK, Mertani HC, Lee KO, and Lobie PE (2000). Autocrine human growth hormone enhancement of human mammary carcinoma cell spreading is Jak2 dependent. *Endocrinol.*, 141: 1571- 1584.

Kelly RB (1991). Secretory granule and synaptic vesicle formation. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 3: 654- 660.

Kelly PA, Djiane J, Boutin JM, and Edery M (1991). The prolactin-growth hormone receptor family. *Endocrinol. Rev.*, 12: 235- 251.

Keppler OT, Peter ME, Hinderlich S, Moldenhauer G, Stehling P, Schmidt I, Schwartz-Albiez R, Reutter W, and Pawlita M (1999). Differential sialylation of cell surface glycoconjugates in human B lymphoma cell line regulates susceptibility for CD-95 mediated apoptosis and for infection by a lymphotropic virus. *Glycobiol.*, 9: 557- 569.

Kern FG, McLeskey SW, Zhang L, Kurebayashi J, Liu Y, Ding LYF, Kharbanda S, Chen D, Miller D, Cullen K, Paik S, and Dickson RB (1994). Transfected MCF-7 cells as a model for breast cancer progression. *Breast Cancer Res. Treat.*, 31: 153- 165.

Knabbe C, Lippman MA, Wakefield LM, Flander KC, Kasid A, Derynck R, and Dickson RB (1987). Evidence that TGF β is a hormonally regulated negative growth factor in human breast cancer cells. *Cell*, 48: 417- 428.

Knudson AG (1993). Antioncogenes and human cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 10914- 10921.

Kouhara H, Hadari YR, Spivak-Kroizman T, Schilling J, Bar-Sagi D, Lax I, and Schlessinger J (1997). A lipid-anchored grb2-binding protein that links FGF-receptor activation to the ras/MPAK signaling pathway. *Cell*, 89: 693- 702.

Kouzarides T (2000). Acetylation : a regulatory modification to rival phosphorylation? *EMBO J.*, 19 : 1176- 1179.

Krajewski S, Krajewska M, Turner BC, Pratt C, Howard B, Zapata JM, Frenkel V, Robertson S, Ionov Y, Yamamoto H, Peruch M, Takayama S, and Reed JC (1999). Prognostic significance of apoptosis regulators in breast cancer. *Endocr. Related Cancer*, 6: 29- 40.

Kreitman RJ (1999). Immunotoxins in cancer therapy. *Curr. Opini. Immunol.*, 11: 570- 578.

Kruttgen A, Moller JC, Heymach JV, and Shooter EM (1998). Neurotrophins induce release of neurotrophins by the regulated secretory pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 9614- 9619.

Kruttgen A, Kahle PJ, Heymach JV and Shooter EM (1997). The role of the nerve growth factor carboxyl terminus in receptor binding and conformational stability. *J. Biol. Chem.*, 272: 29222- 29228.

Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, and Gustafsson JA (1996). Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 5925- 5930.

Kumar R, and Wang RA (2002). Protein kinases in mammary gland development and cancer. *Microsc. Res. Technique*, 59 : 49- 57.

Kumar, R, Vadlamudi, RK, and Adam L (2000). Apoptosis in mammary gland and cancer. *Endocrine-Related Cancer*, 7: 257- 269.

L

Laird AD, Vajkoczy P, Shawver LK, Thurnher A, Liang C, Mohammadi M, Schlessinger J, Ullrich A, Hubbard SR, Blake RA, Fong TA, Strawn LM, Sun L, Tang C, Hawtin R, Tang F, Shenoy N, Hirth KP, McMahon G, and Cherrington (2000). SU6668 is a potent antiangiogenic and antitumor agent that induces regression of established tumors. *Cancer Res.*, 60: 4152- 4160.

Lakhani SR (1999). The transition from hyperplasia to invasive carcinoma of the breast. *J. Pathol.*, 187: 272- 278.

Laronga C, Yang HY, Neal C, and Lee MH (2000). Association of the cyclin-dependent kinases and 14-3-3s negatively regulates cell cycle progression. *J. Biol. Chem.*, 275 : 23106- 23112.

Laudet V, Hanni C, Coll J, Catzeflis F, and Stéhelin D (1993). Evolution of the nuclear receptor gene superfamily. *EMBO J.*, 11: 1005- 1013.

Laudet V, and Stéhelin D (1993). Les récepteurs nucléaires. *Pour la science*, 183 : 32- 39.

Lazaris AC, Chatzigianni EB, Panoussopoulos D, Tzimas GN, Davaris PS, and Golematis BC (1997). Proliferating cell nuclear antigen and heat shock protein 70 immunolocalization in invasive ductal breast cancer not otherwise specified. *Breast Cancer Res. Treat.*, 43: 43- 51.

Le Bourhis X, Toillon RA, Boilly B, and Hondermarck H (2000). Autocrine and paracrine growth inhibitors in breast cancer cells. *Breast Cancer Res. Treat.*, 1722: 1- 8.

Lehmann W, Widmaire R, and Langen P (1989). Response of different epithelial cell lines to a mammary derived growth inhibitor (MDGI). *Biomed. Biochem. Acta*, 48: 143- 151.

Levi-Montalcini, R (1987). The nerve growth factor 35 years after. *Science*, 4237, 1154- 1162

Levitzki A (1999). Protein tyrosine kinase inhibitors as novel therapeutic agents. *Pharmacol. Therapy*, 82: 231- 239.

Levitzki A and Gazit A (1995). Tyrosine kinase inhibition: an approach to drug development. *Science*, 267: 1782- 1788.

Levitzki A (1994). Signal-transduction therapy. A novel approach to disease management. *Eur. J. Biochem.*, 226: 1- 13.

Lewin GR and Barde YA (1996). Physiology of neurotrophins. *Annu. Rev. Neurosci.*, 19: 289- 317.

Leygue E, Dotzlaw H, Watson PH, and Murphy LC (1998). Altered estrogen receptor α and β messenger RNA expression during human breast tumorigenesis. *Cancer Res.*, 58: 3197- 3201.

Liao F, Li Y, O'Connor W, Zanetta L, Bassi R, Santiago A, Overholser J, Hoger A, Mignatti P, Dejana E, Hicklin DJ and Bohlen P (2000). Monoclonal antibody to VE-cadherin is a potent inhibitor of angiogenesis, tumor growth and metastasis. *Cancer Res.*, 60: 6805- 6810.

Li Y, Bhuiyan M, Alhasan S, Senderowicz AM, and Sarkar FH (2000). Induction of apoptosis and inhibition of c-erbB2 in breast cancer cells by flavopiridol. *Clin. Cancer Res.*, 6: 223- 229.

Liao F, Li Y, O'Connor W, Zanetta L, Bassi R, Santiago A, Overholser J, Hooper A, Mignatti P, Dejana E, Hicklin DJ, and Bohlen P (2000). Monoclonal antibody to vascular endothelial-cadherin is a potent inhibitor of angiogenesis, tumor growth, and metastasis. *Cancer Res.*, 60: 6805- 6810.

Liotta LA and Khon EC (2001). The microenvironment of the tumour-host interface. *Nature*, 411: 375- 379.

Lin EY, Nguyen AV, Russell RG, and Pollard JW (2001). Colony-stimulating factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy. *J. Exp. Med.*, 193: 727- 739.

Lindsay RM and Harmar AJ (1989). Nerve growth factor regulates expression of neuropeptides genes in adult sensory neurons. *Nature*, 337: 362- 364.

Liu QY, Niranjana B, Gomes P, Gomm JJ, Davies D, Coombes RC, and Buluwela L (1996). Inhibitory of activin on the growth and morphogenesis of primary and transformed mammary epithelial cells. *Cancer Res.*, 56: 1155- 1163.

Locke D (1999). GAP junctions in normal and neoplastic mammary gland. *J. Pathol.*, 186: 343- 349.

Lossing C, and Hanssian HA (1993). Peptide growth factors and myofibroblasts in capsules around human breast implants. *Plast. Reconstr. Surg.*, 91: 1277- 1286.

Lu B and Figurov A (1997). Role of neurotrophins in synapse development and plasticity. *Rev. Neurosci.*, 8: 1- 12.

M

MacDonald TJ, and Ladisch S (2001). Antisense to integrin alpha v inhibits growth and induces apoptosis in medulloblastoma cells. *Anticancer Res.*, 21: 3785- 3791.

Macleod K (2000). Tumor suppressor genes. *Curr. Opin. Genet. Devel.*, 10: 81- 93.

Mamidipudi V and Wooten W (2002). Dual role for p75NTR signaling in survival and cell death: can intracellular mediators provide an explanation? *J. Neurosci. Res.*, 68: 373- 384.

Marcusson EG, Yacyshyn BR, Shanahan WR, and Dean NM (1999). Preclinical and clinical pharmacology of antisense oligonucleotides. *Mol. Biotech.* 2: 992- 1003.

Matsuo T and Seyama Y (2000). Introduction to modern biological mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.*, 35: 114- 130.

McAllister AK, Katz LC, and Lo DC (1999). Neurotrophins and synaptic plasticity. *Annu. Rev. Neurosci.*, 22: 295- 318.

McPherson K, Steel CM, and Dixon JM (2000). ABC of breast diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors and genetics. *BMJ*, 321: 624- 628.

Mareel M, Boterberg T, Noe V, van Hoorde L, Vermeulen S, Bruyneel E, and Bracke M (1997). E-cadherin/catenin/cytoskeleton complex: a regulator of cancer invasion. *J. Cell Physiol.*, 173: 271- 274.

Marks P, Rifkind RA, Richon VM, Breslow R, Miller T, and Kelly WK (2001). Histone deacetylases and cancer: causes and therapies. *Nat. Rev. Cancer*, 1: 194- 202.

Marxsen JH, Schmitt O, Metzen E, Jelkmann W, and Hellwing-Burgel T (2001). Vascular endothelial growth factor gene expression in the human breast cancer cell line MX-1 is controlled by o₂ availability in vitro and in vivo. *Ann. Anat.*, 193: 343- 349.

Matrisian LM, Cunha GR, and Mohla S (2001). Epithelial-stromal interactions and tumor progression: meeting summary and future directions. *Cancer Res.*, 61: 3844- 3846.

May FEB, and Westley BR (1995). Estrogen regulated messenger RNAs in human breast cancer cells. *Biomed. Pharmacother.*, 49: 400- 414.

Mazumdar A (2001). Transcriptional repression of estrogen receptor by metastasis-associated protein 1 corepressor. *Nature Cell Biol.*, 3: 30- 37.

Mendell LM & arvanian VL (2002). Diversity of neurotrophin action in the postnatal spinal cord. *Brain Res. Brain Res. Rev.*, 40: 230- 239.

Mendell LM, Albers KM, and Davis BM (1999). Neurotrophins, nociceptors, and pain. *Microsc. Res. Techn.*, 45: 252- 261.

Menke A, Philippi C, Vogelmann R, Seidel B, Lutz MP, Alder G, and Wedlich D (2001). Down-regulation of E-cadherin gene expression by collagen type I and III in pancreatic cancer cell lines. *Cancer Res.*, 61: 3508- 3517.

Mercurio AM, Bachelder RE, Chung J, O'Connor KL, Rabinovitz I, Shaw LM, and Tani T (2001). Integrin laminin receptors and breast carcinoma progression. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*, 6: 299- 309.

Mitchell RA and Bucala R (2000). Tumor growth-promoting properties of macrophage migration inhibitory factor (MIF). *Sem. Cancer Biol.*, 10: 359- 366.

