

**UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE  
ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE-SANTE DE LILLE**

## **THESE**

présentée pour l'obtention du grade de  
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE EN SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE**

par

**Alessandro FURLAN**

**Rôle du facteur de transcription Ets-1  
dans les capacités invasives et angiogéniques  
de cellules cancéreuses mammaires ;  
implications dans la tumorigenèse mammaire**

soutenue publiquement le 14/12/2007

devant le jury composé de:

<b>Président :</b>	<b>Pr Didier VIEAU</b>
<b>Rapporteurs :</b>	<b>Dr Myriam POLETTE</b>
	<b>Pr Nicolas WERNERT</b>
<b>Examineurs :</b>	<b>Dr Bernard VANDENBUNDER</b>
	<b>Dr Flavio MAINA</b>
<b>Co-directeur de thèse et tuteur:</b>	<b>Dr Albin POURTIER</b>

# RESUME

Les cancers du sein sont souvent invasifs et angiogéniques, c'est-à-dire qu'ils induisent le développement à leur profit de néo-vaisseaux sanguins, ce qui va favoriser leur dissémination locale puis à distance, en lien avec un mauvais pronostic vital pour les patientes.

Le facteur de transcription Ets-1 est surexprimé dans les cancers du sein et corrélé à des capacités invasives accrues. Nous avons montré que la surexpression d'Ets-1 dans des cellules cancéreuses mammaires murines MMT déclenchait la mise en place de programmes menant à une invasion accrue, de manière individuelle, dans des gels mimant la matrice extracellulaire. Cette exploration est toutefois contrebalancée par une densité cellulaire réduite et l'incapacité de ces cellules à former des structures multicellulaires organisées.

En parallèle, cette surexpression d'Ets-1 dans les cellules cancéreuses accroît leur potentiel angiogénique *in vitro*, en augmentant la capacité de leurs milieux conditionnés à induire la morphogenèse de cellules endothéliales, et en favorisant leurs interactions physiques avec ces mêmes cellules endothéliales.

L'injection de ces cellules cancéreuses en souris nude a permis de vérifier la relevance *in vivo* du déséquilibre induit par Ets-1 au profit de l'invasion et au détriment de la croissance. De plus, les tumeurs surexprimant Ets-1 présentent une angiogenèse soutenue et structurellement différente. L'ensemble de ces données nous a amené à nous interroger sur le rôle d'Ets-1 dans le processus de métastase *in vivo*.

En résumé, nos travaux indiquent Ets-1 comme un régulateur clé de la dissémination des cellules cancéreuses mammaires, orchestrant à la fois les processus d'invasion et d'angiogenèse, ce qui suggère un rôle probable dans les capacités métastatiques de ces cellules.

**mots clés** : cancer, invasion, adhérence, angiogenèse, métastase

thèse réalisée sous la co-direction du Dr Albin Pourtier et du Dr Yvan de Launoit  
à l'UMR8161/Institut de Biologie de Lille  
Equipe 5, « Initiation et Evolution de Cancers Epithéliaux »  
1, rue du Pr Calmette  
59021 Lille CEDEX

# ABSTRACT

## **Role of Ets-1 transcription factor in the invasive and angiogenic abilities of mammary cancer cells; involvement in mammary tumorigenesis**

Breast cancers are most often invasive angiogenic, i.e. they induce the development to their profit of neo-blood vessels. Both features are crucial for the dissemination of cancer cells in their local environment then in distant organs, and are associated with a poor prognosis.

Ets-1 transcription factor is overexpressed in breast cancers, and correlated with enhanced invasive abilities. We showed that Ets-1 overexpression in murine mammary cancer cells triggered the completion of programs leading to enhanced and more individualistic invasiveness, in matrix-mimicking gels. This cell invasion is however counterbalanced by a reduced cellular density, and the inability of these cells to develop multicellular organized structures.

Besides, Ets-1 favors the angiogenic potential of cancer cells *in vitro*. Its overexpression by cancer cells actually enhances the ability of their conditioned media to induce the morphogenesis of endothelial cells cultured on or within matrix gels. Moreover, Ets-1 overexpression in cancer cells also promotes their physical interactions with these same endothelial cells.

Injection of these cancer cells into nude mice confirmed *in vivo* the relevancy of the imbalance induced by Ets-1 between invasion and growth, to the detriment of the latter. Moreover, the tumors overexpressing Ets-1 induced a sustained angiogenesis, with structurally different vessels. These results led us to consider the question of Ets-1 role in breast cancer metastasis.

Taken together, our work indicates Ets-1 as a key regulator of mammary cancer cell dissemination, through the orchestration of invasive and angiogenic processes, suggesting a probable role in the metastatic abilities of these cells.

**key words** : cancer, invasion, adhesion, angiogenesis, metastasis

# TABLE DES MATIERES

<b>RESUME .....</b>	<b>2</b>
<b>TABLE DES MATIERES.....</b>	<b>4</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS .....</b>	<b>7</b>
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>9</b>
1. LA GLANDE MAMMAIRE .....	9
1.1. Anatomie du sein chez la femme .....	9
1.2. Développement normal de la glande mammaire.....	10
2. LES CANCERS DU SEIN .....	11
2.1. Qu'est-ce que le cancer ?.....	11
2.2. Généralités sur les mécanismes génétiques de la cancérisation.....	12
2.3. Les tumeurs du sein .....	13
2.4. L'évolution maligne des cancers du sein, les métastases.....	14
3. LE DESEQUILIBRE ENTRE LA PROLIFERATION ET LA MORT CELLULAIRE LORS DE LA TUMORIGENESE MAMMAIRE.....	15
3.1. La prolifération cellulaire.....	15
3.2. L'échappement à la mort cellulaire.....	17
4. L'INVASION CELLULAIRE DANS LA PROGRESSION TUMORALE.....	20
4.1. La transition épithélio-mésenchymateuse .....	20
4.2. Les interactions avec la matrice extracellulaire.....	22
4.3. La migration des cellules au sein de la matrice extracellulaire .....	27
5. LA CONTRIBUTION DU MICROENVIRONNEMENT TUMORAL .....	33
6. L'ANGIOGENESE, ACTEUR CLE DE LA PROGRESSION TUMORALE .....	34
6.1. Les mécanismes moléculaires de l'angiogenèse .....	34
6.2. L'angiogenèse tumorale et ses implications.....	36
6.3. L'adhérence des cellules cancéreuses à l'endothélium .....	37
6.4. Les stratégies anti-angiogéniques de traitement des cancers .....	38
7. LE FACTEUR DE TRANSCRIPTION ETS-1.....	39
7.1. La famille des facteurs de transcription ETS.....	39
7.2. Les mécanismes d'action du facteur de transcription Ets-1.....	40
7.3. Le facteur de transcription Ets-1 dans le développement normal .....	43
7.4. Le facteur de transcription Ets-1 dans la tumorigenèse .....	44
8. PLAN DE TRAVAIL DE THESE .....	46



<b>RESULTATS .....</b>	<b>47</b>
DEMARCHE INITIALE .....	47
1. ETS-1, CHEF D'ORCHESTRE DE L'INVASION .....	48
1.1. <i>Introduction</i> .....	48
1.2. <i>Résultats</i> .....	48
1.3. <i>Résultats complémentaires : présentation et discussion</i> .....	49
1.4. <i>Conclusion</i> .....	55
2. LA FACE CACHEE D'ETS-1, LA REPRESSION DE LA CROISSANCE TUMORALE .....	56
2.1. <i>Introduction</i> .....	56
2.2. <i>Résultats</i> .....	56
2.3. <i>Résultats complémentaires ; présentation et discussion</i> .....	57
2.4. <i>Conclusion/discussion</i> .....	61
3. ETS-1 CONTROLE LE POTENTIEL ANGIOGENIQUE DES CELLULES MAMMAIRES CANCEREUSES .....	63
3.1. <i>Introduction</i> .....	63
3.2. <i>Résultats</i> .....	63
3.3. <i>Conclusion</i> .....	64
<b>DISCUSSION .....</b>	<b>66</b>
1. ETS-1 CHEF D'ORCHESTRE DE L'INVASION .....	66
1.1. <i>La dissociation des cellules</i> .....	66
1.2. <i>La migration et l'invasion cellulaire</i> .....	67
2. LA FACE CACHEE D'ETS-1 .....	69
2.1. <i>La croissance et l'invasion, deux aspects de la tumorigenèse</i> .....	69
2.2. <i>Les cibles moléculaires d'Ets-1 dans la croissance cellulaire</i> .....	70
2.3. <i>La culture des cellules en gels de matrice</i> .....	71
3. LE MICROENVIRONNEMENT TUMORAL .....	72
3.1. <i>Le dialogue entre l'épithélium et le stroma</i> .....	72
3.2. <i>L'induction de l'expression d'Ets-1</i> .....	72
3.3. <i>Le rôle d'Ets-1 dans l'angiogenèse tumorale</i> .....	73
4. ETS-1 ET LE PROCESSUS DE METASTASE .....	76
4.1. <i>Le point faible des traitements actuels, les métastases</i> .....	76
4.2. <i>Les interactions avec l'endothélium dans le processus de métastase</i> .....	76
4.3. <i>L'étude du rôle d'Ets-1 dans le processus de métastase</i> .....	77
5. PERSPECTIVES FONDAMENTALES ET THERAPEUTIQUES .....	78
5.1. <i>Les gènes importants pour le processus métastatique</i> .....	78
5.2. <i>La place d'Ets-1 dans le processus de métastase</i> .....	79
5.3. <i>Ets-1 en tant que cible des thérapies anti-cancéreuses</i> .....	80

<b>VALORISATION DES COMPETENCES UN NOUVEAU CHAPITRE DE LA THESE</b>	<b>82</b>
1. CADRE GENERAL ET ENJEUX DE LA THESE .....	83
2. DEROULEMENT, GESTION ET COUT DU PROJET DE THESE .....	84
3. COMPETENCES ET QUALITES MISES EN OEUVRE .....	88
4. RESULTATS ET IMPACT DE LA THESE .....	90
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>91</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>109</b>
ANNEXE1 : EXPRESSION D'ETS-1 DANS LES CANCERS HUMAINS.....	109
ANNEXE 2 : <i>ST6GALNAC I EXPRESSION IN MDA-MB-231 BREAST CANCER CELLS GREATLY MODIFIES THEIR O-GLYCOSYLATION PATTERN AND ENHANCES THEIR TUMOURIGENICITY.</i> .....	110
ANNEXE 3 : POSTER EXPOSE LORS DU CONGRES EUROCANCER EN JUIN 2006.....	111
ANNEXE 4 : POSTER EXPOSE LORS DU CONGRES ANNUEL DE LA TUMOR MICROENVIRONMENT SOCIETY EN MARS 2007. ....	112

## LISTE DES ABREVIATIONS

ADN Acide DésoxyriboNucléique  
AMV (Avian Myeloblastosis Virus)  
AP-1 (Activator Protein-1)  
Bcl-2/Bcl-XL (B Cell Lymphoma)  
BMP (Bone Morphogenetic Protein)  
CBP (CREB Binding Protein) / p300  
CDK (Cyclin-Dependent Kinase)  
DARC (Duffy Antigen Receptor for Chemokines)  
DB (DNA-Binding domain)  
EBS (Ets Binding Site)  
ECM (ou MEC) ExtraCellular Matrix (ou Matrice ExtraCellulaire)  
EGF (Epidermal Growth Factor)  
EMT (ou TEM) Epithelial-Mesenchymal Transition (ou Transition Epithélio-Mésenchymateuse)  
ETS (E Twenty-six Specific)  
FGF (Fibroblast Growth Factor)  
HB-EGF (Heparin Binding-EGF)  
HGF/SF (Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor)  
HIF-1 (Hypoxia-Inducible Factor)  
IGF (Insulin-like Growth Factor)  
IGF-BP (IGF Binding Protein)  
KAI-1 (Kang AI, anti-cancer en chinois)  
MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase)  
MDR (MultiDrug Resistance)  
MMP (Matrix MetalloProteinase)  
MMT (Mouse Mammary Tumor)  
MSP (Macrophage-Stimulating Protein)  
MVD (Micro Vessel Density),  
NK (Natural Killer)  
NLS (Nuclear Localization Sequence)  
p16 INK4a (INhibitor of cdK4a)  
PD-ECGF (Platelet-Derived Endothelial Cell Growth Factor)  
PEA-3 (Polyoma Enhancer Activator)  
PIGF (Placental Growth Factor)  
RECK (REversion-inducing Cystein-rich protein with Kazal motifs)  
TAD (TransActivation Domain)

TCF/LEF (Lymphoid Enhancer Factor/T Cell Factor proteins)

TDLU (Terminal Duct Lobular Unit)

TEB Terminal End Buds

TGF (Transforming Growth Factor)

TIMP (Tissue Inhibitor of MetalloProteinase)

TMIM (Tumor Microenvironment Invasion Model)

tPA (tissue-type Plasminogen Activator)

uPA (urokinase-type Plasminogen Activator)

VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)

# INTRODUCTION

## 1. La glande mammaire

### 1.1. Anatomie du sein chez la femme

Le sein est un organe glandulaire dont la fonction est de produire du lait. Chaque sein est composé de 15 à 20 secteurs, ou lobes, reliés au mamelon par les canaux galactophores. Ces derniers se ramifient en canaux de plus petit calibre, aboutissant à des structures terminales éparpillées dans le sein appelées lobules (cf figure 1). Les lobules sont constitués de petits tubes ou ductules terminaux agencés de façon radiée autour du galactophore terminal intralobulaire.

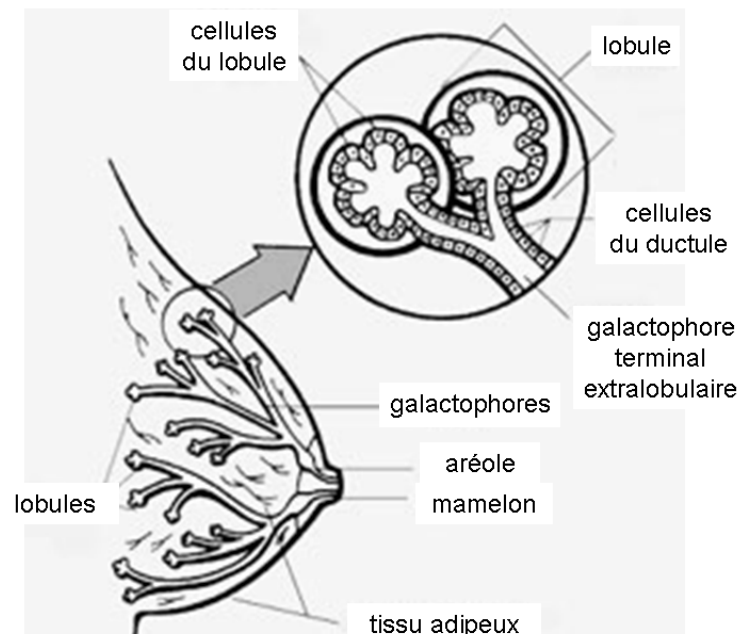


Figure 1. Structure du sein. (d'après <http://www.mammo.it/generalita.htm>)

Les lobules sont composés d'une double couche de cellules. La couche interne bordant la lumière est composée de cellules épithéliales, tandis que la couche externe est formée de cellules myoépithéliales qui participent entre autres à l'élaboration d'une membrane basale. Cette membrane basale est une zone d'échange avec le tissu conjonctif, notamment adipeux. Elle s'oppose au passage des cellules cancéreuses, et son respect/ou non par celles-ci a permis de définir le concept de carcinome in situ/ ou invasif.

Le concept de TDLU (Terminal Duct Lobular Unit) englobe le lobule et le galactophore terminal extralobulaire (cf figure 1). De par sa grande sensibilité aux hormones, il représente le lieu de développement de la plupart des proliférations épithéliales bénignes et malignes.

Les ductules terminaux sont entourés par un tissu conjonctif lâche très vascularisé, le tissu palléal. C'est un lieu d'échange et un site privilégié de la croissance du tissu mammaire. Outre les vaisseaux sanguins, qui apportent aux cellules l'oxygène et les nutriments qui leur sont nécessaires,

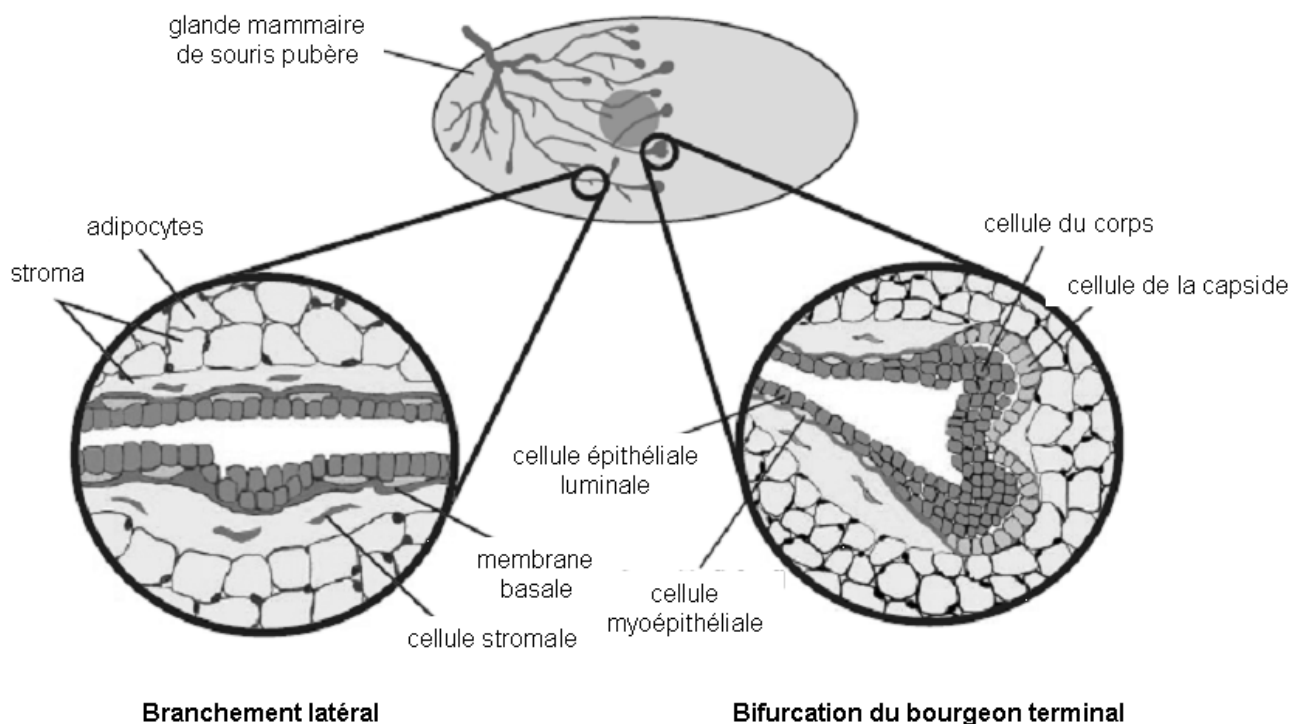
la glande mammaire comporte également un réseau de vaisseaux lymphatiques. Ceux-ci drainent la lymphe, formée à partir de certains éléments du sang et du liquide interstitiel présent dans les espaces intercellulaires, vers les ganglions lymphatiques. Les vaisseaux sanguins et lymphatiques serviront de voie de dissémination à distance des cellules cancéreuses.

Enfin, la plus grande partie du sein est constituée de tissu adipeux qui comble l'espace situé entre les différentes structures du sein.

## **1.2. Développement normal de la glande mammaire**

Le développement de la glande mammaire s'initie à partir d'une bandelette d'ectoderme qui envahit le mésenchyme sous-jacent. Ce bourgeon primaire rudimentaire se ramifie peu durant la vie foetale, et aboutit à la formation d'une cupule qui va définir le futur emplacement du mamelon.

Chez la femme, la glande mammaire croît de manière isométrique jusqu'à la puberté. La libération des hormones ovariennes à ce stade va induire le développement des bourgeons des extrémités terminales ou TEBs (Terminal End Buds), structures en forme de bulbes composées de plusieurs couches épithéliales cuboïdes. Ces TEBs sont les fronts d'invasion des ductules qui prolifèrent et s'étendent dans le tissu conjonctif par le processus de morphogénèse de branchement. Ils se ramifient par bifurcation terminale ou ramification latérale (cf figure 2), jusqu'à ce que l'ensemble du tissu adipeux soit colonisé (Sternlicht, 2006).



**Figure 2. La morphogénèse de branchement de la glande mammaire**, (tiré de (Wiseman and Werb, 2002)). Lorsque la ramification s'opère par branchement latéral, elle s'initie par une prolifération des cellules lumineuses qui vont former un renflement au niveau du ductule. L'arborescence épithéliale peut également avoir lieu par bifurcation du bourgeon terminal, où prolifèrent les cellules du "corps".

La glande mammaire, contrairement à la plupart des autres tissus solides de l'organisme qui conservent leur structure première tout au long de la vie, est le siège d'un remodelage régulier lors de la vie adulte. En effet, la glande subira un léger remaniement à chaque cycle de stimulation ovarienne. De plus, lors de la grossesse, les hormones reproductives induisent l'expansion et la différenciation terminale de l'épithélium mammaire en des alvéoles sécrétantes, produisant du lait. L'ensemble du tissu mammaire est alors occupé par les acini tout au long de l'allaitement, au détriment du tissu adipeux, qui subsiste sous la forme d'adipocytes enchâssés entre les tubules. Le sein s'est spécialisé pour accomplir sa fonction lactifère. Une phase d'involution de la glande aura lieu suite au sevrage, au cours de laquelle les cellules épithéliales dégénéreront par apoptose.

L'homéostasie de la glande mammaire implique un dialogue finement régulé entre les cellules épithéliales et leur stroma. Les stimuli hormonaux vont être perçus par les cellules épithéliales et stromales, et diriger ces interactions paracrines. Il est important de noter que nombre des mécanismes mis en jeu lors de la morphogenèse mammaire, comme l'invasion, la prolifération cellulaire, la résistance à l'apoptose et l'angiogenèse sont détournés ou corrompus par les cellules cancéreuses en développement (Wiseman and Werb, 2002). Nous nous intéresserons ultérieurement en détail à ces mécanismes.

## 2. Les cancers du sein

### 2.1. Qu'est-ce que le cancer ?

Le mot cancer, du latin *cancer, cancri*, « crabe », vient du grec *karkinos* qui signifie « écrevisse », ou « pince ». C'est Hippocrate qui donna la première définition de la maladie, appelée alors « carcinome » (terme conservé pour désigner les cancers d'origine épithéliale) ou « squirre » : une tumeur dure, non inflammatoire, avec tendance à la récurrence et à la généralisation, amenant une issue fatale. Cette dénomination vient de l'aspect de sa propagation en rayons, mimant les pattes de l'animal.

D'après le Dictionnaire de Médecine Flammarion, "le cancer est une tumeur liée à la prolifération à la fois anarchique et indéfinie d'un clone cellulaire conduisant à la destruction du tissu originel, à l'extension locale, régionale et générale de la tumeur et à la mort de l'individu en l'absence de traitement".

Les cellules saines, qui sont l'élément de base des tissus, se divisent et se renouvellent ou meurent de manière ordonnée. Ce processus d'homéostasie permet à l'organisme de conserver son équilibre. Il arrive cependant que des cellules se mettent à croître de façon dérégulée, et produisent du tissu excédentaire anormal, ou tumeur. Les tumeurs peuvent être bénignes ou malignes.

- Les tumeurs bénignes ne sont pas des cancers ; elles ne diffusent pas dans l'organisme et menacent rarement la vie du patient. Le plus souvent, les tumeurs bénignes peuvent être enlevées par la chirurgie et les risques de récurrence locale sont faibles.

- Les tumeurs capables d'envahir les tissus avoisinants sont appelées tumeurs malignes ou cancers. De plus, ces tumeurs cancéreuses peuvent, par les voies sanguines ou lymphatiques,

disséminer dans d'autres parties de l'organisme, parfois très loin de la tumeur d'origine, pour y former de nouvelles tumeurs, ou métastases (du grec metastasis « changement de place »). Ce mode de propagation à distance est l'une des difficultés majeures posées par les cancers car, même après l'ablation de la tumeur cancéreuse initiale, la maladie est susceptible de réapparaître sous cette forme métastatique.

Cette notion de métastase est primordiale lorsqu'on évoque les carcinomes, car les métastases constituent la première cause de mortalité liée à ces cancers. La plupart des patients atteints de cancer ne meurent pas en effet de l'affection du site primaire mais de l'impact délétère de cellules disséminées sur la fonction d'organes distants.

## **2.2. Généralités sur les mécanismes génétiques de la cancérisation**

Au contraire de beaucoup de maladies ayant une cause unique et identifiable, par exemple un virus ou une bactérie, les cancers sont des maladies multifactorielles. Ils sont la conséquence de différents dérèglements de la machinerie cellulaire liés à une addition d'anomalies génétiques provoquant la transformation des cellules puis la formation éventuelle d'une tumeur.

Ces anomalies génétiques peuvent affecter de larges portions du génome, et aboutir à la délétion de fragments de chromosomes ou leur translocation. De nombreuses translocations et fusions de gènes (358 à ce jour) ont été identifiées, et on estime qu'elles rendent compte de 20% de la mortalité liée aux cancers (Mitelman et al., 2007). Les mutations peuvent également affecter les gènes de manière plus ponctuelle. Les espèces réactives de l'oxygène peuvent générer ce genre de lésions à l'ADN (Acide DésoxyriboNucléique); l'oxydation des bases entraînant une mauvaise reconnaissance de celles-ci lors de la réplication de l'ADN. Parmi les gènes mutés dans les cancers, on trouvera les proto-oncogènes, c'est-à-dire des gènes qui contribuent à la transformation maligne des cellules, mais aussi les gènes « suppresseurs de tumeurs » ayant une fonction de contrôle de la croissance cellulaire. Des mutations activatrices d'oncogènes ainsi que des mutations délétères à l'activité des gènes « suppresseurs de tumeurs » sont fréquemment retrouvées dans les cancers.

Parmi les oncogènes fréquemment activés suite à des mutations, des amplifications ou des translocations, on retrouve différents récepteurs des signaux extracellulaires, comme les récepteurs aux facteurs de croissance, les éléments des voies de transduction de ces signaux, des facteurs de transcription...

En ce qui concerne les gènes suppresseurs de tumeurs, on peut citer *p53*, qui est muté dans plus de la moitié des tumeurs humaines (Levine, 1997). La protéine *p53* est considérée comme le principal gardien de l'intégrité génomique, déclenchant la mort cellulaire lorsque les dommages à l'ADN sont trop importants. Dans le cas des cancers du sein, il faut évoquer également les gènes *brca1* et *brca2* codant pour des protéines impliquées dans la réparation de l'ADN, et dont les mutations constituent des facteurs héréditaires de prédisposition aux cancers du sein (Boulton, 2006).



### **2.3. Les tumeurs du sein**

La glande mammaire est le siège du développement de différentes pathologies associées à un développement anarchique de cellules. L'hyperplasie épithéliale pure correspond à une multiplication des couches de cellules épithéliales pouvant aller jusqu'à combler les lumières et dilater les tubes. Dans l'hyperplasie simple, les cellules ne sont cependant pas cancéreuses. Les tumeurs bénignes du sein sont généralement bien circonscrites et récidivent très peu après exérèse. Le fibroadénome est une tumeur bénigne très fréquente, dont la croissance, à la fois épithéliale et conjonctive, s'arrête généralement lorsqu'il atteint 2-3 cm.

Dans plus de 95% des cas, le cancer du sein est un adénocarcinome, c'est-à-dire qu'il se développe à partir de l'épithélium glandulaire. Comme tous les cancers solides, il se caractérise par sa capacité à récidiver localement après exérèse et à métastaser. Le carcinome in situ représente la phase initiale de la maladie, dans lequel les cellules malignes sont contenues par la membrane basale ; les cellules cancéreuses n'étant pas en contact avec les vaisseaux sanguins et lymphatiques, le risque métastatique est nul.

Le carcinome lobulaire in situ est défini par la prolifération de cellules épithéliales comblant la lumière du lobule. Le carcinome lobulaire infiltrant se compose de petites cellules arrondies régulières identiques à celles observées dans la forme in situ. Classiquement les cellules sont dissociées les unes des autres ou agencées en fines travées avec des aspects en file indienne. Il représente environ 5 à 10% des carcinomes infiltrants. Il a pour caractéristique d'avoir, malgré une cinétique lente, une forte propension à métastaser (bien que souvent tardivement, parfois 15 à 20 ans après l'exérèse mammaire).

Le carcinome canalaire in situ (ou galactophorique in situ) débute classiquement dans les TDLU (Terminal Duct Lobular Unit), mais a tendance à distendre les canaux et à s'étendre dans les galactophores. Les carcinomes canaux infiltrants représentent les trois quarts des carcinomes infiltrants du sein.

Les cancers du sein sont les cancers les plus fréquents chez la femme. Ils posent un problème majeur de santé publique, avec une incidence augmentant progressivement avec l'âge. Le cancer du sein représente plus de 20% de l'ensemble des cancers observés dans le monde. À l'échelle du globe, on estime qu'il y a eu plus d'un million de nouveaux cas de cancer du sein en 2002 (source : *GLOBOCAN 2002* database, disponible sur le site <http://www-dep.iarc.fr>).

Le cancer du sein représente 26.5% des nouveaux cas de cancers diagnostiqués chez la femme en Europe, et constitue la première cause de mortalité liée au cancer chez les femmes occidentales, en étant responsable de 17.5% de ces décès (Tyczynski, 2002). En 2000, on estimait à 42.000 le nombre de nouveaux cas diagnostiqués par an en France, et à 11.000 le nombre de décès liés à ce cancer (informations tirées de la brochure *Le Cancer du Sein* disponible sur le site de la Ligue Nationale Contre le Cancer).

## **2.4. L'évolution maligne des cancers du sein, les métastases**

Comme évoqué précédemment, le carcinome in situ représente la phase initiale de la maladie. Dès que le cancer devient invasif et que les cellules franchissent la membrane basale, il devient probable qu'elles puissent interagir avec les vaisseaux sanguins et lymphatiques, et utiliser la circulation pour se répandre. Même si cela n'est pas démontré de façon catégorique, il semble que ces deux voies d'évasion puissent être utilisées en parallèle et de façon indépendante par les cellules cancéreuses. Bien que des métastases à distance semblent pouvoir se produire directement par la voie sanguine, l'invasion progressive des ganglions lymphatiques fournit des indices cruciaux pour le diagnostic de la maladie, sa classification, et la manière de l'appréhender. Les ganglions lymphatiques constituent en effet des filtres mécaniques et des barrières immunitaires susceptibles de lutter, par les lymphocytes qu'ils contiennent, contre des corps anormaux transportés par la lymphe. Les cellules cancéreuses font partie de ces éléments qui seront arrêtés dans les ganglions, où elles peuvent être détruites ou au contraire se développer, en formant un foyer tumoral secondaire. La plupart des ganglions lymphatiques qui filtrent la lymphe du sein ont une localisation axillaire.

En ce qui concerne le cancer du sein, les métastases à distance les plus fréquentes sont osseuses, dans 60% des cas. Elles sont associées à des douleurs, des fractures pathologiques, et peuvent entraîner une dégradation de la qualité de vie ou même certaines complications et le décès. Les localisations les plus courantes sont ensuite le poumon, le foie et le système nerveux. Le type histologique influe sur le site métastatique. Ainsi le carcinome lobulaire a tendance à métastaser dans les espaces méningés, le péritoine, la paroi du tube digestif, les ovaires et l'endomètre.

Un diagnostic précoce est d'autant plus important dans le cas du cancer du sein que c'est avant d'essaimer que la maladie répond le mieux au traitement. Plus la détection et le traitement sont précoces, plus les chances de guérison définitive sont grandes, d'où l'utilité de la mammographie qui peut parfois aider à détecter la maladie avant qu'elle soit palpable. C'est ce constat qui a mené à la mise en place du plan national de dépistage des cancers du sein.

Différents facteurs anatomo-pathologiques à visée pronostique permettent d'évaluer les risques de récidives loco-régionales ou de métastase à distance. Les cancers du sein peuvent être classifiés en trois grades histo-pronostiques dits de Scarff-Bloom-Richardson, selon leur degré d'atypie en ce qui concerne : la formation de tubes, l'anisocaryose (ou inégalité de la taille des noyaux) et la proportion de cellules mitotiques. La classification TNM apprécie la taille de la tumeur (T), l'éventuelle atteinte ganglionnaire (N), et la présence ou non de métastases (M). Ce bilan d'extension de la maladie va orienter le médecin dans le choix d'une stratégie de traitement adaptée à chaque patiente.

### **3. Le déséquilibre entre la prolifération et la mort cellulaire lors de la tumorigenèse mammaire**

Comme évoqué précédemment, les cellules cancéreuses se multiplient de façon anarchique et notre organisme n'est plus en mesure de contrôler leur croissance. Ce phénomène implique aussi bien des capacités de prolifération accrues des cellules cancéreuses que leur résistance aux signaux de mort cellulaire induits par l'environnement.

#### **3.1. La prolifération cellulaire**

La prolifération des cellules épithéliales se produit de manière finement régulée lors du développement de la glande mammaire et de son remodelage, à chaque cycle menstruel et surtout au cours de la grossesse.

La prolifération anarchique des cellules de cancer constitue une des caractéristiques les plus facilement observables de ces cellules, et permet la croissance de masses tumorales importantes. Le degré de prolifération cellulaire intervient ainsi dans le diagnostic des biopsies du sein. C'est ainsi qu'une majorité des premiers traitements de chimiothérapie des cancers est composée d'agents à visée antimitotique, dont les fameux poisons du fuseau mitotique de la famille du taxol.

Un emballement du cycle cellulaire va être fréquemment observé dans différents cancers, et de nombreuses molécules de contrôle de ce cycle, comme les cyclines, sont dérégulées dans ces cancers (pour revue, voir (Massague, 2004)). La surexpression de facteurs mitogènes ou l'activation constitutive de leurs récepteurs sont bien souvent responsables du développement de différentes tumeurs.

#### **a) Rôle des hormones**

Différentes hormones, comme les hormones ovariennes mais aussi l'hormone de croissance, jouent un rôle crucial dans l'homéostasie de la glande mammaire. Elles influent également sur la formation des cancers du sein. C'est ainsi qu'une puberté précoce et une ménopause tardive, c'est-à-dire une fenêtre d'exposition longue aux changements hormonaux du cycle ovarien, sont associées à des risques accrus de développer un cancer du sein (Kelsey and Berkowitz, 1988). Inversement, avoir une première grossesse tôt dans la vie ainsi que le fait d'avoir plusieurs grossesses réduit le risque de développer un cancer du sein.

L'importance de ces hormones dans le développement des cancers du sein est connue depuis de nombreuses années. Les oestrogènes vont notamment stimuler la prolifération des cellules cancéreuses du sein, d'où l'idée de les cibler en thérapie, par l'utilisation de drogues modulant leurs interactions avec leurs récepteurs, tels que le tamoxifène. L'étude de l'expression des récepteurs à ces hormones dans les biopsies de cancers du sein permet de prédire la réponse aux traitements anti-oestrogènes. Il s'est avéré cependant qu'une résistance à ces traitements apparaissait, avec une évolution vers des cancers hormono-indépendants, comme on peut l'observer également en ce qui concerne les androgènes pour le cancer de la prostate.

## **b) Les facteurs de croissance**

Outre les hormones, plusieurs membres de la famille des facteurs de croissance interviennent également dans l'homéostasie de la glande mammaire.

L'IGF (Insulin-like Growth Factor) et l'EGF (Epidermal Growth Factor) font partie des premiers facteurs de croissance étudiés dans ces processus. Ils se fixent à des récepteurs membranaires de type Tyrosine kinases, entraînent leur dimérisation, leur transautophosphorylation et le recrutement de différentes protéines de signalisation. L'IGF semble intervenir en aval des oestrogènes et de l'hormone de croissance dans l'induction du développement épithélial (pour revue, voir (Kleinberg et al., 2000)). En ce qui concerne l'EGF, il fait partie d'une famille de plusieurs ligands, comprenant également l'amphiréguline- $\alpha$  et le TGF- $\alpha$  (Transforming Growth Factor alpha). Ceux-ci se fixent aux récepteurs de la famille de l'EGF-R (EGF-Receptor). Il existe différentes combinaisons ligands-récepteurs, présentant des affinités plus ou moins importantes. L'EGF-R est ainsi capable de fixer au moins sept ligands, et peut se dimériser avec un autre monomère d'EGF-R, ou un des récepteurs ErbB, qui appartiennent à la même famille. Il semble que les ligands de la famille de l'EGF agissent en aval de l'oestrogène lors du développement normal des ductules épithéliaux (Kenney et al., 2003). Ils sont également capables de stimuler la prolifération des cellules cancéreuses mammaires, et certains de leurs récepteurs sont exprimés de façon aberrante dans les cancers du sein et sont considérés comme des proto-oncogènes. La surexpression du récepteur ErbB2 est notamment corrélée à un mauvais pronostic, et a donné lieu à la mise au point de thérapies utilisant des anticorps bloquants de ce récepteur. Le trastuzumab, ou herceptine (anticorps humanisé dirigé contre le récepteur erbB2), en combinaison avec une chimiothérapie classique, permet d'améliorer la survie de patientes atteintes d'un cancer du sein métastatique et surexprimant ErbB2 (Slamon et al., 2001). Il est toutefois à noter que l'herceptine, comme d'autres inhibiteurs de récepteurs de type Tyrosine kinases, peut causer des problèmes liés à ses effets cardiotoxiques, ErbB2 protégeant notamment les cellules du myocarde de l'apoptose (Mann, 2006).

L'HGF/SF (Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor), est un facteur aux effets pléiotropiques important pour les processus normaux de morphogenèse de branchement. Son récepteur, c-Met, est un récepteur de type Tyrosine kinase. La dérégulation de l'activité de ce couple est fréquemment observée dans différents types de cancers, dont les cancers du sein (Tuck et al., 1996). Le récepteur c-Met transduit un ensemble de réponses importants pour la « croissance invasive » des cellules (pour revue, voir (Gentile and Comoglio, 2004)). De par ses effets sur la dispersion des cellules et leur réponse de survie à différents stress, il est impliqué dans les processus de métastase (Jeffers et al., 1998).

Le TGF- $\beta$ , quant à lui, interagit avec des récepteurs de type Sérine/Thréonine kinases à la surface de ces cellules. C'est un puissant inhibiteur de la prolifération des cellules épithéliales normales, qui peut également induire leur mort par apoptose, mais aussi réguler le dépôt de la matrice extracellulaire ou son remodelage. Au cours de la progression des cancers du sein s'observe une bascule, ou « switch », des effets du TGF- $\beta$ . Les cellules cancéreuses deviennent en effet de plus en plus réfractaires aux effets anti-prolifératifs du TGF- $\beta$ , ce qui contribue à leur prolifération anarchique et incontrôlée, tandis que d'autres effets promoteurs de la tumorigenèse se développent (pour revue,

voir (Dumont and Arteaga, 2000)). Différents mécanismes interviennent dans ce processus. D'une part, une réduction de l'expression du récepteur de type II au TGF- $\beta$  est corrélée avec un haut grade tumoral dans les cancers du sein (Gobbi et al., 2000), et une délétion de ce récepteur dans l'épithélium mammaire de souris favorise la progression tumorale de la glande (Forrester et al., 2005). D'autre part, le TGF- $\beta$  peut favoriser l'invasion des cellules dans certains contextes, en stimulant la production de protéases de la matrice extracellulaire (Overall et al., 1991). L'activation de voies de signalisation en parallèle du TGF- $\beta$  va influencer sur les effets induits par celui-ci. Ainsi, l'activité de la kinase Raf, impliquée dans la signalisation de différents facteurs mitogènes, promeut la production du TGF- $\beta$ , et va bloquer les effets pro-apoptotiques de ce dernier (Lehmann et al., 2000). Enfin, le TGF- $\beta$  peut aussi contribuer à la tumorigenèse mammaire, par un rôle suppresseur de la réponse immunitaire.

L'HGF/SF et le TGF- $\beta$  sont deux acteurs clés du dialogue entre épithélium et stroma lors du développement de la glande mammaire (pour revue, voir (Silberstein, 2001)) et sa dérive cancéreuse (Cheng et al., 2007). Lors du développement de l'arborescence épithéliale, l'expression de l'HGF/SF par les cellules du stroma va stimuler la ramification des cellules épithéliales mammaires (qui expriment le récepteur c-Met). Une concentration locale en TGF- $\beta$  en certaines régions de l'épithélium mammaire va inhiber la sécrétion par les cellules stromales de l'HGF/SF (Silberstein, 2001). Ce dialogue joue également un rôle primordial dans la dérive cancéreuse. Ainsi, il a été démontré que la délétion du récepteur de type II au TGF- $\beta$  dans des fibroblastes promeut le développement de carcinomes mammaires, via la surexpression de l'HGF (Cheng et al., 2007).