Miller P, DiOrio C, Moyer M, Schnur RC, Bruskin A, Cullen W, and Moyer JD (1994). Depletion of the erbB2 gene product p185 by benzoquinoid ansamycins. *Cancer Res.*, 54: 2724- 2730.

Mirza MR (1991). Anti-estrogen induced synthesis of transforming growth factor b in breast cancer patients. *Cancer Treat. Rev.*, 18: 145- 148.

Michell BS, Schumacher VV, Stauber VV, and Kaiserling E (1994). Are breast tumors innervated? Immunohistological investigations using antibodies against the neuronal marker protein gene product 9.5 in benign and malignant breast lesions. *Eur. J. Cancer*, 8: 1100- 1103.

Moller JC, Kruttgen A, Heymach JV, Ghori N, and Shooter EM (1998). Subcellular localization of epitope-tagged neurotrophins in neuroendocrine cells. *J. Neurosci. Res.*, 51: 463- 472.

Mosselman S, Polman J, and Dijkema R (1996). ER- β : identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett.*, 392: 449- 53.

Murphy RA, Saide JD, Blanchard MH, and Young M (1977). Molecular properties of the Nerve growth factor secreted in mouse saliva. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74: 2330- 2333.

N

Nacht M, Ferguson AT, Zhang W, Petroziello JM, Cook BP, Gao YH, Maguire S, Riley D, Coppola G, Landes GM, Madden SL, and Sukumar S (1999). Combinig serial analysis of gene expression and array technologies to identify genes differentially expressed in breast cancer. *Cancer Res.*, 59: 5464- 5470.

Nakamura T, Matsumoto K, Kiritoshi A, Tano Y, and Nakamura T (1997). Induction of hepatocyte growth factor in fibroblasts by tumor-derived factors affects invasive growth of tumor cells: in vitro analysis of tumor-stromal interactions. *Cancer Res.*, 57: 3305- 3313.

Nakashatri H, Bhat-Nakashatri P, Martin DA, Goulet RJ, and Sledge GW (1997). Constitutive activation of NF- κ B during progression of breast cancer to hormone-independent growth. *Mol. Cell. Biol.*, 17: 3629- 3639.

Naot D, Sionov RV, and Ish-Shalom D (1997). CD44: structure, function, and association with the malignant process. *Adv. Cancer Res.*, 71: 241- 319.

Nass SJ, and Dickson RB (1997). Defining a role for c-Myc in breast tumorigenesis. *Breast Cancer Res. Treat.*, 44: 1- 22.

Nelson AR, Fingleton B, Rotherberg ML, and Matrisian LM (2000). Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. *J. Clin. Oncol.*, 18: 1135- 1149.

Newell KJ, Witty JP, Rodgers WH, and Matrisian LM (1994). Expression and localization of matrix metalloproteinases during colorectal tumorigenesis. *Mol. Carcinog.*, 10: 199- 206.

Nguyen M, Lee MC, Wang JL, Tomlinson JS, Shao ZM, Alpaugh ML, and Barsky SH (2000). The human myoepithelial cell displays a multifaceted anti-angiogenic phenotype. *Oncogene*, 19: 3449- 3459.

Nicholson, DW (1999). Caspase structure, proteolytic substrates and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ.*, 6: 1028- 1042.

Nicoll CS and Bern Ha (1972). Lactogenic hormones. Wolstenholme Gen and Knight (eds), 299- 327.

Nicolson GL (1993). Cancer progression and growth: relationship of paracrine and autocrine growth mechanisms to organ preference of metastasis. *Exp. Cell. Res.*, 204: 171- 180.

O

Oku T, Tjuvajev TG, Miyagawa T, Sasajuna T, Joski A, Finn R, Claffey KP, and Blasberg RG (1998). Tumor growth modulation by sense and antisense vascular endothelial growth factor gene expression: effects on angiogenesis, vascular permeability, blood volume, blood flow, fluorodeoxyglucose uptake, and proliferation of human melanoma intracerebral xenografts. *Cancer Res.*, 58: 4185- 4192.

Ortega N, Jonca F, Vincent S, Faward C, Malavand B, Bertrand N, Mazerolles C, Richmann P, Pouliquen Y, Sarrammon JP, Ruchoux MM and Plouet J (1996). Modulation of the tumor progression by anti-idiotypic antibodies of angiogenesis factors. *CR Acad. Sci.*, 319: 411- 415.

Osborne CK, Coronado EB, Kitten LJ, Arteaga CI, Fuqua SA, Ramasharma K, Marshall M, and Li CH (1989). Insulin-like growth factor-II (IGF-II): a potential autocrine/paracrine growth factor for human breast cancer acting via the IGF-I receptor. *Mol. Endocrinol.*, 3: 1701- 1709.

Ostman A, and Bohmer FD (2001). Regulation of receptor tyrosine kinase signaling by protein tyrosine phosphatases. *Trends Cell Biol.*, 11: 258- 266.

Ottaviano YL, Issa JP, Parl FF, Smith HS, Baylin SB, and Davidson NE (1994). Methylation of the estrogen receptor gene CpG island marks loss of estrogen receptor expression in human breast cancer cells. *Cancer Res.*, 54: 2552- 2555.

Oudard S (1997). Le cancer du sein : épidémiologie , anatomie pathologique, dépistage, diagnostic, évolution, pronostique, principes du traitement. *Bull. Cancer*, 84 : 107- 116.

P

Pace P, Taylor J, Suntharalingam S, Coombes RC, and Ali S (1997). Human estrogen receptor β binds DNA in a manner similar to and dimerizes with estrogen receptor α . *J. Biol. Chem.*, 272: 25832- 25838.

Paik S (1992). Expression of IGF-I and IGF-II mRNA in breast tissue. *Breast Cancer Res. Treat.*, 22: 31- 38.

Panka DJ, Mano T, Suhara T, Walsh K, and Mier JW (2001). Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt activity regulates cFLIP expression in tumor cells. *J. Biol. Chem.*, 276: 6893- 6896.

Park CC, Bissell MJ, and Barcellos-Hoff MH (2000). The influence of the microenvironment on the malignant phenotype. *Mol. Med. Today*, 6: 324- 329.

Park JW, Stagg R, Lewis GD, Carter P, Maneval D, Slamon DJ, Jaffe H, and Shepard HM (1991). Anti-p185HER2 monoclonal antibodies: biological properties and potential for immunotherapy. In: genes, oncogenes, and hormones: advances in cellular and molecular biology of breast cancer. Dickson RB and Lippman ME (eds). Kluwer Academic Publishers.

Pasquali C, Vilbois F, Curchod ML, Van Huijsduijnen RH, and Arigoni F (2000). Mapping and identification of protein-protein interactions by two-dimensional far-western immunoblotting. *Electrophoresis*, 21: 3357- 3368.

Pawlak W, Zolnierek J, Sarosiek T and Szczylik C (2000). Antisense therapy in cancer. *Cancer Treat. Rev.*, 26: 333- 350.

Pawson T, and Nash P (2000). Protein-protein interactions define specificity in signal transduction. *Genes & Development*, 14: 1027- 1047.

Pawson T, and Scott JD (1997). Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins. *Science*, 278: 2075- 2080.

Pawson T (1995). Protein modules and signalling networks. *Nature*, 373: 573- 580.

Perl AK, Wilgenburs P, Dahl U, Semb H, and Christofori G (1998). A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma. *Nature*, 392: 190- 193.

Pestell KE, Ducruet AP, Wipf P, and Lazo JS (2000). Small molecule inhibitors of dual specificity protein phosphatases. *Oncogene*, 19: 6607- 6612.

Peter ME, Hellbardt S, Schwartz-Albiez A, Westendorp MO, Walczak H, Moldenhauer G, Grell M, and Krammer PH (1995). Cell surface sialylation plays a role in modulating sensitivity towards APO-1 mediated apoptotic cell death. *Cell Death Differ.*, 2: 163- 171.

Petrone A, and Sap J (2000). Emerging issues in receptor protein tyrosine phosphatase function: lifting fog or simply shifting? *J. Cell Sci.*, 113: 2345- 2354.

Peyrat JP, Vanlemmes L, Fournier J, Huet G, Révillon F, and Bonnetterre J (1998). Prognostic value of p53 and urokinase-type plasminogen activator in node-negative human breast cancers. *Clin. Cancer Res.*, 4 : 189- 196.

Peyrat JP, Bonnetterre J, Hecquet B, Vennin PH, Louchez MM, Fournier C, Lefevre J, and Demaille A (1993). Plasma insulin-like growth factor-I concentrations in human breast cancer. *Eur. J. Cancer*, 29: 492- 497.

Peyrat JP, Hondermarck H, Louchez MM, and Boilly B (1991) ; Demonstration of basic fibroblast growth factor high and low affinity binding sites in human breast cancer cell lines. *Cancer Comm.*, 3: 323- 329.

Peyrat JP, Bonnetterre J, Vennin PH, Jammes H, Beuscart R, Hecquet B, Djiane J, Lefevre J, and Demaille A (1990). Insulin-like growth factor-I receptor and IGF-I in human breast tumors. *Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 37: 823- 827.

Pietras RJ, Fendly BM, Chazin VR, Pegram MD, Howell SB, and Slamon DJ (1994). Antibody to HER2/neu receptor blocks DNA repair after cisplatin in human breast and ovarian cancer cells. *Oncogene*, 9: 1829- 1838.

Pignatelli M (1998). Integrins, cadherins, and catenins: molecular cross-talk in cancer cells. *J. Pathol.*, 186: 1- 2.

Plowman GD, Ullrich A, and Shawver LK (1994). Receptor tyrosine kinases as targets for drug intervention. *Drug News & Perspectives*, 7: 334- 339.

Pflug BR, Dionne C, Kaplan, DR, Lynch J, and Djakiew D (1995). Expression of a trk high affinity nerve growth afctor receptor in the human prostate. *Endocrinol.*, 136: 262- 268.

Polyak K (2001). On the birth of breast cancer. *Biochim. Biophys. Acta*, 1552: 1- 13.

Poo MM (2001). Neurotrophins as synaptic modulators. *Nat. Rev. Neurosci.*, 2: 24- 32.

Portier CJ (2002). Endocrine dismodulation and cancer. *Neuroendocrinol. Lett.*, 23 : 43- 47.

Praillet C, Grimaud JA, and Lortat-Jacob H (1998). Les protéoglycanes. Molécules aux multiples fonctions... futures molécules thérapeutiques? *Méd. Sci.*, 14 : 412- 420.

Prenzel N, Zwick E, Leserer M, and Ullrich A (2000). Tyrosine kinase signalling in breast cancer. Epidermal growth factor receptor: convergence point for signal integration and diversification. *Breast Cancer Res.*, 2: 184- 190.

Pujol P, Rey JM, Nirde P, Roger P, Gastaldi M, Laffargue F, Rochefort H, and Maudelonde T (1998). Differential expression of estrogen receptor a and b messenger RNAs as a potential marker of ovarian carcinogenesis. *Cancer Res.*, 58: 5367- 5373.

Pupa SM, Menard S, Forti S, and Tagliabue E (2002). New insights into the role of extracellular matrix during tumor onset and progression. *J. Cell. Physiol.*, 192: 259- 267.

R

Rabizadeh S, Oh J, Zhong LT, Yang J, Bitler CM, Butcher LL, and Bredesen DE (1993). Induction of apoptosis by the low-affinity nerve growth factor receptors. *Science*, 261: 346- 356.