Il est important de noter que la plupart des facteurs de croissance évoqués ont également des effets sur d'autres types cellulaires présents dans la glande mammaire et impliqués dans sa progression tumorale, notamment les cellules endothéliales. Nous en reparlerons plus en détail ultérieurement.

### **3.2. L'échappement à la mort cellulaire**

Les cellules cancéreuses, outre un caractère prolifératif souvent augmenté, présentent généralement une résistance accrue à la mort cellulaire, et notamment au processus d'apoptose. Ce mécanisme de mort cellulaire programmée intervient lors du développement normal mais aussi cancéreux. Au cours de l'embryogenèse, c'est par ce processus que se formera le tube digestif, mais également que seront éliminées différentes cellules en excès, telles que les cellules des espaces interdigitaux, ou les cellules immunitaires dirigées contre le soi. Au cours de la vie adulte, il jouera un rôle dans l'homéostasie de la peau et du système digestif notamment, dans le remodelage des tissus hormono-inductibles.

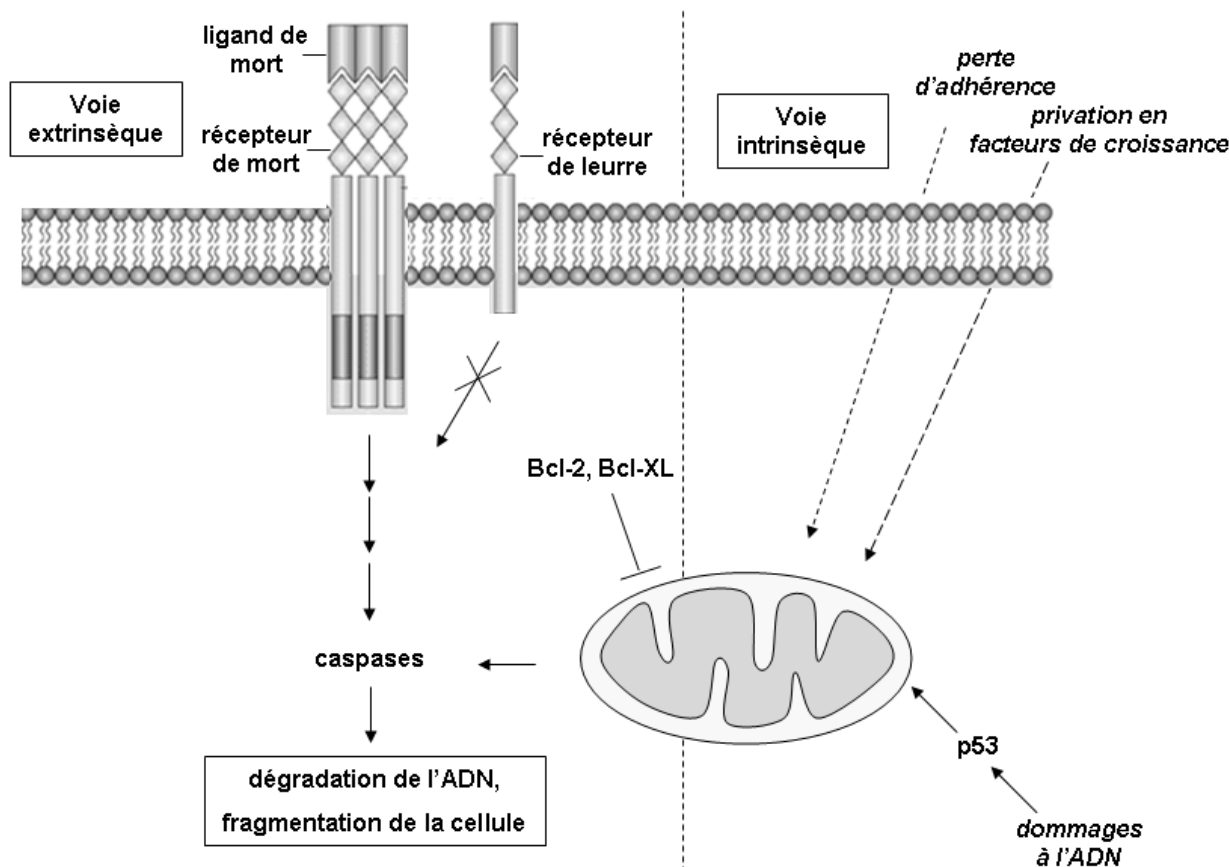


Figure 3. Schéma des voies de l'apoptose.

L'apoptose intervient aussi dans l'élimination de cellules infectées par des virus, mais également dans la destruction de cellules de l'organisme considérées comme nuisibles, comme celles présentant des dommages trop importants de l'ADN. Des signaux internes indicateurs d'un mauvais fonctionnement de la cellule peuvent donc déclencher ce programme, mais des stimuli externes peuvent également en être la source (cf figure 3). Ces signaux externes peuvent être des agents inducteurs de l'apoptose, comme les ligands des « récepteurs de mort », ou la perte de signaux physiologiques tels que les facteurs de croissance ou la matrice extracellulaire. Une machinerie intracellulaire va se déclencher, menant au clivage par des protéases appelées caspases de différents substrats critiques pour la vie de la cellule, et aboutissant à la fragmentation du noyau et de de la cellule. La mitochondrie va jouer un rôle central dans la gestion du processus apoptotique, en libérant différents facteurs proapoptotiques séquestrés dans son espace intermembranaire. Les molécules de la famille Bcl-2 (B Cell Lymphoma), en s'intégrant dans la membrane mitochondriale, vont faciliter ou au contraire bloquer ce relargage.

Différentes molécules jouant un rôle dans l'apoptose sont mutées ou différemment exprimées dans les cancers. Ainsi les cellules tumorales présentent généralement une baisse d'expression de « récepteurs de mort » par rapport aux cellules normales, ou la surexpression de récepteurs de leurre piégeant les ligands pro-apoptotiques. En parallèle, l'expression de molécules de la famille Bcl-2 va être modifiée dans divers cancers. Il est à noter que Bcl-2 a d'ailleurs été

initialement identifié suite à sa surexpression dans des lymphomes folliculaires, qui conférait aux cellules une survie accrue dans diverses conditions de stress. La surexpression de ces molécules anti-apoptotiques est généralement corrélée à une résistance accrue aux chimiothérapies, et à un mauvais pronostic. Elle sera en effet critique pour la survie des cellules métastatiques qui, en dégradant la matrice environnante lors de leur invasion, vont perdre un certain nombre de signaux physiologiques relayés par cette matrice, puis devront survivre dans la circulation sanguine, résister aux cellules immunitaires et s'adapter au nouveau site de colonisation.

La résistance des cellules cancéreuses à différentes drogues chimiothérapeutiques est également favorisée par l'expression de « pompes », comme la P-glycoprotéine, produit du gène *MDR1* (MultiDrug Resistance), qui vont provoquer l'efflux de ces drogues (pour revue, voir (Moscow and Cowan, 1988)). On peut signaler ici que le facteur de transcription Ets-1, qui est l'objet d'étude de cette thèse, stimule l'expression du gène *MDR1* (Sampath et al., 2001). D'autres mécanismes de mort cellulaire sont également mis en jeu et parfois corrompus lors du développement des cancers. La nécrose est un phénomène couramment observé dans les tumeurs. C'est un processus aux mécanismes moléculaires apparemment peu régulés de destruction des cellules suite à des conditions pathophysiologiques, comme une infection, l'inflammation ou l'ischémie. Le défaut de vascularisation d'une tumeur, ou d'une région de celle-ci, provoque souvent des conditions d'hypoxie, et l'induction de la mort des cellules. La nécrose, contrairement à l'apoptose, mène au relargage de composés intracellulaires et peut ainsi provoquer une réaction inflammatoire. D'autres formes de mort cellulaire sont étudiées depuis moins longtemps mais semblent être mises en oeuvre lors de la tumorigenèse, telles que l'autophagie ou la catastrophe mitotique (pour revue, voir (Okada and Mak, 2004)). L'autophagie est un processus d'internalisation d'une proportion plus ou moins importante du contenu cellulaire dans des vésicules de dégradation, qui peut permettre la survie des cellules en absence de nutriments par le recyclage des organites. Son rôle dans la tumorigenèse est fort controversé, étant donné qu'il peut conférer aux cellules des capacités de survie accrues, mais aussi limiter les dommages génotoxiques en dégradant notamment les mitochondries endommagées par un stress oxydant (pour revue, voir (Levine, 2007)). La catastrophe mitotique est quant à elle observée lorsque des mitoses aberrantes se produisent, menant à la formation de cellules géantes multinucléées. Des agents chimiothérapeutiques, comme le paclitaxel, qui affectent le fuseau mitotique et la ségrégation correcte des chromatides, provoquent la mort des cellules par catastrophe mitotique.

Il faut enfin mentionner l'existence de cellules métastatiques solitaires dormantes, qui ne sont ni mourantes ni en prolifération (Naumov et al., 2002). Des cellules de cancer du sein injectées dans la veine mésentérique de souris peuvent présenter un tel état, et résistent dans ces conditions à des traitements tels que celui par la doxorubicine (Naumov et al., 2003). Nous reviendrons sur cette notion de dormance dans le chapitre sur l'angiogenèse (cf p.).

## 4. L'invasion cellulaire dans la progression tumorale

Bien que le déséquilibre de la balance prolifération/mort des cellules cancéreuses soit nécessaire à la croissance d'une tumeur, ce sont leurs capacités invasives et métastatiques qui vont être responsables de la létalité des cancers du sein (Sporn, 1996).

### 4.1. La transition épithélio-mésenchymateuse

L'épithélium mammaire est composé de cellules cohésives solidement ancrées les unes aux autres. Cet épithélium est maintenu en place par des molécules d'adhérence intercellulaire, et sa cohésion est renforcée par la continuité de la membrane basale à laquelle s'ancrent ces cellules.

La transition épithélio-mésenchymateuse, ou EMT (Epithelial-Mesenchymal Transition), est un processus fondamental, finement régulé spatio-temporellement au cours du développement, permettant la migration de cellules épithéliales hors de leur tissu d'origine (Thiery, 2002). Lors de cette EMT, les cellules perdent leurs caractéristiques cohésives, et acquièrent un phénotype fibroblastoïde propice à leur motilité et les faisant ressembler à des cellules mésenchymateuses. Ce processus clé pour l'embryogenèse est également réactivé dans différents carcinomes (cf figure 4), dont les cancers du sein. Les mécanismes empruntés lors de ces EMT normale et pathologique sont semblables, la différence étant qu'au contraire des cellules normales qui se redifférencient à l'issue de ce processus, ces mécanismes persistent généralement dans les cellules cancéreuses.

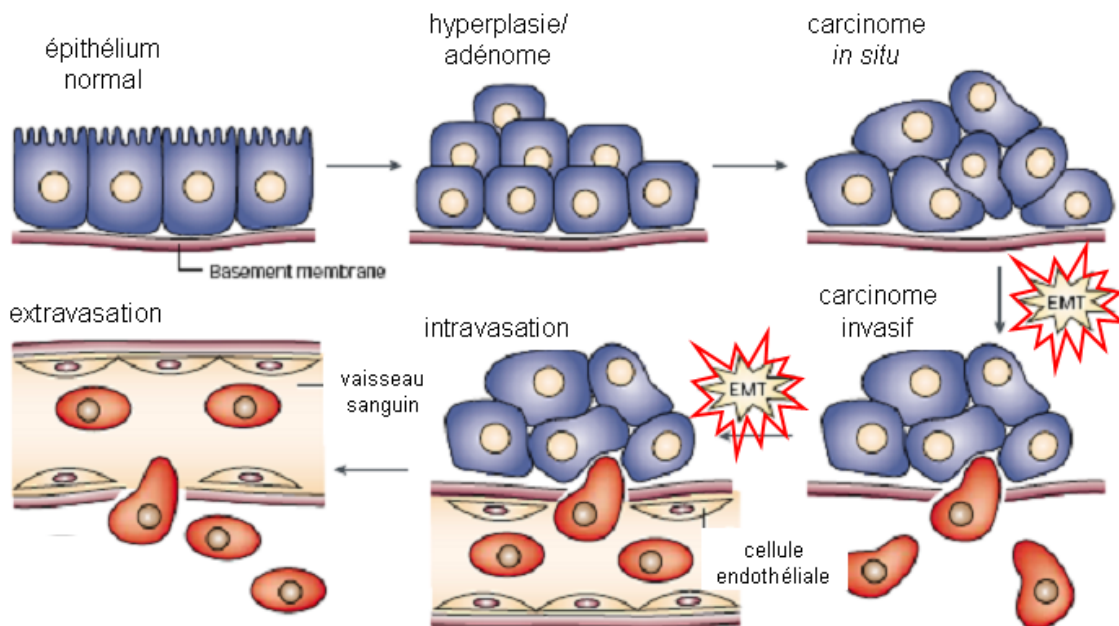


Figure 4. Manifestation des phénomènes de transition épithélio-mésenchymateuse ou EMT (Epithelial-to-Mesenchymal Transition), à différentes étapes de la progression tumorale, adapté de (Thiery, 2002)



La perte des jonctions intercellulaires est un trait caractéristique des mécanismes d'EMT, qui permet la dissociation initiale des cellules. Les molécules d'adhérence classiques de la cohésion des cellules épithéliales sont les E-cadhérines. Ce sont des protéines d'adhérence dépendantes du calcium. Leur partie cytoplasmique interagit avec les filaments d'actine au niveau des jonctions adhérentes, ou peut être reliée aux filaments intermédiaires du cytosquelette dans des structures appelées desmosomes. Dans la majorité des carcinomes, l'adhérence des cellules relayée par les E-cadhérines est perdue lors de la progression cancéreuse (pour revue, voir (Cavallaro and Christofori, 2004)). Cette perte de fonction peut être associée à différents mécanismes génétiques et épigénétiques. On retrouve des mutations fréquentes du gène de la E-cadhérine dans certains cancers du sein (Berx et al., 1995). En parallèle, l'expression de la E-cadhérine peut être réduite au niveau transcriptionnel, ou sa fonctionnalité peut être affectée au niveau protéique, notamment par des clivages. Il est à noter que son expression réduite dans les cancers du sein non-lobulaires est associée à un mauvais pronostic (Rakha et al., 2005).

Par ailleurs, d'autres marqueurs, comme les kératines, qui sont des filaments intermédiaires associés à la différenciation, voient leur expression réduite lors des processus d'EMT. En parallèle, différents gènes typiquement mésenchymateux vont être surexprimés, dont le plus connu est celui de la vimentine, filament intermédiaire du cytosquelette des cellules mésenchymateuses.

Le déclenchement d'un processus d'EMT par une cellule épithéliale est induit par différents signaux extérieurs, parmi lesquels on retrouve différents facteurs de croissance. L'HGF/SF est associé à la morphogenèse de branchement de la glande mammaire. De par sa forte capacité à induire la dispersion cellulaire, il est associé à l'EMT lors d'évènements morphogénétiques de l'embryogenèse mais aussi dans le cas des cellules cancéreuses. Certains ligands appartenant aux familles de l'EGF, de l'IGF, ou du FGF (Fibroblast Growth Factor) sont également impliqués dans les processus d'EMT (pour revue, voir (Thiery, 2002)). La famille des TGF- $\beta$  / BMP (Bone Morphogenetic Protein) / activines peut elle aussi induire et réguler l'EMT embryonnaire (Zeisberg et al., 2003), de même que la protéine Wnt, fortement impliquée dans le contrôle de la polarité des tissus.

Ces différents stimuli vont déclencher différentes voies de transduction. La voie de signalisation Ras-MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases) est une des principales mises en oeuvre lors des mécanismes d'EMT, et mène à l'activation de facteurs de transcription, comme Snail ou Slug (pour revue, voir (Thiery, 2002)). Ces facteurs de transcription sont exprimés lors de l'embryogenèse et régulent le processus d'EMT. Ils répriment entre autres l'expression de la E-cadhérine, menant notamment à la dissociation des cellules de carcinomes (Batlle et al., 2000). Snail est ainsi considéré comme un "master gene" dans la conversion épithélio-fibroblastoïde. Le facteur de transcription Ets-1, situé en aval des voies de transduction de différents facteurs de croissance, est associé à l'EMT, notamment au niveau du sclérotome et des crêtes neurales, lors du développement (Fafeur et al., 1997). La diminution d'expression de la E-cadhérine ou sa perte de fonction va également entraîner la relocalisation nucléaire de la  $\beta$ -caténine, normalement associée à la partie cytoplasmique de la E-cadhérine, ce qui permettra à cette dernière d'interagir avec les facteurs de transcription TCF/LEF (Lymphoid Enhancer Factor/T Cell Factor proteins), membres de la famille ETS, et d'induire des programmes génétiques responsables de la migration des cellules (Gottardi et al., 2001).

D'autres facteurs de transcription ont été décrits plus récemment comme importants pour l'EMT et associés aux capacités métastatiques de cellules cancéreuses mammaires, comme Twist (Yang et al., 2004), Gooseoid (Hartwell et al., 2006), ou FOXC2 (Mani et al., 2007).

## **4.2. Les interactions avec la matrice extracellulaire**

La matrice extracellulaire constitue une barrière à traverser pour envahir le tissu environnant, mais peut aussi se révéler un support pour la migration des cellules.

### **a) La composition de la matrice extracellulaire**

La matrice extracellulaire est composée de protéines variées, comme les collagènes, la laminine... et de protéoglycanes sécrétés par les cellules.

Les principaux constituants de la majorité des matrices extracellulaires sont les protéines de la famille des collagènes. Il s'agit de protéines fibrillaires constituées de trois sous-unités enroulées entre elles sous forme de torsades, et stabilisées par des ponts hydrogène. Il existe différentes sous-unités, et leur combinaison va générer différents types de collagène (au moins 28 chez les Vertébrés). Le collagène de type I est typique des collagènes de par sa structure trimérique en triple hélice parfaite. C'est un collagène abondant dans les tissus conjonctifs ; il contribue à la solidité des tendons et cartilages notamment. C'est d'ailleurs du tendon de rat que sera généralement extrait le collagène de type I utilisé pour les expériences de culture cellulaire.

Le collagène IV est un composé majeur des membranes basales des cellules épithéliales. Il forme un réseau entrelacé et a une fonction importante de filtration des molécules. Des interactions entre les domaines NC1 (Non Collagenous) des trimères de collagène de type IV produisent des hexamères, stabilisés par une réticulation via des liaisons covalentes. D'autres protéines viendront compléter la composition de ces matrices particulières, comme la laminine, l'élastine, l'entactine mais aussi des protéoglycanes. L'assemblage de ces composants semble se faire selon un ordre défini, guidé par différents récepteurs membranaires dont les intégrines, et les connexions entre ces protéines stabilisent ensuite la structure de cette matrice (cf figure 5 à la page suivante)

La composition de la matrice extracellulaire du sein évolue au cours de son développement normal et de son remaniement (Schedin et al., 2004a). Des modifications de celle-ci sont aussi associées à sa dérive cancéreuse. Dès les premières études histologiques, il est apparu que la matrice associée aux cancers du sein était profondément altérée par rapport à celle de tissus sains. La réaction stromale péri-tumorale est caractérisée par un dépôt important de collagènes, de type I et II notamment, mais aussi de fibronectine (Lagace et al., 1985).

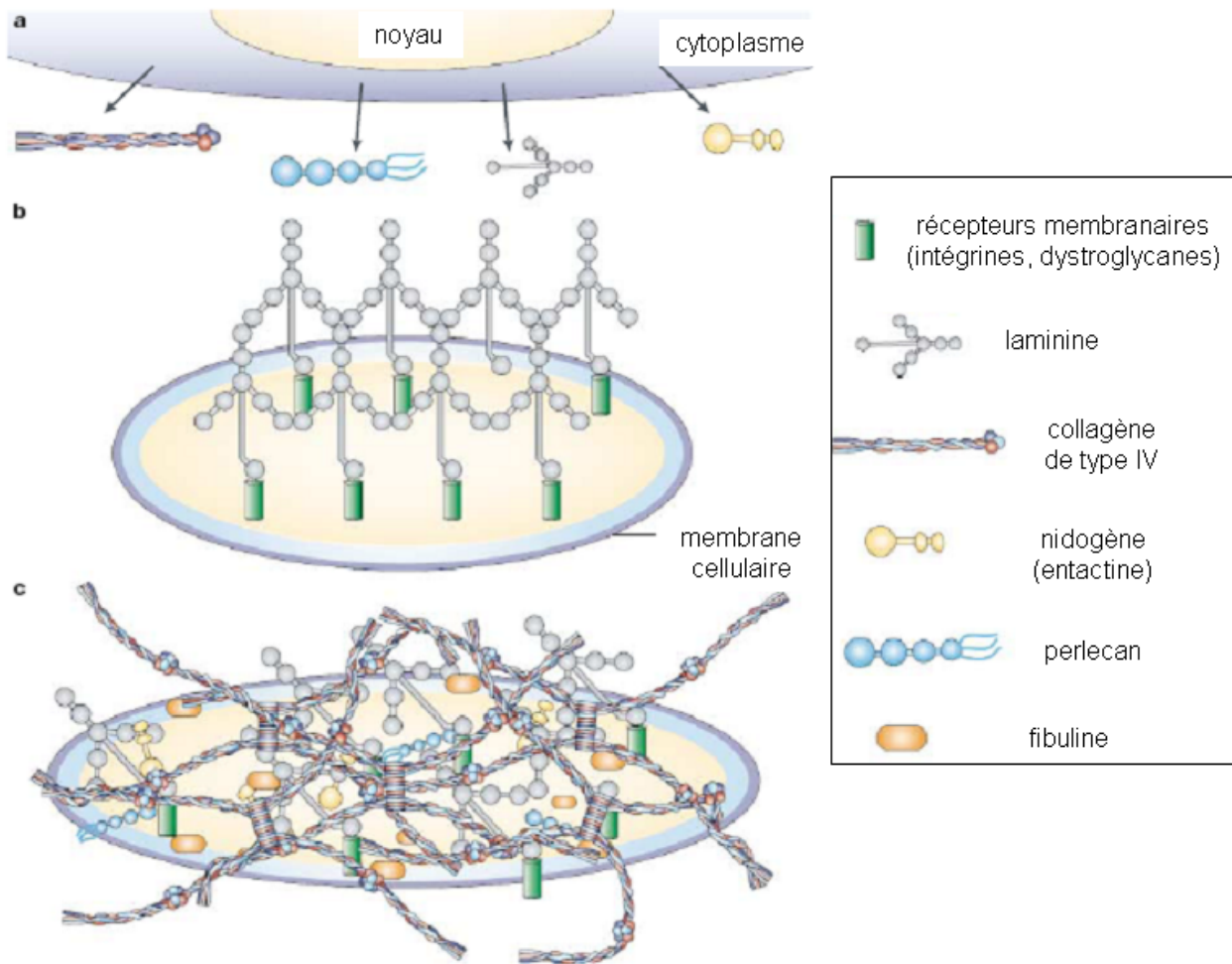


Figure 5. Assemblage de la membrane basale, extrait de (Kalluri, 2003)

L'assemblage des réseaux de laminine et de collagène de type IV est organisé grâce à différents récepteurs de la membrane, dont les intégrines. Ces réseaux sont ensuite stabilisés par des interactions avec divers autres composés de la matrice, notamment l'entactine.

### **b) Les fonctions de la matrice extracellulaire**

Outre son rôle dans l'architecture des tissus et la migration des cellules, la matrice extracellulaire va orchestrer différentes fonctions cellulaires et réguler ainsi le comportement des cellules ou leur malignité (pour revue, voir (Lukashev and Werb, 1998)). Ces fonctions varient selon la composition et l'organisation de cette matrice, mais aussi des facteurs de croissance qu'elle peut séquestrer. Les protéoglycanes, ou glycosaminoglycanes de la matrice peuvent aussi servir de récepteurs accessoires ou favoriser l'activité de facteurs de croissance. L'héparine et les héparanes sulfates stimulent ainsi l'activité du bFGF et de l'HGF/SF en favorisant la dimérisation du ligand, de son récepteur, ou encore la liaison du ligand à ce dernier (Kemp et al., 2006).

La matrice extracellulaire spécialisée des cellules épithéliales mammaires, ou membrane basale, joue un rôle très important dans le maintien de leur état différencié. La culture dans un environnement normalisé de cellules épithéliales transformées peut aussi restaurer chez ces cellules

un phénotype normal, malgré la présence d'anomalies génétiques (Bissell et al., 2003). Lorsqu'un cancer du sein se développe, l'intégrité de cette membrane basale, ou au contraire sa destruction, va permettre de définir le stade d'avancement de la maladie.

La contribution de la matrice extracellulaire au développement des cancers constitue un sujet d'étude récent, prenant de plus en plus d'ampleur. Une modification de la matrice extracellulaire contribuant à la progression des cancers du sein a été suggérée, par le fait qu'une densité haute du tissu mammaire à la mammographie constitue un facteur de risque significatif de développer un cancer du sein (Boyd et al., 2005). Cette forte densité est associée à une rigidité accrue de la matrice extracellulaire. Des études ont depuis démontré qu'une rigidité trop importante de la matrice extracellulaire perturbait la capacité de cellules épithéliales mammaires normales à s'organiser de manière polarisée (Paszek et al., 2005). De plus, d'autres études *in vitro* ont montré que les cellules sont capables de sentir les zones de rigidité accrue et migrent préférentiellement vers elles ; c'est ce qu'on appelle le durotactisme (Lo et al., 2000).

La matrice extracellulaire peut donc s'avérer être un frein à la croissance de la tumeur, rôle initialement attribué à la réaction stromale, mais également un élément moteur de la malignité.

### **c) Les intégrines, acteurs de l'adhérence et de la signalisation intracellulaire**

Les cellules adhèrent à la matrice extracellulaire essentiellement via des glycoprotéines transmembranaires spécialisées, appelées intégrines. Ces intégrines sont composées de dimères de sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$ , formant au moins 25 combinaisons, permettant la reconnaissance des différents substrats matriciels (cf figure 6). Ces protéines interviendront également lors des interactions des cellules immunitaires ou cancéreuses avec l'endothélium, en interagissant avec des molécules comme VCAM-1 (Vascular Cellular Adhesion Molecule) à la surface des cellules endothéliales (cf p 53).

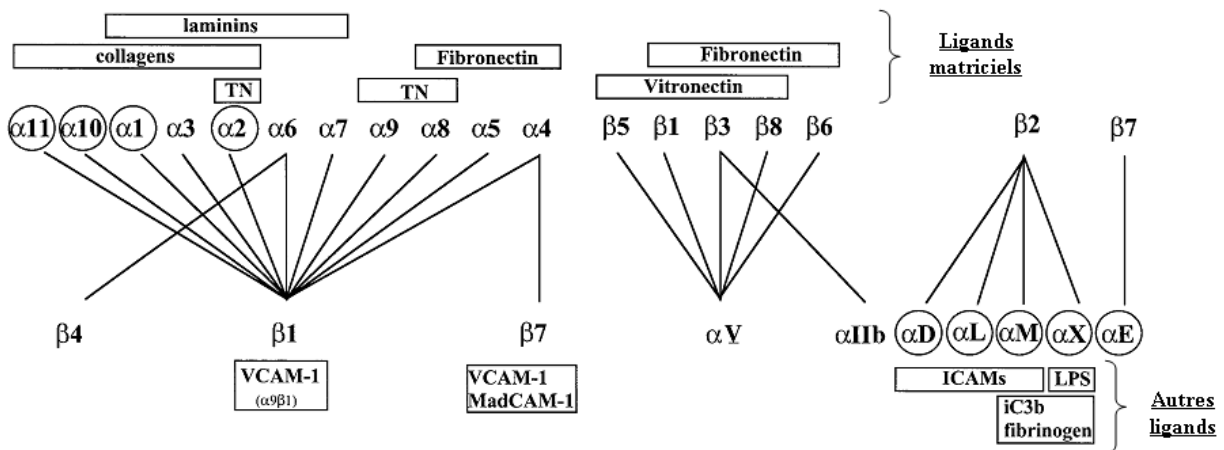


Figure 6. Combinaisons des différentes sous-unités d'intégrines et ligands reconnus.

tiré de (Ivaska and Heino, 2000)

La partie cytoplasmique des intégrines peut interagir avec les filaments intermédiaires du cytosquelette dans des structures de type hémidesmosomes, comme c'est le cas pour les dimères  $\alpha6\beta4$  impliquées dans l'ancrage des cellules épithéliales à leur membrane basale. Les intégrines peuvent aussi s'associer aux filaments d'actine dans des structures spécialisées dans la migration, comme les filopodes. Ces différentes structures, en influant fortement sur l'organisation du cytosquelette et la forme de la cellule, vont jouer un rôle clé respectivement dans l'ancrage ou la migration des cellules épithéliales. De manière intéressante, le contexte tumoral peut influencer le recrutement des intégrines  $\alpha6\beta4$  depuis les hémidesmosomes afin de favoriser leur association avec les filaments d'actine dans les lamellipodes et les filopodes, promouvant ainsi la migration.

La modulation d'expression de certaines intégrines est observée lors de la cancérisation de la glande mammaire, en lien avec un remaniement de la matrice environnante. Ainsi, une expression élevée de l'intégrine  $\beta1$  est observée chez des patientes atteintes d'un cancer du sein invasif, et corrélée à l'expression de fibronectine, substrat pro-migratoire auquel l'intégrine  $\beta1$  peut se lier (Yao et al., 2007). La suppression, dans un modèle de souris transgénique développant des cancers mammaires, de l'expression de l'intégrine  $\beta1$  a permis de montrer l'importance de celle-ci dans l'initiation de ces cancers (White et al., 2004). De plus, l'expression des intégrines  $\alpha6\beta1$  et  $\alphaV\beta3$  dans des cellules cancéreuses mammaires promeut leurs capacités métastatiques *in vivo* (Wewer et al., 1997) (Sloan et al., 2006).

Les intégrines sont interconnectées à des voies de transduction du signal, et vont transmettre un certain nombre d'informations aux cellules. La présence d'une matrice extracellulaire va ainsi fournir notamment des signaux de survie. Ces signaux peuvent permettre aux cellules cancéreuses de résister à des agents chimiothérapeutiques (Hodkinson et al., 2006), et des stratégies thérapeutiques visant à inhiber ces signaux dans les cellules cancéreuses sont donc envisagées. Ceci explique par ailleurs que l'évaluation de la réponse de cellules cancéreuses *in vitro* à des agents inducteurs d'apoptose ou à des traitements chimio-thérapeutiques soit souvent plus critique lorsque les essais sont réalisés en contexte matriciel (Haouzi et al., 2005) (Ono et al., 2007). D'un autre côté, la perte des signaux de survie transduits par les intégrines peut provoquer l'apoptose des cellules, c'est ce qu'on appelle l'anoikis. Il est à noter que les cellules métastatiques ont acquis la capacité à échapper à cette forme de mort, ce qui est crucial pour leur survie lors de leur transport par la circulation sanguine.

Il est également important de signaler que le comportement des cellules, et leur caractère migratoire en particulier, est profondément différent selon qu'elles sont cultivées sur un support bi-dimensionnel de type plastique, ou se retrouvent dans un contexte matriciel tri-dimensionnel (pour revue, voir (Walpita and Hay, 2002) et (Even-Ram and Yamada, 2005))

Différentes voies de signalisation associées aux intégrines ont été décrites au cours de ces dernières décennies. La partie cytoplasmique des intégrines peut recruter différentes molécules de signalisation, telles que FAK (Focal Adhesion Kinase), Grb2, Src, et activer entre autres les voies de la PI3K (Phosphatidyl Inositol 3 Kinase) ou des MAPK (cf figure 7, pour revue, voir Baron et al., 2001).

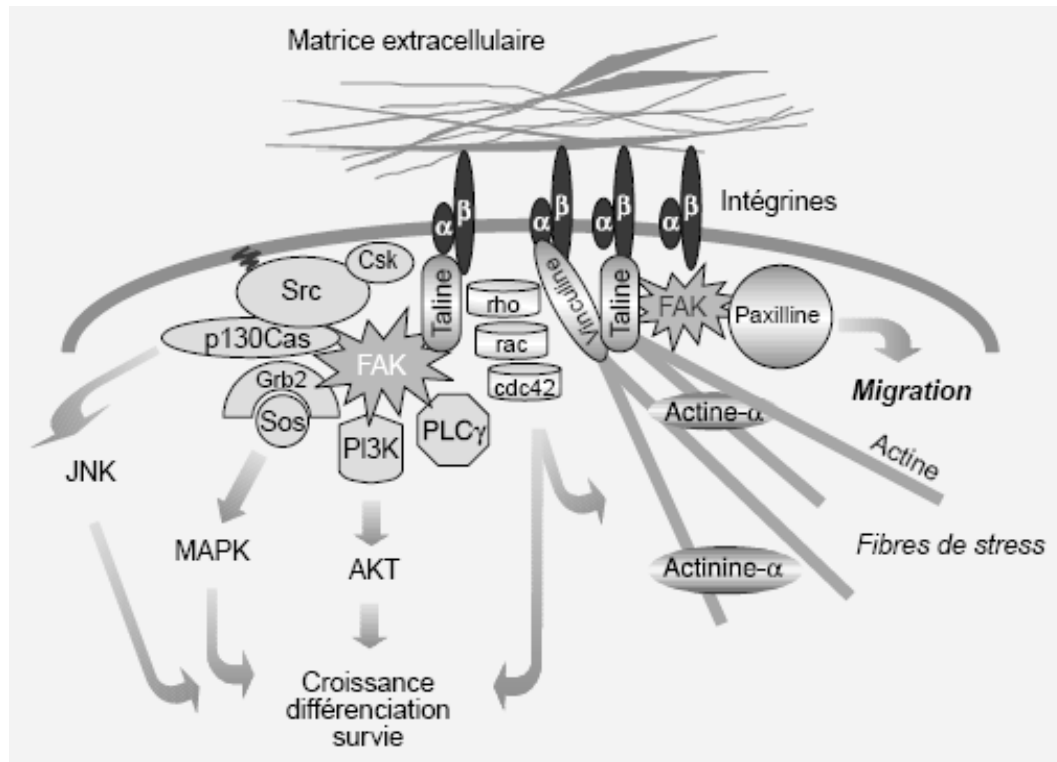


Figure 7. Recrutement de différentes protéines de signalisation au niveau des plaques focales d'adhérence, extrait de (Baron et al., 2001)

De nombreuses interactions entre les signaux induits par les intégrines et ceux transmis par les facteurs de croissance ont récemment été mises en évidence, à différents niveaux de ces voies. Tout d'abord les intégrines peuvent interagir physiquement avec des récepteurs Tyrosine kinases et promouvoir leur caractère transformant dans des cellules cancéreuses mammaires, comme l'intégrine  $\beta 4$  avec le récepteur à l'HGF/SF, c-Met (Bertotti et al., 2005), ou avec ErbB2 (Guo et al., 2006). De son côté, l'intégrine  $\alpha V\beta 3$  va contrôler la prolifération de cellules de cancer du sein en établissant une interaction réciproque avec la voie des MAPK (Vellon et al., 2006), mais peut aussi stimuler l'induction d'une EMT par le TGF- $\beta$  dans les cellules épithéliales mammaires normales (Gallier and Schiemann, 2006). Les intégrines peuvent également transduire des signaux menant à la modulation d'expression de facteurs de croissance, et vice-versa.

### **4.3. La migration des cellules au sein de la matrice extracellulaire**

Différentes structures de matrice extracellulaire peuvent être considérées comme un frein à la migration des cellules cancéreuses. Ainsi, la membrane basale constitue-t-elle une matrice dense difficile à traverser, contribue à la cohésion de l'épithélium et favorise sa différenciation. Dans un second temps, une réaction stromale de type desmoplastique peut se développer à la périphérie de la tumeur, avec la formation d'une coque de matrice qui vient circonscrire celle-ci.

Les cellules cancéreuses disposent de différents outils leur permettant d'outrepasser les « barrières de matrice », voire d'en tirer profit. Outre un remaniement de l'expression des intégrines dans les cellules cancéreuses, celles-ci vont être capables de digérer la matrice via la surexpression de différentes protéases de la matrice. Le modèle classique de migration cellulaire dans la matrice implique les étapes successives suivantes : attachement du front de migration de la cellule à la matrice, digestion contrôlée de la matrice par les protéases, puis contraction de la cellule dont la partie arrière se détache.

Deux familles de protéases de la matrice extracellulaire type ont été particulièrement étudiées au cours de la morphogenèse de la glande mammaire et de sa dérive cancéreuse ; il s'agit des Sérine protéases, et des métalloprotéases matricielles, ou MMPs (Matrix MetalloProteinases).

Les Sérine protéases font l'objet d'études depuis plusieurs décennies dans le cadre de l'invasion tumorale. La sérine protéase plasmine est responsable de la dégradation de la fibrine et d'autres composés de la matrice. Cette plasmine est produite sous une forme latente, le plasminogène, et activée par clivage. Il existe deux types d'activateurs du plasminogène, l'uPA (urokinase-type Plasminogen Activator) et le tPA (tissue-type Plasminogen Activator). L'uPA est considéré comme directement impliqué dans la progression tumorale, tandis que le principal rôle du tPA semble être la production de plasmine dans le cadre de la fibrinolyse des vaisseaux sanguins (pour revue, voir (Andreasen et al., 2000)). Il est à noter que l'uPA peut également activer l'HGF/SF et le MSP (Macrophage-Stimulating Protein) par clivage. L'HGF/SF et le MSP possèdent des similarités de séquences avec la plasmine, et sont capables de stimuler la migration cellulaire.

En parallèle, la famille des MMPs ou métalloprotéases matricielles est composée d'une trentaine de membres, dont le rôle lors de la progression des carcinomes apparaît de plus en plus comme primordial et complexe. Les MMPs sont des endopeptidases dépendantes d'ions métalliques comme le Zinc ou le Calcium pour leur activité. Elles sont formées de plusieurs domaines, dont notamment un pro-domaine, et un domaine catalytique (pour revue, voir (Maskos, 2005)).

#### *1. La structure et la classification des MMPs*

Le pro-domaine des MMPs maintient leur activité catalytique sous forme latente. Ce pro-domaine renferme un résidu Cystéine qui agit comme le quatrième ligand d'un ion métallique maintenu par trois résidus d'Histidine dans une poche du domaine catalytique. Le pro-domaine ainsi que le segment le connectant au domaine catalytique de l'enzyme est susceptible aux clivages protéolytiques qui, en libérant l'atome de Zinc du résidu Cystéine, permettront au site catalytique de compléter l'hydrolyse du pro-domaine, et de se lier à son substrat.

Les MMPs sont regroupées en sous-familles selon leur homologie et le spectre de leurs substrats (cf figure 8).

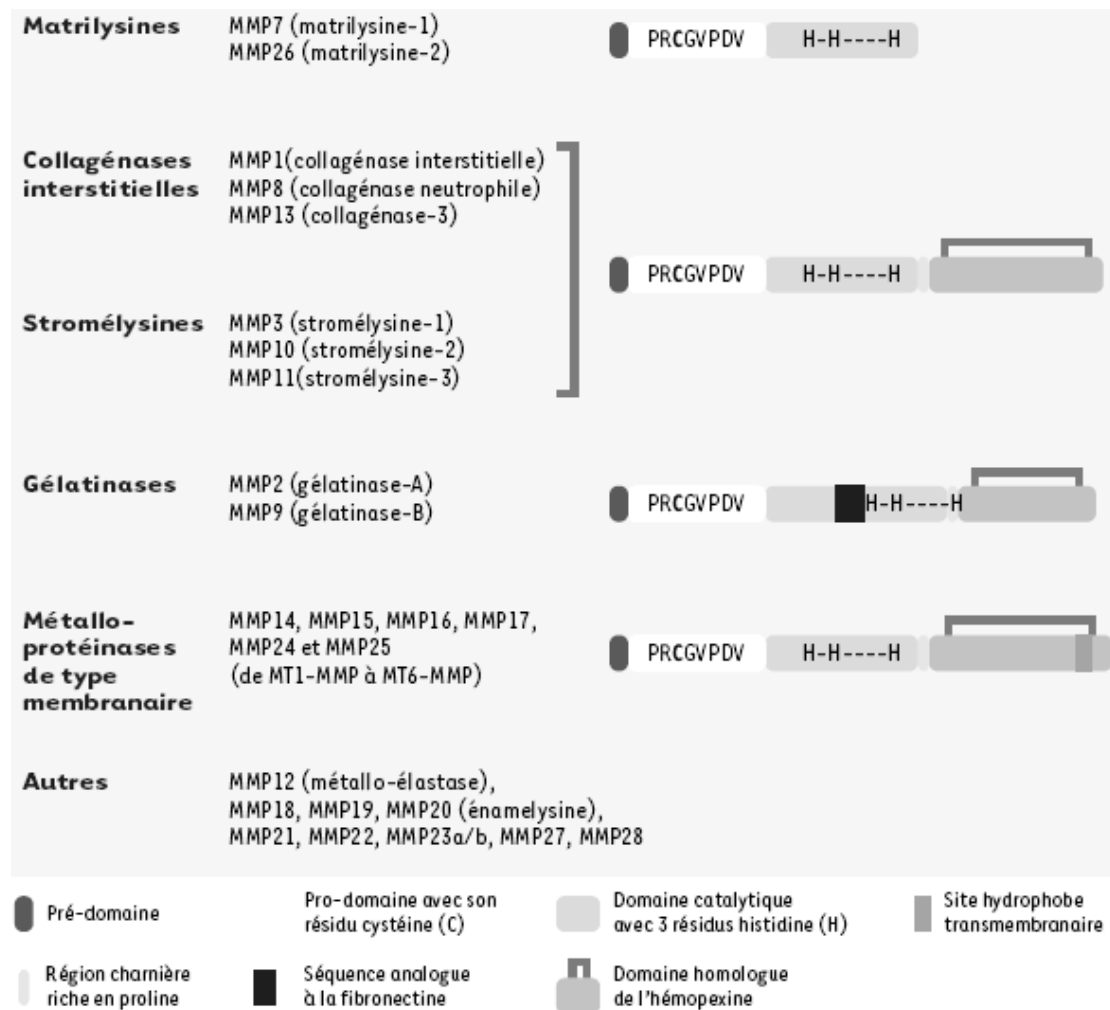


Figure 8. Classification des MMPs en fonction de leur structure, extrait de (Chantrain et al., 2002)

### a) la dégradation de la matrice extracellulaire, les métalloprotéases matricielles

Les spectres des différentes MMPs sont relativement larges et se chevauchent (pour revue, voir (Johansson et al., 2000)). Les MMPs sont malgré tout regroupées en sous-familles. Les collagénases interstitielles (MMP-1, -8 et -13) sont associées à la dégradation du collagène fibrillaire de différents tissus conjonctifs. Les stromélysines (MMP-3, -10 et -11) sont surtout produites par les cellules d'origine épithéliale, et clivent de nombreux protéoglycanes, les collagènes de type IV, V, IX et X, le collagène interstitiel dénaturé (gélatine) et la fibronectine. Les gélatinases (MMP-2 et -9) renferment une séquence répétée de type fibronectine qui, de par l'interaction naturelle entre la fibronectine et les collagènes, leur permet de reconnaître et dégrader le collagène dénaturé ou gélatine; elles clivent aussi le collagène IV des membranes basales, les collagènes de type V, VII, X, XI et XIV, l'élastine et la fibronectine. Les MT-MMPs (Membrane Type - Matrix MetalloProteinases) sont des métalloprotéases ancrées dans la membrane plasmique, qui peuvent dégrader les collagènes de type I, II et III, la laminine, la fibronectine et les protéoglycanes du cartilage.



## 2. La régulation de l'activité des MMPs

L'activité protéolytique des MMPs dépend de l'équilibre entre leur activation et leur inhibition. Il existe différents inhibiteurs endogènes des MMPs, comme l' $\alpha$ 2-macroglobuline ou RECK (REversion-inducing Cystein-rich protein with Kazal motifs), mais surtout et principalement les TIMPs (Tissue Inhibitors of MetalloProteinases). On dénombre quatre TIMPs, formant des complexes stoechiométriques (1:1) avec les différentes MMPs, avec une affinité plus ou moins grande (la constante d'affinité entre MMP-2 et TIMP-2 est de l'ordre du fM, tandis que celle entre MT1-MMP et TIMP-1 est proche de 100nM). La partie N-terminale de ces TIMPs s'associe au site actif des MMPs, tandis que leur extrémité C-terminale peut interagir au prodomaine des progélatinases. Il faut noter cependant que les TIMPs, de même que d'autres inhibiteurs de protéases matricielles, présentent des activités distinctes de la simple inhibition de ces protéases (Lambert et al., 2004) (Noel et al., 2004).

Un autre niveau de régulation de l'activité des MMPs se situe au niveau de leur activation à partir de leur forme latente. Selon les MMPs considérées, cette activation pourra être l'oeuvre de la plasmine, de la furine (notamment pour MT1-MMP), d'autres MMPs ou même d'une autoactivation. Les mécanismes d'activation des gélatinases sont particulièrement bien étudiés. L'activation de la proMMP-2 fait intervenir un complexe avec MT1-MMP et TIMP-2 (Strongin et al., 1995), tandis que celle de la proMMP-9 implique l'axe MT1-MMP/MMP-2 mais aussi la plasmine et la MMP-3 (Ramos-DeSimone et al., 1999) (Toth et al., 2003). L'interaction des MMPs avec différents récepteurs membranaires, notamment les intégrines (Brooks et al., 1996) (Morini et al., 2000) (cf figure 9) va être critique pour la régulation de leur activation et leur activité. Cela va notamment permettre de focaliser le recrutement des MMPs au niveau des régions de la membrane plasmique renfermant ces adaptateurs, comme les filopodes (Bourguignon et al., 1998), et diriger ainsi la digestion de la matrice.

L'expression de la plupart des MMPs peut être induite au niveau transcriptionnel par les facteurs de croissance, les cytokines, les hormones, ou l'adhérence à des substrats matriciels (pour revue, voir (Westermarck and Kahari, 1999)). Les promoteurs de ces MMPs inductibles présentent une conservation importante de séquences de régulation de type AP-1 (Activator Protein-1) ou Pea3 (Polyoma Enhancer Activator) (Westermarck and Kahari, 1999). Il est important de signaler que les éléments Pea3 correspondent à des sites de fixation pour des facteurs de transcription de la famille d'Ets-1 (cf p.57), et que de plus les membres de cette famille coopèrent avec les facteurs de transcription activateurs des complexes AP-1 pour activer la transcription (Wasylyk et al., 1990).

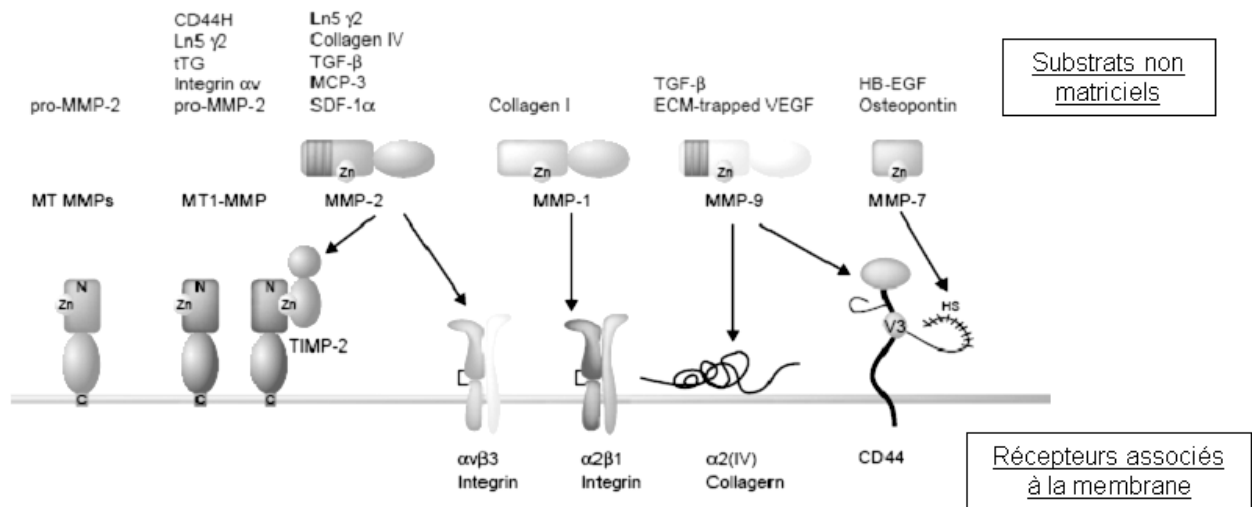


Figure 9. Interactions des MMPs avec différents récepteurs membranaires, extrait de (Seiki, 2002)

Les MMPs peuvent être recrutées et regroupées sur certaines zones de la membrane plasmique, via des interactions avec les intégrines notamment. Ces associations vont permettre une digestion focalisée de la matrice extracellulaire, ou de différents substrats non matriciels.

### 3. Les fonctions « annexes » des MMPs

Il est à noter que la dégradation de certains composés de la matrice par les MMPs peut produire des fragments aux propriétés anti-angiogéniques. Plusieurs MMPs, et principalement la MMP-9, sont capables, en clivant le collagène de type IV, de produire un fragment nommé tumstatine (Hamano et al., 2003). L'endostatine est un autre fragment anti-angiogénique généré par clivage du collagène de type XVIII par différentes MMPs (Ferreras et al., 2000), de même que l'angiostatine produite à partir du plasminogène (Pozzi et al., 2000). Les fonctions des MMPs dans les processus biologiques s'étendent également au-delà des modifications de la matrice (pour revue, (Chantrain et al., 2002)). Les MMPs vont également être capables de cliver différents substrats non matriciels (pour revue, voir Lelongt et al 2002, (Somerville et al., 2003) (Hojilla et al., 2003)). Ils vont ainsi hautement influencer sur les dialogues de différents facteurs de croissance. Les MMPs peuvent en effet cliver l'IGF-BP (IGF Binding Protein) et libérer de l'IGF disponible (Fowlkes et al., 1994). De même, la MMP-3 peut libérer et activer l'HB-EGF (Heparin Binding-EGF) au niveau de la membrane cellulaire (Suzuki et al., 1997). Les MMP-2, -3 et -7, en clivant le protéoglycane « décorine », peuvent libérer le TGF- $\beta$  (Imai et al., 1997). La disponibilité du VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) est également régulée par les MMPs, qui vont ainsi moduler le caractère angiogénique *in vivo* de cellules de cancer du sein (Mira et al., 2004).

Par ailleurs les MMP-3 et -7 sont capables de cliver la E-cadhérine et d'induire une transition épithélio-mésenchymateuse (Nawrocki-Raby et al., 2003; Noe et al., 2001). D'autres fonctions originales des MMPs ont été identifiées récemment. Ainsi la MMP-3 peut induire l'instabilité génomique de cellules épithéliales mammaires normales, via une production d'espèces réactives de l'oxygène dépendante de Rac (Radisky et al., 2005). Par ailleurs, la MMP-2 peut présenter une localisation nucléaire, et est impliquée dans le clivage de l'enzyme PARP, en lien avec l'apoptose de cardiomyocytes (Kwan et al., 2004).

Il apparaît donc que les MMPs ne modulent pas uniquement la physiologie des cellules par un remodelage de la matrice extracellulaire, mais aussi par une action directe de clivage de substrats cellulaires.

#### 4. L'importance des MMPs dans la tumorigenèse

Un nombre important de données expérimentales et épidémiologiques montre que différentes MMPs sont impliquées dans la morphogenèse épithéliale mammaire et sa dérive cancéreuse. La gélatinase-A (MMP-2) et la stromélysine-1 (MMP-3) orchestrent ainsi la morphogenèse de branchement de la glande mammaire (Wiseman et al., 2003). La surexpression de la stromélysine-1 favorise aussi la tumorigenèse mammaire (Sternlicht et al., 1999), de même que celle de la MT1-MMP (Ha et al., 2001). Dans l'ensemble, une expression élevée de nombreuses MMPs est associée dans différents cancers à la progression tumorale, des capacités invasives et métastatiques, et un mauvais pronostic de survie (Deryugina and Quigley, 2006). Quelques exceptions existent cependant ; ainsi l'expression de la MMP-8, ou collagénase-2, dans des cellules cancéreuses mammaires est associée à des capacités métastatiques réduites (Agarwal et al., 2003), et a un rôle protecteur contre la carcinogenèse de la peau (Balbin et al., 2003).

L'exemple de la MMP-9 est évocateur de l'impact possible des MMPs sur les capacités tumorales. Tout d'abord, des études sur les cancers du sein indiquent une augmentation des activités MMP-2 et -9 lors de la progression tumorale mammaire (Hanemaaijer et al., 2000). L'activité du promoteur de la MMP-9 corrèle également avec le caractère invasif de cancers mammaire induits dans des souris transgéniques (Kupferman et al., 2000). Un rôle protecteur de MMP-9 contre l'apoptose a été mis en évidence dans des cellules cancéreuses *in vitro* (Meyer et al., 2005), de même qu'un rôle immunosuppresseur (Sheu et al., 2001). La MMP-9 est également nécessaire pour les capacités métastatiques de cellules cancéreuses de prostate (Sehgal et al., 1998). Ces effets pro-tumorigéniques de la MMP-9 sont toutefois contrebalancés par son rôle dans la production de tumstatine, dont les effets anti-angiogéniques freinent le développement tumoral (Hamano et al., 2003).

L'activité des MMPs sur un nombre conséquent de substrats divers démontre que leur contribution dans la progression cancéreuse est complexe. Elles jouent un rôle important dans plusieurs étapes de la progression cancéreuse telles que la prolifération des cellules cancéreuses et leur caractère invasif, la dissémination métastatique et l'angiogenèse, ce qui en fait des cibles intéressantes dans les stratégies anti-cancéreuses.

Les premiers essais cliniques visant les MMPs, réalisés sur des patients à des stades avancés, ont cependant montré des effets mitigés, pour plusieurs raisons (pour revue, (Matrisian et al., 2003)). D'une part, les essais ont eu lieu sur des patients atteints de cancers avancés, chez lesquels il est probable que les événements tels que l'invasion, l'angiogenèse, voire le dissémination métastatique, impliquant les MMPs, se sont déjà produits. Il a d'ailleurs été démontré dans des modèles animaux que l'utilisation d'inhibiteurs des MMPs était nettement plus efficace à des stades précoces de cancérisation (Bergers et al., 1999). D'autre part, des limites liées aux propriétés des MMPs sont à prendre en compte. Etant donné l'implication des MMPs dans certains processus physiologiques comme l'ossification, l'inhibition de certaines de ces MMPs peut provoquer des effets collatéraux, comme des douleurs articulaires. De plus, la relativement forte homologie des différentes MMPs, qui leur confère des spectres d'activité se chevauchant, pose des problèmes quant à l'obtention d'inhibiteurs spécifiques, qui est cruciale pour ces stratégies anticancéreuses au vu des rôles complexes de ces enzymes dans la tumorigenèse. Ainsi des traitements par des inhibiteurs à large spectre peuvent avoir des effets imprévus, comme le Batimastat qui modifie le tropisme métastatique de cellules cancéreuses mammaires du poumon vers le foie (Kruger et al., 2001). En revanche, l'utilisation d'inhibiteurs plus spécifiques, notamment des gélatinases, semble montrer une plus grande efficacité anti-métastatique dans des modèles animaux utilisant des cellules de lymphome ou de cancer de la prostate (Arlt et al., 2002) (Bonfil et al., 2006). De nouveaux essais cliniques sont envisagés, sur des patients porteurs de cancers à un stade précoce, en prévention de la dissémination métastatique, et en utilisant des inhibiteurs plus sélectifs.

#### **b) les mécanismes de migration indépendants de la protéolyse de la matrice**

Bien que les différentes protéases de la matrice jouent un rôle essentiel dans le caractère agressif des cellules cancéreuses et soient associées à leurs capacités invasives, ces cellules peuvent dans certains contextes migrer de façon indépendante de la protéolyse de la matrice.

Il a ainsi récemment été montré que, suite à une inhibition majeure des protéases de la matrice, des cellules de cancer du sein et de fibrosarcome mettaient en oeuvre une migration de type amiboïde, en se déformant pour passer à travers les « mailles du filet » de la matrice, sans que leur vitesse de migration en soit grandement affectée (Wolf et al., 2003). Cette migration s'accompagne d'une expression diffuse à la surface des cellules des intégrines et protéases de la matrice, et n'exerce que de faibles tensions sur les fibres de matrice extracellulaire (Friedl and Wolf, 2003). En parallèle, d'autres études avaient mis en évidence que la migration de cellules cancéreuses pouvait avoir lieu sans protéolyse, via des mécanismes impliquant une contractilité associée à l'activité de la GFTase Rho (Sahai and Marshall, 2003). Ce type de migration décrit *in vitro* est venu bousculer le dogme de la migration dépendante de la protéolyse. Il semble toutefois que ce mécanisme d'échappement ne soit pas généralisable à toutes les situations. D'autres auteurs suggèrent en effet que ce mécanisme ne soit possible que dans des modèles où il manque un « cross-linking » des fibres de collagène (Sabeh et al., 2004).

Grâce aux améliorations de la microscopie et notamment au développement de la microscopie multiphotonique, il est devenu possible de visualiser la migration des cellules au sein des

tissus vivants. Cette technique de microscopie se base sur l'excitation de fluorochromes par plusieurs photons de basse énergie, et permet d'observer des éléments marqués, des cellules par exemple, mais aussi les fibres de collagène qui, du fait de leur structure primaire renvoient des harmoniques secondes. Des premières données obtenues *in vivo* indiquent que les cellules de carcinomes mammaires migrent selon un processus amiboïde, le long de fibres de matrice convergeant vers les vaisseaux sanguins, à des vitesses presque dix fois supérieures à celles enregistrées *in vitro* ((Wang et al., 2002), revu dans (Condeelis and Segall, 2003)). Il faut toutefois confirmer et vérifier l'étendue de ce processus dans différentes conditions de tumorigenèse.

## 5. La contribution du microenvironnement tumoral

La plupart des tissus des Vertébrés, et particulièrement la glande mammaire, constituent des systèmes complexes nécessitant une coordination étroite des différents types cellulaires qui les composent. Le maintien de ces structures est en partie assuré par la matrice extracellulaire, et nécessite un flux constant et dynamique de communications entre ces cellules. Les cellules tumorales vont s'approprier, mal interpréter, ou ne pas tenir compte de ces signaux réciproques, et prendre le dessus sur les populations locales du tissu hôte envahi.

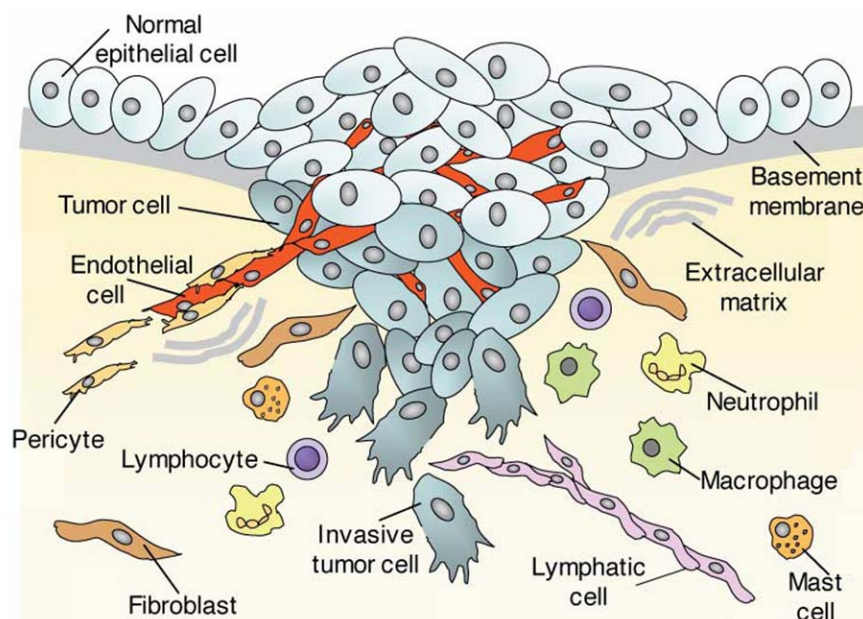


Figure 10. Le microenvironnement tumoral, d'après (Joyce, 2005).

De nombreuses recherches ont montré que le développement tumoral ne se réduit pas à une simple multiplication anarchique et incontrôlée de cellules tumorales mais qu'il dépend également de leurs nombreuses interactions avec leur microenvironnement (cf figure 10). En effet, les cellules environnantes au sein du tissu atteint ne sont pas de simples spectateurs, mais plutôt des participants actifs qui influent sur l'incidence des tumeurs et leurs caractéristiques (Park et al., 2000). On retrouve ainsi des fibroblastes activés en proximité de nombreux carcinomes. L'ajout, dans des modèles de

xénogreffe, de fibroblastes issus de cancers invasifs du sein va favoriser le développement de cancers à partir de cellules cancéreuses mammaires (Orimo et al., 2005). En revanche, l'ajout de fibroblastes dérivés de sein sain dans des modèles proches va réduire la croissance tumorale (Sadlonova et al., 2007). En parallèle, les cellules myoépithéliales normales de sein inhibent l'expression de MMPs par des cellules de cancer du sein et réduisent leur caractère invasif (Jones et al., 2003). Par ailleurs, des interactions entre cellules de cancer du sein et adipocytes ont été démontrées comme bénéfiques aux premières, *in vitro* (Manabe et al., 2003) et *in vivo* (Andarawewa et al., 2005). D'autres études ont également montré qu'un dialogue s'établit entre les macrophages et les cellules de cancer du sein stimulant la migration de chacun des deux partenaires (Goswami et al., 2005). Enfin, le recrutement ou l'induction de nouveaux vaisseaux sanguins par les tumeurs constituent une étape cruciale dans la progression de nombreux cancers, et fait l'objet du prochain chapitre.

La stabilité génétique des cellules du microenvironnement, en opposition à l'instabilité des cellules tumorales, fait de celui-ci une cible thérapeutique intéressante pour bloquer ou du moins freiner le développement tumoral (Joyce, 2005). Cette supposée stabilité est cependant actuellement controversée. Des travaux suggèrent en effet que des modifications génétiques dans le stroma pourraient même précéder la conversion maligne des cellules épithéliales (Moinfar et al., 2000), remettant en cause le dogme de la stabilité génétique des cellules du microenvironnement tumoral.

## **6. L'angiogenèse, acteur clé de la progression tumorale**

La formation de nouveaux vaisseaux sanguins irriguant la tumeur va être essentielle à l'expansion de celle-ci, en lui apportant de l'oxygène et des nutriments et en permettant l'élimination de ses déchets. La nécessité de l'induction angiogénique a notamment été démontrée pour la progression tumorale dans un modèle de cancer du pancréas (Bergers et al., 1999). Ces vaisseaux sanguins fourniront également aux cellules cancéreuses une voie d'échappement dans l'organisme, leur permettant d'établir des foyers métastatiques à distance, d'autant plus facilement que ces vaisseaux présentent souvent des discontinuités

### **6.1. Les mécanismes moléculaires de l'angiogenèse**

Les angiogenèses physiologique ou tumorale semblent emprunter des mécanismes similaires, comprenant plusieurs étapes d'un modèle classiquement admis. L'angiogenèse de bourgeonnement débute avec une vasodilatation locale et une augmentation de la vasoperméabilité menant au dépôt de fibrine, qui servira de support d'invasion aux cellules endothéliales. Puis interviennent la dégradation de la membrane basale des vaisseaux, l'activation et la migration de cellules endothéliales vers le stimulus angiogénique, la prolifération de ces cellules, leur alignement et leur différenciation (cf figure 11 à la page suivante).

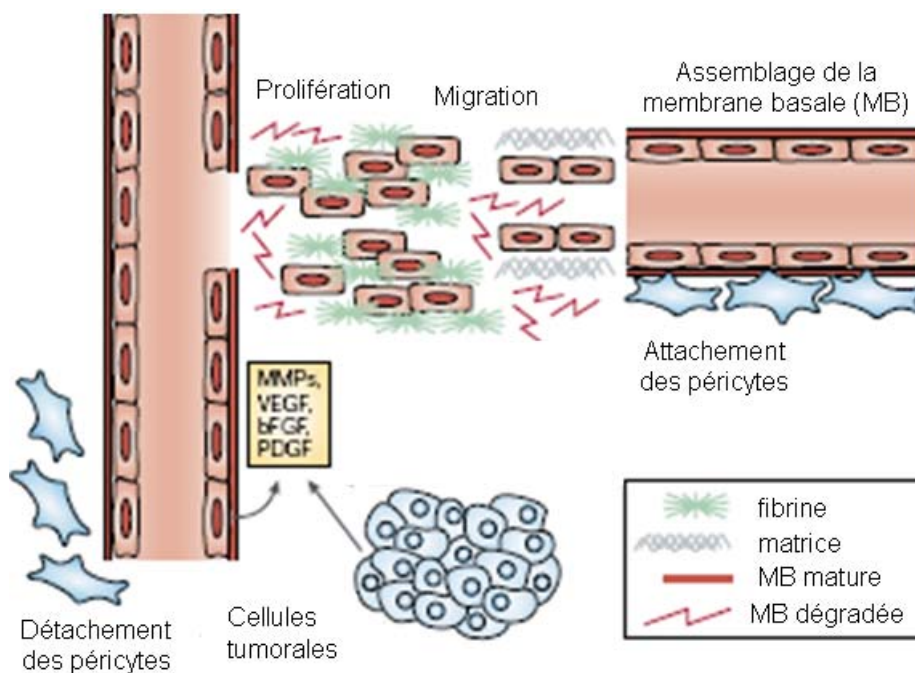


Figure 11. Le processus d'angiogénèse, adapté de (Kalluri, 2003).

Le processus d'angiogénèse mis en oeuvre par les cellules endothéliales présente donc des similitudes avec la morphogénèse de branchement des cellules épithéliales, qui possèdent la même origine embryonnaire, à savoir l'ectoderme. Un certain nombre d'acteurs est donc commun à ces mécanismes, comme les facteurs de croissance, les intégrines, et les protéases de la matrice.

L'angiogénèse est associée à une dégradation puis une reformation de la membrane basale. Des facteurs de croissance, tels que le VEGF, le bFGF et le PDGF, ainsi que diverses MMPs, sont sécrétés par la tumeur et stimulent la prolifération et la migration des cellules endothéliales. Les péricytes contribuent à la stabilisation des vaisseaux. Ils se détachent lors de l'initiation angiogénique et se rattachent lors de la maturation éventuelle des nouveaux vaisseaux.

Les facteurs de croissance vont être des éléments essentiels lors de l'angiogénèse (pour revue, voir (Bussolino et al., 1996)). Parmi ceux-ci, le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) apparaît comme un régulateur central de l'angiogénèse, et en particulier de l'angiogénèse tumorale (pour revue, voir (Nicosia, 1998)). L'expression des transcrits de plusieurs facteurs de croissance angiogéniques a été détectée dans des tumeurs primaires du sein. Parmi ceux-ci, outre le VEGF, on retrouve les FGF (Fibroblast Growth Factor) -a et -b, le TGF- $\beta$ 1 (Transforming Growth Factor), le PD-ECGF (Platelet-Derived Endothelial Cell Growth Factor), et le PlGF (Placental Growth Factor). Le VEGF s'est trouvé être le plus abondant, et son expression corrèle avec un mauvais pronostic (Relf et al., 1997). Une forte expression du VEGF a de plus été associée à une réponse réduite aux traitements chimiothérapeutiques de cancers du sein avancés (Foekens et al., 2001).

L'induction de l'expression de ces molécules angiogéniques a des origines multiples. Il existe par exemple une stimulation croisée de ces facteurs ; l'HGF/SF promeut ainsi l'expression du VEGF (Zhang et al., 2003b). L'hypoxie des tissus, liée le plus souvent à une vascularisation insuffisante ou à

un développement tumoral trop rapide, va provoquer une réponse angiogénique des cellules, pour essayer de pallier à cette absence d'oxygène (pour revue, voir (Carmeliet et al., 1998)). Il est intéressant de noter que l'expression du facteur de transcription HIF-1 (Hypoxia-Inducible Factor) augmente progressivement lors de la tumorigenèse mammaire (Bos et al., 2001) et corrèle avec l'expression du VEGF (Maxwell et al., 1997). En parallèle, il existe également une régulation de l'angiogenèse par d'autres facteurs solubles plus spécifiques du processus endothélial, comme les angiopoïétines, qui vont jouer un rôle crucial dans la maturation des vaisseaux (Jain and Munn, 2000).

La composition de la matrice extracellulaire va également jouer un rôle crucial dans l'angiogenèse tumorale, notamment les collagènes et les protéoglycanes qui vont stocker ou présenter certains facteurs angiogéniques comme le VEGF ou le bFGF (pour revue, voir Rooney et al., 1997). Le choix de la composition de la matrice sera donc crucial pour étudier l'angiogenèse dans des modèles de culture *in vitro* (Bishop et al., 1999) (Montanez et al., 2002). Le remaniement de cette matrice par les protéases matricielles, notamment les protéases membranaires, va fortement influencer l'angiogenèse (pour revue, voir (Bauvois, 2004)). Les MMPs peuvent de plus intervenir directement sur la production de facteurs angiogéniques; ainsi l'expression de la MT1-MMP dans des cellules de cancer du sein promeut celle du VEGF via Src (Sounni et al., 2004). Réciproquement, différents facteurs de croissance angiogéniques, dont l'HGF/SF (Wang and Keiser, 2000), vont induire l'expression de ces protéases de la matrice, nécessaires à l'invasion des cellules endothéliales.

## **6.2. L'angiogenèse tumorale et ses implications**

Les vaisseaux tumoraux présentent une prolifération très soutenue, et montrent classiquement des défauts de différenciation, associés à cet emballement du processus et à un défaut de maturation. On note ainsi l'absence fréquente de péricytes, de membrane basale et une discontinuité des cellules endothéliales. Ces vaisseaux sont souvent très fins et perméants, avec un branchement anormal et des extrémités aveugles, et sont très peu efficaces en terme de flux sanguin, qui y apparaît comme intermittent et chaotique (pour revue, voir (Sivridis et al., 2003)). Etant donné que les cellules cancéreuses sont tolérantes à l'hypoxie et capables de glycolyse anaérobie, il semble que l'angiogenèse tumorale, menant à la formation de vaisseaux défectueux, permettrait surtout aux cellules cancéreuses de trouver une voie d'accès facile à la circulation systémique, au-delà d'une oxygénation et d'un apport en nutriments limités. Il est aussi important de noter que les cellules endothéliales peuvent stimuler de façon paracrine la survie de cellules cancéreuses *in vivo* avant même de produire des vaisseaux perfusés (Shan et al., 2004).

En ce qui concerne les cancers du sein, les premiers signes d'angiogenèse tumorale apparaissent au stade de carcinome *in situ* de haut grade (Engels et al., 1997). Le degré de vascularisation évolue ensuite en parallèle de la progression tumorale, et corrèle avec un mauvais pronostic (Hansen et al., 2000). La densité de micro-vaisseaux, ou MVD (Micro Vessel Density), corrèle avec le risque qu'un cancer du sein invasif métastase (Weidner et al., 1991).



L'angiogenèse apparaît également dans différents modèles comme le mécanisme permettant la levée de la « dormance » tumorale. Il a été observé que des cancers microscopiques pouvaient rester cachés et asymptomatiques pendant de nombreuses années, et il arrive parfois qu'un cancer traité avec succès se manifeste à nouveau après plusieurs années. L'existence de cellules cancéreuses isolées dans les os de patientes atteintes de cancer du sein au moment du diagnostic est associée à un mauvais pronostic (Braun et al., 2005). L'angiogenèse semble être un élément clé dans la levée de cette dormance (Naumov et al., 2006). En effet, des travaux ont montré que des lignées cellulaires tumorales humaines dormantes pouvaient être sorties de cet état par la transfection du VEGF (Udagawa et al., 2002).

### **6.3. L'adhérence des cellules cancéreuses à l'endothélium**

Les cellules cancéreuses peuvent exprimer différentes molécules favorisant l'adhérence à l'endothélium. L'HGF/SF promeut ainsi l'expression du protéoglycane CD44 par des cellules de cancer du sein, et favorise leur adhérence à un tapis de cellules endothéliales *in vitro* (Mine et al., 2003). L'expression par ces cellules cancéreuses de certaines intégrines, notamment  $\alpha V\beta 3$ , favorise aussi cette adhérence, qui est renforcée par l'intervention des plaquettes sanguines (Gomes et al., 2004). Des cellules de cancer du sein, en interagissant avec les cellules endothéliales induisent également la perte des jonctions intercellulaires entre ces dernières (Lewalle et al., 1997), ce qui pourrait faciliter les processus d'intra- et d'extravasation. De plus, l'endothélium de cancers du sein est le lieu d'une expression accrue de molécules d'adhérence pouvant promouvoir les interactions avec les cellules immunitaires ou les cellules cancéreuses, de la famille des sélectines ou d'ICAM (InterCellular Adhesion Molecule) (Fox et al., 1995). L'expression par l'endothélium de telles molécules est déclenchée physiologiquement par diverses molécules proinflammatoires, pour favoriser l'acheminement des cellules immunitaires vers les sites d'infection (pour revue, voir (Dunon et al., 1996)). Dans le cadre des cancers, cette expression peut faciliter l'adhérence des cellules cancéreuses, dans ce qui constituera une étape initiale du processus de métastase. De plus, les cellules immunitaires recrutées au niveau de la tumeur (cf figure 10) pourront favoriser son développement (Goswami et al., 2005).

Il faut aussi mentionner au chapitre des interactions cancer-endothélium la tétraspanine CD82, protéine membranaire exprimée par les cellules épithéliales, et également nommée KAI-1 (Kang AI, signifiant anti-cancer en chinois), qui interagit avec la protéine DARC (Duffy Antigen Receptor for Chemokines) exprimée par les cellules endothéliales. Au contraire des autres molécules impliquées dans l'adhérence à l'endothélium, la liaison de KAI-1 à DARC réduit la croissance des cellules cancéreuses, via la surexpression de gènes associés à la sénescence (Bandyopadhyay et al., 2006). Son expression est réduite dans différents cancers, dont ceux du sein, et cette baisse est corrélée avec un mauvais pronostic (Huang et al., 1998).

#### **6.4. Les stratégies anti-angiogéniques de traitement des cancers**

Etant donné l'importance de l'angiogenèse pour la progression tumorale et les capacités métastatiques des cellules cancéreuses, différentes stratégies visant à la bloquer ont été élaborées (pour revue, voir (Morabito et al., 2004)).

Les récepteurs Tyrosine kinases exprimés par les cellules endothéliales, de même que les intégrines exprimées par les vaisseaux angiogéniques, font partie des cibles de tels traitements. La plupart des molécules anti-angiogéniques testées, dont des inhibiteurs des protéases de la matrice (cf p.43), l'ont été sur des patients à des stades avancés de cancer, ce qui explique leur relative inefficacité jusqu'à présent (Schneider and Miller, 2005). Les stratégies anti-angiogéniques devraient sans doute être évaluées sur des cancers à des stades précoces, c'est-à-dire durant les périodes où le blocage de l'angiogenèse est censé être le plus efficace (Bergers et al., 1999), afin de démontrer leur potentiel réel.

Des limites intrinsèques à l'idée de bloquer l'angiogenèse apparaissent toutefois. Il faut tout d'abord se rappeler que les agents thérapeutiques ont accès à la tumeur par la voie sanguine, et que donc l'irrigation de la tumeur est nécessaire au ciblage de celle-ci. Des modèles ont d'ailleurs été proposés, où les agents anti-angiogéniques viseraient à stabiliser les vaisseaux tumoraux plutôt qu'à les détruire, afin d'améliorer l'accessibilité des agents chimiothérapeutiques à la tumeur (Jain, 2001).

Un problème des stratégies ciblées est le risque d'échappement, comme démontré dans un modèle de cancer pancréatique, où l'inhibition prolongée du VEGF-R2 amenait à un échappement à ce traitement impliquant le FGF (Casanovas et al., 2005). Par ailleurs, l'induction de l'hypoxie par des stratégies antiangiogéniques peut avoir des conséquences imprévisibles. Ainsi l'hypoxie peut favoriser la motilité des cellules cancéreuses via la surexpression du récepteur c-Met, dans ce qui apparaît comme un autre mécanisme d'échappement tumoral (Pennacchiotti et al., 2003).

Il faut également signaler que l'angiogenèse de bourgeonnement n'est pas le seul mécanisme mis en jeu pour le développement de la vascularisation de la tumeur, ce qui peut intervenir dans l'échappement des cancers aux thérapies anti-angiogéniques (pour revue, voir (Dome et al., 2007)). Les tumeurs peuvent en effet co-opter les vaisseaux pré-existants, et sont capables de vasculogénèse en recrutant des précurseurs de cellules endothéliales. L'analyse des vaisseaux de tumeurs mammaires induites dans des souris transgéniques surexprimant le récepteur Neu, par moulage de ceux-ci à l'aide de méthyl-méthacrylate, révèle une hétérogénéité de vascularisation avec la co-existence au sein d'un même nodule tumoral de zones d'angiogenèse de bourgeonnement exacerbée et d'autres zones d'intussusception (Djonov et al., 2001). L'intussusception est un mécanisme impliquant la formation à l'intérieur des vaisseaux de piliers qui, en fusionnant, séparent les vaisseaux-fils. Cela a un impact potentiel important sur les stratégies antiangiogéniques, étant donné que les vaisseaux en intussusception ne prolifèrent pas et sont donc a priori plus résistants à des traitements cytotoxiques. Enfin des phénomènes de mimétisme vasculaire (vasculogenic mimicry) ont été décrits menant à l'expression de marqueurs endothéliaux par des cellules de mélanome agressif et à la formation de vaisseaux par ces dernières (Maniotis et al., 1999). Des données plus récentes semblent indiquer que ce processus serait également à l'oeuvre dans les cancers du sein agressifs (Basu et al., 2006).

## 7. Le facteur de transcription Ets-1

### 7.1. La famille des facteurs de transcription ETS

Dans les années 1970, la présence dans le génome de certains virus de séquences similaires à des séquences du génome de la cellule infectée laissait suggérer une sorte de 'kidnapping' par ces virus de fragments du génome cellulaire. Les séquences virales en question étaient bien souvent responsables d'un caractère oncogénique du virus, les séquences normales correspondantes dans le génome cellulaire étant désignées sous le terme de proto-oncogènes.

Parmi ces virus, les rétrovirus AMV (Avian Myeloblastosis Virus) et E26, inducteurs de leucémies, possédaient en commun une séquence myb. A la différence d'AMV, le virus E26 possédait la capacité d'induire l'érythroblastose. Il renfermait par ailleurs une séquence nucléotidique supplémentaire distincte des gènes de réplication virale, qui fut nommée v-ets (pour E Twenty-six Specific) (Leprince et al., 1983). Cette séquence v-ets présente dans le virus E26 correspondait à une séquence du génome du poulet, c-ets, codant pour le proto-oncogène c-Ets-1, facteur de transcription fondateur de la famille ETS.

#### Sous-famille












ETS	ETS1, ETS2, POINTED	
ERG	ERG, FLI1, FEV	
ELG	GABP $\alpha$ , ELG	
ELF	ELF1, NERF/ELF2, MEF/ELF4	
ESE	ESE1/ESX/ELF3, ESE2/ELF5, ESE3/EHF	
ERF	ERF/PE2, ETV3/PE1	
TEL	TEL/ETV6, TEL2/ETV7, YAN	
PEA3	PEA3/E1AF/ETV4, ERM/ETV5, ER81/ETV1, ER71/ETV2	
SPI	PU.1/SPI, SPIB, SPIC	
TCF	ELK1, SAP1/ELK4, NET/SAP2/ELK3, LIN	
PDEF	PDEF/SPDEF/PSE	

Figure 12. Représentation schématique de la structure des membres des sous-familles Ets, d'après (Gutierrez-Hartmann et al., 2007). Ets, domaine ETS de liaison à l'ADN ; Pointed, domaine Pointed ; AD, Domaine d'Activation ; RD, Domaine de Répression.

La famille des facteurs de transcription ETS contient une trentaine de membres identifiés à ce jour, impliqués dans la régulation d'une large gamme de fonctions biologiques. Ils ont tous en commun un domaine de liaison à l'ADN très conservé dans la famille, désigné domaine ETS. Ce domaine d'environ 85 acides aminés prend une structure de type hélice-tour-hélice reconnaissant des séquences particulières dans l'ADN, les EBS (Ets Binding Sites), qu'on retrouve dans les promoteurs de nombreux gènes (cf chapitre 7.2.b). Au sein de la famille ETS, différents membres sont regroupés en sous-familles, selon leur degré d'homologie entre eux. On retrouve ainsi notamment les sous-familles Ets, Erg, PEA3, Elf et Spi (cf figure 12).

## **7.2. Les mécanismes d'action du facteur de transcription Ets-1**

### **a) la structure du proto-oncogène Ets-1**

La protéine Ets-1 peut être divisée en six domaines (cf figure 13). Les modélisations moléculaires ainsi que les techniques de résonance magnétique nucléaire et de cristallographie ont permis de faire de grands progrès dans la compréhension de l'organisation des différents domaines de Ets-1.