Révillion F, Bonnetterre J, and Peyrat JP (1998). ERBB2 oncogene in human breast cancer and its clinical significance. *Eur. J. Cancer*, 34: 791- 808.

Robertson SC, Tynan JA and Donoghue DJ (2000). RTK mutations and human syndromes when good receptors turn bad. *Trends in Genetics*, 16: 265- 271.

Rochefort H, Chalbos D, Cunat S, Lucas A, Platet N, and Garcia M (2001). Estrogen regulated proteases and metalloproteases in ovarian and breast cancer cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 76: 119- 124.

Rochefort H (1992). Cathepsin D in breast cancer: a tissue marker associated with metastasis. *Eur. J. Cancer*, 28: 1780- 1783.

Ronnov-Jenssen L, Peterson OW, and Bissell MJ (1996). Cellular changes involved in conversion of normal to malignant breast : importance of the stromal reaction. *Physiol. Rev.*, 76 : 69- 125.

Rosen LS (2002). Clinical experience with angiogenesis signaling inhibitors : focus on vascular endothelial growth factor blockers. *Cancer control*, 9: 36- 44.

Rouayrenc JF (1997). Les inhibiteurs de croissance des cellules mammaires. *Méd. Sci.*, 13 : 89- 92.

Rountree MR, Bachman KE, Herman JG, and Baylin SB (2001). DNA methylation, chromatin inheritance, and cancer. *Oncogene*, 20: 3156- 3165.

Rudolph-Owen LA, and Matrisian LM (1998). Matrix metalloproteinases in remodeling of the normal and neoplastic mammary gland. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*, 3: 177- 189.

Ruohola JK, Valve EM, Karkkainen MJ, Joukov V, Alitalo K, and Harkonen PL (1999). Vascular endothelial growth factor are differentially regulated by steroid hormones and antiestrogens in breast cancer cells. *Mol. Cell Endocrinol.*, 149: 29- 40.

Ryu BK, Lee MG, Chi SG, Kim YW, and Park JH (2001). Increased expression of cFLIP in colonic adenocarcinoma. *J. Pathol.*, 194: 15- 19.

S

Sandhu C, and Slingerland J (2000). Deregulation of the cell cycle in cancer. *Cancer Detect. Prev.*, 24: 107- 118.

Sarhadi NS, Dunn JS, Lee FD and Soutar DS (1996). An anatomical study of the nerve supply of the breast, including the nipple and areola. *British J. Plast. Surg.*, 49: 156- 164.

Sato T, Irie S, Kitada S, and Reed JC (1995). FAP-1: a protein tyrosine phosphatase that associates with Fas. *Science*, 268: 411- 415.

Sauer G, Deissler H, Kurzeder C, and Kreienberg R (2002). New molecular targets of breast cancer therapy. *Strahlenther Onkol.*, 178: 123- 133.

Saunders MM, Seraj MJ, Li Z, Zhou Z, Winter CR, Welch DR, and Donahue HJ (2001). Breast cancer metastasis potential correlates with a breakdown in homospecific and hetrespecific gap junction intercellular communication. *Cancer Res.*, 61: 1765- 1767.

Saglier J, and Antoine EC (1996). Cancer du sein, questions et réponses au quotidien. *Editions Masson*, Paris.

Scaffidi C, Schmitz I, Krammer PH, and Peter ME (1999). The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 274: 1541- 1548.

Scheiffele P, Peranen J and Simons K (1995). N-glycans as apical sorting signals in epithelial cells. *Nature*, 378: 96- 98.

Schraa AJ, Kok RJ, Moorlag He, Bos EJ, Proost JH, Meijer DK, de Leij LF, and Molema G (2002). Targeting of RGD-modified proteins to tumor vasculature: a pharmacokinetic and cellular distribution study. *Int. J. Cancer*, 102: 469- 475.

Schwab M, Praml C, and Amler LC (1996). Genomic instability in 1p and human malignancies. *Genes Chromosomes & Cancer*, 16: 211- 229.

Schlessinger J (2000). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*,103: 211- 225.

Schmitz, I, Kirchhoff, S, and Krammer, PH (2000). Regulation of death receptor-mediated apoptosis pathways. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, 32: 1123- 1136.

Scott J, Selby M, Urdea M, Quiroga M, Bell GI, and Rutter W J (1983). Isolation of nucleotide of a cDNA encoding the precursor of mouse nerve growth factor. *Nature*, 302: 538- 540.

Scorilas A, Karameris A, Arnogiannaki N, Ardavanis A, Bassilopoulos P, Trangas T, and Talieri M (2001). Overexpression of matrix metalloproteinase9 in human breast cancer: a potentiel favourable indicator in node-negative patients. *Br. J. Cancer*, 1: 1488- 1496.

Segal DM, Weiner GJ, and Weiner LM (1999). Bispecific antibodies in cancer therapy. *Curr. Opini. Immunol.*, 11: 558- 562.

Serenella M, Ménard S, Forti S, and Tagliabue E (2002). New insights into the role of extracellular matrix during tumor onset and progression. *J. Cell. Physiol.*, 192: 259- 267.

Shao C, Deng L, Henegariu O, Liang L, Stambrook PJ, and Tischfield JA (2000). Chromosome instability contributes to loss of heterozygosity in mice lacking p53. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97: 7405- 7410.

Shaw LM (1999). Integrin function in breast carcinoma progression. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*, 4: 367- 376.

Sheikh, MS, and Fornace, AJ (2000a). Role of p53 family members in apoptosis. *J. Cell. Physiol.*, 182: 171- 181.

Sheikh MS, and Fornace AJ (2000b). Death and decoy receptor and p53-mediated apoptosis. *Leukemia*, 14: 1509- 1513.

Sidransky D (2002). Emerging molecular markers of cancer. *Nat. Rev.*,2: 210- 219.

Simon Ma (2000). Receptor tyrosine kinases: specific outcomes from general signals. *Cell*, 103: 13-15.

Singer CF, Kubista E, Garmroudi F, and Cullen KJ (2000). Local feedback mechanisms in human breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.*, 63: 95- 104.

Sledge GW, Hu P, Falkson G, Tormey D and Abeloff M (2000). Comparison of chemotherapy with chemohormonal therapy as first-line therapy for metastatic, hormone-sensitive breast cancer: an Eastern cooperative oncology group study. *J. Clin. Oncol.*, 18: 262- 266.

Smolich BD, Yuen HA, West KA, Giles FJ, Albitar M, and Cherrington JM (2001). The antiangiogenic protein kinase inhibitors SU5416 and SU6668 inhibits the SCF receptor (c-kit) in a human myeloid leukemia cell line and in acute myeloid leukemia blasts. *Blood*, 97: 1413- 1421.

Smorenburg SM and Van Nordeen CJ (2001). The complex effects of heparin on cancer progression and metastasis in experimental studies. *Pharmacol. Rev.*, 53: 93- 105.

Solomon E, Borrow J, and Goddard AD (1991). Chromosome aberrations and cancer. *Science*, 254: 1153- 1160.

Souttou B, Hamelin R, and Crépin M (1994). FGF2 as an autocrine growth factor for immortal human breast epithelial cells. *Cell Growth Differ.*, 5: 615- 623.

Stephens RW, Brunner N, Janicke F and Schmitt M (1998). The urokinase plasminogen activator system as a target for prognostic studies in breast cancer. *Breast cancer Res. Treat.*, 52: 99 –111.

Stern DF (2000). Tyrosine kinase signaling in breast cancer. ErbB family receptor tyrosine kinases. *Breast Cancer Res.*, 2: 176- 183.

Sternlicht MD, Kedeshian P, Shao ZM, Safarians S, and Barsky SH (1997). The human myoepithelial cell is a natural tumor suppressor. *Clin. Cancer Res.*, 3: 1949- 1958.

Stevens A and Lowe J (1992). *Histologie. Editions Pradel/Edisem, Paris.*

Stewart T, Pattengale PK, and Leder P (1984). Spontaneous mammary adenocarcinomas in transgenic mice that carry and express MMTV/ myc fusion genes. *Cell*, 38: 627- 637.

Strobl JS, Wonderlin WF, and Flynn DC (1995). Mitogenic signal transduction in human breast cancer cells. *Gen. Pharmacol.*, 26: 1643- 1649.

T

Tagliabue E, Castiglioni F, Ghirelli C, Modugno M, Asnaghi L, Somenzi G, Melani C, and Ménard S (2000). Nerve growth factor cooperates with p185her2 in activating growth of human breast carcinoma cells. *J. Biol. Chem.*, 275: 5388- 5394.

Taipale J, and Keski-Oja J (1997). Growth factors in the extracellular matrix. *FASEB J.*, 11: 51- 59.

Tamm I, Wang Y, Sausville E, Scuderio DA, Vigna N, Oltersdorf T, and Reed JC (1998). IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas, Bax, caspases and anticancer drugs. *Cancer Res.*, 58: 5315- 5320.

Tamura M, Gu J, Matsumoto K, Aota S, Parsons R, and Yamada KM (1998). Inhibition of cell migration, spreading, and focal adhesions by tumor suppressor PTEN. *Science*, 280 : 1614- 1617.

Tanaka K, Yanoshita R, Konishi M, Oshimura M, Maeda Y, Mori T, and Miyaki M (1993). Suppression of tumorigenicity in human colon carcinoma cells by introduction of normal chromosome 1p36 region. *Oncogene*, 8: 2253- 2258.

Thoenen A (1995). Neurotrophins and neuronal plasticity. *Science*, 270: 593- 598.

Taylor HB and Norris HJ (1967). Epithelial invasion of nerves in benign diseases of the breast. *Cancer*, 14: 2245- 2249.

Thoenen H (1991). The changing scene of neurotrophic factors. *Trends Neurosci.*, 14: 165- 170.

Thomas PA, Kirschmann DA, Cerhan JR, Folberg R, Seftor EA, Sellers TA, and Hendrix MJ (1999). Association between keratin and vimentin expression, malignant phenotype, and survival in postmenopausal breast cancer patients. *Clin Cancer Res.*, 5: 2698- 2703.

Timmer T, de Vries EGE, and de Jong S (2002). Fas receptor-mediated apoptosis: a clinical application? *J. Pathol.*, 196: 125- 134.

Tlsty TD, and Hein PW (2001). Know the neighbor: stromal cells can contribute oncogenic signals. *Curr. Opin. Genet. Devel.*, 11: 54- 59.

Toi M, Taniguchi T, Ueno T, Asano M, Funata N, Sekiguchi K, Iwanari H, and Tominaga T (1998). Significance of circulating hepatocyte growth factor level as a prognostic indicator in primary breast cancer. *Clin. Cancer Res.*, 4: 659- 664.

Toillon RA, Descamps S, Adriaenssens E, Ricort JM, Bernard D, Boilly B, and Le Bourhis X (2002). Normal breast epithelial cells induce apoptosis of breast cancer cells via Fas signaling. *Exp. Cell Res.*, 275: 31- 43.

Toillon RA, Chopin V, Jouy N, Fauquette W, Boilly B, and Le Bourhis X (2002). Normal breast epithelial induce p53-dependent apoptosis and p53-independent cell cycle arrest of breast cancer cells. *Breast Cancer Res. Treat.*, 71: 269- 280.

Toillon RA, Adriaenssens E, wouters D, Lottin S, Boilly B, Hondermarck H, and Le Bourhis X (2000). Normal breast epithelial cells induce apoptosis of MCF-7 breast cancer cells through a p53-mediated pathway. *Mol. Cell Biol. Res. Commun.*, 3: 338- 344.