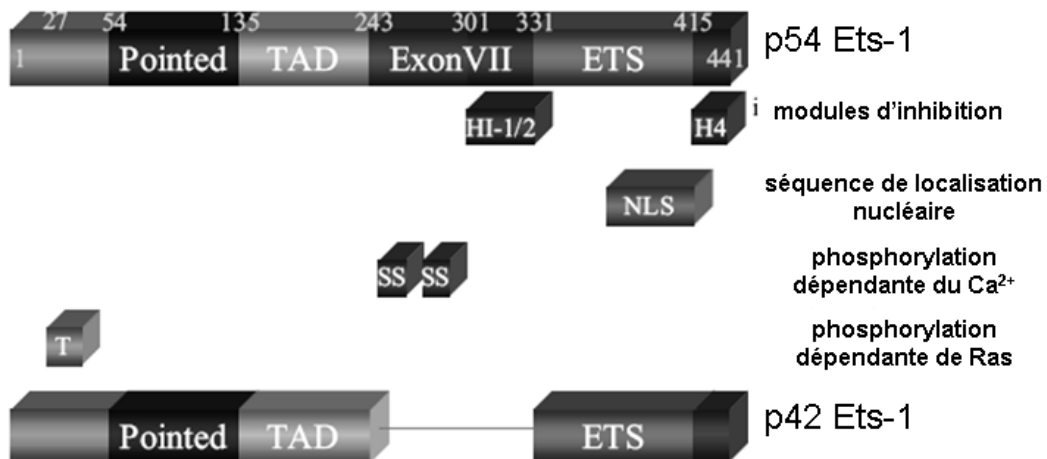


Figure 13. Représentation schématique des domaines de la protéine Ets-1, d'après (Dittmer, 2003). TAD : Domaine de TransActivation, NLS : Séquence de Localisation Nucléaire, HI-1/2 : hélices d'inhibition1/2, H4 : hélice 4 inhibitrice, S et T : sérine et thréonine dont la phosphorylation régule l'activité d'Ets-1.

Intéressons-nous tout d'abord au domaine de liaison à l'ADN, ou domaine ETS. Celui-ci est caractérisé par une structure de type hélice-tour-hélice (cf figure 14 à la page suivante). Il est composé de trois hélices  $\alpha$  et de quatre feuillets  $\beta$ . C'est la troisième hélice de ce domaine, H3, qui interagit avec le motif GGAA/T dans le sillon majeur de l'ADN, tandis que le tour entre les feuillets 3 et 4 entre en contact avec le sillon mineur (Werner et al., 1997).

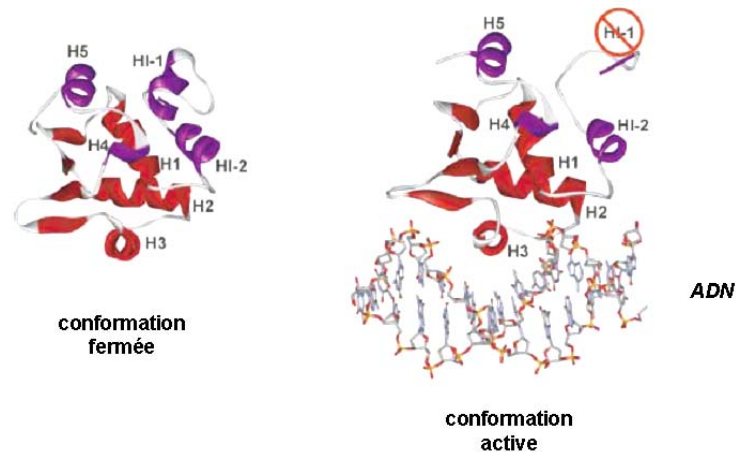


Figure 14. Modèle d'auto-inhibition d'Ets-1 et d'interaction d'Ets-1 avec l'ADN, d'après (Pufall et al., 2005). Conformation fermée : Les hélices inhibitrices (en violet) forment un module empêchant la liaison du domaine ETS (en rouge) à l'ADN. Conformation active : l'hélice inhibitrice HI-1 est dépliée et l'hélice H3 du domaine ETS (en rouge) peut interagir avec la séquence d'ADN.

Le domaine Pointed (PNT) est quant à lui conservé dans différentes protéines de la famille ETS et associé à des mécanismes d'homo-oligomérisation, d'hétérodimérisation ou de répression transcriptionnelle (pour revue, voir (Sharrocks, 2001)).

Le domaine de transactivation contient une forte proportion de résidus acides, et permet l'interaction de Ets-1 avec CBP (CREB Binding Protein) / p300 qui vont pouvoir agir comme co-activateurs.

L'exon VII et la partie C-terminale de Ets-1 sont capables de former un module inhibiteur relativement stable, maintenant le domaine ETS dans une conformation où Ets-1 ne peut plus se lier à l'ADN (cf figure 14) (Petersen et al., 1995).

Chez les mammifères, il existe une isoforme de Ets-1 provenant d'un épissage de l'exon VII. La protéine correspondante p42 Ets-1 (cf figure 13) est capable de se fixer à des séquences plus variées, en lien avec la perte d'une région inhibitrice de la fixation, par rapport à la protéine pleine longueur (Lionneton et al., 2003).

Outre cette structure liée à la séquence protéique, des modifications post-traductionnelles moduleront l'activité d'Ets-1 (cf figure 13) (pour revue, voir (Dittmer, 2003)). La partie N-terminale de Ets-1 contient un site de réponse à Ras, dont la phosphorylation augmente l'activité transcriptionnelle de Ets-1 (Yang et al., 1996), tandis que la phosphorylation de l'exon VII renforce l'inhibition de liaison à l'ADN (Cowley and Graves, 2000). D'autres modifications post-traductionnelles, comme la sumoylation, régulent aussi l'activité d'Ets-1 (Ji et al., 2007).

### **b) la régulation de l'expression d'Ets-1**

Le promoteur du gène codant pour Ets-1 est un promoteur dépourvu de boîte TATA, contenant différents éléments régulateurs positifs et négatifs. On y retrouve notamment des sites de fixation pour Ets-1, AP-1, AP-2 et Sp1 (pour revue, voir (Dittmer, 2003)).

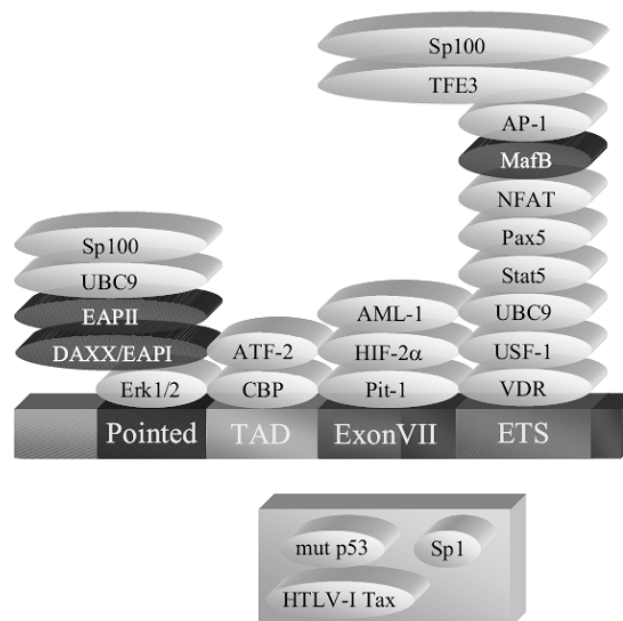
L'expression d'Ets-1 peut être induite par différents facteurs de croissance, comme l'HGF/SF (Paumelle et al., 2002), le VEGF (Watanabe et al., 2004), le PDGF (Naito et al., 1998) ou le TGF- $\beta$

(Huang et al., 2005). La transcription d'Ets-1 peut aussi être activée par l'acide rétinoïque (Raouf et al., 2000), les oestrogènes (Lincoln et al., 2003), ou des conditions d'hypoxie (Oikawa et al., 2001).

### **c) la spécificité de fixation**

Les facteurs de transcription ETS se fixent sur l'ADN au niveau de séquences consensus de type GGAA/T, et vont induire l'activation ou la répression des promoteurs renfermant ces EBS (Ets Binding Sites). Ces EBS figurent parmi les motifs d'ADN les plus importants pour obtenir une réponse transcriptionnelle au niveau de promoteurs variés (Edelman et al., 2000). Les membres de la famille ETS diffèrent dans leur site préférentiel de liaison en fonction des nucléotides flanquant le cœur GGAA/T (Graves and Petersen, 1998).

Cependant, les facteurs de la famille ETS sont également capables de se lier à des sites qui ne correspondent pas à leurs séquences consensus définies. Il apparaît que la spécificité et l'affinité des facteurs ETS pour différents EBS sont contrôlées par le contexte géométrique de cette séquence par rapport à d'autres éléments situés en cis, en lien avec la capacité de ces facteurs d'interagir en synergie avec d'autres éléments des complexes transcriptionnels (pour revue, voir (Verger and Duterque-Coquillaud, 2002)). Un schéma récapitulatif non exhaustif de l'interaction des différents domaines de Ets-1 avec d'autres protéines est proposé dans la figure 15. Ceci explique la versatilité des facteurs de transcription ETS, illustrée par l'exemple de Ets-1 qui régule l'expression de Fli-1 dans les cellules endothéliales mais pas dans les fibroblastes (Lelievre et al., 2002). En parallèle, l'étude du promoteur du récepteur de type II au TGF- $\beta$  a révélé que les effets de différents facteurs ETS variaient dans un même type cellulaire en fonction de son état de différenciation (Kopp et al., 2004).



**Figure 15. Protéines interagissant avec Ets-1**, d'après (Dittmer, 2003). Les protéines coopérant avec Ets-1 pour activer la transcription sont indiquées en gris clair, et celles pour lesquelles l'interaction a un rôle répresseur de la transcription sont en gris foncé. Les protéines dont le site d'interaction n'est pas encore défini (Sp1, HTLV-I Tax, mut p53) sont montrés sous Ets-1. AML1 :

acute-myeloid-leukemia-1, AP-1 : activator protein 1, ATF2 : activating transcription factor 2, CBP : CREB binding protein, ERK1/2 : extracellular-signal-regulated kinase 1/2, HIF-2 $\alpha$  : hypoxia-inducible factor 2 $\alpha$ , HTLV-I Tax : human T-cell lymphotropic virus-I transactivating protein of region X, MafB : musculoaponeurotic fibrosarcoma B, NFAT : nuclear factor of activated T-cells, Pax5 : paired box containing gene 5, Pit-1 : pituitary-specific trans-acting factor 1, Sp100 : speckled, 100 kD, Stat5 : signal transducer and activators of transcription 5, EAP : Ets1-associated protein, UBC9 : ubiquitin-conjugating enzyme 9, USF-1 : upstream stimulatory factor 1, VDR : vitamin D receptor

#### **d) les gènes cibles potentiels**

De nombreux sites EBS ont été caractérisés dans les promoteurs de divers gènes. Parmi les gènes cibles potentiels, on retrouve entre autres (pour revue, voir (Sementchenko and Watson, 2000)) de nombreux gènes codant pour des molécules à l'expression dérégulée dans les cancers. Ces gènes cibles potentiels comprennent:

- des facteurs de transcription, tels que p53, c-myc, TBP, GATA-1, c-fos, JunB, PU1, Fli1 ou NF- $\kappa$ B1,
- des protéases de la matrice et leurs inhibiteurs, comme MMP-1, -3 et -9, TIMP-1, la cathepsine B ou l'élastase,
- des protéines du cycle cellulaire, cdc2, la cycline D1, Rb et p21 Waf1,
- des protéines de l'apoptose, telles que Fas, PARP, Bcl-2 ou Bcl-XL,
- des récepteurs membranaires, comme Kit, GM-CSF-R, Flt-1, Flk-1, ErbB2, Met ou TGF $\beta$ RII,
- des cytokines comme les interleukines, et le facteur de croissance FGF-1,
- des molécules d'adhérence telles que les E- et VE- cadhérines et les sous-unités d'intégrines  $\alpha$ 4,  $\beta$ 4 et  $\alpha$ V,
- des protéines virales, comme la polymérase de HIV-1 (Human Immunodeficiency Virus-1),
- et des marqueurs de différenciation des lignées épithéliale, endothéliale ou lymphoïde/myéloïde.

### **7.3. Le facteur de transcription Ets-1 dans le développement normal**

L'expression des facteurs ETS dans différents tissus de l'organisme à différents stades du développement rend compte de leur importance dans de nombreux processus physiologiques. Bien qu'une certaine redondance puisse exister entre les différents facteurs ETS, l'émergence d'une famille si variée suggère que ses différents membres exercent des fonctions distinctes (Sementchenko and Watson, 2000).

Pour comprendre le rôle biologique de Ets-1, on peut partir de l'analyse du phénotype de souris transgéniques déficientes en Ets-1. Les premiers défauts observés chez ces souris concernent une altération fonctionnelle des lymphocytes B et T, et des cellules NK (Natural Killer) (Bories et al., 1995) (Barton et al., 1998), indiquant un rôle clé d'Ets-1 dans le développement de la lignée lymphoïde. Plus récemment, Ets-1 a été également impliqué par des approches similaires dans la réponse vasculaire de type inflammatoire (Zhan et al., 2005).

L'analyse du profil d'expression d'Ets-1 au cours du développement chez les Mammifères a aussi permis de mieux définir les fenêtres d'étude les plus appropriées pour ce facteur (pour revue,

voir (Maroulakou and Bowe, 2000)). Outre la confirmation du rôle d'Ets-1 dans les lignées immunitaires, l'implication d'Ets-1 dans les processus d'angiogenèse chez l'embryon et l'adulte (Vandenbunder et al., 1989) (Wernert et al., 1992) a été particulièrement soulignée par ce genre d'étude. De plus, l'expression d'Ets-1 a été décrite lors des mécanismes d'organogenèse impliquant des interactions inductives entre épithélium et mésenchyme (Kola et al., 1993). En ce qui concerne la glande mammaire, l'expression d'Ets-1 est détectée dans les cellules du mésenchyme au début de la morphogenèse, avant de l'être au sein des cellules épithéliales des extrémités terminales invasives (Delannoy-Courdent et al., 1996).

#### **7.4. Le facteur de transcription Ets-1 dans la tumorigenèse**

Des translocations chromosomiques impliquant différents gènes de la famille ETS ont été décrits dans les sarcomes d'Ewing (Delattre et al., 1992), des leucémies (Golub et al., 1994), ainsi que plus récemment dans des cancers de la prostate (Tomlins et al., 2007). En parallèle, différents facteurs de transcription de la famille ETS sont surexprimés dans de nombreuses pathologies, dont les cancers du sein.

##### **a) les facteurs de transcription ETS dans la tumorigenèse mammaire**

Différents membres de la famille ETS voient leur expression dérégulée dans les cancers du sein, et associée à leur caractère transformé.

ESX et ESE-1 sont capables de transformer des cellules épithéliales mammaires (Schedin et al., 2004b) (Prescott et al., 2004). Ets-2 est impliqué dans la croissance sans ancrage et l'invasion de cellules cancéreuses mammaires (Sapi et al., 1998). Les membres de la sous-famille Pea3 sont associés aux capacités métastatiques de cellules de cancer du sein et à un mauvais pronostic (de Launoit et al., 2000) (Myers et al., 2006). Cependant, l'expression de Pea3 peut également être délétère à la croissance de cellules cancéreuses mammaires (Xing et al., 2000; Yu et al., 2006). Enfin, tout récemment, l'expression de Fli-1 a été associée au caractère malin et à la résistance à l'apoptose de cellules de cancer du sein (Sakurai et al., 2007).

En revanche, l'expression de Pdef est réduite dans les cancers du sein et sa réexpression dans des cellules issues de tels cancers provoque une baisse de leur motilité (Turner et al., 2007).

##### **b) le facteur de transcription Ets-1 dans les cancers**

La surexpression d'Ets-1 est observée dans de nombreux carcinomes, sarcomes mais aussi dans des astrocytomes (cf annexe 1). Elle est en général associée à la progression tumorale. Ainsi une expression élevée d'Ets-1 est corrélée avec une faible différenciation de carcinomes hépatiques (Kanda et al., 2002), et un grade histologique élevé dans les cancers de l'endomètre et de l'ovaire (Takai et al., 2000) (Takai et al., 2002). Elle est associée à une incidence accrue de métastases ganglionnaires dans les carcinomes du poumon (Sasaki et al., 2001), du colon (Nakayama et al., 2001) ou de la peau (Pande et al., 1999). Une forte expression d'Ets-1 est corrélée à un mauvais pronostic dans les cancers de l'ovaire (Davidson et al., 2001) et du col utérin (Fujimoto et al., 2002).



La surexpression d'Ets-1 est également observée dans les cancers de la prostate latents ou déclarés (Alipov et al., 2005), du pancréas (Ito et al., 1998), de la glande thyroïde (Nakayama et al., 1999), et certains cancers de l'estomac (Nakayama et al., 1996) ou de l'oesophage (Saeki et al., 2000).

### **c) le facteur de transcription Ets-1 dans les cancers du sein**

Outre son expression lors de la morphogenèse de la glande mammaire, Ets-1 est également exprimé dans les cancers du sein (Wernert et al., 1994). Alors qu'elle était essentiellement décrite dans les cellules du stroma dans un premier temps (Behrens et al., 2001), elle est depuis également, voire principalement, observée dans les cellules tumorales, aussi bien au niveau transcriptionnel (Buggy et al., 2004) que protéique (Katayama et al., 2005) (Mylona et al., 2006), en lien avec leur caractère invasif et agressif. D'un point de vue clinique, l'expression d'Ets-1 est corrélée avec un grade histologique élevé et un mauvais pronostic dans les cancers du sein (Span et al., 2002), (Katayama et al., 2005). Le facteur de transcription Ets-1 apparaît donc comme un marqueur d'agressivité des cancers du sein. Toutefois, les mécanismes moléculaires impliqués dans cette observation étaient relativement mal définis.

## 8. Plan de travail de thèse

Je me suis plus particulièrement intéressé au cours de cette thèse au rôle d'Ets-1 dans les capacités invasives et angiogéniques des cellules de cancer du sein. Ces deux caractéristiques sont en effet étroitement liées aux capacités des cellules cancéreuses à se disséminer dans l'organisme par le processus de métastase, responsable de la majorité des décès liés au cancer du sein.

Pour répondre à ces questions, j'ai utilisé divers systèmes de culture tri-dimensionnelle dans des composés de matrice extracellulaire. Ces modèles visent à mimer l'architecture physiologique de l'environnement de ces cellules et semblent en effet plus appropriés pour étudier le comportement invasif des cellules cancéreuses, mais aussi l'angiogenèse *in vitro*.

Nous avons surexprimé Ets-1 ou en parallèle un mutant dominant négatif, dans des cellules cancéreuses mammaires murines, par des approches utilisant des rétrovirus écotropes murins défectifs. Ces méthodes permettent d'obtenir une forte proportion de cellules infectées et de pouvoir étudier ultérieurement dans des modèles *in vivo* murins le développement tumoral et l'angiogenèse, sans problème de barrière interspèces.

La première partie de ce travail de thèse a d'abord consisté à caractériser *in vitro* les effets de la manipulation de l'expression ou de l'activité d'Ets-1 dans les processus de dissociation, de migration et d'invasion, en identifiant les cibles moléculaires impliquées dans ces mécanismes. Nos travaux ont notamment porté sur l'étude de l'expression de l'HGF/SF, des intégrines et des protéases de la matrice extracellulaire par nos différentes sous-lignées de cellules MMT (article 1).

Suite à l'observation d'une modulation par Ets-1 de la croissance des cellules cancéreuses mammaires dans les modèles de morphogenèse en gels matriciels, une deuxième partie de mon travail a visé à comprendre ce phénomène et son impact potentiel sur le processus de tumorigenèse (article 2). Pour cela, des tests de croissance en agar et d'injection des cellules en sous-cutané en souris nude ont été réalisés. De tels modèles m'ont permis de confirmer la pertinence physiologique de nos observations sur l'invasion et la croissance. L'impact d'Ets-1 sur la croissance des métastases pulmonaires induites suite à l'injection intraveineuse des cellules MMT dans les souris nude a également été évalué.

Enfin, nous avons porté une attention particulière à mettre au point des modèles de co-culture entre cellules cancéreuses et cellules endothéliales, pour évaluer si la surexpression d'Ets-1 dans les premières pouvait influencer sur le dialogue entre ces deux partenaires (article 3). J'ai ainsi étudié les caractéristiques de prolifération, de migration, de morphogenèse, de chimioattraction, et d'adhérence entre ces deux types cellulaires. Finalement, nous avons cherché à étudier l'impact de la surexpression d'Ets-1 dans les cellules cancéreuses mammaires sur le caractère angiogénique des tumeurs primaires évoquées ci-dessus.

# RESULTATS

## Démarche initiale

A l'origine, le laboratoire de Biologie du Développement, que j'ai intégré au cours de mon année de DEA étudiait le rôle des facteurs de croissance lors de l'embryogenèse puis lors du développement cancéreux. Au cours de ces travaux l'attention du Pr Xavier DESBIENS s'était portée notamment sur le facteur de transcription Ets-1. Ce proto-oncogène, dont l'expression peut être induite par divers facteurs de croissance *in vitro*, est exprimé par les cellules stromales, puis par les cellules épithéliales, lors des interactions épithélium-mésenchyme dans le développement embryonnaire. Sa surexpression a été décrite et associée à un mauvais pronostic vital dans différents types de cancers, dont ceux du sein.

A mon arrivée dans ce laboratoire, mes travaux se sont orientés sur les conséquences de cette surexpression de Ets-1 dans les cancers du sein. Des premiers résultats avaient été obtenus quelques années auparavant, indiquant qu'un dominant négatif des facteurs ETS pouvait bloquer l'expression de la Sérine protéase uPA et freiner l'invasion de cellules cancéreuses mammaires murines, les cellules MMT (Mouse Mammary Tumor), entre deux couches de collagène (Delannoy-Courdent et al., 1998). Ce dominant négatif est composé du domaine de liaison à l'ADN d'Ets-1, ou DB pour DNA Binding domain. Ce domaine étant fort conservé entre les facteurs de transcription de la famille ETS, cet outil va potentiellement interférer avec les autres membres de la famille exprimés. Pour mieux comprendre le rôle d'Ets-1 spécifiquement, et comme l'expression d'Ets-1 était modérée dans ces cellules cancéreuses cultivées *in vitro*, nous avons choisi de surexprimer Ets-1 en parallèle dans une autre sous-lignée de cellules MMT. L'expression d'Ets-1 dans les cancers du sein n'est pas liée à une amplification ou une translocation du gène, mais semble être induite par l'environnement. L'expression d'Ets-1 par les cellules cancéreuses en culture est relativement modérée, mais peut être obtenue par l'addition de facteurs de croissance. Toutefois, pour étudier spécifiquement les effets de la surexpression d'Ets-1 sur l'invasion, et ultérieurement son rôle dans l'angiogenèse par des systèmes de co-culture, sans avoir le problème de l'effet angiogénique de ces facteurs de croissance, nous avons choisi d'infecter les cellules par une construction permettant la surexpression d'Ets-1.

Mon projet de thèse a consisté à étudier l'influence du facteur de transcription Ets-1 sur les capacités invasives et angiogéniques de ces cellules cancéreuses mammaires, afin de mieux comprendre comment la surexpression d'Ets-1 dans les cancers du sein pouvait favoriser leur progression.

# 1. Ets-1, chef d'orchestre de l'invasion

## 1.1. Introduction

Je me suis dans un premier temps attaché à décrire les effets de la surexpression d'Ets-1 ou de son dominant négatif sur les capacités invasives des cellules MMT, et à caractériser les mécanismes moléculaires en lien avec l'invasion régulés par Ets-1.

Différents gènes-cibles potentiels des facteurs de transcription de la famille ETS en lien avec l'invasion sont décrits. Cependant, la plupart de ces gènes ont été identifiés par des systèmes artificiels d'analyse de promoteurs couplés à des gènes rapporteurs, et parfois même uniquement par la présence de sites EBS (ETS Binding Sites) dans ces promoteurs. De plus, de nombreuses études ont conclu à la « versatilité » des facteurs de cette famille, à savoir que leur effet sur un même promoteur peut varier selon le type cellulaire étudié (Lelievre et al., 2002), ou son état de différenciation (Kopp et al., 2004). Il s'agissait donc de définir les cibles de Ets-1 dans les cellules mammaires cancéreuses, et de comprendre l'influence de cette régulation sur leur caractère invasif.

J'ai pour cela combiné des analyses phénotypiques à des études de l'expression de molécules candidates, au niveau transcriptionnel et protéique. Je me suis particulièrement intéressé aux mécanismes de dissociation intercellulaire, d'adhérence à la matrice extra-cellulaire et de digestion de celle-ci, autant d'événements dérégulés lors des premières étapes de progression des cancers vers des formes invasives.

Après avoir confirmé le rôle d'Ets-1 dans la dispersion des cellules cancéreuses sur plastique, nous avons étudié son impact sur la morphogenèse des cellules leur invasion dans des modèles plus pertinents de culture tri-dimensionnelle en gels de matrice extracellulaire.

## 1.2. Résultats

L'essentiel de ces travaux a fait l'objet d'un manuscrit récemment accepté pour publication dans le Journal of Cellular Physiology, intitulé *Ets-1 triggers and orchestrates aggressive phenotype of mammary cancer cells within their matrix environment*, et présenté ci-après.

**Ets-1 triggers and orchestrates the malignant  
phenotype of mammary cancer cells  
within their matrix environment**

Authors :

**Alessandro FURLAN<sup>1</sup>, Chantal VERCAMER<sup>1</sup>, Xavier DESBIENS<sup>1</sup>, and Albin  
POURTIER<sup>1,2</sup>.**

Address :

<sup>1</sup>: UMR-8161 « Institut de Biologie de Lille », CNRS/ Université de Lille-1/ Université de  
Lille-2/ Institut Pasteur de Lille, BP 447, F-59021 Lille CEDEX, France.

<sup>2</sup>: Corresponding author;

tel: (33) 3 20 87 11 02; fax: (33) 3 20 87 11 11; [albin.pourtier@ibl.fr](mailto:albin.pourtier@ibl.fr)

Running head: Ets-1-orchestrates malignancy of tumor cells

Key words: mammary cancer; Ets-1 control; invasion; matrix proteinases, integrin shift.

Total N° of figures: 7

Grants:

Association pour le Recherche contre le Cancer (ARC); N°13584 and Ligue Nationale  
Contre le Cancer ; N°24665a, to Albin Pourtier. Ligue Nationale Contre le Cancer; N°03768  
to X. Desbiens. French ministry for research; fellowship N°8920-2003 and Ligue Nationale  
Contre le Cancer fellowship N° 940/1015/R6DIV to A. Furlan.

## ABSTRACT

Acquisition of invasive characteristics is a hallmark of breast carcinoma progression. During this phenomenon, Ets-1 transcription factor overexpression is induced and associated with breast cancer invasiveness, and poor prognosis. We hypothesized that Ets-1 transcription factor could be the orchestrator of a genetic program inducing the expression of genes necessary for cell motility, as postulated by the Tumor Microenvironment Invasion Model. We aimed at elucidating the role of Ets-1 in the molecular control of mammary cancer cell invasion and aggressiveness within their matrix environment. To that purpose, murine mammary tumour MMT epithelial cells were engineered to stably overexpress Ets-1, or the dominant negative Ets-1 DNA Binding domain.

The biological function of Ets-1 was assessed in three-dimensional extracellular matrix systems recreating a microenvironmental architecture resembling *in vivo* geometric constraints. Ets-1 overexpression provided MMT cells with a motile and invasive phenotype, leading to cell scattering, and impairing multicellular organization in matrix-mimicking gels. We evidenced that Ets-1 promoted HGF/SF activation, and the expression of its receptor, c-Met. Ets-1 also orchestrated switches in integrin expression pattern, towards a pro-migratory and malignant phenotype. Moreover, Ets-1 concomitantly triggered matrix metalloproteinases expression and activation, thus contributing to cell scattering. Functional relevance of these observations was confirmed with blocking antibodies or MMP inhibitors.

Our data highlight a critical role for Ets-1 in the orchestration of a network of molecular and phenotypic events, converging to enhance malignant features and invasion by mammary cancer cells of their environment. Ets-1 overexpression hence appears as a probable key step for breast cancer progression.

## INTRODUCTION

Normal mammary gland epithelial tree development involves cell movement through extracellular matrix and highly controlled cell-to-cell communication determining cell fate. Cohesive epithelial cells can dissociate and migrate during transitory “epithelial-mesenchymal transitions (EMT)”. Transcription factors are key regulators of these physiological processes, leading to the expression of the appropriate genetic programs.

ETS genes encode a family of transcription factors associated with the regulation of various biological functions. The Ets-1 proto-oncogene (Leprince et al., 1983) is expressed by stromal cells and epithelial cells within the normal mammary gland development during inductive epithelium-mesenchyme interactions. Ets-1 is expressed by normal mammary epithelial cells in terminal end buds during branching morphogenesis, i.e. when cells migrate and invade the parenchyma (Delannoy-Courdent et al., 1996). Ets-1 expression also correlates with invasive processes during tumor development. Ets-1 overexpression in breast tumors was not correlated with any gene amplification, but is rather a result of inductive interactions between epithelial and mesenchymal compartments (Delannoy-Courdent et al., 1996). Ets-1 overexpression in breast cancer was first described in the stroma, within endothelial cells and fibroblasts. However, more recent data revealed intense staining for Ets-1 in tumor cells of invasive breast carcinomas (Katayama et al., 2005). Ets-1 expression moreover proved to be an independent prognostic factor for relapse-free survival in breast cancers (Span et al., 2002). Nonetheless molecular events underlying this observation are imprecisely understood, and need further description.

According to the tumor microenvironment invasion model (TMIM), tumor invasion is comparable with morphogenetic programs elicited during embryogenesis (Condeelis et al., 2005), and would thus be linked with the transient expression of genes necessary for cell motility and intercellular reorganization. Ets-1 transcription factor is a proto-oncogene expressed during invasive processes of both normal breast development and tumor progression, and could thus be a crucial regulator of these genetic programs. ETS Binding Sites contain a purine-rich core sequence, GGAA/T, found in the promoter/enhancer regions of multiple target genes. Although studies have led to a better understanding of the structural properties of Ets-1, its role in biological processes is still poorly understood. Potential ETS target genes include molecules involved in cell migration, such as matrix proteinases and cell-to-matrix or cell-to-cell adhesion molecules. However most target genes have been identified through studies focused on promoter analysis, which were realized in diverse cell types. Strikingly, cellular context can modify the effect of ETS factors upon the activity of a same promoter. Indeed, Ets-1 induces Fli-1 expression in endothelial cells but not in fibroblasts. This functional versatility is linked to their interactions with other proteins to regulate transcription (for review, see (Sementchenko and Watson, 2000)).

Understanding of Ets-1 involvement in mammary tumorigenesis thus required a more detailed study of molecular events regulated by Ets-1 in mammary carcinoma cells.

Breast carcinoma progression and aggressiveness are associated with extracellular matrix digestion, invasion and modification of cell-cell and cell-matrix interactions. It appeared crucial for us to define more precisely the role of Ets-1 in these various features of mammary carcinoma development.

To address this issue, we stably expressed an Ets-1 dominant negative mutant or, in parallel, overexpressed Ets-1, in murine mammary tumor MMT cells. Cell morphology and motility of these two cell sublines were dramatically modified in comparison with control cells, when cultured upon plastic. We further investigated Ets-1 role in invasive features of MMT cells within three-dimensional matrix gels. Previous studies have indeed demonstrated that such models more closely mimic the normal mammary gland environment and provide more relevant information, especially with regard to invasion. These models allowed us to show that Ets-1 was a key orchestrator of mammary cancer cell invasion within their matrix environment, through the coordinated regulation of a network of molecules controlling multiple malignant features.



## **MATERIALS AND METHODS**

### ***Cell culture***

Mouse Mammary Tumor epithelial cells (MMT, CCL-5, ATCC) were routinely cultured in DMEM (Biowhittaker) with penicillin, streptomycin, non essential amino acids, L-Glutamine and 10% fetal calf serum (Gibco). They were infected in parallel by supernatants from virus-producing GP+E86 cells transfected with MFG retroviral constructs, as outlined in Fig. 1a. MFG-Neo or MFG-ets1DB retroviral vectors have been previously described (Delannoy-Courdent et al., 1998). The MFG-ets1DB retroviral vector associates the mouse Ets1-DB (DNA Binding domain) sequence (amino acids 306-423) with IRES and neomycin resistance sequences. The control MFG-Neo vector only carries IRES and neo sequences. MFG Ets-1 vector contains hemagglutinin-tagged full length murine Ets-1 sequence upstream of the IRES and neomycin resistance sequences (Lelievre et al., 2000). Selection was carried out with 0.8 mg/ml G418 sulphate. Clone pools were characterized for constructs expression, and maintained under selection. Cultures were frequently reinitiated from deep-frozen stocks.

### ***Cell migration and invasion assays***

MMT cells were seeded onto the top of Transwell<sup>®</sup> cell culture inserts with 8.0µm pore size (Falcon), at a density of 25,000 cells per well (24-well format). Cells were stimulated to migrate across the filters by providing 5% fetal calf serum as a chemoattractant in the assay chambers beneath the inserts. After 24 hours incubation at 37°C, nonmigratory cells were removed from the top of the filter by scrapping, while cells that had migrated through the filter pores to the lower face of the inserts were fixed in paraformaldehyde, stained with Hoechst and counted. Data are expressed as means of four independent experiments ± SEs. Comparisons were made using the Mann and Whitney test. Results were considered statistically different when the *P* value was less than 0.05.

Cells were alternatively seeded upon Transwell<sup>®</sup> inserts coated with reconstituted Growth Factor Reduced basement membrane (Matrigel). After 24 hours incubation at 37°C, cells still on the top of the filters were removed by scrapping, then cells on the lower face of the inserts were fixed and stained in 0,1% crystal violet dissolved in 70° ethanol.

### ***Actin labeling***

MMT cell populations grown on plastic were fixed in 4% paraformaldehyde. Permeabilization was performed with 0.1% Triton X-100- 0.1% sodium citrate in PBS for 2 minutes on ice followed by 15 minutes at room temperature. Blocking was carried out in 2% Bovine Serum Albumin. Actin staining was performed with 0.1% phalloidin Alexa Fluor 546 (Molecular Probes). Cells were then photographed under fluorescence with a Nikon EclipseTE2000-6 inverted microscope.

### ***Agar aggregation assay***

Agar (Difco BiTek, 1.3 g/100 mL water) was mixed with an equal volume of MEM 2X (Sigma) and poured in 12-well plates. Cell aggregation test was performed by seeding 50,000 cells per well on agar gels. Cell clusters were photographed under a Leica DMIRB inverted microscope, 6 hours and 24 hours post-seeding.

### ***Three-dimensional culture***

Collagen gels were prepared by mixing on ice, 4 volumes of rat tail type-I collagen 4.5 mg/mL (Upstate), with 4 volumes of DMEM (Biowhittaker), 1 volume of sodium bicarbonate 22 g/L, and 1 volume of PBS. When mentioned, fibronectin (BD Biosciences) was added within the collagen solution at a final concentration of 20 µg/mL.

Alternatively, a composite substrate mixing collagen and Matrigels was prepared through the addition of 1 volume of ice-cold collagen solution described above, to 1 volume FCS-free DMEM, and 1 volume of Matrigel constituted half by Matrigel and half by Growth-Factor-Reduced Matrigel (Becton Dickinson).

A first layer of cell-free matrix was poured in 48-well plates and incubated for 30 minutes at 37°C to allow this basal layer to gel. A second layer containing 3,000 cells suspended in 200 µL of matrix per well was then deposited and incubated for 30 minutes at 37°C before culture medium was added.

When mentioned, cell suspensions were incubated for 30 minutes with blocking antibodies (final concentration of 5 µg/mL) against c-Met (AF527, RnD Systems) or β3 integrin (sc-19671-L, Santa Cruz Biotechnology, Inc.), prior to their mixing with the matrix solution.

Alternatively, GM6001 (Chemicon® International) dissolved in DMSO was added both to matrix solution and culture medium at a final concentration of 10 µM, and identical DMSO concentration was added for control conditions.

At the end of the experiment, cellular structures were stained with neutral red then fixed in paraformaldehyde. Pictures were taken with a Leica DMIRB inverted microscope.

### ***Cell adhesion***

Twelve-well plates were coated with 0.5 mg/mL type-I collagen (Upstate®) or 0.1 mg/mL fibronectin (BD Biosciences), or collagen + Matrigel mixture, as described in the previous paragraph. MMT cells were seeded at a density of 50,000 cells per well and incubated at 37°C. Pictures were taken every 10 minutes using the “Bioposition<sup>©</sup>” software from the “Centre Commun de Microscopie et d’Imagerie Cellulaire” (Lille-1 University). Mean time to get 50% spread cells was assessed. Results are means of three independent experiments ± SEs. Comparisons were made using the Mann and Whitney test. Results were considered statistically different when the *P* value was less than 0.05.

### ***Semi-quantitative RT-PCR***

RNAs from the different MMT cell sublines were extracted with Tri Reagent® (Euromedex). One µg of RNA was treated with DNase I (Fermentas). Reverse transcription was performed with iScript Reverse Transcriptase (Biorad). Polymerase Chain Reactions were carried out with Taq DNA polymerase (Fermentas). Primers were designed thanks to Primer 3 software (Whitehead Institute)

Primers sequences are : Ets-1, sense ATGAAGGCGCCGTCGATCTC, anti-sense CCACTCATGCAGAACTTCTGGAA; GAPDH, sense ATCACTGCCACCCAGAAGAC, anti-sense AGATCCACGACGCACACATT; MMP-2, sense AAGTTTCCGTTCCGCTTCCAG, anti-sense ACACCACACCTTGCCATCGTT; MMP-9, sense CTGTCCAGACCAAGGGTACAG, anti-sense GCTTAGAGCCACGACCATAACA; MT1-MMP, sense ACATCTGTGACGGGAACTTTG, anti-sense ATCCTTCCTTTCGTAGGCAGT; MMP-3, sense TGGAGATGCTCACTTTGACG, anti-sense ATGGAAACGGGACAAGTCTG; TIMP-2, sense AAAGCAGTGAGCGAGAAGGA, anti-sense TTCTTTCCTCCAACGTCCAG; β3, sense GACATCGAGCAGGTGAAAGAG, anti-sense ATATCAGGACCCTTGGGACAC.

### ***Western blot***

Cells were seeded at a density of  $3.10^6$  cells per 100mm Petri dish coated with collagen + Matrigel substrate. Twenty-four hours later, cells were rinsed twice in Phosphate Buffer Saline. Hypotonic buffer (0.5 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.1 mM EDTA pH7.7, adjusted to pH 7.0 with 0.5 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0.1 mM EDTA pH 5.1) was then added to cells for 10 minutes on ice. Cells were scrapped and lysates subjected to freeze-thaw lysis by four successive alternative dips in 37°C water and liquid nitrogen. These lysates were ultracentrifuged at 100,000 g for 45 minutes at 4°C. Pellets consisting of membrane-enriched fractions were resuspended in PBS and protein amounts measured according to Bradford method. Proteins were separated by PolyAcrylamide Gel Electrophoresis, then transferred to Nitrocellulose membranes. Blocking was performed with 5% non-fat dry milk in PBS Tween. Primary antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology Inc. for Ets-1 (sc-350), HGF/SF  $\alpha$ -chain (sc-7949),  $\beta$ 1 integrin (sc-6622),  $\beta$ 4 integrin (sc-6628), and from Affinity BioReagents™ for MMP-9 (OPA1-08094). Secondary peroxidase-conjugated antibodies were purchased from Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc. Peroxidase activity was recorded by chemoluminescent detection using ECL™ kit and Hyperfilm™ MP from Amersham Biosciences.

### ***Zymography***

Membrane-enriched fractions were analyzed for their gelatinolytic activities. Briefly, SDS-PAGE was performed under non-reducing conditions in 7.5% polyacrylamide gels containing 0.1% gelatin. Gels were then rinsed for 30 minutes in 10 mM Tris HCl / 2.5% Triton X-100 (pH8.0), and further incubated at 37°C for 20 hours in 50 mM Tris HCl, 0.5 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$  (pH 8.0) to restore gelatinases activity. Gels were stained in 0.25% Coomassie blue R250 and destained in 7% acetic acid plus 25% methanol. Gelatin degradation is detected by the appearance of translucent bands in the blue-stained gelatin background. Casein (0.25%) was alternatively substituted to gelatin to study MMP-3 activities. For gelatin reverse zymography, 5% of conditioned medium from MMT control cells was added to the activation bath. Metalloproteinases present in the conditioned medium homogeneously degraded the gelatin within the gel, except for zones where TIMP protected from digestion, appearing as dark blue bands.

## RESULTS

### **Ets-1 overexpression and Ets1-DB expression**

Retroviral infection was used to manipulate Ets-1 expression or activity within murine mammary tumoral cells (MMT). Three different MMT cell sublines were established from pooled clones, stably overexpressing Ets-1, an Ets-1-dominant negative mutant, or the control expression vector, respectively.

Ets-1 transcript levels in the engineered cell sublines were checked by semi-quantitative RT-PCR, using primers localized upstream of the Ets1 DNA binding domain. This region is common to endogenous Ets-1 and MFG-Ets1 construct while absent in control MFG-neo and dominant negative mutant MFG-ets1DB constructs (as schematized in Fig. 1a). Ets-1 transcript is clearly overexpressed in MMT Ets-1 cells, when compared to control MMT-neo and MMT ets1DB cells, both expressing endogenous Ets-1 transcripts at moderate levels (Fig. 1b). HA-tagged Ets-1 expression was verified at the protein level by immunoprecipitation and Western blotting. So was Ets-1 DB protein expression after <sup>35</sup>S labelling (Fig. 1c and d).

### **Ets-1 promotes individual migratory and invasive abilities of MMT cells.**

The daily observation of routine cultures highlighted strong differences between the morphologies of our different cell sublines (Fig. 2a). Indeed, control MMT cells formed a regular network, two days post-seeding on plastic. MMT ets1DB mutant cells rather gathered in cell groups, which later connected with each other (data not shown). On the contrary, Ets-1 overexpressing MMT cells tended to stay as individual scattering cells. Our cell sublines also displayed different cell shapes. Phalloidin staining (Fig. 2b) showed lamellipodia structures with oriented stress fibers at the edges of control MMT cells. Ets-1 overexpressing MMT cells developed multiple thin protrusions in various directions. Conversely, MMT ets1DB mutant cells possessed few but marked focal adhesions, structures classically associated with cell anchorage.

Modulation of cell scattering and cell actin cytoskeleton strongly suggested that Ets-1 regulated MMT cell migration. This hypothesis was supported by Transwell<sup>®</sup> assays. Indeed Ets-1 overexpression enhanced MMT cell migration, whereas expression of ets1DB mutant decreased it (Fig. 2c). This effect was even more marked when cells had to migrate through membranes coated with Growth Factor Reduced Matrigel. Representative fields of the lower faces of filters indicate that invasive potential of MMT cells is strongly enhanced following Ets-1 overexpression, and inversely reduced by ets1DB mutant expression, when compared with control cells (Fig. 2d).

### **Ets-1-overexpression impairs MMT cell association.**

The scattered phenotype of MMT Ets-1 cells also suggested that Ets-1 was associated with the control of cell-cell interactions. Such interactions are often lost during cancer progression, contributing to cell invasive abilities. As mentioned above, Ets-1 overexpression triggered individual cell scattering upon plastic (Fig 2a). When grown over confluence, control MMT cells overlapped, and MMT ets1DB cells developed even more compact cystic structures, whereas MMT Ets-1 cells failed to overlap and to form such structures (Fig. 3a).

In order to study intercellular interactions independently of cell anchorage to their substrate, MMT cells were seeded upon agar. Under these conditions, control MMT cells began to aggregate after 6 hours, to form larger cysts after 24 hours (Fig. 3b, left). In comparison, MMT Ets-1 cells only formed small aggregates, whereas MMT ets1DB cells formed larger ones (Fig. 3b, middle and right respectively), confirming that Ets-1 overexpression hindered MMT intercellular interactions and aggregation.

### **Ets-1 overexpression leads to a shift from morphogenesis to individual invasion within matrix gels.**

The different MMT sublines were then cultured in parallel within three-dimensional matrix-mimicking gels. Such models had indeed been shown to provide cells with a more appropriate microenvironment, yielding more relevant insight in the processes of cell morphogenesis and invasion.

Type-I collagen environment led control MMT cells to first form small cell groups, further growing and expanding all around (Fig. 4 upper panel) while MMT ets1DB cells displayed more compact clusters. In contrast, MMT Ets-1 cells rather scattered in the gel, without any cell cluster formation. Addition of fibronectin, a known substrate for cell motility, promoted cell dispersion of control and MMT ets1DB cells, while not affecting MMT Ets-1 cell scattering (Fig. 4 middle panel). Three-dimensional morphogenesis assays were also performed in gels mixing type-I collagen with Matrigel, more closely mimicking the mammary gland matrix environment surrounding epithelial cells. Both control MMT and MMT ets1DB cells formed branching tubules resembling normal tubular mammary epithelial organization (Fig. 4 lower row). In addition, ets1-DB expression favored the formation of cell cysts (white arrowheads), representative of increased intercellular interactions. On the contrary, MMT Ets-1 cells failed to form thick pseudo-tubules, but rather formed single cell cords, with some interspersed individual cells (black arrowheads).

### **Ets-1 promotes HGF/SF activation, and the overexpression of c-Met receptor, to trigger invasion in three-dimensional matrix**

HGF/SF (Hepatocyte Growth Factor / Scatter Factor), is associated with cancer cell motility and invasion. The signalling of HGF/SF and its receptor Met was described as critical for the shift from tubule formation to scattering and invasiveness of murine mammary adenocarcinoma cells. Interestingly, MMT cells produce HGF/SF, and Ets-1 overexpression promoted HGF/SF activation from its 90 kDa precursor form to a mature 50kDa form (Fig. 5a). In contrast, the dominant negative ets1DB expression almost abrogated HGF/SF activation. Moreover Ets-1 also stimulated the expression of c-Met, the HGF/SF receptor (Fig. 5b).

To define functional importance of this system for Ets-1-triggered MMT cell scattering and cord-like behaviour in three-dimensional assays, we used a blocking antibody directed against c-Met receptor (Fig. 5c). Blockade of c-Met strongly reduced invasive features of three-dimensional structures from the different cell sublines. Especially, invasion of MMT Ets-1 cells was almost abrogated.

### **Ets-1 orchestrates switches within integrin expression pattern, in favour of MMT cell invasion.**

In our models, Ets-1 regulates MMT cell invasion and morphogenesis within matrix gels. Such processes involve cell-to-matrix adhesion and matrix proteolysis. We tested the impact of Ets-1 on the expression of molecules associated to these mechanisms.

Routine cell culture highlighted strong differences between our cell sublines with regard to plating and spreading times. Cell adhesion speed on plastic was increased in MMT Ets-1 cells, and reduced in MMT ets1DB cells, when compared with control cells, as visualized 3 hours after seeding (Fig. 6a). Similar drastic differences in adhesion speeds were also recorded on type-I collagen and fibronectin, while they were attenuated on a coating mixing collagen and Matrigel (Fig. 6b). We investigated whether the modulation by Ets-1 of integrins expression could account for the modifications of cell adhesive properties. AlphaV $\beta$ 3 integrin is important for tumor cell migration upon fibronectin, and is associated with breast malignant progression. RT-PCR and Western blot experiments revealed that the  $\beta$ 3 subunit was up-regulated by Ets-1 and reduced by negative dominant ets1-DB (Fig. 6c and d). We also checked the expression of  $\beta$ 1 and  $\beta$ 4 integrin subunits, as they were respectively associated with aggressive and reverted phenotypes in mammary cells (Weaver et al., 1997). Western blotting showed that MMT Ets-1 cells expressed more  $\beta$ 1 integrin, and less  $\beta$ 4 integrin, than control cells, while MMT ets1DB cells displayed the opposite pattern of expression (Fig. 6d).

Functional importance of Ets-1-mediated  $\beta 3$  integrin overexpression for MMT cell invasion was assessed using a blocking antibody. Branching morphogenesis of control MMT cell and MMT ets1DB cells was reduced, while MMT Ets-1 cells developed more organized and cohesive tubular structures (Fig. 6e).

#### **Ets-1 triggers overexpression and activation of gelatinolytic activities in MMT cells.**

Cell migration is facilitated by the proteolytic degradation of ECM components. Matrix Metalloproteinases (MMPs) are key enzymes for cell invasion during normal and tumor development. They are also involved in three-dimensional morphogenesis. MMP-2 and -9 (respectively gelatinases A and B) are particularly associated with carcinoma invasive properties. MMPs are produced as latent forms, which are activated through the cleavage of their prodomains. MMP-2 can be recruited to the plasma membrane through its interaction with  $\alpha V\beta 3$  integrin (Brooks et al., 1996). MT1-MMP and TIMP-2 (Tissue Inhibitor of MetalloProteinases) were shown to be involved in MMP-2 activation, with an excess of TIMP-2 preventing MMP-2 activation ((Strongin et al., 1995), and Fig. 7a diagram). Semi-quantitative RT-PCR analyses showed that Ets-1 overexpression up-regulated MMP-2 and to a lesser extent MT1-MMP transcript levels, while it reduced TIMP-2 transcript level (Fig. 7a left). Ets1-DB mutant expression induced opposite effects. Analysis of proteolytic activities by gelatin zymography highlighted an increase in MMP-2 activity associated with Ets-1 overexpression (Fig. 7a right), while reverse zymography showed the parallel reduction of TIMP-2 activity.

In parallel to its recruitment to the plasma membrane by  $\beta 1$  or  $\beta 3$  integrins, MMP-9 activation was shown to require MMP-3 excess over TIMP-1 ((Toth et al., 2003), Fig. 7b diagram). Beside its stimulatory effect on MMP-9 and MMP-3 transcript levels (Fig. 7b left), Ets-1 overexpression promoted both increase in MMP-3 activity, as detected by casein zymography, and reduction in TIMP-1 protein level analyzed by reverse zymography (Fig. 7b right). Western blotting of cell lysates showed increased MMP-9 activation within MMT Ets-1 cells compared to control cells, while MMT ets1DB cells could not complete full MMP-9 activation, displaying only latent and intermediary active forms (Fig. 7b right).

In order to investigate MMPs importance for Ets-1-triggered MMT cell invasion, the MMP inhibitor GM 6001 was added to ECM-mimicking gels. Under these conditions, control and MMT ets1DB cells failed to develop pseudo-tubules, and rather remained as cell clusters (Fig. 7c). Conversely, the individual scattering and invasive behaviour of MMT Ets-1 cells was partially reverted by MMPs inhibition, which led to the formation of pseudo-tubules rather than cell cords (Fig. 7c).



## DISCUSSION

Ets-1 transcription factor is overexpressed by invasive breast cancers, and associated with poor prognosis (Katayama et al., 2005; Span et al., 2002). Potential ETS target genes involved in invasion have been described, although mostly through promoter activity studies. Nevertheless, the function of ETS family members upon a same promoter can differ depending on the investigated cell type. It thus appeared crucial for us to elucidate the molecular events underlying this association between Ets-1 and breast cancer invasiveness and aggressiveness. This was investigated in three-dimensional matrix models, which are more relevant with regard to invasion. Ets-1 overexpression in breast cancer cells is not described to be related to its gene amplification. It is rather the result of inductive interactions between the tumor and the stroma. Ets-1 is expressed at moderate levels in various epithelial breast cancer cells, and that is why we had to overexpress it in MMT cancer cells. We hereby present interconnected molecular events orchestrated by Ets-1 transcription factor in mammary tumor cells, converging to promote cell invasion of their matrix environment.

The observation of routine MMT cell cultures on plastic, gave us the first clues about Ets-1 promotion of cell motility and scattering. This can be paralleled with previous observation of Ets-1 up-regulation during HGF-mediated MDCK scattering (Fafeur et al., 1997). Cell motility is closely linked to cytoskeleton organization. Cells that lack a fixed orientation are generally more sensitive to chemotactic signals, presumably because there is no intrinsic polarity to be overcome (Wang et al., 2002). Reduced motility of MMT ets1DB cells in Transwell assays, in response to serum signals, might be associated with their stronger focal adhesion observed with phalloidin staining. On the contrary, weak polarity of MMT Ets-1 cells could favour their motility towards these chemotactic signals. Ets-1 overexpression also markedly enhanced cell invasion through the matrix, suggesting that Ets-1 could also control cell interactions with the extracellular matrix. Our investigation of MMT cell behaviour in three-dimensional matrix gels indeed revealed strong discrepancies between our three cell sublines. Both type-I collagen and fibronectin accumulate in the stroma of neoplastic mammary tissue as a result of desmoplasia (for review, see (Lochter and Bissell, 1995)). Cell scattering within type-I collagen was tightly controlled by Ets-1. The addition of a pro-motile substrate, fibronectin, to type-I collagen gels enhanced control and MMT ets1DB cells scattering, while it did not affect already scattered MMT Ets-1 cells. Although the structures developed by control MMT cells in basal lamina-mimicking gels did not display growth arrest, they greatly resembled a normal branching morphogenetic program, confirming that restoring normal tissue structure to tumor cells can partially restore a pseudo-normal phenotype (Nelson and Bissell, 2005). Interestingly, Ets-1 overexpression hindered this phenotypic reversion, and rather promoted an

invasive and aggressive phenotype with individual cell scattering and thinner cell cords formation, when compared to control cells. This pattern of dissociated cells and Indian file cell arrangement is similar to that observed in some cases of invasive breast carcinomas. Conversely, cells expressing ets1-DB mutant, formed clusters within their arborescence, representative of greater cell-cell interactions and reduced invasiveness.

Hepatocyte Growth Factor / Scatter Factor (HGF/SF) is known to be secreted by stromal fibroblasts and to induce the scattering and invasion of several epithelial cells during normal morphogenesis. Nevertheless, it can also be detected in breast carcinoma epithelial cells (Tuck et al., 1996). We show hereby that Ets-1 overexpression greatly enhanced HGF/SF activation from its precursor form, while dominant negative ets1DB drastically reduced it. To our knowledge, this is the first evidence that Ets-1 promotes HGF/SF activation. Interestingly Ets-1 also coordinated the expression of c-Met, the HGF/SF receptor. Hence Ets-1 appears to favour HGF/SF signalling by triggering both HGF/SF activation and its receptor over-expression in MMT cells, in agreement with observed scattered phenotype of MMT Ets-1 cells, and strong inhibition of their invasion by a blocking anti-Met antibody. Previous studies had associated Met-HGF/SF signalling to the control of the balance between tubule formation and malignancy of murine mammary adenocarcinoma cells (Firon et al., 2000). Indeed, tubule formation implicates arrangement of cohesive cells for correct morphogenesis. HGF/SF and Met activities could impair the cell cohesion necessary for tubule formation, while promoting cord-like scattering or invasion. Our data highlight the role of Ets-1 overexpression in promoting malignancy through Met-HGF/SF-mediated motility in mammary cancer cells, which allows these cells to bypass the requirement of pro-migratory signals supplied by their environment (such as fibronectin), for invading it.

The ability to form three-dimensional tubules requires intercellular adhesion in order to form multicellular structures. The inability of MMT Ets-1 cells to develop organized structures is another clue of their aggressive behaviour. In agreement with our data from three-dimensional gels, cell culture over confluence on plastic, and aggregation tests upon agar, clearly demonstrated that Ets-1 overexpression was deleterious to cell-to-cell adhesion, while dominant negative ets1-DB expression favoured it. E-cadherin is the main epithelial homotypic intercellular adhesion molecule, and its expression or function can be modified in breast cancers (Knudsen and Wheelock, 2005). We however failed to detect full length 120 kDa E-cadherin by Western blotting in MMT cells, independently of Ets-1 status. Moreover, immunocytochemistry highlighted E-cadherin intracellular localization in our three sublines (data not shown), in agreement with their tumoral status. These data suggest that intercellular adhesion mechanisms occurring in MMT cells are E-cadherin-independent. Such

kind of mechanism is still poorly described, but might involve interactions integrins, mucins or tetraspanins (Shigeta et al., 2003).

Altered adhesion to extracellular matrix is often a key component of disease processes. Weaver et al. suggested that  $\beta 1$  and  $\beta 4$  integrin subunits allowed breast cells to sense their microenvironment and drive tissue organization. Beta1 integrin can be associated with several  $\alpha$  integrin subunits, (Ivaska and Heino, 2000) and its high expression in breast carcinomas predicts poor survival (Yao et al., 2007). In parallel,  $\beta 4$  integrin is a key component of hemidesmosome structures mediating adhesion to the basal lamina, and inhibition of  $\beta 4$  integrin drove the malignant conversion of normal mammary cells (Weaver et al., 1997). Interestingly, Ets-1 overexpression in MMT cells increased the expression of  $\beta 1$  integrin subunit, and concomitantly reduced the expression of  $\beta 4$  integrin subunit, thus orchestrating a switch to a malignant pattern of integrins expression.

Ets-1 overexpression speeded up MMT cell adhesion to type-I collagen and fibronectin, which are fibrillar substrates involved in cell motility. In correlation with this modulation of adhesive properties, we showed up-regulation by Ets-1 of the expression of  $\beta 1$  and  $\beta 3$  integrin subunits, which are involved in adhesion to these substrates (for review, see (Ivaska and Heino, 2000)). AlphaVbeta3 expression by tumor cells is associated with breast malignant progression, and  $\beta 3$  integrin was described to promote breast cancer cell migration (Rolli et al., 2003). Addition of a blocking antibody directed against  $\beta 3$  to three-dimensional matrix cultures reduced the expansion of control cell arborescence, and to a lesser extent that of MMT ets1DB cells. In parallel, it reduced MMT Ets1 scattering, rather promoting the formation of pseudo-tubular structures. So,  $\beta 3$  integrin up-regulation by Ets-1 in MMT cells appears to contribute to Ets-1-mediated enhanced scattering. Several MMPs are overexpressed in carcinomas and associated with enhanced invasive abilities (for review, see (Deryugina and Quigley, 2006)). Ets-1 transcription factor enhanced transcript levels of gelatinases MMP-2 and -9, membrane type MT1-MMP (MMP-14) and stromelysin-1 (MMP-3), enzymes associated with mammary cancer cell invasion. Another key control of MMPs activity is their activation from their latent forms, through cleavage of their pro-domain. It is mainly described at the cell surface, where soluble MMPs are recruited, notably through interactions with integrins, and activated by other MMPs (see diagrams in Fig.7). Beta3 integrin was described to cooperate with MMP-9 and promote its activation, to favour breast cancer cell migration (Rolli et al., 2003). AlphaV $\beta 3$  also binds MMP-2, thus promoting cell motility (Brooks et al., 1996). Beta1 integrin was also associated with mammary cancer cell invasion and MMP-9 activity (Morini et al., 2000). An excess of MMP-3 over TIMP-1 (Tissue Inhibitor of MetalloProteinases) is then necessary to get fully active MMP-9 (Ogata et al., 1995), while MMP-2 activation requires a complex with MT1-MMP and TIMP-2, with an

excess of TIMP-2 being unfavourable to this activation (Strongin et al., 1995). We report in this study concomitant regulation by Ets-1 of these various actors in a manner that favoured gelatinases activation, as could be eventually observed. It is worth noting that the abundance of latent MMP-2 in the serum used for cell culture precluded any chance to correctly assess latent MMP-2 produced by MMT cells. However Ets-1-mediated MMP-2 activation was clearly detected.

Mammary epithelial cells branching morphogenesis requires MMPs activity (Simian et al., 2001). Gelatinase activity in three-dimensional gels was assessed using quenched substrates, which revealed exacerbated activity in MMT Ets-1 cells and more restricted activity in MMT ets1DB cells, when compared to control cells (data not shown). Functional relevance of MMPs participation in the morphogenesis of our MMT cell sublines was assessed using GM6001, a broad-spectrum MMP inhibitor. Its addition to the tri-dimensional type-I collagen and Matrigel™ cultures prevented control cells and MMT ets1DB cells branching tubulogenesis. In presence of GM6001, control MMT cells and MMT ets1DB cells did not fulfil standard branching morphogenesis but rather remained as cell rounded clusters apparently unable to invade the matrix. In contrast, GM6001 addition led MMT Ets1 cells to develop as thicker pseudo-tubules with reduced individual cell scattering. This suggests that intense MMPs activity in MMT Ets1 cells was deleterious to tubule formation while, in presence of 10  $\mu$ M GM6001, MMPs activity reached a level in agreement with pseudo-tubular network formation. On the contrary, the intrinsic formation of cell clusters by MMT ets1DB cells might be associated with insufficient MMPs activity. Altogether these data suggest that Ets-1 control of MMP expression and activity plays a critical role in the promotion of mammary cancer cell invasion within surrounding extracellular matrix. One can not exclude that the inhibition of other ETS family members activity could partially account for some of the effects of the ets1-DB dominant negative mutant. Nevertheless, most of these latter effects were opposite to those of Ets-1 overexpression. Recent experiments using specific Ets-1 siRNAs paralleled the dominant negative mutant effect upon MMP-9 expression (data not shown). We now aim at improving RNA interference protocols for one-week lasting three-dimensional cultures.

In conclusion, we describe the coordination by Ets-1, of up- or down-regulation of an intricate net of effectors, to contribute to the multiple features of mammary cancer cell invasion within the surrounding matrix. Indeed, Ets-1 overexpression impairs cell association and pseudo-normal morphogenesis, while triggering their dissemination within their matrix environment. Transient changes in gene expression patterns that support invasion can result from the influence of the microenvironment. According to the Tumor Microenvironment Invasion Model (TMIM), tumor invasion is similar to a microenvironment-induced morphogenetic program

involving the expression of genes leading to cell motility (Condeelis et al., 2005). During breast morphogenesis, Ets-1 is expressed by normal mammary epithelial cells at the end of invading tips. In breast cancers, Ets-1 abnormal overexpression seems to be induced by tumor-stroma interactions. Ets-1 emerges as a potential effector of TMIM, orchestrating the invasive program leading to cancer cell dissemination. Ets-1 expression in mammary neoplastic cells contributes to tumorigenesis, in agreement with its description as a poor prognostic factor in breast cancer. A growing attention is paid to cancer cell invasion as a crucial pathway to target, in order to avoid cell dissemination and metastasis. Elucidation of the mechanisms triggered by Ets-1 in cancer cell migration could thus provide precious data for breast cancer therapy.

### ***ACKNOWLEDGEMENTS***

This work was supported by le Ministère de l'Éducation Nationale, de la Recherche et des Technologies and by grants from Association pour la Recherche contre le Cancer, Comité du Nord de la Ligue Nationale contre le Cancer and la Société Française du Cancer.

We are much grateful to Dr. Fabrice Soncin for retroviral constructs, Dr. Christian Slomianny for immunocytochemistry experiments, and Dr. Anne Chotteau-Lelièvre for generous MMP-2 primers gift. Gilles Courtand is acknowledged for his help using the “Bioposition<sup>®</sup>” software.

## ***Bibliography***

- Brooks PC, Stromblad S, Sanders LC, von Schalscha TL, Aimes RT, Stetler-Stevenson WG, Quigley JP, Cheresch DA. 1996. Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin alpha v beta 3. *Cell* 85(5):683-693.
- Condeelis J, Singer RH, Segall JE. 2005. The great escape: when cancer cells hijack the genes for chemotaxis and motility. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21:695-718.
- Delannoy-Courdent A, Fauquette W, Dong-Le Bourhis XF, Boilly B, Vandebunder B, Desbiens X. 1996. Expression of c-ets-1 and uPA genes is associated with mammary epithelial cell tubulogenesis or neoplastic scattering. *Int J Dev Biol* 40(6):1097-1108.
- Delannoy-Courdent A, Mattot V, Fafeur V, Fauquette W, Pollet I, Calmels T, Vercamer C, Boilly B, Vandebunder B, Desbiens X. 1998. The expression of an Ets1 transcription factor lacking its activation domain decreases uPA proteolytic activity and cell motility, and impairs normal tubulogenesis and cancerous scattering in mammary epithelial cells. *J Cell Sci* 111 ( Pt 11):1521-1534.
- Deryugina EI, Quigley JP. 2006. Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 25(1):9-34.
- Fafeur V, Tulasne D, Queva C, Vercamer C, Dimster V, Mattot V, Stehelin D, Desbiens X, Vandebunder B. 1997. The ETS1 transcription factor is expressed during epithelial-mesenchymal transitions in the chick embryo and is activated in scatter factor-stimulated MDCK epithelial cells. *Cell Growth Differ* 8(6):655-665.
- Firon M, Shaharabany M, Altstock RT, Horev J, Abramovici A, Resau JH, Vande Woude GF, Tsarfaty I. 2000. Dominant negative Met reduces tumorigenicity-metastasis and increases tubule formation in mammary cells. *Oncogene* 19(20):2386-2397.
- Ivaska J, Heino J. 2000. Adhesion receptors and cell invasion: mechanisms of integrin-guided degradation of extracellular matrix. *Cell Mol Life Sci* 57(1):16-24.
- Katayama S, Nakayama T, Ito M, Naito S, Sekine I. 2005. Expression of the ets-1 proto-oncogene in human breast carcinoma: differential expression with histological grading and growth pattern. *Histol Histopathol* 20(1):119-126.
- Knudsen KA, Wheelock MJ. 2005. Cadherins and the mammary gland. *J Cell Biochem* 95(3):488-496.
- Lelievre E, Mattot V, Huber P, Vandebunder B, Soncin F. 2000. ETS1 lowers capillary endothelial cell density at confluence and induces the expression of VE-cadherin. *Oncogene* 19(20):2438-2446.
- Leprince D, Geronne A, Coll J, de Taisne C, Schneeberger A, Lagrou C, Stehelin D. 1983. A putative second cell-derived oncogene of the avian leukaemia retrovirus E26. *Nature* 306(5941):395-397.
- Lochter A, Bissell MJ. 1995. Involvement of extracellular matrix constituents in breast cancer. *Semin Cancer Biol* 6(3):165-173.
- Morini M, Mottolese M, Ferrari N, Ghiorzo F, Buglioni S, Mortarini R, Noonan DM, Natali PG, Albini A. 2000. The alpha 3 beta 1 integrin is associated with mammary carcinoma cell metastasis, invasion, and gelatinase B (MMP-9) activity. *Int J Cancer* 87(3):336-342.
- Nelson CM, Bissell MJ. 2005. Modeling dynamic reciprocity: engineering three-dimensional culture models of breast architecture, function, and neoplastic transformation. *Semin Cancer Biol* 15(5):342-352.
- Ogata Y, Itoh Y, Nagase H. 1995. Steps involved in activation of the pro-matrix metalloproteinase 9 (progelatinase B)-tissue inhibitor of metalloproteinases-1 complex

- by 4-aminophenylmercuric acetate and proteinases. *J Biol Chem* 270(31):18506-18511.
- Rolli M, Fransvea E, Pilch J, Saven A, Felding-Habermann B. 2003. Activated integrin  $\alpha$ v $\beta$ 3 cooperates with metalloproteinase MMP-9 in regulating migration of metastatic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(16):9482-9487.
- Sementchenko VI, Watson DK. 2000. Ets target genes: past, present and future. *Oncogene* 19(55):6533-6548.
- Shigeta M, Sanzen N, Ozawa M, Gu J, Hasegawa H, Sekiguchi K. 2003. CD151 regulates epithelial cell-cell adhesion through PKC- and Cdc42-dependent actin cytoskeletal reorganization. *J Cell Biol* 163(1):165-176.
- Simian M, Hirai Y, Navre M, Werb Z, Lochter A, Bissell MJ. 2001. The interplay of matrix metalloproteinases, morphogens and growth factors is necessary for branching of mammary epithelial cells. *Development* 128(16):3117-3131.
- Span PN, Manders P, Heuvel JJ, Thomas CM, Bosch RR, Beex LV, Sweep CG. 2002. Expression of the transcription factor Ets-1 is an independent prognostic marker for relapse-free survival in breast cancer. *Oncogene* 21(55):8506-8509.
- Strongin AY, Collier I, Bannikov G, Marmor BL, Grant GA, Goldberg GI. 1995. Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease. *J Biol Chem* 270(10):5331-5338.
- Toth M, Chvyrkova I, Bernardo MM, Hernandez-Barrantes S, Fridman R. 2003. Pro-MMP-9 activation by the MT1-MMP/MMP-2 axis and MMP-3: role of TIMP-2 and plasma membranes. *Biochem Biophys Res Commun* 308(2):386-395.
- Tuck AB, Park M, Sterns EE, Boag A, Elliott BE. 1996. Coexpression of hepatocyte growth factor and receptor (Met) in human breast carcinoma. *Am J Pathol* 148(1):225-232.
- Wang W, Wyckoff JB, Frohlich VC, Olynykov Y, Huttelmaier S, Zavadil J, Cermak L, Bottlinger EP, Singer RH, White JG, Segall JE, Condeelis JS. 2002. Single cell behavior in metastatic primary mammary tumors correlated with gene expression patterns revealed by molecular profiling. *Cancer Res* 62(21):6278-6288.
- Weaver VM, Petersen OW, Wang F, Larabell CA, Briand P, Damsky C, Bissell MJ. 1997. Reversion of the malignant phenotype of human breast cells in three-dimensional culture and in vivo by integrin blocking antibodies. *J Cell Biol* 137(1):231-245.
- Yao ES, Zhang H, Chen YY, Lee B, Chew K, Moore D, Park C. 2007. Increased  $\beta$ 1 integrin is associated with decreased survival in invasive breast cancer. *Cancer Res* 67(2):659-664.



## LEGENDS

### **Fig. 1 Expression of HA-tagged Ets-1, and ets1DB (DNA Binding Domain) constructs.**

*a.* Schematic representation of retroviral constructs used to infect MMT cells. *b.* Amplification by RT-PCR of endogenous and overexpressed Ets-1 transcripts in MMT cell sublines. Primers target a transcript region corresponding to Ets-1 N-terminal part (arrows in *a*), leading to a specific 305 bp fragment. GAPDH transcripts RT-PCR was used as a control. *c.* HA Western blotting revealed proper expression of 60 kDa HA-tagged Ets-1 protein (white arrowhead). *d.* Expression of the 13 kDa Ets1-DNA Binding domain, revealed by Western blotting after immunoprecipitation. This truncated form of Ets-1 is a dominant negative mutant (black arrowhead). Images from different parts of the same gel were gathered.

### **Fig. 2 Ets-1 favors MMT cell scattering and migration on plastic, and invasion through reconstituted basement membrane.**

*a.* Cell morphologies of the MMT cell sublines after a two-day culture on plastic dishes. Scale bar 100µm. *b.* The actin cytoskeleton of MMT cells was detected by labelled phalloidin staining. Scale bar 10µm. *c.* MMT cells were seeded upon Transwell® inserts, and allowed to migrate for 24 hours. Then cells that had migrated to the lower side of the filters were counted. Values are means of four experiments. \*  $P < 0.05$ . *d.* MMT cells were seeded upon Growth Factor - Reduced Matrigel coated Transwell® inserts. Invasive cells on the bottom of the filters were stained with crystal violet, and representative fields were photographed. *White arrowheads*, refringent pores ; *black arrowheads*, stained cells. Scale bar 100µm.

### **Fig. 3 Ets-1 prevents cell association on plastic and agar.**

*a.* Cell morphologies of the MMT cell sublines after one-week culture on plastic dishes. *b.* MMT cell sublines aggregation observed 6 hours (upper panel), and 24 hours (lower panel) after seeding upon agar gels. Scale bar 100µm.

### **Fig. 4 Ets-1 overexpression leads to a shift from morphogenesis to individual invasion within matrix gels.**

*Upper pictures:* The MMT cell sublines were seeded within type I collagen gels. *Middle pictures:* Fibronectin was added to type-I collagen gels. After three-day development, tri-dimensional cell architectures were recorded using an inverted microscope. *Lower pictures:* MMT cell branching morphogenesis after one-week development



in type-I collagen + Matrigel gels. Note individual scattering cells (black arrowheads) and thinner cord-like branches formed by MMT Ets-1 cells, and presence of cell clusters in MMT ets1DB network (white arrowheads). Scale bar 100  $\mu$ m.

**Fig. 5 Ets-1 promotes HGF/SF activation, and the overexpression of c-Met receptor.**

*a and b.* The MMT cell sublines were cultured on coatings mixing type-I collagen and Matrigel. *a.* Western blotting of cell lysates using an antibody raised against  $\alpha$ -chain of HGF/SF reveals Ets-1-mediated HGF/SF activation from the precursor 90kDa form to the mature 50 kDa form. *b.* HGF/SF receptor, c-Met, expression was also checked by Western blotting. *c.* MMT cell branching morphogenesis in type-I collagen + Matrigel gels, in presence of a blocking anti-Met antibody, or corresponding vehicle. Scale bar 50 $\mu$ m.

**Fig. 6 Ets-1 regulates MMT cell adhesion on several matrix substrates.**

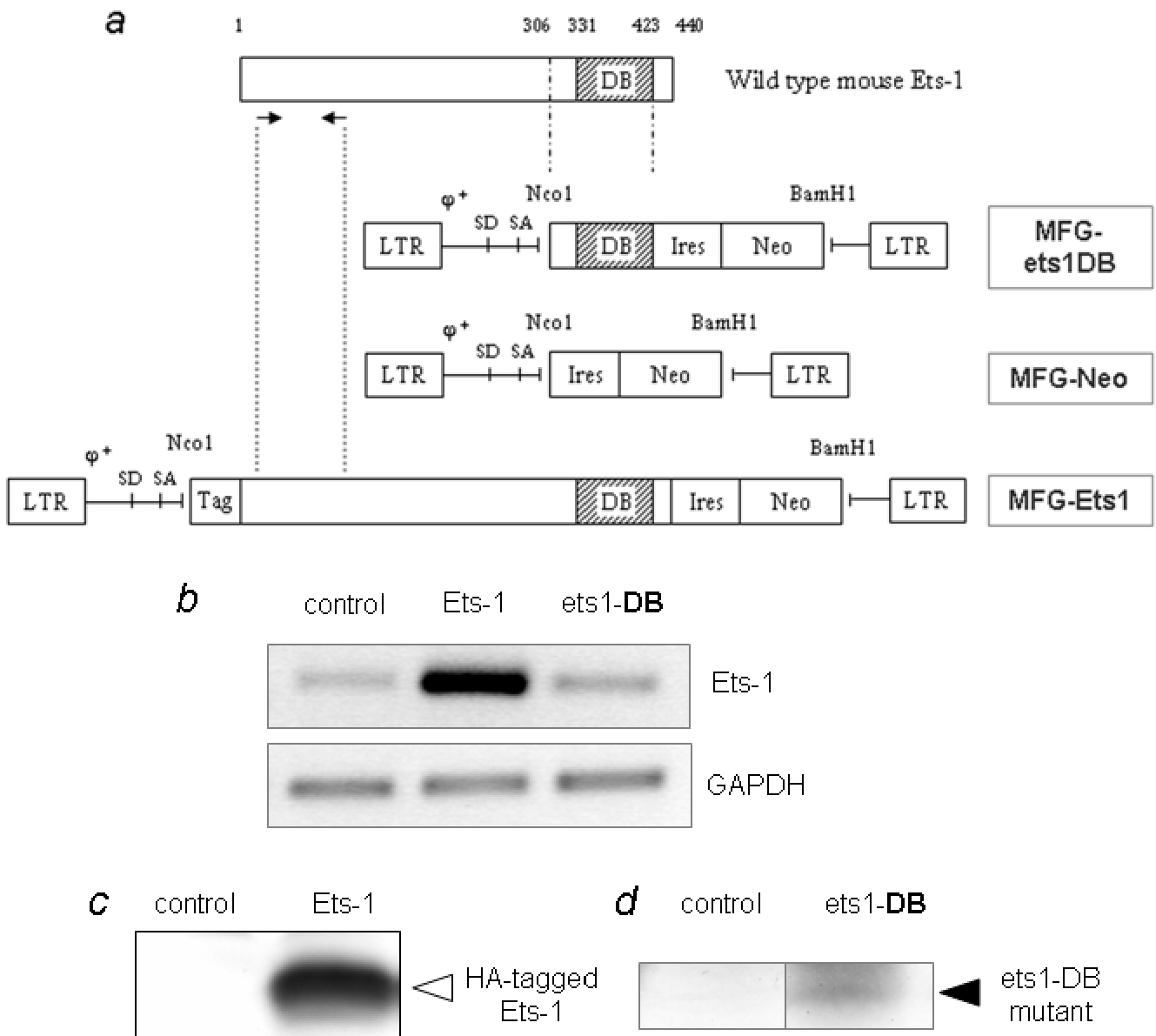
*a.* MMT cell spreading, photographed three hours after their seeding on plastic. *b.* Mean time to get 50% spread MMT cells on coatings of type-I collagen, fibronectin, or a mixture of collagen and Matrigel. \*  $P < 0.05$ .  
*c and d.* MMT cells were cultured for 24 hours on a mixture of type-I collagen and Matrigel. Beta 3 integrin subunit transcript levels were assessed by semi-quantitative RT-PCR analysis (*c*). Western blotting of cell membrane extracts was directed against  $\beta 3$ ,  $\beta 1$  and  $\beta 4$  integrin subunits, and GAPDH as a loading control (*d*).  
*e.* MMT cell branching morphogenesis in type-I collagen + Matrigel gels, in presence of a blocking antibody directed against  $\beta 3$  integrin subunit, or corresponding vehicle. Scale bar 50  $\mu$ m.

**Fig.7 Ets-1 triggers MMP expression and activation.**

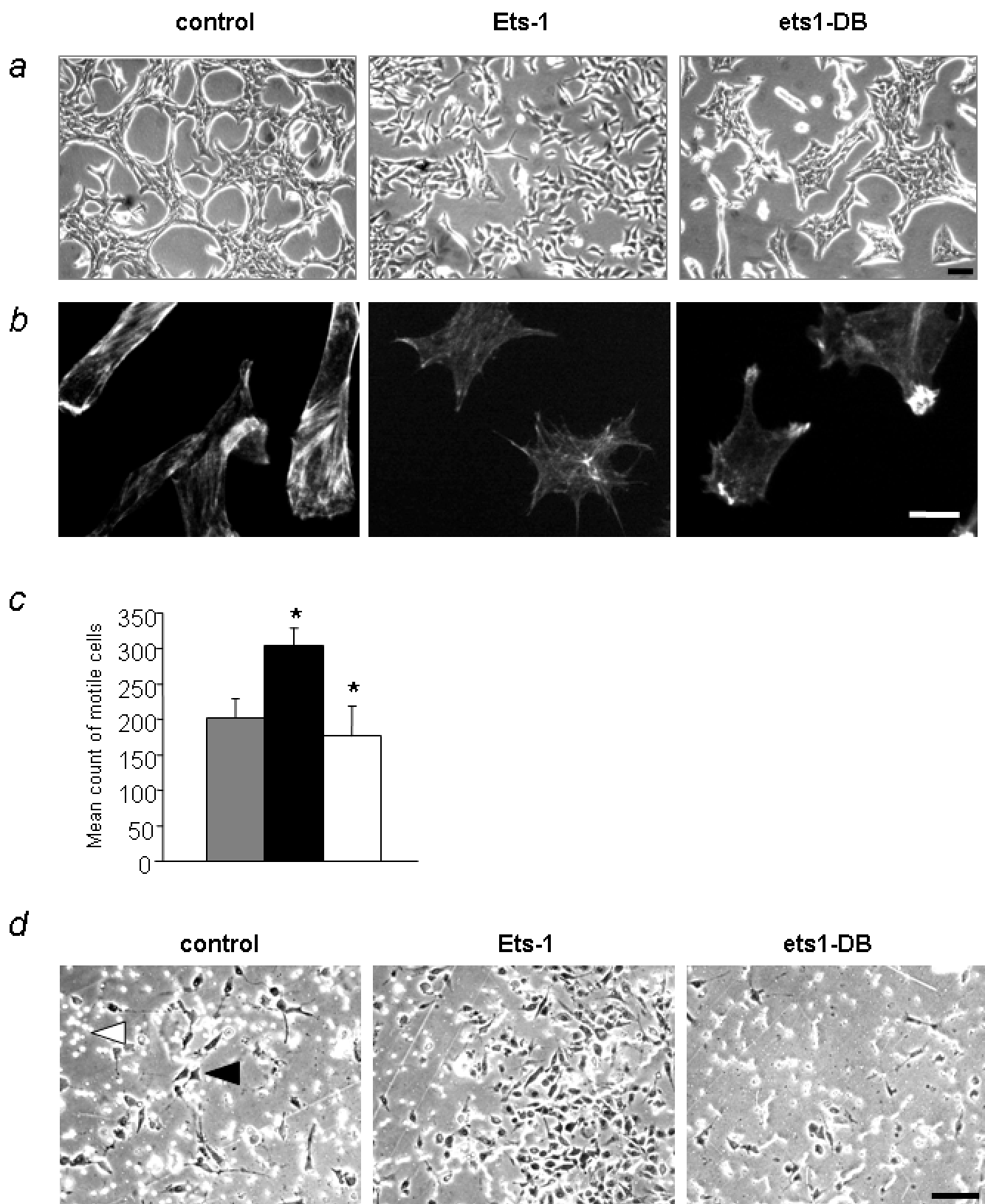
The MMT cell sublines were cultured for 24 hours upon a coating of type I collagen and Matrigel.