Torca M, Bracci-Laudiero L, Lucibello M, Nencioni L, Labardi D, Rubartelli A, Cozzolino F, Aloe L, and Garaci E (1996). Nerve growth factor is an autocrine survival factor for memory B Lymphocytes. *Cell*, 85: 345- 356.

Trosko JE, and Ruch RJ (2002). Gap junctions as targets for cancer chemoprevention and chemotherapy. *Curr. Drug Targets*, 3: 465- 482.

Tsihlias J, Kapusta L, and Slingerland J (1999). The prognostic significance of altered cyclin-dependent kinase inhibitors in human cancer. *Annu. Rev. Med.*, 50: 401- 423.

U

Ullrich A, and Schlessinger J (1990). Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell*, 61: 203- 212.

Uria JA, Stahle-Backdahl M, Seiki M, Fueyo A, and Lopez-Otin C (1997). Regulation of collagenase-3 expression in human breast carcinomas is mediated by stromal-epithelial cell interactions. *Cancer Res.*, 57: 4882- 4888.

V

Van Aken E, De Wever O, Correia da Rocha AS, and Marell M (2001). Defective e-cadherin/catenin complexes in human cancer. *Virchows Arch.* 439: 725- 751.

Van Golen K, Milliron K, Davies S, and Merajver SD (1999). BRCA-associated cancer risk: molecular biology and clinical practice. *J. Lab. Clin. Med.*, 134 : 11- 18.

Van Hoorde L, Van Aken E, and Mareel M (2000). Collagen type I: a substrate and a signal for invasion. In: *Progress in Molecular and subcellular Biology. Signaling through the Matrix*, 25, 105-134.

Varley JM, Swallow JE, Brammar W, Whittaker J, and Walker RA (1987). Alterations to either c-erbB2 or c-myc proto-oncogenes in breast carcinomas correlate with poor short-term prognosis. *Oncogene*, 1: 423- 430.

Vercoutter-Edouart AS, Lemoine J, Le Bourhis X, Hornez L, Boilly B, Nurcombe V, Révillion F, Peyrat JP, and Hondermarck H (2001). Proteomic analysis reveals that 14-3-3 σ is down-regulated in human breast cancer cells. *Cancer Res.*, 61: 76- 80.

Vetter ML, Martin-Zanca D, Parada LF, Bishop JM and Kaplan DR (1991). Nerve growth factor stimulates tyrosine phosphorylation of phospholipase C- γ 1 by a kinase activity associated with the product of the trk protooncogene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 5650- 5654.

Vihinen P, and Kähäri VM (2002). Matrix metalloproteinases in cancer: prognostic markers and therapeutic targets. *Int. J. Cancer*, 99: 157- 166.

Vogel PM, Georgiade NG, Fetter BF, Vogel FS, and McCarty KS (1981). The correlation of histologic changes in the human breast with the menstrual cycle. *Am. J. Pathol.*, 104: 23- 34.

Vonderhaar BK (1987). Local effect of EGF, TGF α and EGF-like growth factors on lobuloalveolar development of the mouse mammary gland *in vivo*. *J. Cell. Physiol.*, 132: 581- 584.

W

Wang XH, and Poo MM (1997). Potentiation of developing synapses by postsynaptic release of neurotrophin-4. *Neuron*, 19: 825- 835.

Wang TT, and Phang JM (1995). Effects of estrogen on apoptotic pathways in human breast cancer cell line MCF-7. *Cancer Res.*, 55: 2487- 2489.

Watson FL, Porcionatto MA, Bhattacharyya A, Zhao W, and Presta LG (1999). TrkA glycosylation regulates receptor localization and activity. *J. Neurobiol.*, 39: 323- 336.

Weaver VM, Fisher AH, Peterson OW, and Bissel MJ (1996). The importance of microenvironment in breast cancer progression: recapitulation of mammary tumorigenesis using a unique human mammary epithelial cell model and a three-dimensional culture assay. *Bioch. Cell. Biol.*, 74: 833- 851.

Weiner TM, Liu ET, Craven RJ and Cance WG (1993). Expression of faocal adhesion kinase gene and invasive cancer. *Lancet*, 342: 1024- 1025.

Wels W, Beerli R, Hellmann P, Schmidt M, Marte BM, Kornilova ES, Hekele A, Mendelson J, Groner B, and Hynes NE (1995). EGF receptor and p185erbB2-specific single-chain antibody toxins differ in their cell-killing activity on tumor cells expressing both receptor proteins. *Int. J. Cancer*, 60: 137- 144.

Widschwendter M, and Jones PE (2002). DNA methylation and breast carcinogenesis. *Oncogene*, 21: 5465- 5482.

Wingender E (1994). Recognition of regulatory regions in genomic sequences. *J. Biotechnol.*, 35: 273- 280.

Witters L, Kumar R, Mandal M, Bennett CF, Miraglia L, and Lipton A (1999). Antisense oligonucleotides to the epidermal growth factor receptors. *Breast Cancer Res. Treat.*, 53: 41- 50.

Witters L, Kumar R, Chinchilli VM, and Lipton A (1997). Enhanced anti-proliferative activity of the combination of tamoxifen plus HER2/neu antibody. *Breast Cancer Res. Treat.*, 42: 1- 5.

Wolf C, Rouyer N, Lutz Y, Adida C, Lorient M, Bellocq JP, Chambon P, and Basset P (1993). Stromelysin 3 belongs to a subgroup of proteinases expressed in breast carcinoma fibroblastic cells and possibly implicated in tumour progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 1843-1847.

X

Xiao G, Liu YE, Gentz R, Sang QA, Ni J, Goldberg ID, and Shi YE (1999). Suppression of breast cancer growth and metastasis by a serpin myoepithelium-derived serine proteinase inhibitor expressed in the mammary myoepithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96: 3700- 3705.

Y

Yamaguchi N, Anand-Apte B, Lee M, Sasaki T, Fukai N, Shapiro R, Que I, Lewis C, Timpl R, and Olsen BR (1999). Endostatin inhibits vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell migration and tumor growth independently of zinc binding. *EMBO J.*, 18: 4414- 4423.

Yamashita J, Ogawa M, Yamashita S, Nomura K, Kuramoto M, Saijshoji T, and Shin, S (1994). Immunoreactive hepatocyte growth factor is a strong and independent predictor of recurrence and survival in human breast cancer. *Cancer Res.*, 54: 1630- 1633.

Yang X, Yan L, and Davidson NE (2001). DNA methylation in breast cancer. *Endocrine-Related Cancer*, 8: 115- 127.

Yang X (2000). Transcriptional activation of estrogen receptor alpha in human breast cancer cells by histone deacetylase inhibition. *Cancer Res.*, 60: 6890- 6894.

Yaar M, Grossman K, Eller M, and Gilchrist BA (1991). Evidence for nerve growth factor-mediated paracrine effects in human epidermis. *J. Cell Biol.*, 115: 821- 828.

Yee D, Paik S, Lebovic GS, Marcus RR, Favoni RE, Cullen KJ, Lippman ME and Rosen N (1989). Analysis of IGF-I gene expression in malignancy: evidence for a paracrine role in human breast cancer. *Mol. Endocrinol.*, 3: 509- 517.

Yip, YL, and Ward RL (2002). Anti-erbB2 monoclonal antibodies and ErbB2-directed vaccines. *Cancer Immunol. Immunother.*, 50: 569- 587.

Z

Zhang X, and Yee D (2000). Tyrosine kinase signalling in breast cancer. Insulin-like growth factors and their receptors in breast cancer. *Breast Cancer Res.*, 2: 170- 175.

Zhang GJ, Kimijima I, Onda M, Kanno M, Sato, H, Watanabe T, Tsuchiya A, Abe R, and Takenoshita S (1999). Tamoxifen-induced apoptosis in breast cancer cells relates to down-regulation of bcl-2, but not Bax and Bcl-X(L), without alteration of p53 protein levels. *Clin. Cancer Res.*, 5: 2971- 2977.

Zhang GJ, Kimijima I, Abe R, Kanno M, Katagata N, Hara K, Watanabe T, and Tsuchiya A (1997). Correlation between the expression of apoptosis-related bcl-2 and p53 oncoproteins and the carcinogenesis and progression of breast carcinomas. *Clin. Cancer Res.*, 3: 2329- 2335.

Zhang L, Chang C, Bacus SS, and Hung M (1995). Suppressed transformation and induced differentiation of HER2/neu overexpressing breast cancer cells by emodin. *Cancer Res.*, 55: 3890-3896.

Zhu Z, Bohlen P and White L (2002). Clinical development of angiogenesis inhibitors to vascular endothelial growth factor and its receptors as cancer therapeutics. *Curr. Cancer Drug Targets*, 2: 135-156.

Zhu Z, Friess H, DiMola FF, Zimmermann A, Graber HU, Korc M, and Buchler MW (1999). Nerve growth factor expression correlates with perineural invasion and pain in human pancreatic cancer. *J. Clin. Oncol.*, 17: 2419- 2428.

Zou Z, Anisowicz A, Hendrix MJ, Thor A, Neveu M, Sheng S, Rafidi K, Seftor E, and Sager R (1994). Maspin, a serpin with tumor-suppressing activity in human mammary epithelial cells. *Science*, 263: 526- 529.

Zugmaler G, Ennis BW, Deschauer B, Katz D, Knabbe C, Wilding C, Daly P, Lippman ME, and Dikson RB (1989). Transforming growth factor β 1 and β 2 are equipotent growth inhibitors of human breast cancer cell lines. *J. Cell. Physiol.*, 141: 353- 361.

Zwick E, Bange J, and Ullrich A (2001). Receptor tyrosine kinase signalling as a target for cancer intervention strategies. *Endocrine-Related Cancer*, 8: 161- 173.

ANNEXE

LA RT-PCR QUANTITATIVE EN TEMPS REEL

La méthode de RT-PCR quantitative en temps réel permet la détection et la quantification de produits de PCR au fur et à mesure de leur apparition dans le milieu réactionnel (AbiPrism 7700 Sequence Detection System, Applied Biosystems, Perkin Elmer). Cet appareil utilise la méthodologie « TaqMan » et nécessite l'utilisation de tubes optiques spécifiques qui restent fermés du début de l'amplification PCR jusqu'à la détection, réduisant les risques de contaminations.

I- METHODOLOGIE « TAQMAN ».

La méthodologie TaqMan repose sur l'activité 5'-3' exonucléase de la Taq polymérase. En effet, cette propriété est exploitée pour digérer une sonde oligonucléotide complémentaire d'une séquence située sur la cible (ici le NGF) entre les amorces sens et anti-sens. Cette sonde porte une molécule fluorescente à chacune de ses extrémités. Toutes les sondes utilisées au sein du laboratoire portent le TAMRA (6-carboxy-tetraméthyl-rhodamine) comme molécule fluorescente à l'extrémité 3' (quencher). Pour notre sonde, la molécule fluorescente à l'extrémité 5' (reporter) est le FAM (6-carboxy-fluorescein) (Figure 28).

I- 1- Choix des amorces et des sondes.

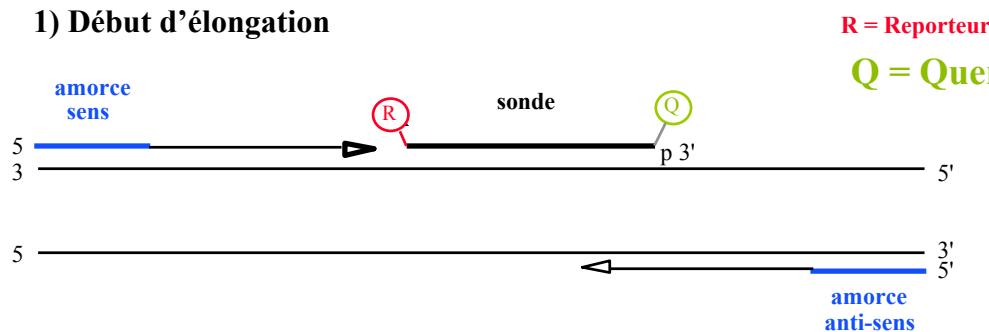
Le choix des amorces et des sondes TaqMan est réalisé à l'aide du logiciel Primer Express (Perkin Elmer). Les indications fournies par ce logiciel sont suffisamment stringentes en ce qui concerne les températures et la structure de la sonde TaqMan, de plus, des paramètres supplémentaires peuvent être modifiés de façon à choisir la sonde la plus appropriée pour l'environnement du gène cible d'intérêt.

Les amorces choisies doivent présenter les critères suivants :

- une taille comprise entre 18 et 30 nucléotides,
- une composition en GC équivalente pour les deux amorces et comprise entre 40 et 60%,
- la présence d'un à trois G ou C en 3' de l'amorce pour verrouiller l'hybridation matrice-amorce,

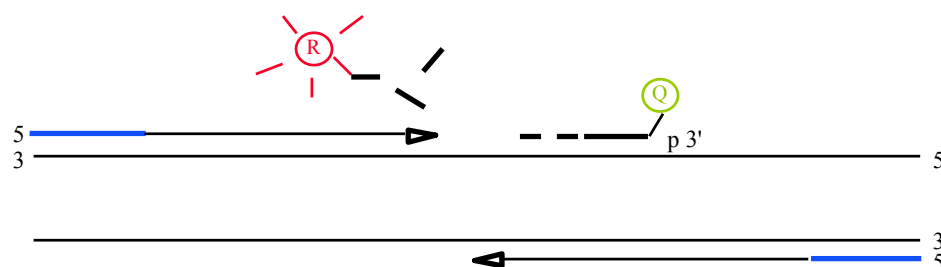
- éviter les repliements d'une amorce sur elle-même (intra-complémentarité) et les dimères d'amorces (inter-complémentarités).

1) Début d'élongation



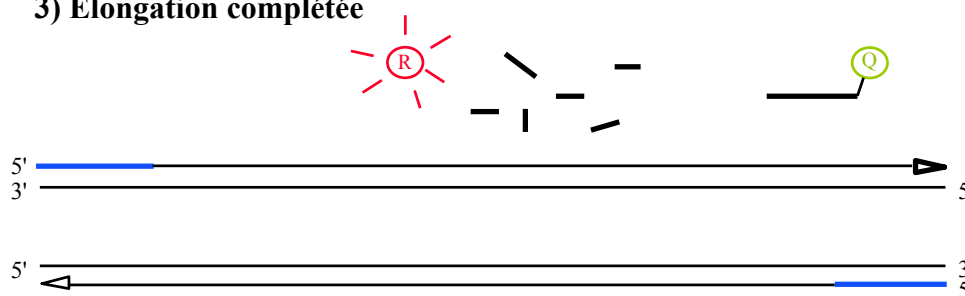
Les 2 fluorochromes, le reporteur et le quencheur sont attachés à la sonde, ils sont proches l'un de l'autre. Aucun signal de fluorescence ne peut être détecté.

2) Digestion de la sonde



Durant chaque cycle d'élongation, l'ADN polymérase Taq clive entre les 2 fluorochromes. Le reporteur, libre, s'éloigne du quencheur, il émet alors sa fluorescence.

3) Elongation complétée



La sonde détruite par l'enzyme, se déshybride de sa cible. La Taq polymérase finit son travail d'élongation.

Figure 28 : Représentation schématique de la méthodologie « TaqMan ».

La sonde TaqMan doit répondre aux mêmes critères que ceux des amorces PCR. Elle doit en outre présenter les caractéristiques suivantes :

- s'hybrider spécifiquement à la cible au niveau d'une séquence située entre les amorces sens et anti-sens,
- être phosphorylée en 3' pour éviter son élongation au cours de la PCR,
- avoir une température de fusion T_m supérieure d'au moins 5°C à celle des amorces pour que l'hybride formé entre la sonde et la cible soit plus stable que les hybrides amorces-cibles,

- ne pas s'hybrider aux amorces,
- ne pas avoir un G en 5' ce qui atténuerait l'émission de fluorescence du reporter après le clivage de la sonde.

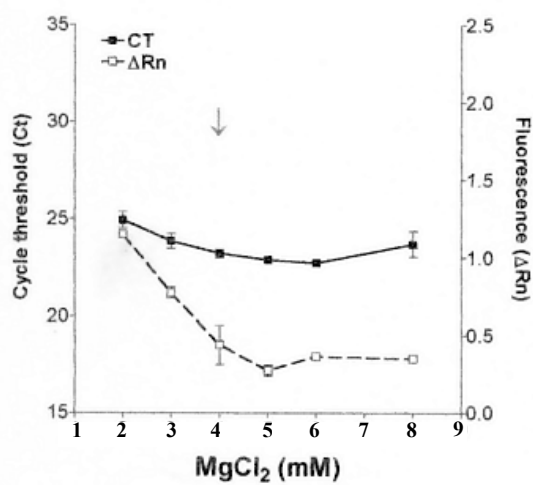
Pour le NGF les séquences nucléotidiques des amorces et la sonde sont présentées sur le table 4.

	Séquences nucléotidiques	Taille de l'amplicon (pb)	Tm	% GC
Amorce sens	5'-GAC AGT GTC AGC GTG TGG GTT-3'	74	60	57
Amorce anti-sens	5'-CCC AAC ACC ATC ACC TCC TT-3'		58	55
Sonde	5'-(6-FAM)AAG ACC GCC ACA GAC ATC AAG G(TAMRA)(p)-3'		68	56

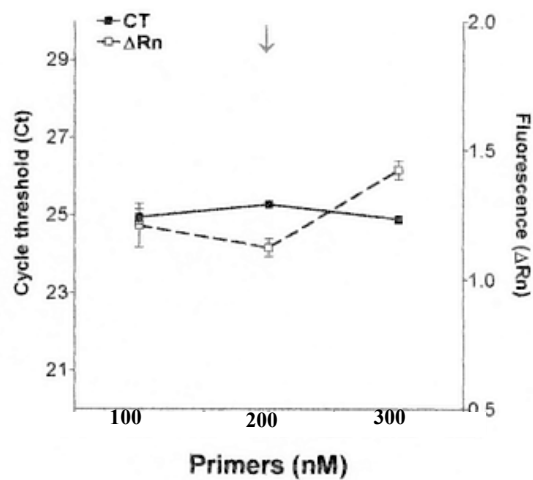
Table 4: Séquences nucléotidiques des amorces et de la sonde du Nerve Growth Factor.

I- 2- Conditions expérimentales.

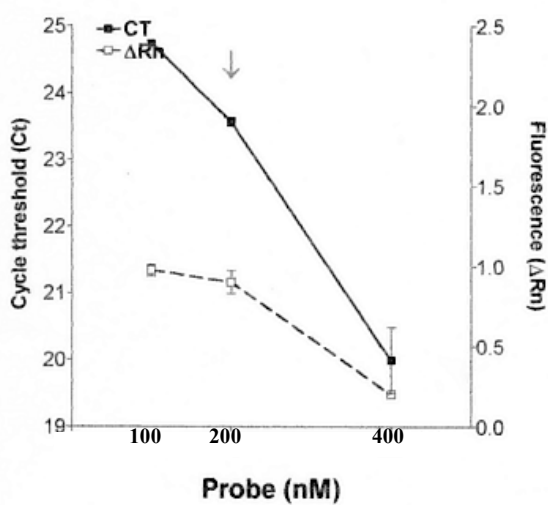
Nous avons choisi les concentrations optimales des composants du mélange réactionnel (MgCl₂, amorces, sonde et reverse transcriptase) pour parvenir au meilleur compromis entre une intensité de fluorescence élevée (Δ RN) et la détection des produits d'amplification la plus précoce possible (Ct bas). Ces conditions ont permis de définir un mélange réactionnel contenant 5 μ l de tampon TaqMan 10X (500 mM KCl ; 0.1 mM éthylènediaminetétraacétique, 100 mM tris HCl, pH8.3, 600 nM ROX), 12.5 unités de reverse transcriptase (MuLV), 1.25 unités d'Ampli Taq Gold DNA Polymérase, 20 unités d'inhibiteur de RNase, 4 mM de MgCl₂, 200 nM d'amorces sens et anti-sens, 200 nM de sonde, 300 μ M de dATP, dCTP, dGTP et 600 μ M de dUTP (Figure 29).



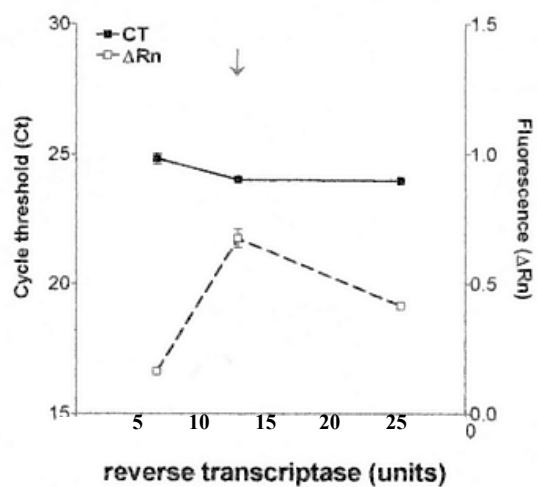
A



B



C



D

Figure 29 : Optimisation des concentrations des composants réactionnels du mélange. La RT-PCR a été réalisée avec des concentrations croissantes de MgCl_2 (A), amorces (B), sonde TaqMan (C), et MuLV reverse transcriptase (D). Les flèches indiquent les concentrations optimales. Le Ct (cycle threshold) est le nombre de cycles à partir duquel une augmentation significative de fluorescence est détectable. Le ΔRn correspond à la variation de l'intensité de fluorescence du reporter avant et après PCR, normalisé à la fluorescence d'une référence passive interne présent dans la solution (ROX : dérivé de rhodamine).

L'utilisation de concentrations élevées en $MgCl_2$, stabilisant l'hybridation de la sonde, permet d'augmenter la température de l'étape d'hybridation/élongation et de plus, la Taq Gold DNA Polymérase nécessite des concentrations élevées en $MgCl_2$. Des contrôles ont été également inclus dans chaque expérience. Les contrôles, les dilutions d'ARNs standards, et des lignées cellulaires ont été effectués en duplicate.