*a. left panel:* Semi-quantitative RT-PCR analysis of MMP-2, MT1-MMP and TIMP-2 transcript levels. *Right panel:* MMP-2 activity checked by gelatin zymography of cell membrane-enriched extracts. Grey and white arrows respectively point to latent (60 kDa) and active MMP-2 (55 kDa) forms. TIMP-2 activity was recorded through reverse-zymography, images from different parts of the same gel being presented. The inserted diagram depicts MMP-2 activation model described in the literature. *b. left panel:* Semi-quantitative RT-PCR analysis of MMP-9 and MMP-3. *right panel:* Casein zymography and reverse gelatine zymography of cell membrane-enriched extracts respectively revealed MMP-3 and TIMP-1 activities. MMP-9 Western blotting (lower item); black, striped and white arrowheads respectively correspond to latent (110 kDa), intermediary active (100 kDa)

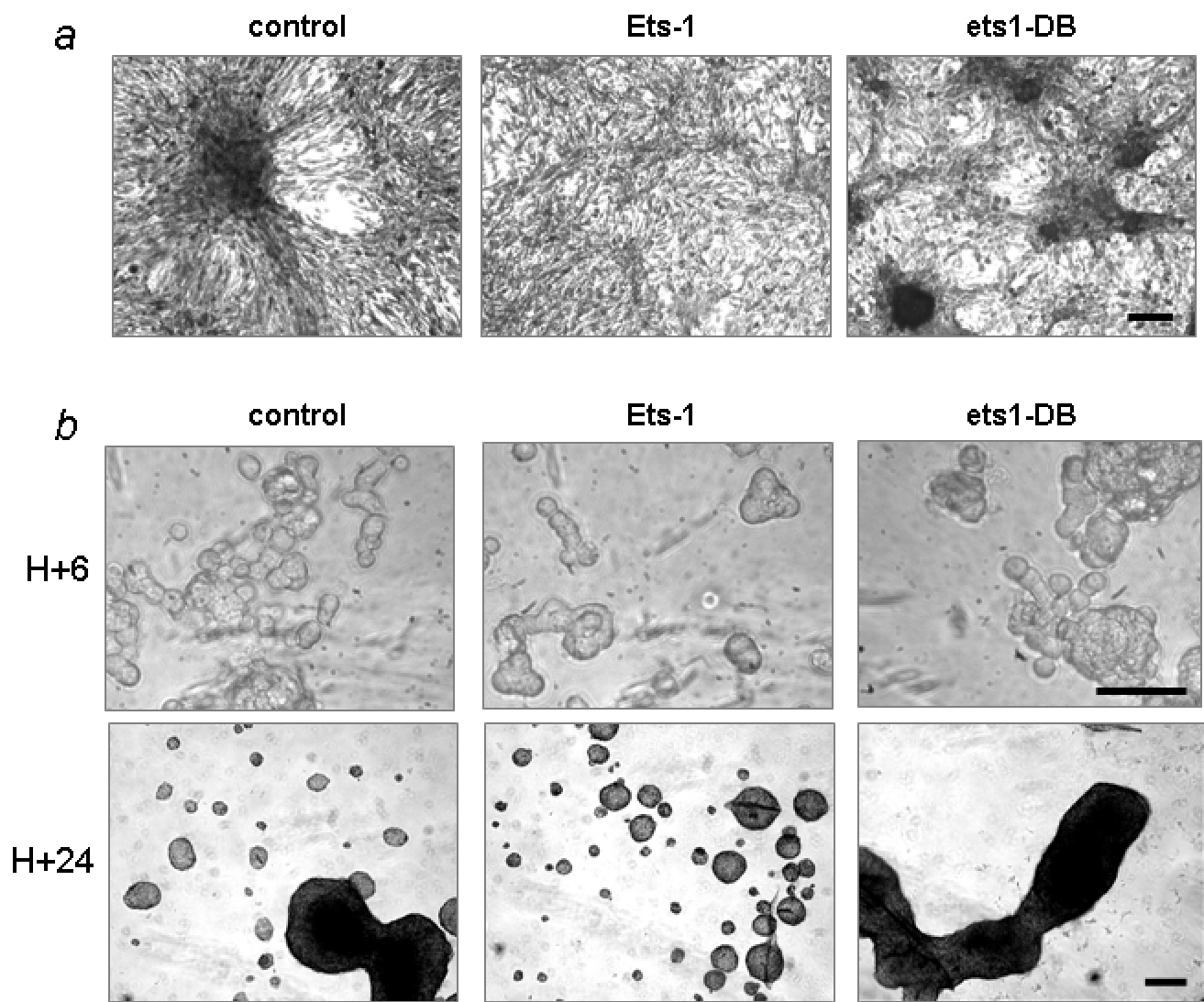
and fully active MMP-9 (85 kDa) forms. The inserted diagram depicts MMP-9 activation model described in the literature. *c.* Cells were cultured for a week in three-dimensional type-I collagen + Matrigel gels, in presence of 10  $\mu$ M GM6001 MMPs inhibitor or corresponding vehicle. Scale bar 50  $\mu$ m.



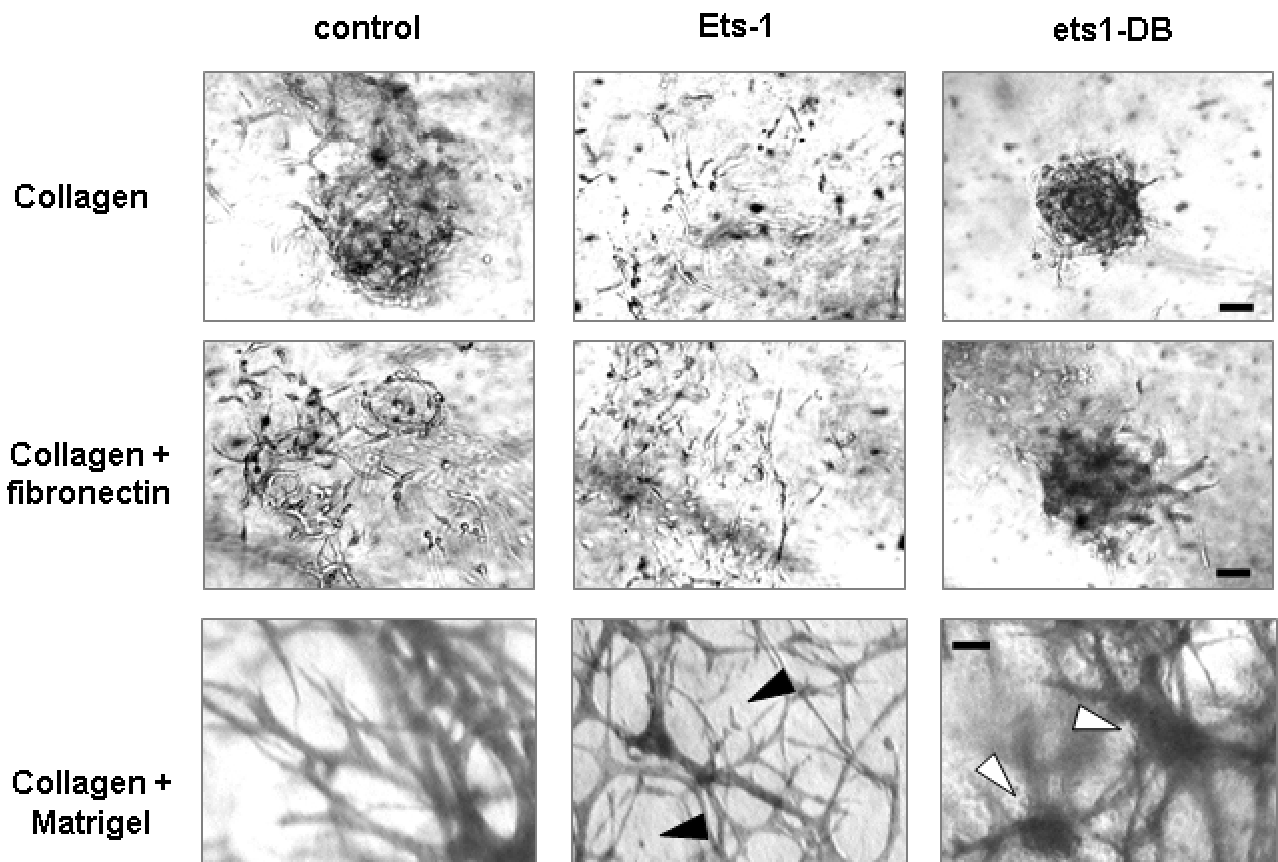
**FIGURE 1**



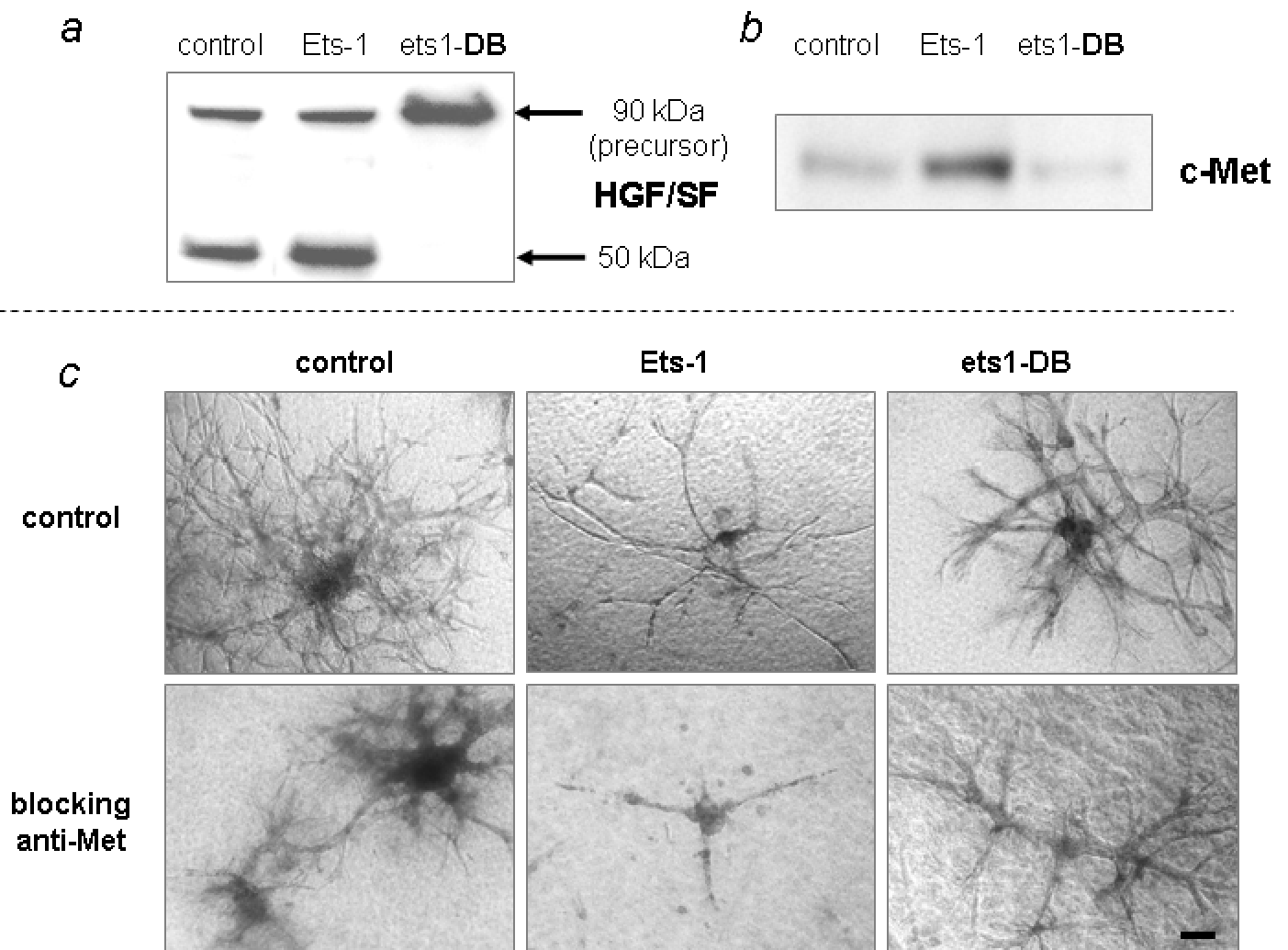
**FIGURE 2**



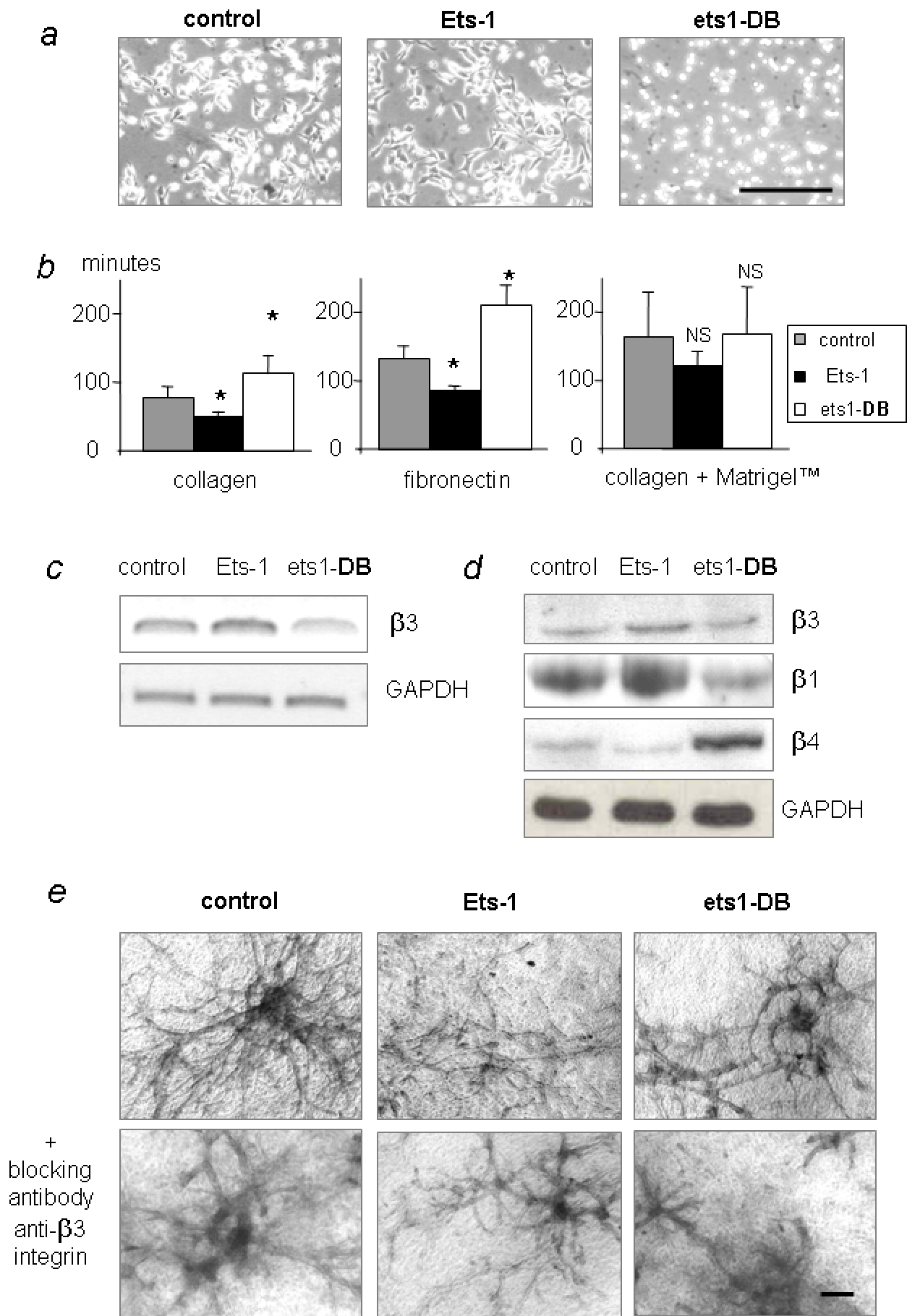
**FIGURE 3**



**FIGURE 4**



**FIGURE 5**



**FIGURE 6**



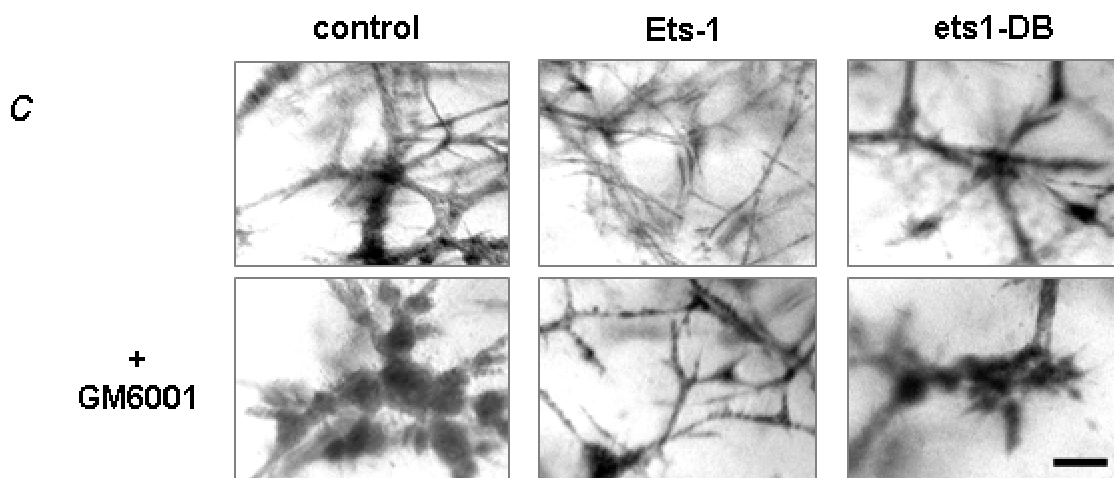
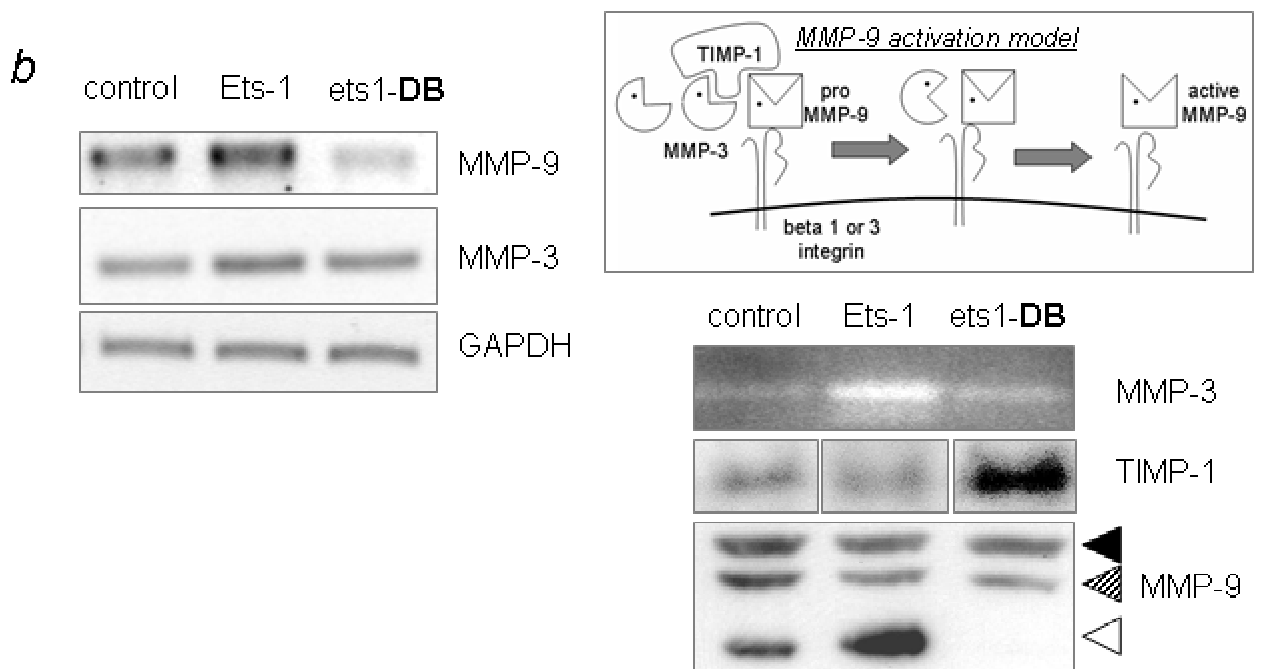
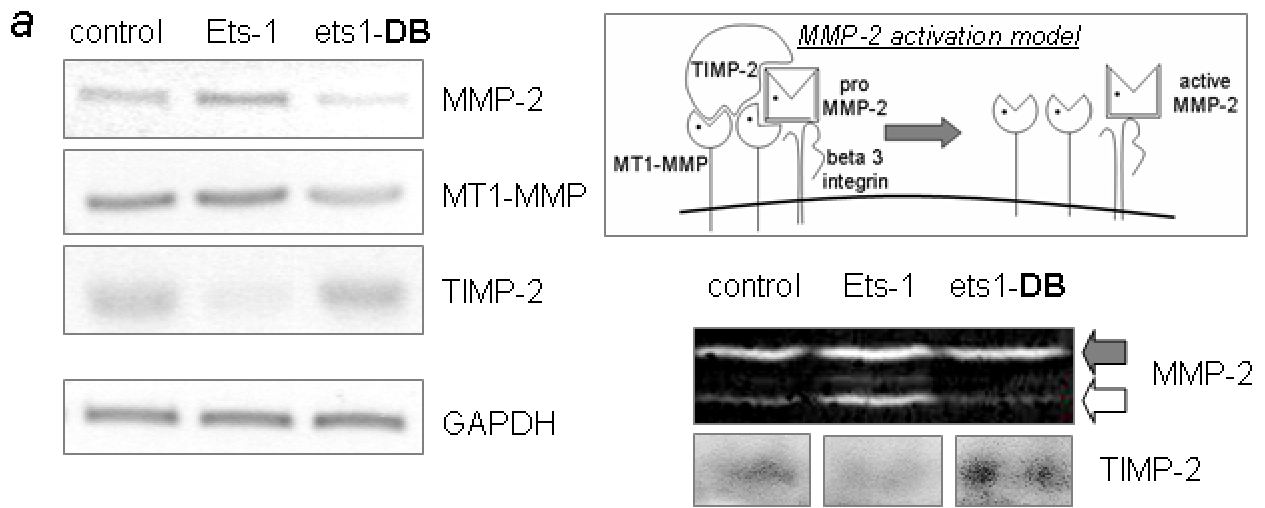


FIGURE 7

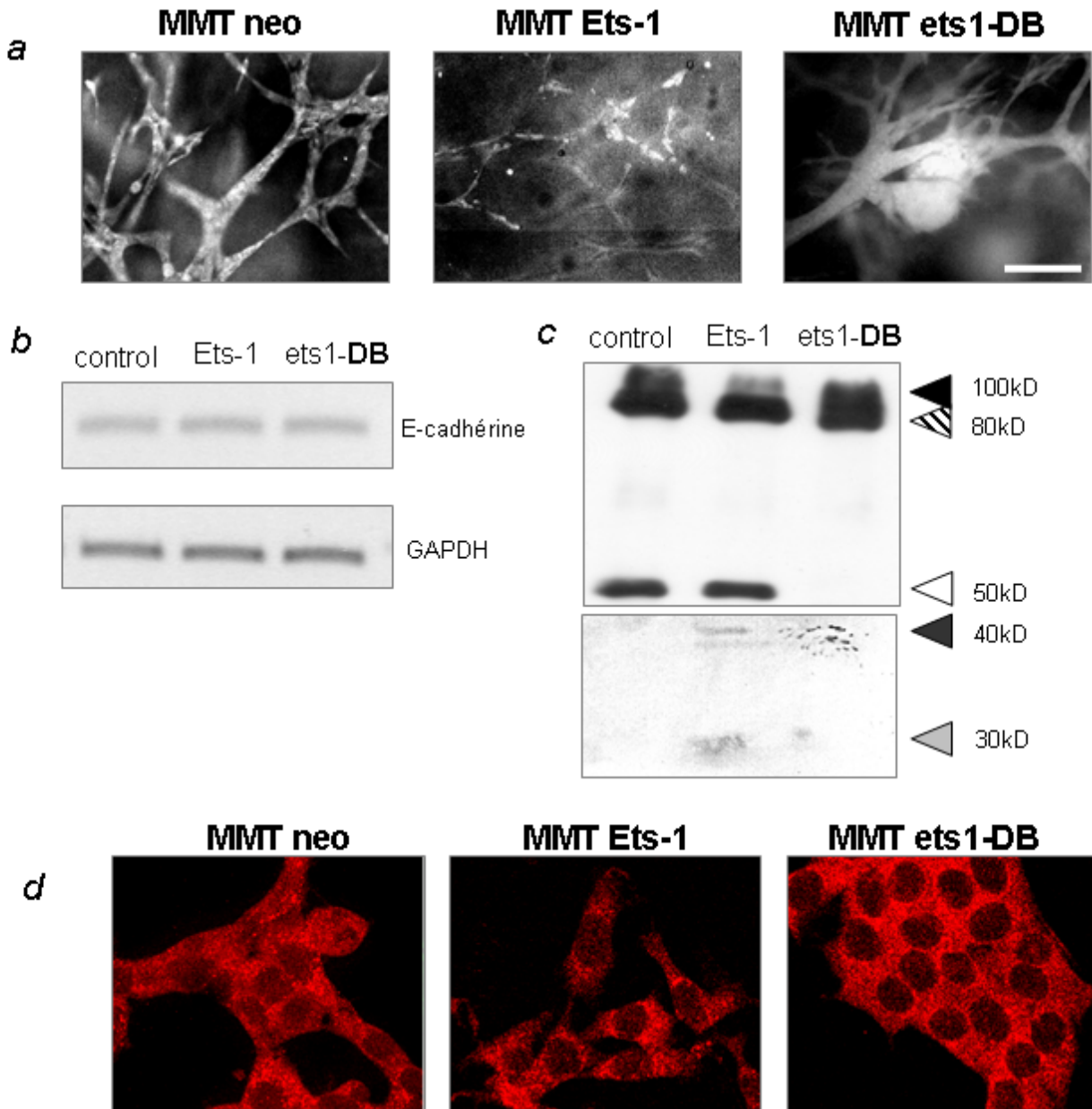
### **1.3. Résultats complémentaires : présentation et discussion**

#### **a) Ets-1 module les interactions intercellulaires des cellules MMT, et les clivages de la E-cadhérine.**

Au cours de cette première partie de mon travail, j'ai décrit une induction par Ets-1 de la dissociation des cellules MMT, sur plastique aussi bien qu'en gels de matrice extracellulaire. Nous avons observé dans ces gels de matrice une migration plus individualisée des cellules surexprimant Ets-1, comparativement aux pseudo-tubules formés par les cellules MMT neo ou MMT DB (cf fig. 4 à la p.25 de l'article 1).

L'observation des interactions cellulaires dans ces matrices a bénéficié du caractère autofluorescent du rouge neutre utilisé pour colorer les structures cellulaires. En effet, grâce à cette propriété, il nous a été possible d'analyser ces structures en réalisant des piles d'images par épifluorescence (logiciel NIS de Nikon®), que nous avons pu reconstruire en trois dimensions par déconvolution (logiciel Autoquant de Media Cybernetics®). Ces images de reconstruction nous ont permis d'obtenir une idée plus précise de l'agencement des cellules dans les gels tridimensionnels, grâce à une qualité d'image nettement supérieure. Nous avons ainsi pu observer notamment l'alignement des cellules MMT Ets-1 en fines chaînes de cellules peu cohésives, comparativement aux pseudo-tubules formés par la jonction des cellules contrôle MMT neo, tandis que les cellules MMT DB pouvaient développer des structures kystiques au sein de leur arborescence (Fig. 16a). Les mécanismes d'adhérence homophile mis en place classiquement entre les cellules épithéliales impliquent la E-cadhérine. Nous nous sommes donc intéressés à l'impact d'Ets-1 sur son expression, pour comprendre si cela influait sur les capacités de dissociation de nos différentes sous-lignées. Des expériences de RT-PCR semi-quantitative nous ont tout d'abord indiqué que l'expression d'Ets-1 n'influait pas sur le niveau de transcrits d'E-cadhérine dans les cellules MMT (Fig. 16b). Des données publiées précédemment avaient pourtant indiqué la présence d'un site EBS régulant de manière négative le promoteur de la E-cadhérine (Rodrigo et al., 1999). De la même manière que nous avons observé une modulation de l'activité de l'HGF/SF au niveau post-traductionnel, nous nous sommes demandés si de telles modifications ne pouvaient pas affecter la fonction de la E-cadhérine dans nos différentes sous-lignées. Par Western blot, nous n'avons malheureusement observé d'expression de la E-cadhérine sous sa forme de pleine longueur dans aucune de nos sous-lignées (Fig. 16c haut), suggérant que leurs mécanismes d'interactions impliquaient d'autres acteurs. Toutefois nous avons observé une quantité variable d'isoformes à 50, 80 et 100kDa dans nos sous-lignées, provenant probablement de clivages de la forme native.

De manière intéressante, l'expression du dominant négatif DB abroge l'apparition de la forme à 50kDa (Fig. 16c haut), ce qui peut être lié à un défaut de clivage. Etant donné que le clivage des E-cadhérines peut mener à l'accumulation de fragments solubles dans le milieu de culture, nous avons cherché à détecter la présence de tels fragments dans les milieux conditionnés. Nous avons observé la présence de fragments à 30 et 40kDa, uniquement dans les milieux conditionnés de cellules MMT Ets-1 (Fig. 16c bas).



**Figure 16. Ets-1 réduit les interactions intercellulaires des cellules MMT, et module les clivages de la E-cadhérine**

a. Les cellules MMT ont été cultivées pendant 5 jours dans des gels tridimensionnels de matrice. Après coloration au rouge neutre des cellules puis fixation au paraformaldéhyde, les structures cellulaires ont été observées par épifluorescence, grâce à l'autofluorescence du rouge neutre. Barre d'échelle 100µm. b. Etude de l'expression des transcrits de E-cadhérine par RT-PCR semi-quantitative; les transcrits de GAPDH servent de normalisateurs. c. Western blotting dirigée contre la E-cadhérine, réalisée sur des extraits membranaires de cellules MMT (partie supérieure) avec l'anticorps primaire sc-7870 commercialisé par Tebu-bio et un anticorps secondaire "anti-lapin" couplé à la peroxydase (Jackson ImmunoResearch). Western blotting dirigée contre la E-cadhérine, réalisée sur des milieux conditionnés des cellules MMT (partie inférieure), avec l'anticorps HECD1 commercialisé par Takara et un anticorps secondaire "anti-souris" couplé à la peroxydase (Jackson ImmunoResearch). d. Immunocytochimie dirigée contre la E-cadhérine, réalisée en plaque Labtek. Après fixation au paraformaldéhyde, perméabilisation en PBS 0,1% Triton 0,1% citrate de sodium et blocage en PBS 2%BSA, j'ai utilisé l'anticorps primaire sc-7870 et l'anticorps secondaire Alexa Fluor 488 (Molecular Probes), pour localiser la E-cadhérine dans les cellules MMT.

L'observation des fragments solubles de E-cadhérine a pu être faite grâce à l'anticorps monoclonal HECD-1, commercialisé par Takara et reconnaissant la partie extracellulaire de la E-cadhérine, et non par l'anticorps polyclonal sc-7870 de Santa Cruz Biotechnology, Inc. qui cible également la partie extracellulaire, mais au niveau de la partie juxtamembranaire. Il semble donc que ces fragments solubles correspondent à la partie extracellulaire terminale de la E-cadhérine.

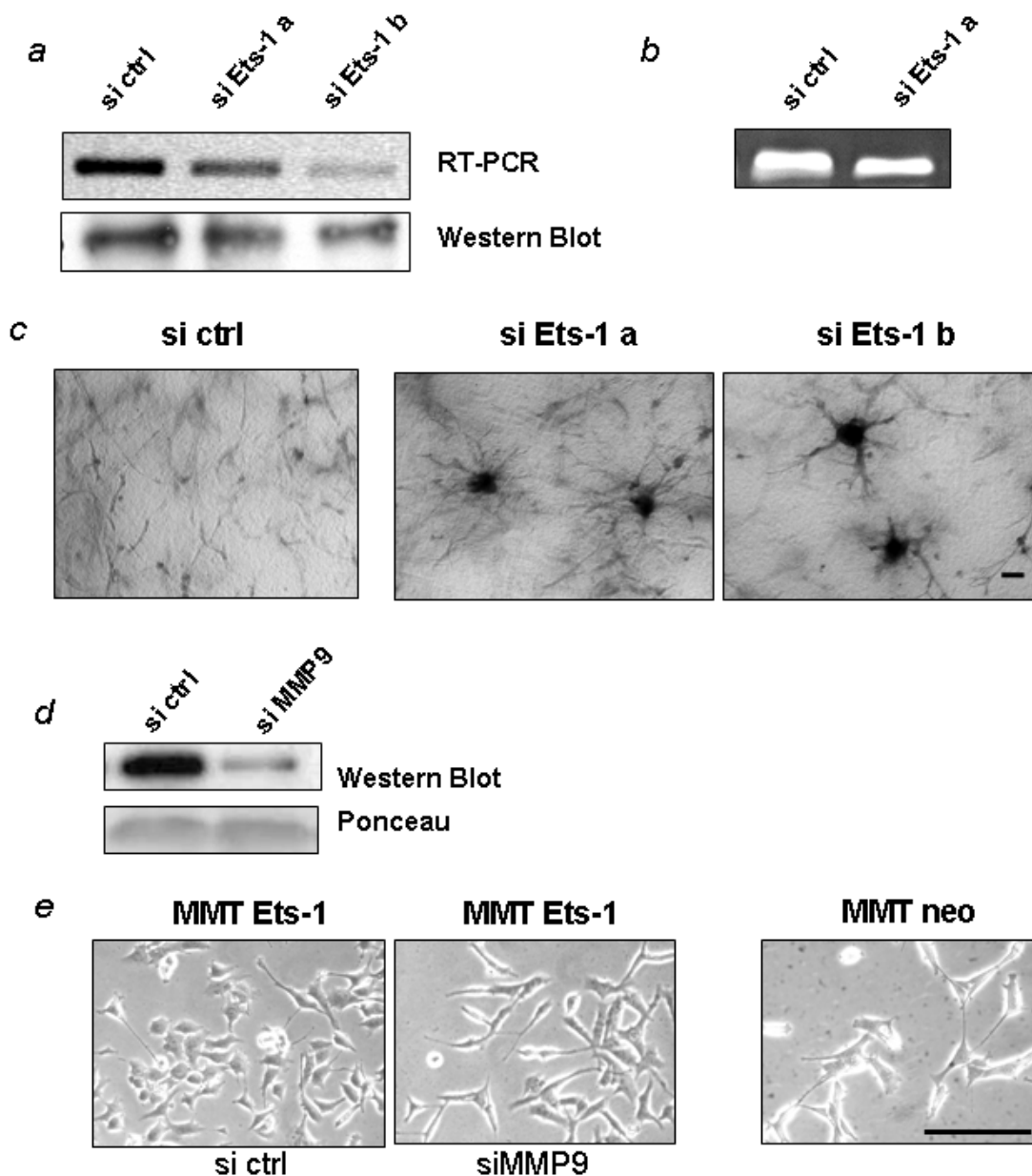
La taille de ces fragments ne correspond toutefois pas à celle habituellement décrite dans la littérature, à savoir 80kDa pour des cellules humaines. Il est possible qu'on ait affaire dans nos cellules murines à d'autres sites de clivage. Les clivages décrits dans les cellules cancéreuses humaines sont l'oeuvre de métalloprotéases matricielles, comme la MMP-3 et la MMP-7 (Noe et al., 2001). Nous avons décrit dans nos cellules MMT une induction par Ets-1 de l'expression de la MMP-3 (cf fig.7 à la p.28 de l'article 1), qui pourrait rendre compte d'un clivage de la E-cadhérine. Cette hypothèse reste toutefois à confirmer par l'utilisation d'inhibiteurs de MMPs, pour vérifier que ce sont bien ces enzymes qui sont responsables de la génération du fragment observé. Enfin, il faudrait vérifier que ce fragment possède effectivement une fonction biologique, ce qui pourrait être évalué par purification, clonage et expression de ce fragment dans des cellules ne l'exprimant pas initialement. Si cela s'avère, cela constituerait un mécanisme supplémentaire par lequel Ets-1 pourrait stimuler l'invasion.

En parallèle, nous avons cherché à localiser les fragments cellulaires de la E-cadhérine, et avons observé par immunocytochimie une localisation diffuse dans le cytoplasme de nos différentes sous-lignées MMT (Fig. 16d). Ceci suggère donc que les différentes sous-lignées de cellules MMT n'expriment pas de E-cadhérine fonctionnelle en terme d'adhérence homophile, tout du moins sur plastique, et que d'autres molécules servent de médiateurs des interactions entre les cellules MMT neo et MMT DB. Parmi les candidats pour de telles interactions figurent les tétraspanines et les intégrines, mais des interactions entre certains sucres de surface et les lectines correspondantes sont également concevables. D'autres molécules de la famille des cadhérines ont été également décrites plus récemment et seraient intéressantes à étudier, comme FAT1, qui joue un rôle dans les jonctions intercellulaires et la dynamique de l'actine (Tanoue and Takeichi, 2004).

Enfin, il est également possible que la culture des cellules dans des composés de membrane basale restaure une certaine différenciation chez celles-ci, comme on peut l'observer par la présence d'une morphogenèse de branchement pseudo-normale dans les cellules contrôle. Auquel cas, il est possible que la E-cadhérine soit correctement exprimée, localisée et fonctionnelle dans de telles structures. Nous vérifierons cette hypothèse par des expériences d'immunocytochimie sur des coupes de nos gels de culture en matrice.

## **b) L'interférence à l'ARN pour éteindre l'expression d'Ets-1 ou de la MMP-9**

Un des avantages et des inconvénients du mutant dominant négatif DB est sa capacité à interférer potentiellement avec les différents facteurs ETS exprimés de façon endogène dans les cellules. C'est pour cette raison que nous avons cherché à cibler Ets-1 de manière plus spécifique, par la méthode d'interférence à l'ARN. J'ai sélectionné pour cela des séquences selon les recommandations de la littérature (Reynolds et al., 2004), grâce au logiciel *siDESIGN*<sup>®</sup> de la société Dharmacon, et nous en avons commandé deux auprès d'Eurogentec S.A. Les séquences des brins sens de 5' à 3' de ces ARN double brin sont respectivement UCAUCACAGAGUCCUAUCA et UGUUACACCUCGGAUUACU. Les brins complémentaires hybridés d'ARN interférents furent transfectés dans les cellules contrôles MMT neo selon les recommandations du fournisseur à une concentration de 20nM, en utilisant comme agent de transfection le Jet si<sup>™</sup> commercialisé par Eurogentec. Après 24H, les cellules ont été lysées et les ARN, ainsi que les protéines, extraits selon les protocoles décrits dans l'article ci-joint (cf p.). On note une réduction des niveaux de transcrits et de protéines d'Ets-1 après transfection des ARN interférents ciblant Ets-1, en comparaison avec la transfection d'ARN interférents contrôle fournis par Eurogentec (Fig.17a). Nous avons également vérifié l'impact de ces manipulations sur l'expression d'une cible d'Ets-1 dans les cellules MMT, à savoir la MMP-9. Par zymographie en gélatine, nous avons observé une baisse de l'activité correspondant à la MMP-9 suite au ciblage d'Ets-1 par interférence à l'ARN (Fig.17b). Le degré d'extinction d'Ets-1 s'est révélé plutôt décevant au niveau protéique 24 heures après la transfection, mais aussi à 48 heures (données non montrées). Cette expérience a été renouvelée sans plus de réussite, même en utilisant des concentrations de 100nM d'ARN interférents. J'ai également essayé de transfecter les cellules deux fois consécutivement à 48 heures d'intervalle, dans le but d'obtenir un meilleur rendement (Belouzard and Rouille, 2006). Je n'ai malheureusement pas obtenu de meilleur rendement. Il est possible que les séquences utilisées soient peu efficaces bien qu'elles aient été choisies selon les recommandations de la littérature, mais il n'y avait malheureusement pas de séquence murine publiée à l'époque de leur préparation. Depuis, des séquences dirigées contre l'ARN murin d'Ets-1 ont été commercialisées par Santa Cruz BioTechnologies. Cependant, il existe à ce jour une seule publication de référence (Wai et al., 2006), et celle-ci ne montre aucun résultat quant au degré d'extinction d'Ets-1. De plus, les ARN interférents y ont été utilisés à des doses de 10µM, nettement supérieures à celles recommandées, et pouvant favoriser de potentiels effets « off-target » sur d'autres transcrits (Fedorov et al., 2006). En outre, bien qu'une attention particulière ait été portée à la conservation des différents produits, un certain degré de dégradation ne peut pas être exclu. Toutefois, lors d'expériences de culture tri-dimensionnelle en gels matriciels, il semble que l'interférence à l'ARN induise dans les cellules MMT transfectées par les siRNA Ets-1 (a et b) le développement de structures plus cohésives (Fig.17c). Cela rappelle le comportement des cellules MMT DB comparées aux cellules MMT neo (cf figure 4 à la p.25 de l'article 1). Ces données sont plutôt encourageantes mais leur exploitation demande une amélioration des protocoles d'interférence à l'ARN pour éteindre de façon plus importante l'expression d'Ets-1.