La transcription-réverse et l'amplification sont réalisées dans le même tube, sur 500 ng d'ARN total, selon le protocole suivant (AbiPrism 7700, Perkin Elmer) : après une incubation de 30 min. à $48^\circ C$ (reverse transcription) et de 10 min. à $95^\circ C$ (activation de la Taq Gold DNA Polymérase) ; la PCR est réalisée 15 sec. à $95^\circ C$ puis 90 sec. à $60^\circ C$ pendant 40 cycles. La figure 30 montre la localisation des amorces sens et anti-sens, et de la sonde sur l'ADNc du NGF.

```

1 agagagcgct gggagccgga ggggagcgca gcgagtttg gccagtggtc gtgcagtcca
61 aggggctgga tggcatgctg gaaccaagct cagctcagcg tccggaacca ataacagttt
121 taccaaggga gcagctttct atcctggcca cactgaggtg catagcgtga atg ccatggt
181 gttctacact ctgatcacag cttttctgat cggcatacag gcggaaccac actcagagag
241 caatgtccct gcaggacaca ccacccccca agtccactgg actaaacttc agcattccct
301 tgacactgcc cttegcagag cccgcagcgc cccggcagcg gcgatagctg caecggtggc
361 ggggcagacc cgcaacatta ctgtggacce caggctggtt aaaaagcggc gactccgttc
421 accccgtgtg ctgtttagca cccagcctcc cctggaagct gcagacactc aggatctgga
481 cttegaggtc ggtggtgctg cccccttcaa caggactcac aggagcaagc ggtcatcctc
541 ccacccatc tccacaggg gcgaattctc ggtgtgtg gac aqtqtcagcg tqlqqqlgg
601 ggataa acc accgccacag acatcaagg caggaggtg atggtgttgc dagaggtgaa
661 cattaacaac agtgtattca aacagtactt ttttgagacc aagtgccggg acccaaatcc
721 cgttgacagc gggtgccggg gcattgactc aaagcactgg aactcatatt gtaccacgac
781 tcacaccttt gtcaaggcgc tgaccatgga tggcaagcag gctgcctggc ggtttatccg
841 gatagatacg gctgtgtgt gtgtgctcag caggaaggct gtgagaagag cctgacctgc
901 cgacacgctc cctccccctg ccccttctac actctctctg gccccctcct acctcaacct
961 gtaaattatt ttaaattata aggactgcat ggtaatttat agtttataca gttttaaaga
1021 atcattattt attaattttt tggaaagc

```

Figure 30 : Séquence de l'ADNc du NGF. Les amorces reconnaissent les séquences représentées par les encadrés bleus ; la sonde se fixe entre ces 2 amorces et est représentée par l'encadré rouge. L'encadré noir désigne le codon « start » et l'encadré vert montre la localisation du signal de polyadénylation. Dans la lecture 5' vers 3', l'amorce sens débute en 578 et se termine en 598, l'amorce anti-sens de 632 à 652 et la sonde de 608 à 629. L'ARNm du NGF comprend 1047 nucléotides.

I- 3- Expression et analyses des résultats.

La détermination du nombre initial de copies dans un échantillon est réalisée en construisant une courbe étalon préparée à partir de dilutions d'un ARN standard de concentration connue. Pour chaque échantillon, le logiciel d'analyse construit une courbe d'amplification [$\Delta Rn=f(\text{nombre de cycles})$], où ΔRn représente la variation de l'intensité du signal fluorescent émis par le reporter avant et au cours de la PCR (Figure 31). Cette courbe permet de déterminer le nombre de cycles à partir duquel un signal fluorescent spécifique est détectable (threshold Cycle, Ct). Le nombre initial de copies est obtenu grâce à la relation linéaire qui existe entre le Ct et le logarithme du nombre initial de copies (Figure 32).

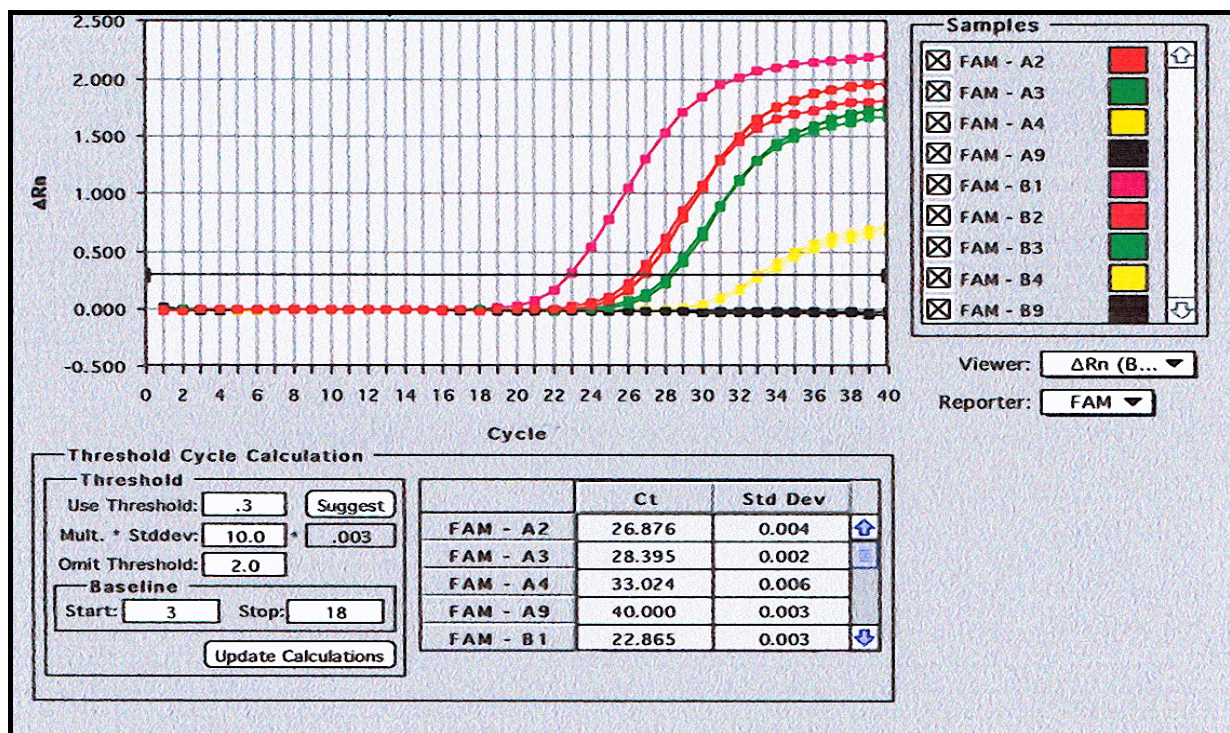


Figure 31 : Courbes d'amplification obtenues à partir de quantités décroissantes d'ARN standard NGF. En abscisse : nombre de cycles de PCR. En ordonnée : intensité du signal de fluorescence (ΔRn). Le nombre de cycles à partir duquel un signal fluorescent spécifique est détectable définit Ct ; sa valeur est d'autant plus faible que la quantité de cible de départ est importante.

La réaction de PCR suit l'équation : $N = N_0 (1+E)^{Ct}$ où

- N = nombre de molécules amplifiées
- N_0 = nombre initial de molécules
- E = efficacité de PCR
- Ct = nombre de cycles

$$\log N = \log N_0 + Ct \log (1+E)$$

$$\text{ou } \log N_0 = \log N - Ct \log (1+E)$$

$$Ct \log (1+E) = \log N - \log N_0$$

$$Ct = (\log N - \log N_0) / \log (1+E) = [1 / \log (1+E)] \times \log N - \log N_0 / \log (1+E)$$

Nous avons une équation du style $Y = AX + B$

Où $Y = Ct$, $X = \log N$ et $B = \log N_0 / \log (1+E)$

La pente de la droite est donc égale à $1 / \log (1+E)$, ce qui implique que celle-ci ne peut être inférieure à 3.32 pour $E=1$.

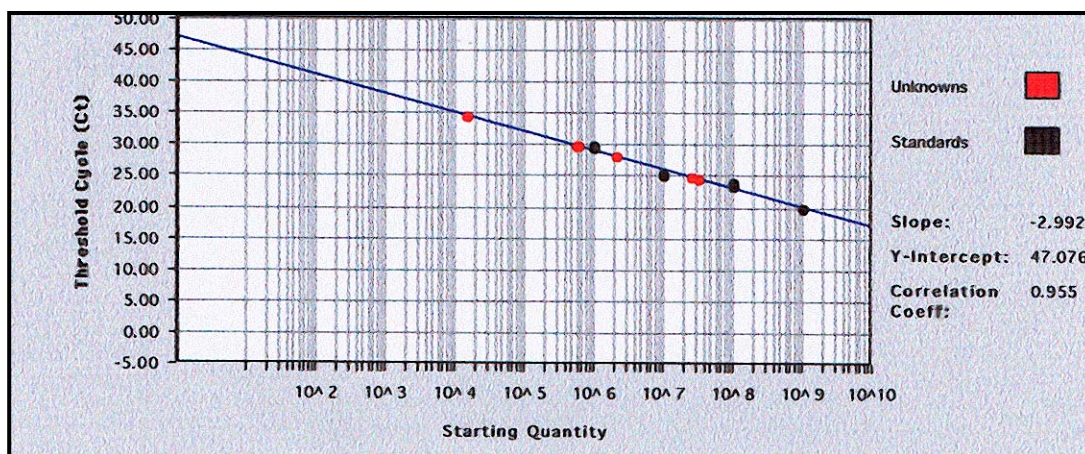


Figure 32 : Droite standard. En abscisse : quantité initiale de cible en nombre de copies. En ordonnée : Ct (threshold Cycle).

Le nombre de molécules accumulées à Ct , quelque soit N_0 , est :

$$\log N = \log N_0 + Ct \log (1+E)$$

Donc pour 2 concentrations différentes, N_0 et N_1 , on peut écrire :

$$\log N = \log N_0 + C_{t0} \log (1+E) = \log N_1 + C_{t1} \log (1+E)$$

$$\log N_0 - \log N_1 = \log (1+E) (C_{t1} - C_{t0})$$

$$\log (N_0 / N_1) = (C_{t1} - C_{t0}) \log (1+E)$$

$$N_0/N = (1+E) C_{t1} - C_{t0}$$

Pour une efficacité de 100% (E=1), si $N_0/N_1=10$ alors $C_{t1}-C_{t0}=3.32$

Si $N_0/N_1=2$ alors $C_{t1}-C_{t0}=1$.

Jusqu'à présent, comme le rôle du NGF dans le cancer du sein n'avait pas été suspecté, rien n'est connu sur la production de ce facteur de croissance. Nous souhaitons définir, dans la tumeur mammaire, les cellules productrices de NGF.

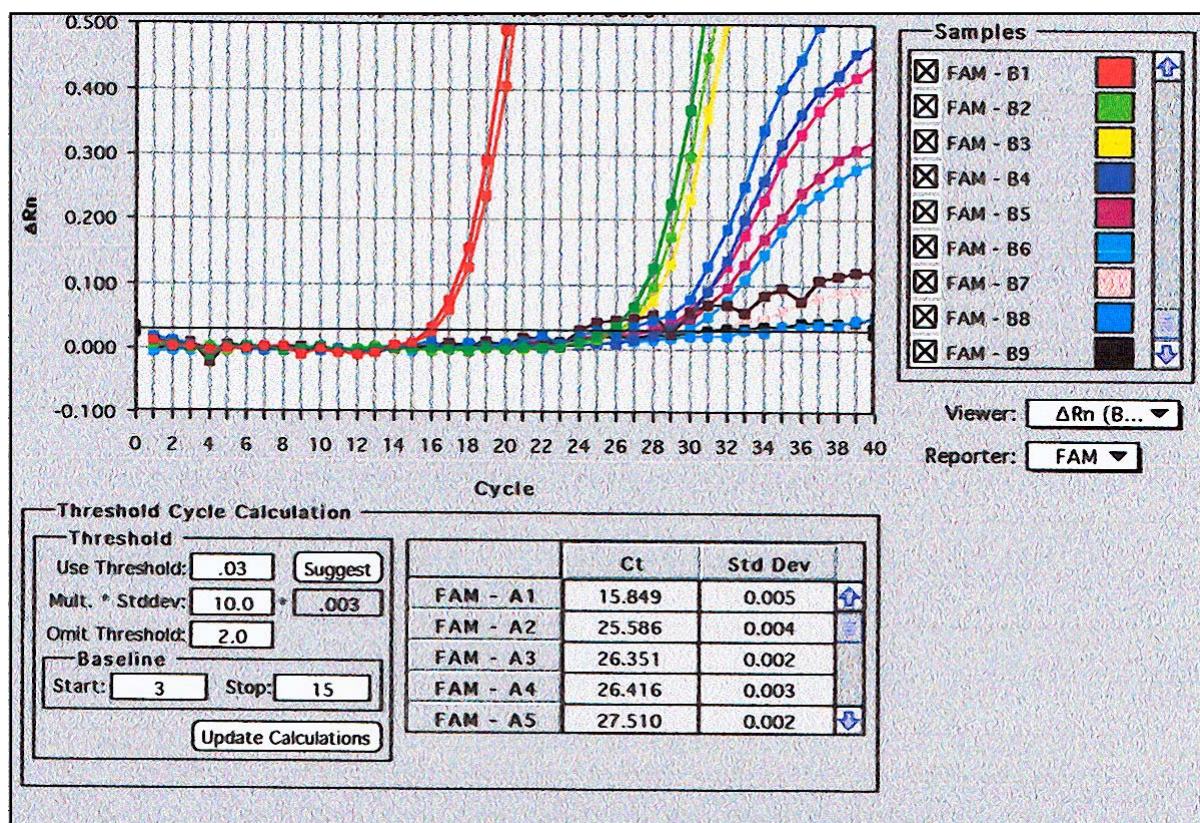


Figure 33 : Courbes d'amplification obtenues à partir de 500 ng d'ARN des lignées cancéreuses mammaires humaines. En abscisse : nombre de cycles de PCR. En ordonnée : intensité du signal de fluorescence. Deux lignées hormono-sensibles, MCF-7 et T47D, ayant conservé plusieurs caractéristiques de l'épithélium mammaire différencié, et deux lignées hormono-insensibles, MDA-MB-231 et BT20, très peu différenciées sont utilisées pour déterminer l'expression du NGF

Pour cela, une partie de notre travail consiste à quantifier les ARNms correspondants au NGF par la technique de RT-PCR quantitative en temps réel. Quatre lignées cancéreuses mammaires ont été utilisées et les différentes conditions de travail sont les mêmes que celles

précédemment décrites. Les résultats montrent que les ARNms de ce facteur de croissance sont présents dans les cellules tumorales (Figure 33). De plus, il est à remarquer que l'expression du NGF n'est pas la même dans toutes ces lignées cellulaires (Figure 34).

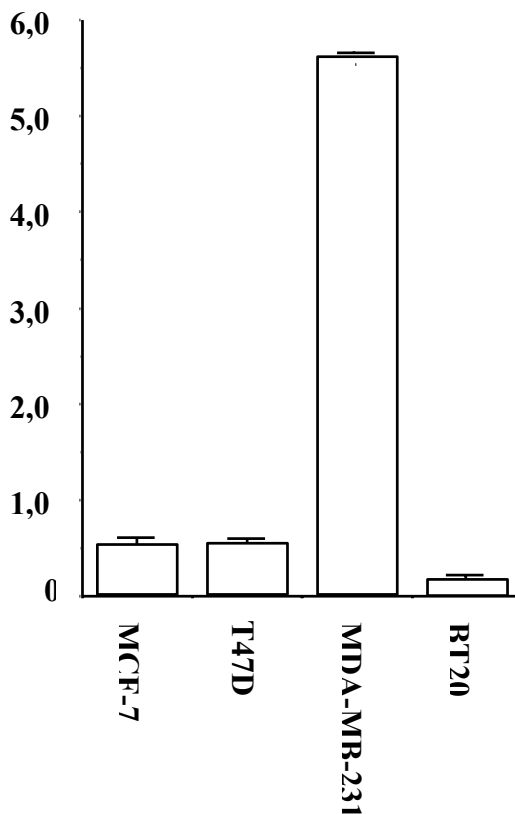


Figure 34 : Expression du NGF par RT-PCR quantitative en temps réel dans les lignées cancéreuses mammaires humaines.

Nos résultats préliminaires tendent à montrer que la lignée MDA-MB-231 exprime de plus grandes quantités d'ARNm du NGF que les autres lignées cellulaires étudiées alors qu'au niveau protéique, toutes les lignées expriment le même taux. A ce stade, ces expériences sont préliminaires et demandent à être validées.

II- CONSTRUCTION DES STANDARDS.

Les différentes étapes du protocole sont représentées sur la figure 35 ci-dessous..

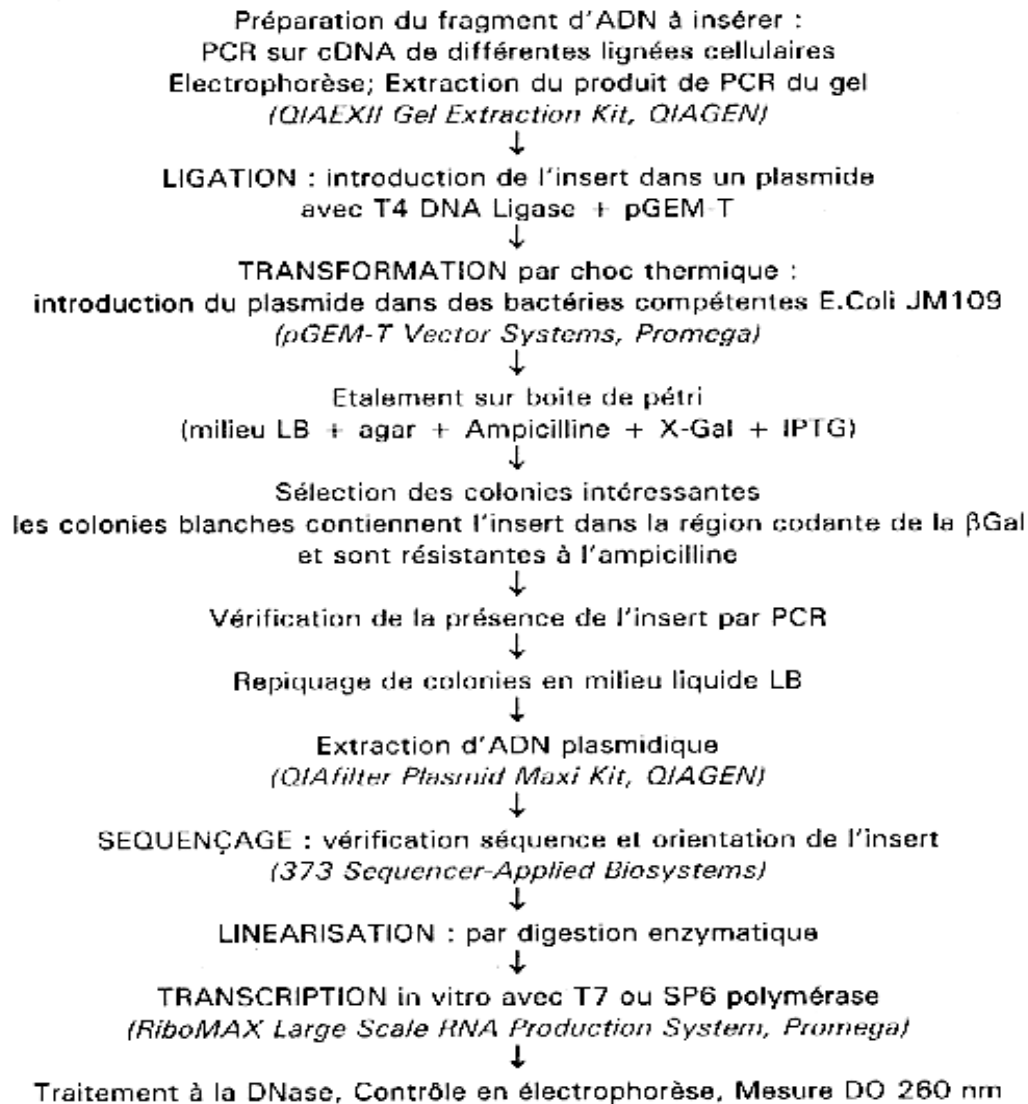


Figure 35 : Schéma récapitulatif de la préparation d'un standard par clonage d'un produit de PCR.

II- 1- Préparation du fragment d'ADN à insérer.

II- 1- a- Préparation de l'ADNc.

L'ARN des cellules cancéreuses mammaires humaines est extrait grâce au kit QIAGEN « RNA Mini Kit » et la mesure d'absorbance est prise sur l'appareil Genquant Pharmacia. Les ADN complémentaires sont préparés à partir d'1 μ g d'ARN total de lignées cellulaires cancéreuses mammaires humaines (Ready-To-Go You-First-Strand Beads, Amersham Pharmacia Biotech). Pour éliminer les structures secondaires, les ARN sont préalablement incubés 10 min. à 65°C (qsp 25 μ l d'H₂O DEPC (DiEthyl PyroCarbonate)),

puis placés 2 min. dans la glace. Ils sont ensuite transférés dans un tube contenant les réactifs (Transcriptase inverse M-MuLV, inhibiteur de Rnase et nucléotides) sous forme de billes avec 0.2 µg de « random hexamères » (qsp 33 µl d'H₂O DEPC). Ils sont maintenus 1 min. à température ambiante et incubés 60 min. à 37°C pour la reverse transcription. L'ADNc est ensuite immédiatement conservé à -20°C.

II- 1- b- Extraction de l'ADNc du gel d'agarose.

On réalise une PCR avec nos amorces d'intérêt à partir de l'ADNc préparé. Lors de cette PCR les amorces, dont le dessin correspond à celui des amorces déterminées pour la RT-PCR sont utilisées, mais avec les modifications suivantes :

- amorce sens :

5'- CGC TAA TAC GAC TCA CTA TAG CCA TGG-**amorce sens** -3'

- amorce anti-sens :

5'-AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA-**amorce anti-sens**-3'

L'amorce sens comporte la séquence T7 du système bactérien de transcription, tandis que l'amorce anti-sens commence en 5' par une queue poly-adenylée (30A). Les produits de PCR sont déposés sur un gel d'agarose à 2%. Après migration (1h à 100V), l'ADN est extrait du gel par le kit QIAEX II (QIAEX-II for DNA extraction, QIAGEN). Le gel est solubilisé en présence de 6 volumes de tampon QX1 (600µl pour 100mg). Les acides nucléiques sont adsorbés sur des particules en gel de silice (30µl de QIAEX-II) en incubant 10 min. à 50°C. Après centrifugation (1min. à 12000g) le surnageant est éliminé. Le culot est lavé une première fois avec 500µl de tampon QX1, puis deux fois avec 500ml de tampon PE. Le culot est séché (30 min.) et l'ADN élué avec 20µl d'eau.

II- 2- Clonage du produit de PCR dans un plasmide.

La ligation de l'insert est réalisée dans le plasmide pGEM (Proméga, France) : 5ng du produit de PCR sont incubés une nuit à 4°C en présence de l'enzyme T4 DNA ligase (Proméga, France), de tampon 10X et de 50ng de plasmide pGEM (Figure 36).