**Figure 17. L'interférence à l'ARN pour éteindre l'expression d'Ets-1 ou de la MMP-9.**

a. Les cellules MMT neo ont étéensemencées en plaque 6 puits à raison de 50.000 cellules par puits, et transfectées à l'aide de l'agent de transfection Jet si (Eurogentec) par 20nM de petits ARN interférents dirigés contre Ets-1 (si Ets-1 a et b) ou contrôle (si ctrl, référence OR-0030-NEG, Eurogentec). Les cellules ont été lysées et les ARN, de même que les protéines en parallèle, extraits 24H plus tard. Le niveau d'expression d'ARN et de protéines correspondant à Ets-1 a été évalué respectivement par RT-PCR semi-quantitative et Western blot. b. L'activité de la MMP-9, que nous avons identifiée comme cible d'Ets-1 dans les cellules MMT, a été étudiée par zymographie en gélatine des surnageants de culture. c. Les cellules MMT neo ayant subi deux transfections consécutives à 48 heures d'intervalle ont été décollées etensemencées dans des gels matriciels tridimensionnels. Leur morphogenèse a été évaluée après 7 jours de culture. d. Les cellules MMT Ets-1 ont été transfectées selon les modalités décrites ci-dessus par des ARN interférents dirigés contre la MMP-9 (si MMP-9) ou contrôle (si ctrl). Après 24 heures, les cellules ont été lysées et un Western blot dirigé contre la MMP-9 a été effectué. e. Morphologie des cellules MMT Ets-1 transfectées par les si ctrl ou les si MMP-9, comparativement aux cellules MMT neo non transfectées. Barres d'échelle 100µm.

En parallèle des approches pour éteindre l'expression d'Ets-1, j'ai mis en place une stratégie d'ARN interférence similaire pour réduire l'expression de la MMP-9 dans les cellules MMT surexprimant Ets-1. La séquence du brin sens de 5' à 3' de l'ARN double brin utilisé est UCCAACCGCUGCAUAAAUA. La réduction de l'expression de la MMP-9 suite à cette stratégie a été mise en évidence par Western blot (Fig.17d). De plus, nous avons observé des changements dans la morphologie des cellules MMT Ets-1 transfectées par les ARN interférents dirigés contre la MMP-9, avec la production de deux ou trois prolongements relativement longs par cellule, comme on peut l'observer dans les cellules MMT neo non transfectées, par rapport à la forme plus polygonale des cellules MMT Ets-1 transfectées avec les ARN interférents contrôle (Fig.17e). Je n'ai cependant pas réussi à reproduire cette première expérience encourageante. Comme pour le cas des ARN interférents dirigés contre Ets-1, une possible dégradation des produits est envisageable pour expliquer ce constat. Malgré tout, il serait intéressant de pouvoir étudier par cette méthode l'importance de la MMP-9 dans nos modèles de culture en gels de matrice, et observer dans quelle mesure celle-ci contribue aux effets de la surexpression d'Ets-1.

## 1.4. Conclusion

Les travaux faisant l'objet de l'article 1 et les résultats complémentaires présentés ci-avant mettent en évidence un rôle clé d'Ets-1 dans la coordination de différents mécanismes contribuant à la motilité et l'invasion par les cellules de composés de matrice extracellulaire. Le facteur de transcription Ets-1 orchestre en effet de façon concomitante différentes caractéristiques nécessaires à l'invasion des cellules, via la modulation de l'expression de plusieurs catégories de molécules, dont notamment les intégrines et les métalloprotéases matricielles (cf tableau synoptique ci-dessous).

	MMT neo	MMT Ets-1	MMT DB
dispersion des cellules (2D/plastique)	+	++	-
capacité des cellules à s'agréger (2D/agar)	+	-	++
capacité des cellules à former des tubules (3D/matrice)	+	-	+
migration/invasion (3D/matrice)	+	++	-
activation de l'HGF/SF	+	++	-
expression de Met	+	++	-
vitesse d'adhérence (2D/plastique et matrice)	+	++	-
expression des sous-unités d'intégrines $\beta 1$ et $\beta 3$	+	++	-
expression de la sous-unité d'intégrine $\beta 4$	+	-	++
expression des MMP	+	++	-
activation des MMPs	+	++	-
expression des TIMPs	+	++	-

N.B. : les variations d'expression des molécules ont été étudiées en boîtes de Petri recouvertes d'un film superficiel de matrice.

Les effets de la surexpression d'Ets-1 sur ces molécules de l'invasion s'observent à la fois directement au niveau transcriptionnel mais aussi de façon indirecte, en favorisant l'expression d'autres molécules intervenant dans la maturation des premières. Ets-1 contrôle ainsi un réseau d'acteurs de l'invasion parmi lesquels le couple HGF/Met semble jouer un rôle central. De par sa capacité à agir lui-même sur l'expression des MMPs ou sur les intégrines pour induire la dispersion des cellules épithéliales, ce facteur de croissance contribue sans doute fortement au phénotype induit par la surexpression d'Ets-1, à savoir un comportement hautement invasif, avec une migration plus individualisée des cellules. Pour poursuivre cette étude du rôle d'Ets-1 dans les capacités migratoires des cellules, il serait intéressant de mieux comprendre l'organisation du cytosquelette de nos



différentes sous-lignées cultivées en gels de matrice. L'étude de l'expression de moteurs du cytosquelette, comme les protéines Rho, pourrait s'avérer particulièrement utile, et il serait aussi intéressant de mesurer la vitesse de migration de nos différentes sous-lignées cellulaires par vidéomicroscopie.

## **2. La face cachée d'Ets-1, la répression de la croissance tumorale**

### **2.1. Introduction**

Les premières études pour évaluer les capacités prolifératives de nos différentes sous-lignées de cellules MMT cultivées sur plastique n'ont pas montré d'effet significatif d'Ets-1 sur cette caractéristique. Toutefois, au cours de nos expériences de culture en gel tri-dimensionnels de matrice extracellulaire, nous avons remarqué que les cellules surexprimant Ets-1 présentaient en parallèle de leurs capacités accrues à explorer leur environnement, une densité cellulaire réduite.

En étudiant la capacité de nos sous-lignées à croître sans ancrage, nous avons aussi observé que la surexpression d'Ets-1 était délétère à la croissance des clones cellulaires. Cette tendance a également été retrouvée au niveau de la croissance des tumeurs primaires ou des métastases pulmonaires issues de nos sous-lignées cellulaires *in vivo*. Ces résultats plutôt surprenants dans un premier temps nous ont permis de mettre en évidence une nouvelle facette d'Ets-1 jusqu'à présent masquée lors des études réalisées en boîtes de Petri.

### **2.2. Résultats**

Un manuscrit est actuellement en préparation pour présenter ces travaux, sous le titre suivant: *Three-dimensional environment reveals the Janus faces of Ets-1 : enhanced invasion and reduced mammary cancer cell growth*. Ce manuscrit est inséré dans les pages qui suivent.

**Three-dimensional environment reveals the Janus faces of Ets-1 :  
enhanced invasion and reduced mammary cancer cell growth.**

Authors :

**Alessandro FURLAN <sup>2</sup>, Chantal VERCAMER <sup>2</sup>, Nicolas WERNERT <sup>3</sup>, Xavier  
DESBIENS <sup>2</sup> and Albin POURTIER <sup>1,2</sup>.**

Address :

<sup>2</sup> : UMR-8161 « Institut de Biologie de Lille », CNRS/ Université de Lille-1/ Université  
de Lille-2/ Institut Pasteur de Lille, BP 447, F-59021 Lille CEDEX, France.

<sup>3</sup> : Institute of Pathology, University of Bonn, PO Box 2120, 53011 Bonn, Germany

<sup>1</sup> : Corresponding author

[albin.pourtier@ibl.fr](mailto:albin.pourtier@ibl.fr)

tel: 00 33 3 20 87 11 02

fax: 00 33 3 20 87 11 11

Running title: Ets-1 pro-invasive and growth-repressing roles in mammary  
tumorigenesis

Key words: mammary cancer; Ets-1; growth; invasion; matrix.

## ABSTRACT

Ets-1 overexpression by breast cancers was associated with their invasiveness, and poor prognosis. By overexpressing Ets-1 or a dominant negative mutant in MMT Murine Mammary Tumor cells, we recently demonstrated the key role of Ets-1 in coordinating multiple invasive features of these cells. However, we also noticed that Ets-1 down-regulated cellular density when culturing murine mammary tumour MMT cells in three-dimensional extracellular matrix. The three-dimensional context was instrumental to this regulation, as it was not observed on plastic or two-dimensional matrix coatings.

We wondered whether this information was relevant to Ets-1 impact on mammary tumorigenesis. We first assessed the transforming abilities of Ets-1 on MMT cells grown without anchorage in soft agar. As observed in three-dimensional matrix, Ets-1 was unfavorable to the growth of cell groups. We then studied whether Ets-1 affected tumorigenesis *in vivo*. To that purpose, we subcutaneously injected our different MMT cell sublines in nude mice. We evidenced again a detrimental impact of Ets-1 expression on primary tumor growth, and also an increased invasive potential of MMT cells in the fatty stroma.

Ets-1 thus emerges as a peculiar oncogene, devoted to the triggering of mammary cancer cell invasion, while hindering cancer growth, possibly via a blockade of cell cycle. Ets-1 transient induction in breast cancers could represent a critical dissemination signal for further expansion of the tumor in the organism, beyond primary tumor growth.

## SHORT REPORT

Ets-1 proto-oncogene is the founder of the ETS family of transcription factors. This family is involved in various biological functions (Maroulakou and Bowe, 2000). Ets-1 transcription factor is notably expressed during events of organ morphogenesis (Kola et al., 1993), and was associated with epithelial-mesenchymal transitions (Fafeur et al., 1997). Ets-1 is expressed in the mammary gland by invading tips of developing epithelial mammary ducts (Delannoy-Courdent et al., 1996), then its expression by mammary epithelial cells is extinguished to almost undetectable levels after the completion of the epithelial arborescence. Ets-1 expression is dramatically enhanced in breast cancers, and associated with aggressive features of invasive carcinomas (Katayama et al., 2005) and poor prognosis (Span et al., 2002). We previously showed that Ets-1 was a critical orchestrator of mammary cancer cell scattering and invasion within their matrix environment (Furlan et al., in press).

Invasiveness is a crucial feature of cancer progression, especially in breast cancers. First steps of mammary tumorigenesis classically include in situ non-invasive growing tumors. These initial tumors are typically hyperproliferative. Nonetheless, several evidence from various cancer models suggest that cells cannot proliferate and migrate simultaneously. Invasive cells from glioma (Giese et al., 2003) and colorectal cancers (Palmqvist et al., 1999) actually display low proliferation rates. Mammary epithelial cells that had undergone an epithelial-mesenchymal transition were also described as hypoproliferative (Schedin et al., 2004).

By stably overexpressing Ets-1 or a dominant negative mutant in murine mammary carcinoma cells MMT (respectively named MMT Ets-1 cells and MMT DB cells), we recently demonstrated that Ets-1 triggered a more aggressive invasiveness in mammary cancer cells, and identified the coordination by Ets-1 of the expression of several molecules responsible for a pro-invasive role.

Interestingly, while studying the role of Ets-1 in invasion, we noticed that Ets-1 overexpression reduced the cellular density in these three-dimensional matrix gel cultures (Figure 1a). When slices from these gels were stained, the more invasive behavior of MMT Ets-1 overexpressing cells was confirmed, whereas control cells formed more organized structures which contained lumens, and mutant-expressing cells developed even more cohesive units with a greater number of cells (Figure 1b). To quantify Ets-1 effect upon cell growth, we cultured cells in classical plastic dishes. However, on this support, Ets-1 did not regulate cell proliferation as expected from 3D

culture results. Ets-1 overexpression rather favored cell proliferation, although to a minor non-statistically significant extent (Figure 1c). To assess the importance of matrix components in the regulation by Ets-1 of cell proliferation, we cultured MMT cells to matrix-coated plates. Growth curves of our three sublines were again almost indistinguishable (Figure 1d). These data thus highlighted that three-dimensional matrix context was instrumental to the repression by Ets-1 of mammary cancer cell growth.

To gain further insights into the implications of this phenomenon in Ets-1 oncogenic potential, we cultured MMT cells in anchorage-independent conditions. Soft agar assays are actually considered as a valuable tool to assess the tumorigenic potential of cells. Curiously for a known oncogene, but in accordance with data from three-dimensional matrix culture, Ets-1 overexpression was deleterious to MMT cell growth without anchorage (Figure 2a). MMT Ets-1 cells were dramatically less clonogenic when compared to control cells, whereas MMT DB cell developed a greater number of clones (Figure 2b). Staining of sections of the agar gels revealed a greater compaction of MMT DB cells, when compared with control cell clones, while MMT Ets-1 cells were far fewer (Figure 2c). At the end of the experiment, the cell-containing agar gels were laid down in plastic culture dishes to assess the cell viability. Interestingly, despite the small size of MMT Ets-1 clusters, cells were still viable and had conserved their more motile and scattered phenotype after a three-week culture in anchorage-independent stringent conditions (Figure 2d). These data strongly suggested a blockade of the cell cycle in this three-dimensional environment.

In order to assess the relevance of our results *in vivo*, the three MMT cell sublines were subcutaneously injected in nude mice, in the region of the mammary fat pads, either with Growth Factor-Reduced Matrigel or High Concentration Matrigel in order to facilitate the tumor take. MMT Ets-1 cells actually grew to a lesser extent in comparison with control cells, while MMT DB cells developed greater tumors (Figure 3a), in both conditions of injection. Whereas the effect of the dominant negative mutant was unequivocally statistically significant, that of Ets-1 overexpression was not, although it was reproducible. It is plausible that the inhibition by the DB mutant of other ETS family factors expressed by MMT cells could account for its greater effect. One should also mention that the tumor volume also includes the volume of cell suspension in Matrigel injected (80 $\mu$ L), which could vary to some extent in the total volume, depending on the time necessary for this matrix to gel or the extent of its diffusion. Moreover, as MMT DB tumors quickly reached sizes close to 1 cm<sup>3</sup>, we

were compelled to sacrifice mice, probably before that Ets-1 overexpression could lead to more statistically significant effects. Nevertheless, histological staining of these tumors revealed that this Ets-1-mediated overall growth reduction was associated with a marked invasive phenotype. The tumors actually grew in vicinity of the mammary glands and the tumor boundaries frequently reached this tissue. Most often, MMT Ets-1 cells greatly infiltrated the fat pad, while MMT DB tumors classically had a pushing growth pattern, which could eventually include regions of the mammary gland (Figure 3b and c). This must be paralleled with the observation that highly proliferating tumors can display a similar low infiltrative, pushing growth pattern (Berglund et al., 2005).

The balance between cell proliferation and cell death was thus investigated in the MMT tumors, to elucidate whether Ets-1 affected one or both of these features *in vivo*. To that purpose, we assessed the expression of the proliferation marker Ki67 by immunostaining and performed TUNEL assays in parallel. Proliferation and apoptosis were found to be quite heterogeneous in these primary tumors (Figure 4a). The proliferation was especially very high in some areas of the tumors, while reduced in others. In parallel, TUNEL assay revealed a greater number of apoptotic cells in the tumors from MMT Ets-1 cells, both in the High Concentration Matrigel and Growth Factor-Reduced Matrigel groups (Figure 4b). Further studies are presently in progress to elucidate whether areas of intense proliferation, apoptosis, or invasion overlap or are rather exclusive, and what is the impact of Ets-1 on the concomitant manifestation of these events.

We then wondered whether Ets-1 could also affect the growth of metastatic foci. The MMT tumor growth was extremely fast in the above-described experiments, and previous unpublished data revealed that this assay did not drive to the formation of consequent metastases. We hence intravenously injected our different MMT cells in nude mice. Ten days later, mice were sacrificed and dissected. Lungs were strikingly colonized by MMT cells. Although Ets-1 manipulation in MMT cells did not affect the quantity of superficial metastatic foci (Fig.5 a), it greatly modified their phenotype. MMT ets-1 cells indeed gave rise to flattened foci, in comparison with MMT neo and MMT DB metastases (Fig.5 b). Moreover, sections of these lungs revealed that MMT Ets-1 internal metastases (black arrows) were smaller in comparison with that of MMT neo and MMT DB cells (Fig.5 c).

The promotion by Ets-1 of MMT cancer cell scattering and invasion, as evidenced in this manuscript and in (Furlan et al, in press) suggested that Ets-1 could favor the initial dissemination of cells during the metastatic process. Moreover, we show in another manuscript under preparation that

Ets-1 also controls the angiogenic potential of MMT cells, and their ability to interact with endothelial cells. This reinforces the notion of a putative involvement of Ets-1 in the initial steps of the metastatic process. However the intravenous injection of cancer cells bypasses these initial steps, and rather reflects the ability of cells to colonize the lungs than their metastatic potential, as previously stated in (Fantozzi and Christofori, 2006). Indeed, in this assay, a great number of cells are entrapped in the capillaries in a quite non-specific manner. Nguyen and Massague postulated that several sets of genes could be necessary for the different steps of metastasis (Nguyen and Massague, 2007). In that point of view, Ets-1 would fall into the class of metastasis initiation genes, which notably underlie cancer cell motility, invasion and angiogenesis, and thus allow cells to escape from the primary tumor and find vessels to disseminate to distant organs. Unfortunately, there are so far few experimental approaches to assess these early steps in the metastatic cascade, except for sophisticated intravital imaging protocols (Sahai, 2007). In this work, we demonstrate that Ets-1 is detrimental to late stages of metastasis such as growth in the secondary site.

It is noteworthy that *ets-1* gene is not described to undergo any amplification associated with breast cancer occurrence. Ets-1 expression in breast cancer cells is rather induced by epithelium-mesenchyme interactions, as it can be triggered by several growth factors, but hypoxic conditions can also stimulate Ets-1 expression (Oikawa et al., 2001). This overexpression of Ets-1 could be a transitory signal for cancer cell dissemination. It would be interesting to evaluate whether Ets-1 expression in breast cancer metastases is similar to that of primary tumors, or if it turns back to a low level in the metastatic organs, in which normoxic conditions are found again.

Taken together, our data confirm a critical role for Ets-1 in mammary cancer invasion *in vivo* and provide evidence for concomitant growth repression. Although unusual, such a conclusion is not that surprising, considered that low proliferation has already been described at the invasive front of cancers (Palmqvist et al., 1999). Moreover, other data previously suggested that a switch between mitosis and motility could occur in mammary epithelial cells in three-dimensional matrix cultures. Indeed, DNA synthesis could not be detected in cells that had undergone epithelial-mesenchymal transitions triggered by Ets-2 and ESX transcription factors, which belong to the ETS family (Schedin et al., 2004). These data could thus explain the major effect of DB dominant negative mutant, as DNA binding domain is highly conserved in ETS family, and our mutant can hence inhibit other members of the ETS family. Our results also emphasize the notion that three-dimensional matrix models provide

cells with relevant cues, and are invaluable tools to get insight into the mechanisms of tumorigenesis. Ets-1 can mediate oncogene-induced senescence of normal cells, as triggered by Ras overexpression for example. It is however unlikely that senescence, which is an irreversible event, accounts for the observed phenotypes, since MMT Ets-1 cells can emerge from soft agar gels after three weeks of apparent “quiescence”, as soon as they find a substrate for migration (Figure 2c and d). We rather postulate an induction by Ets-1 of a delay in the cell, which may however involve a molecular circuitry close to that of senescence. Moreover, it is worth noting that although hindering tumor growth, Ets-1 overexpression in carcinoma cells did not prevent tumor formation. Ets-1 would thus modulate cancer growth to favor infiltrative aggressive invasion, which could contribute to its correlation with poor prognosis. Ets-1 is classically expressed during inductive mesenchyme-epithelium dialogues. It is noteworthy that Ets-1 is not described to be mutated or amplified in breast cancers, but rather induced through tumor-stroma interactions. These interactions classically occur when the tumor has reached a consequent size and could in that way induce an invasive program in carcinoma cells, as proposed in the Tumor Microenvironment Invasion Model (Condeelis et al., 2005). Such invasive signals are critical for carcinoma development, as the growing primary tumor usually faces necrosis, and further expansion requires dissemination of the cells. Ets-1 can be induced in MMT control tumors by a stromal reaction, which could account for a behavior close to that of tumors from constitutively Ets-1 overexpressing cells. On the other hand, the dominant negative mutant would anyway abrogate the effect of Ets-1 induction in MMT DB tumors.

Taken together, our data provide novel significant insight into the role of Ets-1 during mammary tumorigenesis. Interestingly, the overexpression of Ets-1 was also reported and associated with the invasiveness of glioma (Giese, 2003) and colorectal cancers (Nakayama et al., 2001), which are the main localizations where the balance between proliferation and migration was suggested so far. Our observations reinforce the paradigm of this cellular balance, which may have clinical implications, as chemotherapeutic agents targeting proliferating cells might fail to hit migrating cells. Ets-1 thus emerges as a potential therapeutic target that could be regarded as Janus, the divinity of transition, as a master gene in the switch between tumor growth and invasiveness. The targeting of Ets-1 pathways in combination with cytostatic or cytotoxic drugs could prove to be really helpful to target the stromal reaction and block the malignant progression of cancers.



## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by le Ministère de l'Éducation Nationale, de la Recherche et des Technologies and by grants from Association pour la Recherche contre le Cancer, Comité du Nord de la Ligue Nationale contre le Cancer and la Société Française du Cancer. Alessandro FURLAN is a recipient from a Ligue Nationale contre le Cancer grant. We are much grateful to Dr. Fabrice Soncin for retroviral constructs.

## BIBLIOGRAPHY

**Berglund, P., Stighall, M., Jirstrom, K., Borgquist, S., Sjolander, A., Hedenfalk, I. and Landberg, G.** (2005). Cyclin E overexpression obstructs infiltrative behavior in breast cancer: a novel role reflected in the growth pattern of medullary breast cancers. *Cancer Res* **65**, 9727-34.

**Condeelis, J., Singer, R. H. and Segall, J. E.** (2005). The great escape: when cancer cells hijack the genes for chemotaxis and motility. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**, 695-718.

**Delannoy-Courdent, A., Fauquette, W., Dong-Le Bourhis, X. F., Boilly, B., Vandebunder, B. and Desbiens, X.** (1996). Expression of c-ets-1 and uPA genes is associated with mammary epithelial cell tubulogenesis or neoplastic scattering. *Int J Dev Biol* **40**, 1097-108.

**Fafeur, V., Tulasne, D., Queva, C., Vercamer, C., Dimster, V., Mattot, V., Stehelin, D., Desbiens, X. and Vandebunder, B.** (1997). The ETS1 transcription factor is expressed during epithelial-mesenchymal transitions in the chick embryo and is activated in scatter factor-stimulated MDCK epithelial cells. *Cell Growth Differ* **8**, 655-65.

**Fantozzi, A. and Christofori, G.** (2006). Mouse models of breast cancer metastasis. *Breast Cancer Res* **8**, 212.

**Furlan, A., Vercamer, C., Desbiens, X., and Pourtier, A.** Ets-1 triggers and orchestrates the malignant phenotype of mammary cancer cells within their matrix environment, *accepted for publication in Journal of Cellular Physiology*.

**Giese, A.** (2003). Glioma invasion--pattern of dissemination by mechanisms of invasion and surgical intervention, pattern of gene expression and its regulatory control by tumor suppressor p53 and proto-oncogene ETS-1. *Acta Neurochir Suppl* **88**, 153-62.

**Giese, A., Bjerkvig, R., Berens, M. E. and Westphal, M.** (2003). Cost of migration: invasion of malignant gliomas and implications for treatment. *J Clin Oncol* **21**, 1624-36.

**Katayama, S., Nakayama, T., Ito, M., Naito, S. and Sekine, I.** (2005). Expression of the ets-1 proto-oncogene in human breast carcinoma: differential expression with histological grading and growth pattern. *Histol Histopathol* **20**, 119-26.

**Kola, I., Brookes, S., Green, A. R., Garber, R., Tymms, M., Papas, T. S. and Seth, A.** (1993). The Ets1 transcription factor is widely expressed during murine embryo development and is associated with mesodermal cells involved in morphogenetic processes such as organ formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 7588-92.

**Maroulakou, I. G. and Bowie, D. B.** (2000). Expression and function of Ets transcription factors in mammalian development: a regulatory network. *Oncogene* **19**, 6432-42.

**Nakayama, T., Ito, M., Ohtsuru, A., Naito, S. and Sekine, I.** (2001). Expression of the ets-1 proto-oncogene in human colorectal carcinoma. *Mod Pathol* **14**, 415-22.

**Nguyen, D. X. and Massague, J.** (2007). Genetic determinants of cancer metastasis. *Nat Rev Genet* **8**, 341-52.

**Oikawa, M., Abe, M., Kurosawa, H., Hida, W., Shirato, K. and Sato, Y.** (2001). Hypoxia induces transcription factor ETS-1 via the activity of hypoxia-inducible factor-1. *Biochem Biophys Res Commun* **289**, 39-43.

**Palmqvist, R., Sellberg, P., Oberg, A., Tavelin, B., Rutegard, J. N. and Stenling, R.** (1999). Low tumour cell proliferation at the invasive margin is associated with a poor prognosis in Dukes' stage B colorectal cancers. *Br J Cancer* **79**, 577-81.

**Sahai, E.** (2007). Illuminating the metastatic process. *Nat Rev Cancer* **7**, 737-49.

**Schedin, P. J., Eckel-Mahan, K. L., McDaniel, S. M., Prescott, J. D., Brodsky, K. S., Tentler, J. J. and Gutierrez-Hartmann, A.** (2004). ESX induces transformation and functional epithelial to mesenchymal transition in MCF-12A mammary epithelial cells. *Oncogene* **23**, 1766-79.

**Span, P. N., Manders, P., Heuvel, J. J., Thomas, C. M., Bosch, R. R., Beex, L. V. and Sweep, C. G.** (2002). Expression of the transcription factor Ets-1 is an independent prognostic marker for relapse-free survival in breast cancer. *Oncogene* **21**, 8506-9.

## FIGURE LEGENDS

### **Figure 1. Ets-1 affects MMT cell growth in three-dimensional matrix, but not on two-dimensional plastic or matrix coating.**

Mouse Mammary Tumor cells (MMT, CCL-5, ATCC) were routinely cultured in DMEM (Biowhittaker) supplemented with antibiotics and 10% heat-inactivated fetal calf serum (Gibco). Cells were stably infected in parallel by MFG-Neo, MFG-Ets-1, or MFG-ets1D retroviral vectors, as previously described (Furlan et al, in press). Briefly these constructs drive the expression of a gene responsible for resistance to neomycin, alone or in combination with that of full length Ets-1 or Ets-1 DND Binding domain respectively. This latter construct acts as a dominant negative mutant. Clone pools were selected for their resistance to 0.8 mg/mL G418 sulphate. (a). MMT cells were cultured for a week in three-dimensional matrix gels, composed of Matrigel (Becton Dickinson) and type I collagen (Upstate), as previously described (Furlan et al, in press). (b). Gels were fixed with 4% paraformaldehyde in Phosphate Buffer Saline, and processed for paraffin embedding. Seven  $\mu\text{m}$  sections were deparaffinized and stained with May-Grünwald-Giemsa (Sigma). Lumens observed in the tubule sections are indicated by arrows. (c). MMT cells were seeded at a density of 20 000 cells per well in 12-well plates (Falcon). Cells were trypsinized and counted every day; cell number is expressed in millions of cells. Results are representative of three independent experiments (d). Five thousand MMT cells were seeded in 12-well plates coated with the matrix solution used for 3D culture assays. Cell counting was performed along one week. Scale bar 50 $\mu\text{m}$ .

### **Figure 2. Cell growth without anchorage is reduced by Ets-1.**

(a) and (b) MMT cells were studied for their ability to grow without anchorage, in soft agar assays. A first layer of agar (Difco BiTek) devoid of cells was laid in 12-well plates. As a second step, 15 000 MMT cells were mixed with agar solution to get a final concentration of 0.45% agar and 5% FCS, and seeded. Gels were overlaid with DMEM 5% FCS regularly changed. At three weeks post-seeding, cells were fixed with 4% paraformaldehyde, photographed (a) and the number of clones of consequent size was quantified (b). Scale bar 200 $\mu\text{m}$ . (c) Agar gels were processed for paraffin-embedding, and sections of these gels were stained with May-Grünwald-Giemsa. Scale bar 50 $\mu\text{m}$ . (d) Alternatively, at the end of the culture, cell-containing agar gels were laid in plastic dishes to assess cell viability. Cells in contact with plastic adhered to and expanded on it. Scale bar 50 $\mu\text{m}$ .

**Figure 3. Ets-1 promotes invasion but hinders tumor growth *in vivo*.**

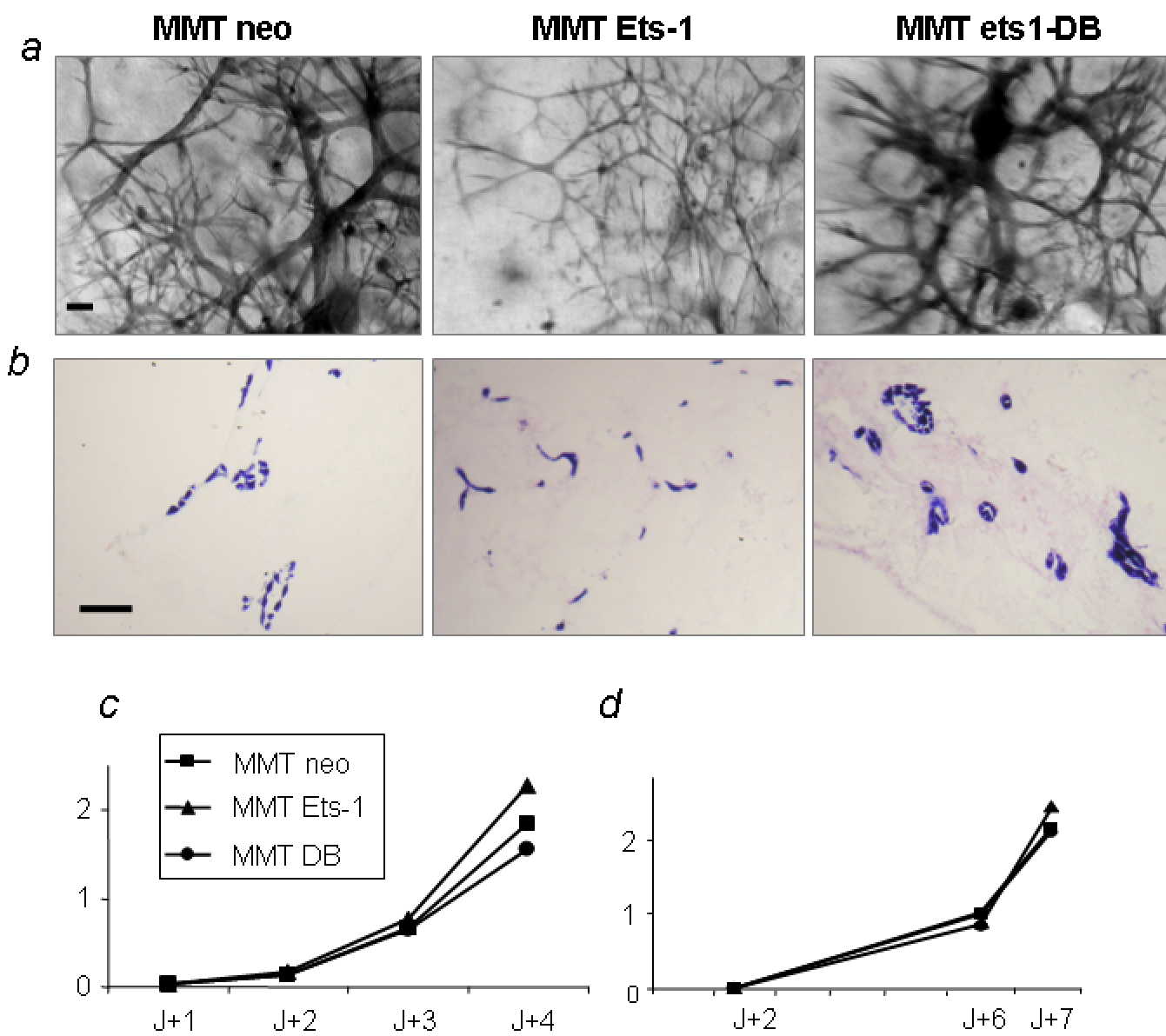
(a) In order to assess the impact of Ets-1 on the tumorigenicity of MMT cells, we subcutaneously injected our three cell sublines in nude mice, in the vicinity of mammary pads. Four or five mice were used for each condition. To favor tumor take, cell suspensions were mixed on ice with twice a volume of Growth Factor-Reduced Matrigel, or in parallel, High Concentration Matrigel, then 500 000 MMT cells were deposited per injection, using chilled Hamilton syringes (23 Gauge). At 8 days post-injection, tumor volumes were measured, and mice sacrificed. Mean volumes and standard errors of representative experiments performed with Growth Factor-Reduced Matrigel (left) and High Concentration Matrigel (right) are reported. (b) and (c) Tumors from MMT cells respectively co-injected with Growth Factor-Reduced Matrigel (b) or High Concentration Matrigel (c) were processed for paraffin embedding and 7 $\mu$ m sections were stained with hematoxylin-eosin. MG stands for Mammary Gland, in which epithelial ductules are indicated by white large arrows. Black thin arrows point to MMT cells invading the fat pad. Scale bar 100 $\mu$ m.

**Figure 4. Ets-1 affects cell cycle and death *in vivo*.**

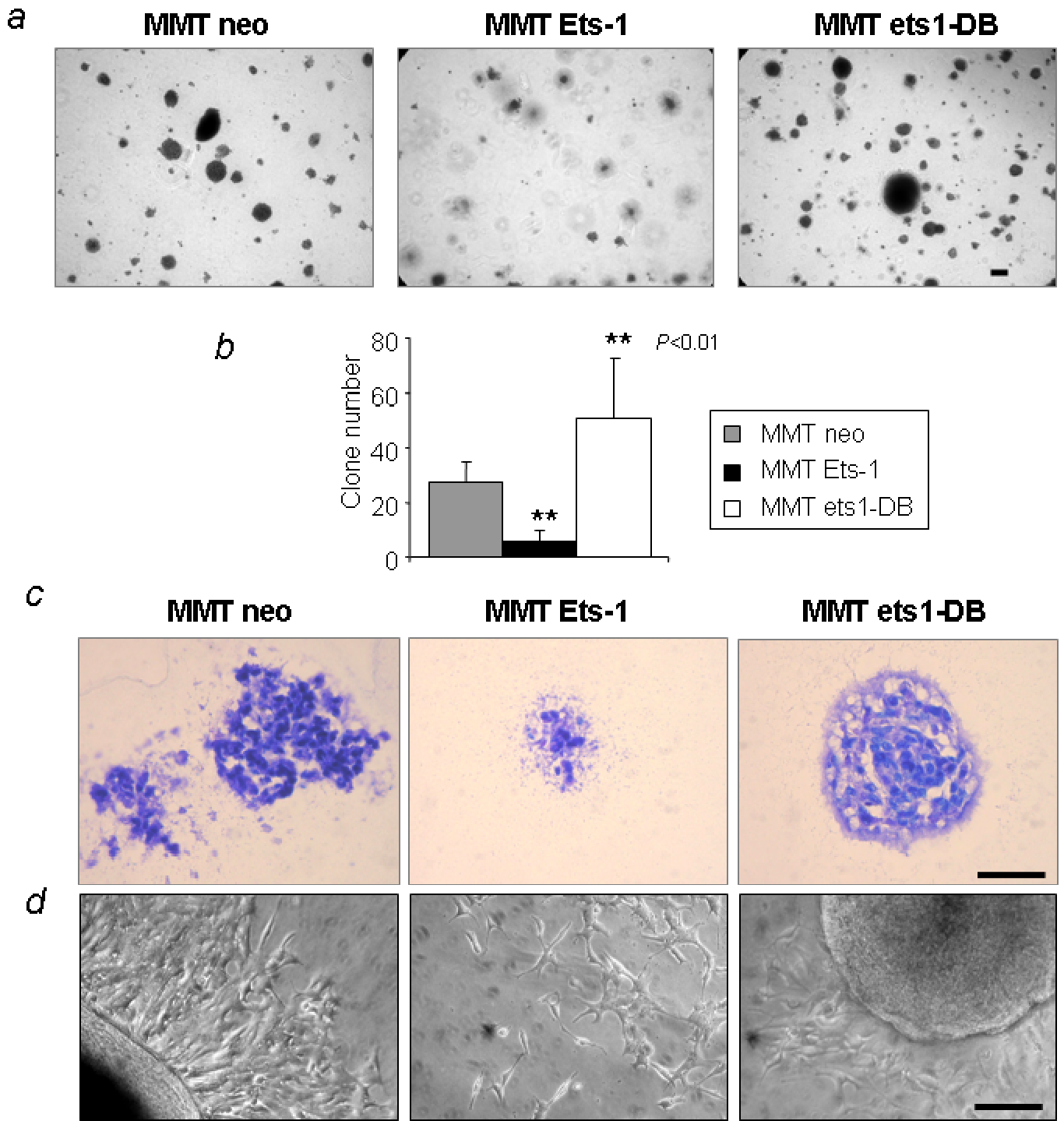
(a) Proliferation rates of MMT tumors were assessed by immunostaining of the proliferative marker Ki67. Tumor sections described in Figure 3 were deparaffinized. In order to block endogenous peroxidase activity, the slides were incubated in 1% hydrogen peroxide diluted in methanol. This was followed by incubation in blocking solution and appropriate antibodies. (b) TUNEL assays (ApopTag™ Oncor®) were performed according to the manufacturer's recommendations. Scale bar 100 $\mu$ m.

**Figure 5. Ets-1 affects the growth of MMT metastatic lung foci.**

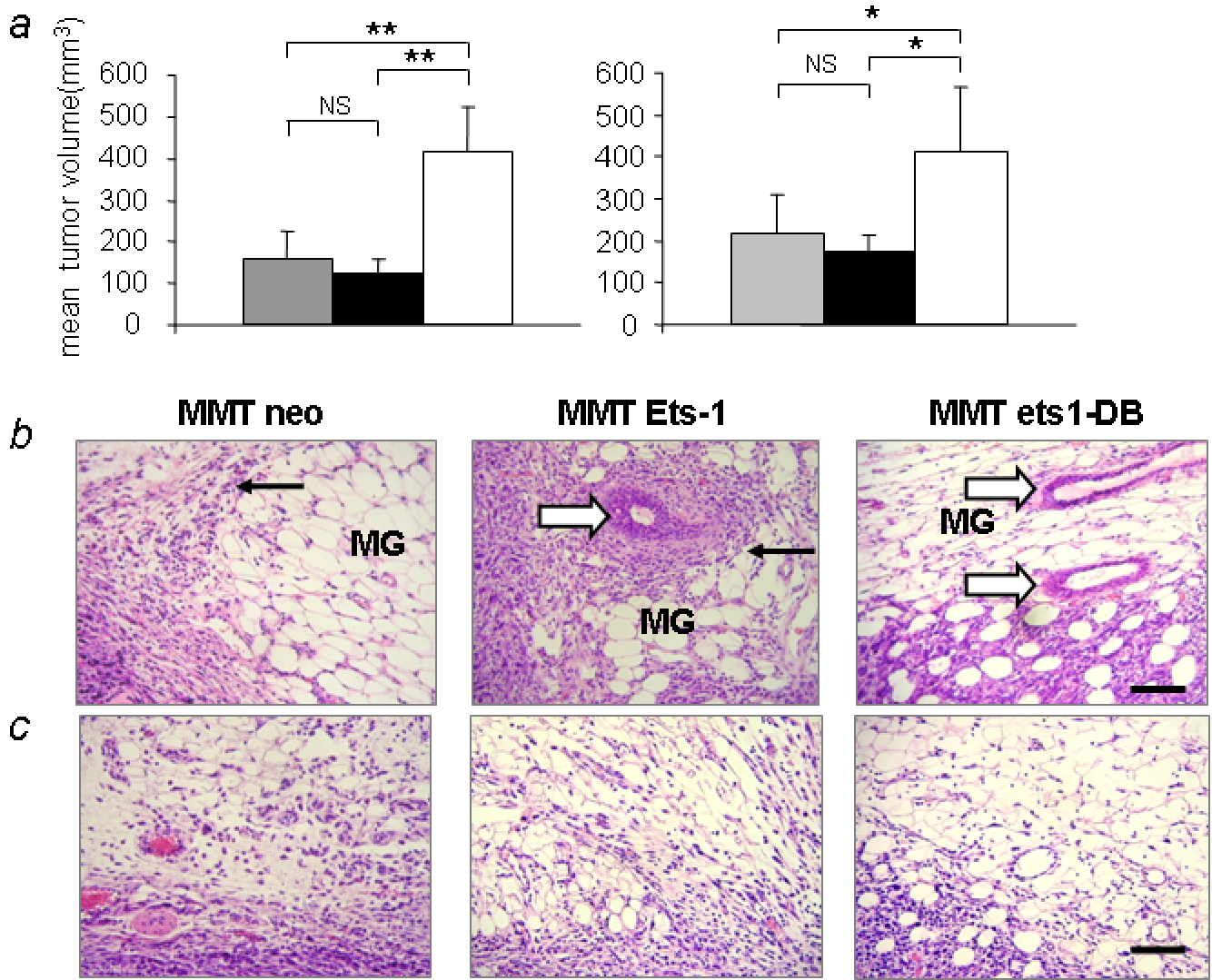
MMT cells were injected in the tail vein of female nu/nu BALB/c mice at a rate of 100,000 cells per mouse. Four mice were used for each condition. Mice were killed 12 days later and dissected. Lungs were fixed in PBS with 4% paraformaldehyde and macroscopically analysed for the presence of external metastatic lesions. (a) Lung external metastatic foci were counted macroscopically. (b) Photographies of the surface of these lungs are provided. (c) Tissues were then processed for paraffin embedding. Seven  $\mu$ m tissue sections were deparaffinized and stained with May-Grünwald-Giemsa. *black arrows*, small internal metastatic foci. Scale bar 100 $\mu$ m.