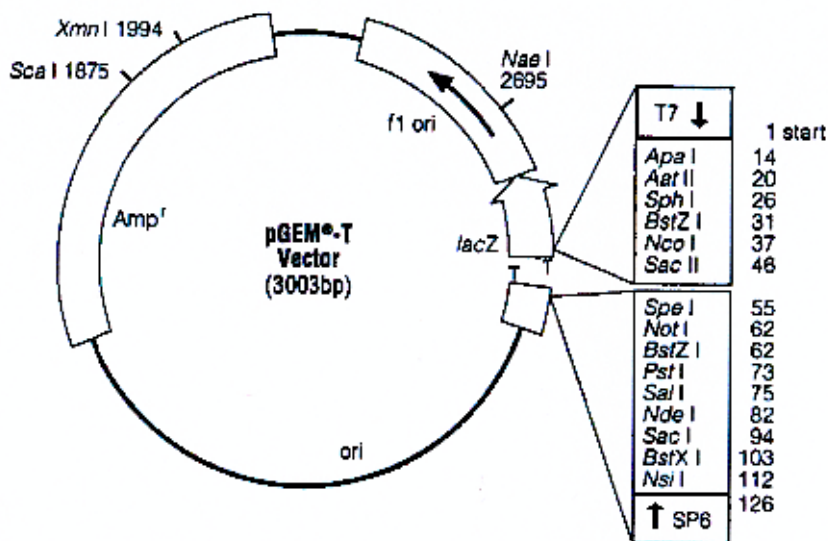


Figure 36 : Carte circulaire du plasmide pGEM-T. Ce vecteur contient : les sites d'initiation de la transcription de l'ARN polymérase T7 (1) et de l'ARN polymérase SP6 (126), les promoteurs de l'ARN polymérase T7 (2987-6) et de l'ARN polymérase SP6 (121-143), un site de clonage multiple (10-113), le codon « start » lac z (165), les séquences de l'opéron lac (2824-2984, 151-380), l'opérateur lac (185-201), la région codant la β -lactamase (1322-2182), la région du phage f1 (2368-2823), les sites de liaisons de l'amorce de séquençage sens (2944-2960) et anti-sens (161-177) du pUC/M13 et le gène de résistance à l'ampicilline. Le vecteur est préparé en coupant le plasmide pGEM-T avec EcoRV dans la région codante du gène de la β -lactamase et en ajoutant une thymide en 3' aux 2 extrémités.

II- 3- Introduction du plasmide dans un hôte approprié.

La transformation bactérienne est réalisée par choc thermique : 2 μ l de produit de ligation sont incubés 20 min. dans la glace avec 50 μ l de bactéries compétentes (*E. coli*, JM109), puis 48 s. à 42°C pour terminer 2 min. dans la glace. Après addition de 250 μ l d'un milieu hypernutritif (SOC, Proméga), on incube 15min. à 37°C avant de laisser sous agitation douce à 37°C pendant 75 min. Le produit de la transformation est étalé dans des boîtes de Pétri sur du milieu LB solide (bactotryptone 10g ; extrait de levure 5g ; NaCl 10g ; eau ultrapure qsp 1l ; pH7+ agar 1.5 g/100ml) contenant de l'ampicilline (25mg/ml), de l'X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside, 20mg/ml) et de l'IPTG(isopropylthio- β -D-galactoside, 25mg/ml). On laisse incuber dans une étuve à 37°C pendant une nuit. Pour sélectionner les recombinants, la méthode employée repose sur la mise en évidence de la

présence ou non d'une activité β - galactosidase. Pour cela nous utilisons le X-Gal, dont l'hydrolyse libère une substance colorée en bleu, en plus du galactose, et l'IPTG, inducteur « gratuit » de la synthèse de la β - galactosidase. La sélection des colonies est réalisée visuellement : bleues si l'insert est absent ou blanches s'il est présent. En effet, une colonie bactérienne pousse si chacune des bactéries qui la compose possèdent le plasmide pGEM recombiné ou non (puisque ce vecteur code une protéine qui est sécrétée dans l'espace périplasmique de la bactérie, où elle inactive l'ampicilline qui y serait présente en hydrolysant l'anneau β -lactame de cette pénicilline).

II- 4- sélection des colonies intéressantes et mise en culture.

Finalement, les colonies blanches, témoins de la présence de recombinants, sont précieusement recueillies. La présence de l'insert dans le plasmide est contrôlée par une PCR classique avec les amorces du gène d'intérêt sur des colonies bactériennes blanches. Les produits de PCR sont déposés sur un gel d'agarose pour vérifier la taille de l'insert. Les bactéries contenant l'insert sont mises en culture dans 50ml de milieu LB en présence d'ampicilline à 37°C.

II- 5- Préparation du standard ARN.

II- 5- a- Extraction de l'ADN plasmidique.

La culture bactérienne est centrifugée (5500g ; 20min ; 4°C). Après élimination du surnageant, le culot de bactéries est remis en suspension dans 10 ml de tampon P1(50mM TrisCl, pH8 ; 10mM EDTA) contenant de la RnaseA (100 μ g/ml). La lyse des bactéries est réalisée avec 10ml de tampon P2 (200mM NaOH, 1% SDS), 5min. à température ambiante. Le lysat est neutralisé par 10ml de tampon P3 (3M acétate de potassium, pH5.5) et l'ensemble est transféré immédiatement sur une colonne QIAFilter, puis incubé 10min. à température ambiante. Le filtrat est ensuite appliqué sur une colonne QIAGEN-tip sous des conditions salines définies. L'ADN plasmidique se lie spécifiquement à la membrane. Il est débarrassé des protéines, ARN et autres contaminants cellulaires par 2 lavages avec 30ml de tampon QC (1M NaCl ; 50mM MOPS, pH7 ; 15% isopropanol). L'ADN est élué avec 15ml de tampon

QF (1.25M NaCl ; 50mM Tris, Tris Cl, pH8.5 ; 15% isopropanol), précipité avec 10.5ml d'isopropanol à température ambiante et centrifugé (15000g ; 30min. ; 4°C). Le culot est lavé (5ml d'éthanol 70% à température ambiante), centrifugé (15000g ; 10min. ; 4°C), puis séché (10min. à l'air) avant d'être dissout dans 500µl de tampon TE (10mM TrisCl, pH8, 1mM EDTA).

II- 5- b- Séquençage du plasmide (réaction de Sanger).

La séquence de l'insert et son sens d'insertion dans le plasmide sont vérifiés par séquençage et électrophorèse sur séquenceur automatique (373 DNA Sequencer, Applied Biosystem). La réaction de séquence de l'ADN plasmidique (250ng) est réalisée à partir de l'amorce universelle sens du phage M13, dont la séquence se trouve dans le plasmide, en présence du mélange réactionnel (Taq polymérase+ dNTP+ didéoxynucléotides marqués, Amersham). La réaction se fait sur 25 cycles (96°C- 10sec/ 50°C-5sec/ 60°C-4min). Les produits de réaction sont purifiés par gel filtration sur résine P10 (centrifugation : 1min. / 2500rpm). Après évaporation, chaque échantillon est repris dans 3µl de tampon de chargement et dénaturé (2min/ 90°C) juste avant le dépôt sur gel d'acrylamide à 6%.

II- 5- c- Linéarisation du plasmide.

La carte circulaire du plasmide est représentée sur la figure 5. Le plasmide est linéarisé par une enzyme de restriction choisie en fonction du sens de l'insert (75min à 37°C). La séquence reconnue par cette enzyme doit être absente de la séquence de l'insert. La linéarisation est contrôlée sur gel d'agarose 1%. Le plasmide linéarisé est extrait par le phénol (200µl), vortexé et centrifugé (3min à 2500rpm). Il est précipité une nuit à -20°C en présence de 220µl d'acétate d'ammonium 4M et 880µl d'éthanol 100%. Le plasmide linéarisé est ensuite centrifugé (30min à 4°C, 12000g), lavé à l'éthanol, centrifugé (15min à 4°C, 12000g), séché et repris dans 50µl d'eau stérile.

II- 5- d- Transcription *in vitro*.

La partie d'ADN du plasmide contenant l'insert est située entre le site de coupure de l'enzyme de restriction et le site de démarrage de la transcription, et transcrit par la T7 ou la SP6 polymérase (RiboMax large scale RNA Production Systems, Proméga) : tampon 5X 50µl ; rNTPs 50µl ; ADN plasmidique 50µl ; Mix 25µl ; H2O 75µl ; 3 h à 37°C. Le produit de transcription est ensuite traité à la DNase (RQ1 : 2 unités/mg d'ADN) 15 min. à 37°C pour éliminer l'ADN plasmidique.

II- 5- e- Extraction du standard ARN.

L'ARN est extrait, selon une technique dérivée de Chomczynski et Sacchi 1987, par un volume d'un mélange de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25/24/1). On vortexe 1 min. et on centrifuge (2 min. ; 12000g à 4°C). La phase aqueuse supérieure est transvasée dans un nouveau tube avec un volume de chloroforme/alcool isoamylique (24/1). On vortexe 1 min. et on centrifuge (2 min. ; 12000g à 4°C). 1/10 acétate d'ammonium 3M et un volume d'isopropanol sont ajoutés au surnageant. L'ARN est précipité 1 h à -20°C, puis lavé à l'éthanol. Le culot est repris dans 200 ml d'H₂O DEPC.

II- 5- f- Calcul du nombre de copies du standard ARN.

La qualité de l'ARN est vérifiée par électrophorèse en gel d'agarose, et sa concentration est estimée en mesurant l'absorbance à 260 nm. Le nombre absolu de copies d'ARN est calculé en utilisant le poids moléculaire du plasmide et du gène d'intérêt cloné, ainsi que le nombre d'Avogadro (sachant qu'une mole contient 6.023×10^{23} molécules).

Nombre de molécules/ml = (concentration en µg/ml x 6.023×10^{23}) / (poids moléculaire du standard ARN x 10^6).

Une solution contenant 10^{16} molécules/µl est stockée à -80°C. Cette solution stock est utilisée pour faire des dilutions successives ultérieures pour la PCR quantitative en temps réel.

Title : Nerve growth factor overexpression and autocrine loop in breast cancer cells

More than fifty years separate the discovery of Nerve Growth Factor (NGF) to the demonstration of its growth stimulatory effects of breast cancer cells. Our laboratory has been precursor in demonstrating that NGF is mitogenic and anti-apoptotic for breast cancer cells and that these activities are mediated *via* two categories of membrane receptors: p140^{TrkA} (tyrosine kinase) and p75^{NTR} (member of Tumor Necrosis Factor-Receptor family).

In the present work, we demonstrate that NGF is synthesized and released by breast cancer cells. This has been shown both *in vitro* (cellular cultures) and *in vivo* (tumor biopsies). In contrast, NGF production was not detected in normal breast epithelial cells, suggesting that NGF has a substantial marker value in breast cancer. We have also shown that NGF is released by breast cancer cells, through secretion vesicles, in a biologically active form. Importantly, NGF secretion resulted in an autocrine stimulation loop of breast cancer cell growth. Subsequently, we have shown that 4-OH-tamoxifen, a common drug used in breast cancer treatment, inhibits the mitogenic effect of NGF by induction of the tyrosine phosphatase FAP-1/ PTPL1, inhibiting the phosphorylation of p140^{TrkA} and MAP-kinases. Using proteomics strategy, we have identified potential molecular partners of FAP-1. Finally, we have demonstrated that NGF stimulation induces the TRADD (TNF-R associated Death Domain) to p75^{NTR}, resulting in increased survival of breast cancer cells.

In conclusion, our results demonstrate that NGF and its signaling pathways are potential markers and potential therapeutic targets in breast cancer.