**FIGURE 1**

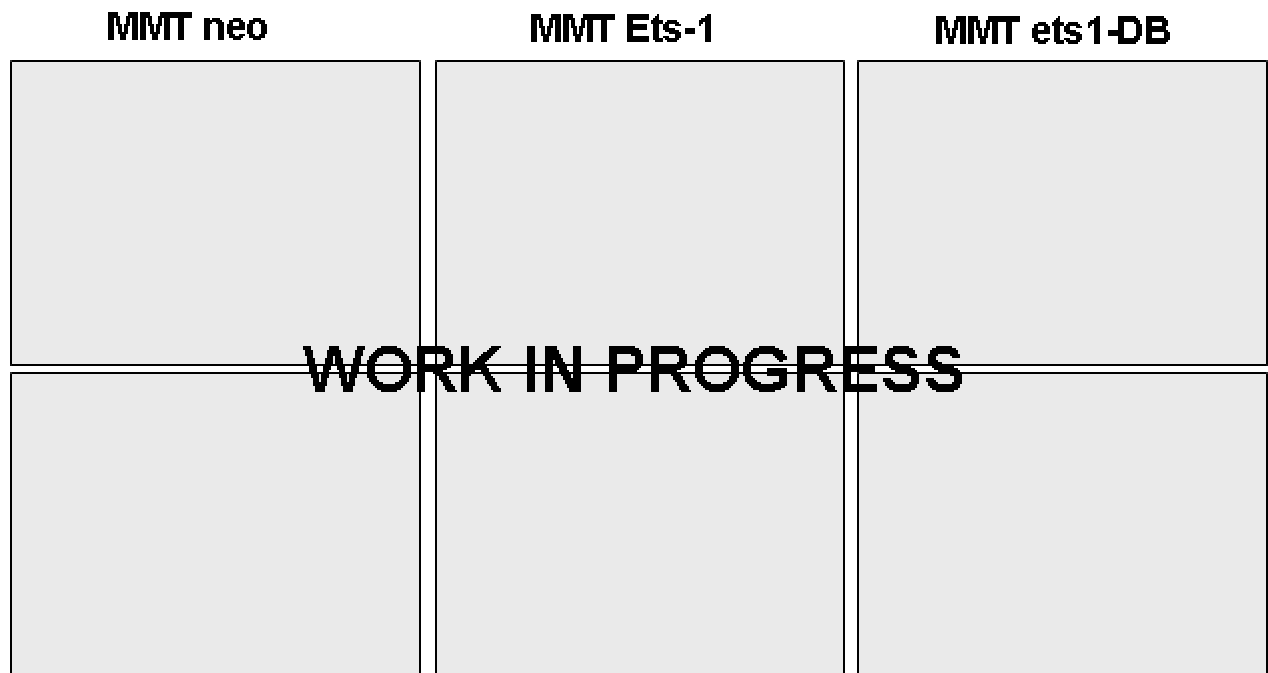


**FIGURE 2**

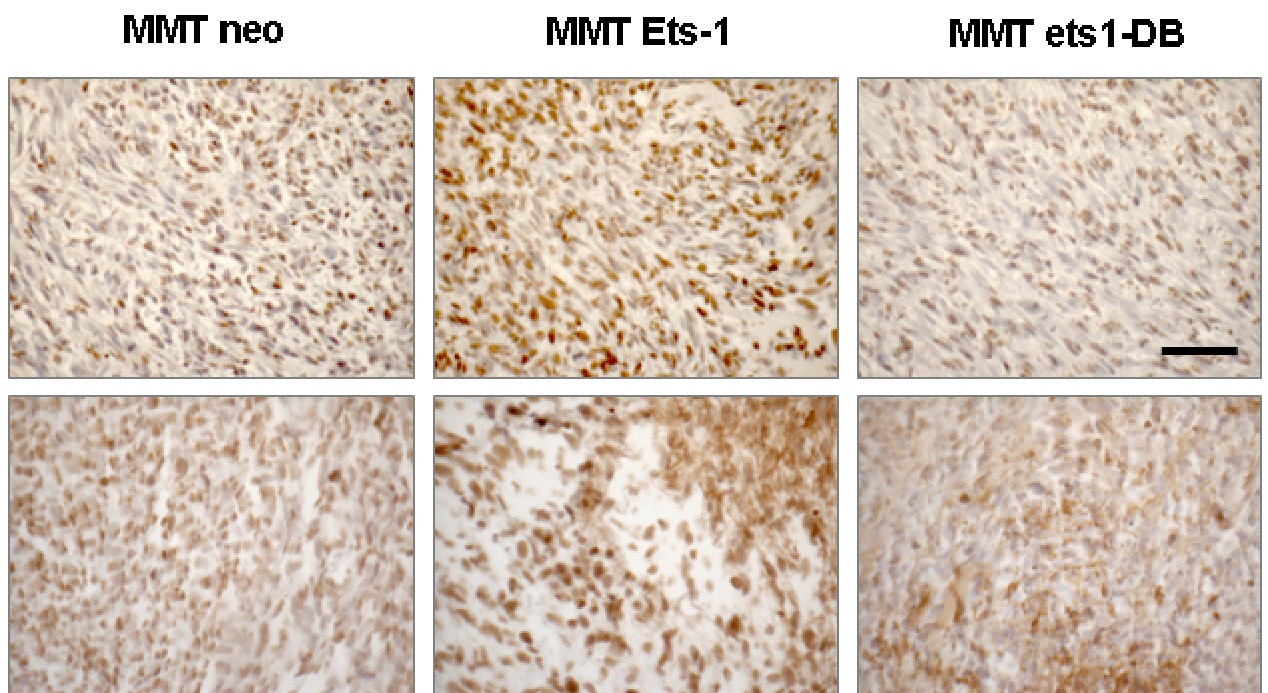


**FIGURE 3**

*a*

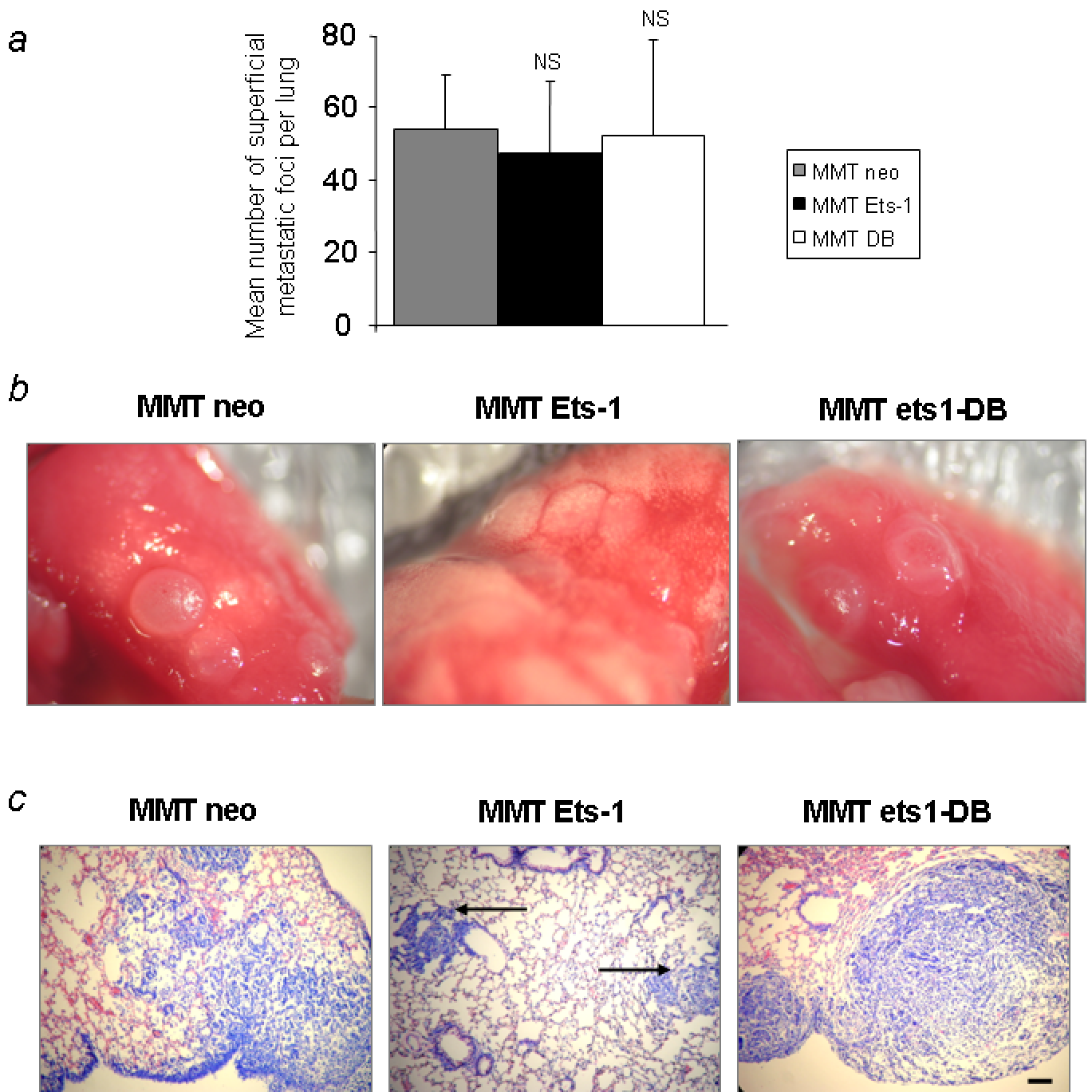


*b*



**FIGURE 4**





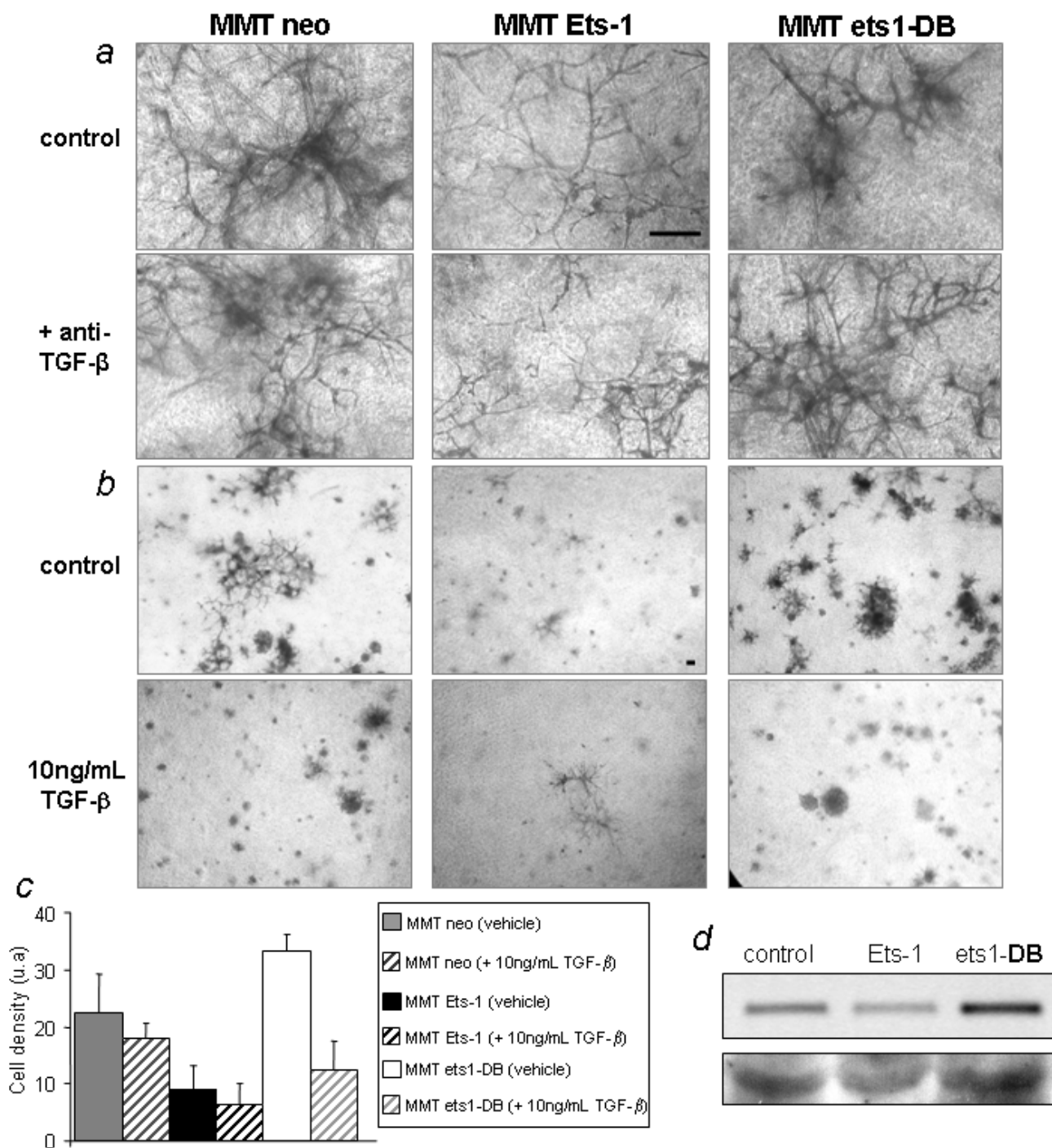
**FIGURE 5**

## **2.3. Résultats complémentaires ; présentation et discussion**

### **a) Ets-1 module la réponse des cellules MMT au TGF $\beta$ .**

Parmi les facteurs connus pour bloquer la prolifération des cellules, le plus célèbre est le TGF $\beta$  (Transforming Growth Factor). Des travaux précédents ont mis en évidence la stimulation par Ets-1 de l'expression du récepteur de type II au TGF $\beta$  dans des cellules de carcinomes embryonnaires (Kopp et al., 2004). Il semblait donc possible que la croissance réduite des cellules MMT Ets-1 dans les gels matriciels soit liée à une augmentation de l'expression de ce récepteur, rendant les cellules MMT Ets-1 plus sensibles à l'inhibition de prolifération déclenchée par le TGF $\beta$ . Il s'est au contraire avéré qu'Ets-1 rendait ces cellules moins sensibles à cet effet inhibiteur. Lors d'expériences de culture des cellules en trois dimensions dans les gels de matrice, l'ajout d'anticorps bloquants du TGF $\beta$  a eu un effet mineur sur la croissance des cellules MMT neo et MMT Ets-1, tandis que les cellules MMT DB se sont mises à proliférer de façon plus forte (Fig. 18a). Ces données suggéraient donc que l'inhibition du TGF $\beta$  levait un blocage dans les cellules MMT DB. Pour confirmer ces résultats, nous avons administré du TGF $\beta$  aux cellules MMT dans ces gels de matrice (Fig. 18b), et quantifié la densité cellulaire (Fig. 18c). Pour ce faire, j'ai coloré les structures cellulaires au rouge neutre puis pris trois photos de chaque puits. Grâce au logiciel Quantity One de BioRad, j'ai estimé la densité cellulaire, en retranchant à la valeur moyenne densitométrique de l'ensemble de l'image la valeur correspondant au bruit de fond, calculée sur une zone de matrice dépourvue de cellules. La culture des cellules ayant été réalisée en duplicats, je disposais donc de 6 valeurs pour chaque condition. Ces expériences m'ont permis tout d'abord de donner une valeur chiffrée estimée des effets de la surexpression d'Ets-1 et de l'expression du DB sur la croissance des cellules dans la matrice (Fig. 18c). Comme on l'observe facilement, l'ajout de TGF $\beta$  dans les cultures bloque de façon remarquable la croissance des cellules MMT DB (Fig. 18b et c), et dans une moindre mesure celle des cellules contrôle. Cet ajout réduit de plus le caractère branché invasif des structures cellulaires. En revanche, cet ajout de TGF $\beta$  affecte peu la densité des cellules MMT Ets-1 et surtout n'empêche pas l'expression de leur phénotype invasif. Nous avons ensuite montré que ces résultats corrélaient avec une baisse d'expression du récepteur de type II au TGF $\beta$  dans les cellules MMT Ets-1, aussi bien au niveau transcrit que protéique (Fig. 18d).

La croissance réduite des cellules MMT Ets-1 en gels matriciels semble donc impliquer des voies indépendantes du TGF $\beta$ , et suggèrent même un blocage important du cycle cellulaire, étant donné que ces cellules moins sensibles à l'inhibition de prolifération du TGF $\beta$  devraient proliférer de façon plus importante que les autres sous-lignées, ce qui n'est pas le cas. De plus, la baisse d'expression du récepteur de type II au TGF $\beta$  dans les cancers du sein a été associée à la progression de ces tumeurs vers un haut grade (Gobbi et al., 2000). Cette régulation négative par Ets-1 de l'expression du récepteur de type II au TGF $\beta$  dans les cellules cancéreuses mammaires pourrait donc contribuer au caractère agressif de celles-ci.



**Figure 18. Ets-1 réduit l'inhibition de la prolifération induite par le TGF-β dans les cellules MMT.**

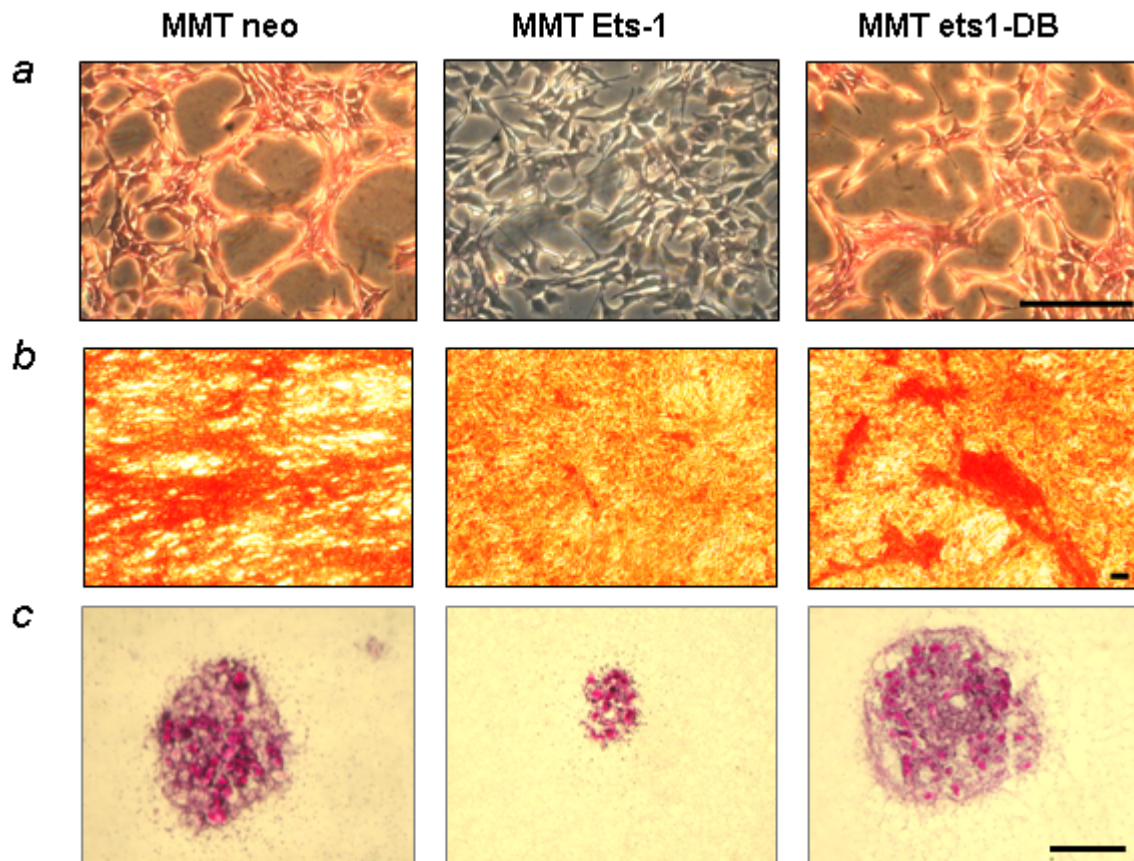
a. Les cellules MMT ont été cultivées pendant 5 jours dans des gels tridimensionnels associant du collagène de type I et du Matrigel™, en présence de 5µg/mL d'anticorps bloquant dirigé contre le TGF-β (MAB1835, R&D Systems) ou du volume correspondant de PBS. Les structures cellulaires ont été colorées au rouge neutre et fixées au paraformaldéhyde. b. Les cellules MMT ont été cultivées selon le modèle indiqué ci-dessus, en présence de 10ng/mL de TGF-β 1 recombinant humain (240-B-002, R&D Systems) ou du volume correspondant de PBS 0,1%BSA. c. La densité cellulaire a été estimée dans l'expérience décrite en b par densitométrie grâce au logiciel Quantity One de Biorad. Trois images ont été prises par puits et la valeur densitométrique correspondant au bruit de fond de la matrice à la valeur densitométrique moyenne totale. d. Analyse de l'expression du récepteur de type II au TGFβ dans les cellules MMT, au niveau transcriptionnel par RT-PCR semi-quantitative (partie supérieure), et au niveau protéique par Western blot (partie inférieure). Barres d'échelle 100µm.

### **b) Ets-1 module le dépôt et le remaniement de la matrice par les cellules MMT.**

La matrice extracellulaire produite par les cellules va leur fournir différents signaux pouvant influencer sur leur survie ou leur motilité notamment. Pour comprendre si la production de matrice était régulée par Ets-1 et pouvait influencer sur la capacité des cellules MMT à se disperser (cf fig 2 à la p.23 de l'article 1), ou à former des structures multicellulaires en se chevauchant à confluence sur plastique (cf fig 3 à la p.24 de l'article 1), nous avons réalisé une coloration au rouge Sirius des cultures de nos différentes sous-lignées MMT. Cette coloration met en évidence en rouge les fibres de collagène et nous a permis de montrer que la surexpression d'Ets-1 dans les cellules MMT abrogeait la production par ces cellules d'une telle matrice (Fig. 19a). Des travaux réalisés sur des fibroblastes avaient montré précédemment qu'Ets-1 réprimait l'expression de collagène et d'autres gènes de composés de la matrice en réponse au TGF $\beta$  (Czuwara-Ladykowska et al., 2002). Il est donc possible que la surexpression d'Ets-1, qui rend les cellules moins sensibles au TGF $\beta$ , contribue de cette manière à la baisse de production de collagène. Il faudrait toutefois reproduire ces expériences en présence de TGF $\beta$  ou d'anticorps bloquant son action, pour confirmer ou infirmer cette hypothèse. Le rouge de Sirius est un colorant dont les groupements acides se fixent sur les groupements basiques des collagènes sans être spécifique d'un type précis de collagène. Il faudrait donc idéalement réaliser des expériences d'immunocytochimie contre les différents types de collagènes pour définir précisément le rôle d'Ets-1 sur leur expression.

Au-delà de cette production de matrice, nous avons observé lors de la culture de nos cellules sur un film de collagène que nos différentes sous-lignées de cellules MMT remaniaient cette matrice. Ainsi, alors que les cellules contrôles s'agençaient en « vagues » cellulaires le long de fibres relativement alignées ce collagène, les cellules MMT DB développaient au sein du tapis cellulaire des structures en paquets, riches en matrice (Fig. 19b). Les cellules MMT Ets-1, quant à elles, formaient une monocouche de cellules où les fibres de collagène semblaient être réparties de façon relativement homogène (Fig. 19b). Il est possible que les fortes activités métalloprotéasiques de ces cellules soient responsables d'une digestion exacerbée de cette matrice qui ne pourrait alors pas s'organiser sous forme de longues fibres, bien qu'il faudrait inhiber les protéases de la matrice pour vérifier cette hypothèse.

Finalement, nous nous sommes demandés si la production différentielle de matrice par nos sous-lignées MMT avait lieu aussi dans les tests de croissance en agar mou, ce qui pourrait contribuer à leurs différences de croissance. Effectivement, après coloration des fibres de réticuline sur nos coupes de gels de culture en agar, nous avons observé une nette réduction de la production de cette matrice suite à la surexpression d'Ets-1 dans les cellules MMT (Fig. 19c). Il a précédemment été décrit que la présence de fibronectine ou de laminine stimulait la croissance de cellules cancéreuses mammaires en agar (Saulnier et al., 1996) (Zahir et al., 2003). Ces protéines matricielles, en fournissant un certain support aux cellules, transmettent des signaux propices à la survie et à la prolifération de ces cellules. Il serait intéressant de mieux comprendre la régulation de leur expression par Ets-1 dans notre modèle, d'autant plus que ces molécules peuvent également influencer sur le caractère migratoire des cellules



**Figure 19. Ets-1 régule le dépôt et le remaniement de la matrice extracellulaire par les cellules MMT.**

a. Coloration au rouge Sirius des fibres de collagène produites par les cellules MMT cultivées sur plastique. Après fixation des cellules au paraformaldéhyde et rinçage au PBS puis à l'eau distillée, les boîtes ont été incubées pendant 30 minutes avec une solution de rouge sirius dilué à 0,1% dans une solution aqueuse saturée en acide picrique. A la fin de la coloration, 3 brefs rinçages à l'eau distillée ont été réalisés, puis le liquide résiduel aspiré et les boîtes mises à sécher. b. Coloration au rouge Sirius des fibres de collagène produites et/ou remaniées par les cellules MMT ensemencées dans des boîtes de plastique recouvertes d'un film à 0,5mg/mL de collagène de type I, et cultivées sur cette matrice pendant une semaine. c. Les cellules MMT ont été cultivées sans ancrage en agar mou pendant 3 semaines, comme indiqué dans l'article p. puis des coupes de ces gels d'agar ont été réalisées. Les fibres de réticuline ont été colorées selon un protocole classique alternant successivement des bains en acide périodique, carbonate d'argent lithiné, eau ammoniacale, eau formolée, chlorure d'or, acide oxalique et hyposulfite de sodium, puis la contre-coloration des cellules a été réalisée au rouge nucléaire Kernechtrot. Barres d'échelle 100µm

## 2.4. Conclusion/discussion

Dans cette partie de nos travaux, nous décrivons donc pour la première fois une implication du proto-oncogène Ets-1 dans la répression de la croissance de cellules tumorales. Bien que ce résultat soit assez surprenant au vu du paradigme qui veut qu'un oncogène accélère la croissance tumorale, d'autres études montrent également que le caractère invasif des cellules cancéreuses peut s'accompagner d'une réduction de leur prolifération. Des travaux effectués sur des cellules de gliomes avaient suggéré que l'inhibition de leur prolifération, lors du passage d'une culture sur plastique à une culture en gels de matrice, était probablement un prérequis à leur migration active (Koochekpour et al., 1995). Cet équilibre entre prolifération et migration a également été décrit sur des analyses de biopsies humaines. Par exemple, des tumeurs du sein présentant une forte expression de la E-cycline ont un aspect peu invasif (Berglund et al., 2005). Réciproquement, le front d'invasion des cancers colo-rectaux montre une faible prolifération, et cette caractéristique corrèle avec un mauvais pronostic vital (Palmqvist et al., 1999), ce qui renforce la notion que la migration induite par Est-1 dans les cellules cancéreuses mammaires constitue un trait d'agressivité.

Le caractère de dispersion exacerbée des cellules MMT surexprimant Ets-1 suggérait un rôle potentiel d'Ets-1 dans les capacités métastatiques des cellules cancéreuses mammaires. Les modèles de tumeurs primaires étant peu adaptés à l'étude du processus de métastase, nous avons injecté les différentes cellules en intraveineuse, chez la souris nude toujours. Ce modèle s'est toutefois avéré plus relevant des capacités de nos cellules à croître dans le parenchyme pulmonaire, sans qu'Ets-1 n'influe significativement sur l'incidence des foyers métastatiques pulmonaires. Nous pensons qu'Ets-1 interviendrait plutôt au niveau des premières étapes de la métastase, mais n'avons pour l'instant pas réussi à appréhender correctement ces étapes précoces *in vivo*. Il est cependant intéressant de noter que l'effet délétère d'Ets-1 sur la croissance des cellules MMT a pu être confirmé dans les poumons, qui sont une localisation assez fréquente des métastases des cancers du sein. Nous reviendrons plus en détail sur ces points dans la discussion générale.

Les observations principales effectuées sur cet aspect de ma thèse sont récapitulées dans le tableau suivant :

	MMT neo	MMT Ets-1	MMT DB
prolifération sur plastique	+	+	+
prolifération sur matrice	+	+	+
densité cellulaire en gels de matrice 3D	+	+/-	++
invasion individuelle <i>in vitro</i>	+	++	-
croissance sans ancrage en agar mou	+	-	++
croissance <i>in vivo</i>	+	+/-	++
invasion <i>in vivo</i>	+	++	-
développement des foyers métastatiques pulmonaires	+	+/-	++

Il serait intéressant de comprendre comment Ets-1 affecte le cycle des cellules MMT. Toutefois, l'analyse par cytométrie de flux des cellules cultivées en gels de matrice pose le problème de la récupération des cellules. Il faut en effet dégrader la matrice sans affecter les cellules, et de plus, celles-ci sont parfois engagées dans des structures jointives qui ne permettent sans doute pas leur individualisation. Les mécanismes moléculaires mis en jeu sont également plus difficiles à étudier dans de tels modèles, car la récupération des cellules et de leurs protéines, dans un état non dégradé et en quantité suffisante, se trouve être compliquée à réaliser. Les méthodes d'immunocytochimie sont les plus faciles à mettre en oeuvre, bien qu'elles ne fournissent qu'une mesure semi-quantitative de l'expression des molécules. Parmi les molécules candidates pour le blocage de la croissance induit par Ets-1, l'inhibiteur de cdk (cyclin-dependent kinases) p16INK4a retient notre intérêt majeur pour plusieurs raisons. C'est une cible connue d'Ets-1 (Ohtani et al., 2001), qui est impliquée dans l'induction du blocage du cycle et de la sénescence de cellules normales en réponse à l'oncogène Ras (Huot et al., 2002). De plus, p16INK4a a été corrélé à la faible prolifération au niveau du front d'invasion des cancers colo-rectaux (Palmqvist et al., 2000), ce qui suggère que dans un cadre cancéreux il puisse bloquer le cycle au profit de l'invasion, sans induire pour autant d'arrêt irréversible du cycle. Il nous reste maintenant à étudier la potentielle régulation par Ets-1 de son expression dans nos modèles.

Par ailleurs, la production différentielle de matrice par les différentes sous-lignées MMT (cf fig.17) pourrait aussi affecter leur survie *in vivo*. Nous avons effectivement observé dans les tests TUNEL (cf fig.4 à la p.13 de l'article 2) que les cellules MMT en contact avec le greffon de Matrigel dans les tumeurs primaires étaient très peu apoptotiques (données non montrées). La production de matrice par les cellules MMT DB dans le reste de la tumeur pourrait donc favoriser la croissance de la tumeur en réduisant l'apoptose des cellules.

Quoiqu'il en soit, nos résultats indiquent que la surexpression d'Ets-1 dans les cellules cancéreuses mammaires induit à la fois une invasion accrue et un ralentissement de leur croissance, dans des modèles pertinents de culture tridimensionnelle *in vitro* et *in vivo*. La possibilité que cette surexpression d'Ets-1 soit induite par l'environnement et provoque une transition dans les stratégies de croissance de la tumeur, d'une simple expansion du volume vers la conquête de nouveaux territoires, est évaluée de manière plus détaillée dans la discussion générale de cette thèse.

## **3. Ets-1 contrôle le potentiel angiogénique des cellules mammaires cancéreuses**

### **3.1. Introduction**

Afin d'étudier le rôle du facteur de transcription d'Ets-1 sur les capacités angiogéniques des cellules MMT, j'ai utilisé une lignée de cellules endothéliales murines normales, les cellules MSS-31 (Mouse Spleen Stroma) (Yanai et al., 1991), obtenues auprès du Dr Yanai. J'ai ensuite mis au point différents systèmes de co-culture de ces cellules avec les cellules MMT, pour essayer d'appréhender le rôle d'Ets-1 dans différents aspects des interactions entre ces deux types cellulaires. Les premiers modèles ont simplement consisté à récupérer les milieux conditionnés par un type cellulaire et à les administrer à des cultures de l'autre type cellulaire. Après avoir initié ces expériences sur plastique, je suis passé à des modèles plus pertinents en matrice tridimensionnelle, qui m'ont permis notamment d'obtenir des résultats quant au rôle d'Ets-1 dans les capacités des cellules MMT à induire la formation de pseudo-capillaires par les cellules endothéliales. J'ai ensuite développé des systèmes de co-culture des cellules endothéliales et des cellules cancéreuses, marquées respectivement par différents fluorochromes intravitaux. J'ai également mis en évidence un rôle complexe d'Ets-1 dans les phénomènes de chimioattraction des deux types cellulaires, par des systèmes de chambres microporées, et la modulation de leur capacité à interagir physiquement.

Nous nous sommes ensuite attachés à décrire l'angiogenèse des tumeurs primaires induites par l'injection en sous-cutané de nos différentes sous-lignées MMT dans des souris nude. Nous avons ainsi montré que les profils de vascularisation de ces tumeurs étaient différents.

### **3.2. Résultats**

Ces résultats ont fait l'objet d'un poster présenté lors du congrès annuel de la Tumor Microenvironment Society en Mars 2007 (cf annexe 3 p.111). De plus, un manuscrit intitulé : *Ets-1 overexpression in mammary cancer cells promotes their interactions with endothelial cells*, en cours de préparation, est fourni ci-après.



# **Ets-1 controls the induction of angiogenesis by mammary tumoral cells *in vitro* and *in vivo***

Authors :

**Alessandro FURLAN <sup>2</sup>, Chantal VERCAMER <sup>2</sup>, Fabrice SONCIN <sup>2</sup>, Nicolas WERNERT <sup>3</sup>, Xavier DESBIENS <sup>2</sup> and Albin POURTIER <sup>1,2</sup>.**

Address :

<sup>2</sup> : UMR-8161 « Institut de Biologie de Lille », CNRS/ Université de Lille-1/ Université de Lille-2/ Institut Pasteur de Lille, BP 447, F-59021 Lille CEDEX, France.

<sup>3</sup> : Institute of Pathology, University of Bonn, PO Box 2120, 53011 Bonn, Germany

<sup>1</sup> : Corresponding author

[albin.pourtier@ibl.fr](mailto:albin.pourtier@ibl.fr)

tel: 00 33 3 20 87 11 02

fax: 00 33 3 20 87 11 11

Running title: Ets-1 controls mammary tumor angiogenic induction

Key words: mammary; tumor; Ets-1; angiogenesis; invasion; matrix.

## ABSTRACT

Ets-1 transcription factor overexpression in breast cancers correlates with poor prognosis. To address whether Ets-1 overexpression in carcinoma cells could affect their ability to induce angiogenesis, we overexpressed Ets-1 or a dominant negative mutant in murine mammary tumor MMT cells, and performed cocultures of these cells with endothelial cells. Conditioned media from cancer cells induced proliferative and migratory responses of endothelial cells cultured on plastic. Interestingly, conditioned media from endothelial cells triggered the opposite effects on mammary cancer cells. However, coculture assays in three-dimensional matrix models revealed reciprocal induction of morphogenesis by each cell partner. In these experiments, Ets-1 emerged as a key regulator of the angiogenic potential of mammary cancer cells. Its overexpression in these cells actually enhanced their ability to induce the morphogenesis of endothelial cells but also to physically interact with them *in vitro*. Assessment of MMT primary tumors revealed that Ets-1 greatly affected their vascularization pattern. Altogether, our data highlight Ets-1 critical and intriguing role in the angiogenic potential of mammary cancer cells.

key words: breast cancer, Ets-1, transcription factor, endothelial cells, interactions

## INTRODUCTION

Breast cancers are the first cause of death among women of industrialized countries. Breast cancers are most often angiogenic, i.e. they induce the development of neo-vessels to their profit. These vessels will allow them to get oxygen and nutrients through the blood supply, but also to reach the systemic circulation to establish secondary tumors. This process of metastasis is responsible for several complications such as pain, especially in the case of bone metastases, and leads to over 80% of all cancer deaths (Jechlinger et al., 2002). Angiogenesis was associated with poor prognosis for breast cancer patients (Hansen et al., 2000). Sprouting angiogenesis occurs through a process of branching morphogenesis and requires endothelial cell proliferation, migration and maturation to form new capillaries. The latter step of differentiation is often missing during tumoral angiogenesis, which leads to more permeant vessels that are hardly effective, but facilitate the access of tumor cells to the systemic circulation (Sivridis et al., 2003). A better understanding of the mechanisms that induce cancer cells to trigger the angiogenic response should provide precious data in order to target this critical phenomenon in cancer progression.

The Ets-1 proto-oncogene (LePrince et al., 1983), the founder of the ETS family of transcription factors, is a critical regulator of invasion induced by dialogues between epithelium and mesenchyme, during both normal and cancerous breast development. Ets-1 is overexpressed in breast cancers by both carcinoma cells and surrounding stroma. Ets-1 overexpression is associated with a poor prognosis (Span et al., 2002). We previously showed that the overexpression of Ets-1 stimulated murine mammary tumor MMT cell scattering in 3D matrix gels, through coordination of the expression of several classes of invasion-related molecules (Furlan et al, in press). Interestingly Ets-1 is also overexpressed in the stromal compartment of tumors, by fibroblasts and endothelial cells (Wernert et al., 1994). Moreover, Ets-1 activity in endothelial cells proved to be crucial for normal and tumor angiogenesis (Pourtier-Manzanedo et al., 2003) (Hashiya et al., 2004). As Ets-1 potentially regulated several soluble factors involved in angiogenesis, such as growth factors or extracellular matrix proteases, we wondered whether Ets-1 overexpression by mammary cancer cells could affect their angiogenic potential, beyond the involvement of Ets-1 expression in the endothelial compartment. This potential role of Ets-1 in the angiogenic induction by mammary cancer cells could contribute, in parallel with enhanced invasion, to the aggressiveness of Ets-1 overexpressing cancers.

To address this issue, we performed cocultures of murine mammary carcinoma MMT cells with normal murine endothelial cells MSS-31 (Yanai et al., 1991). We manipulated Ets-1 activity in MMT cells, as previously described in (Furlan et al, in press), by either overexpressing Ets-1 or a dominant negative mutant. We investigated the effects of such manipulations on the communications between our different MMT cell sublines and MSS-31 cell line. We analyzed the effects of the conditioned medium from one cell type on the proliferative, migratory or morphogenetic answer of the other cell type, in three-dimensional matrix models when possible. We also performed direct cocultures of both cell types labeled with different intravital fluorochromes.

Such models indeed recreate a more relevant environment and allowed us to mimick several aspects of physiological formation of capillaries. Proliferation, migration, morphogenesis, chemoattraction and interactions were studied. Finally, the relevance of our *in vitro* observations was assessed by comparing the angiogenic pattern of tumors induced by our different MMT cell sublines in nude mice.

## RESULTS

### **Ets-1 transcription factor modulates the ability of mammary cancer cells to induce the migration but not the proliferation of endothelial cells.**

MMT cells were infected by MFG retroviral vectors (Fig.1 a), as previously described in (Furlan et al, in press) to overexpress Ets-1 or the dominant negative mutant DB (for DNA Binding domain).

To assess the impact of these manipulations on cancer cell angiogenic ability, the conditioned media from our different MMT cell sublines were administered to MSS-31 murine endothelial cells for 5 days. MMT cells stimulated the proliferation of MSS-31 cells; however Ets-1 overexpression did not significantly affect this increase in MSS-31 cell number (Fig.1 b). We further investigated whether Ets-1 manipulation affected the potential of MMT cell conditioned medium to induce migration of endothelial cells. MSS-31 cell cultures at subconfluence were wounded and subjected to the conditioned medium of our MMT cell sublines. Ets-1 overexpression in MMT cells promoted the migration of MSS-31 cells in the wound, while the expression of the dominant negative DB mutant reduced it (Fig.1 c).

### **Ets-1 transcription factor modulates the ability of mammary cancer cells to induce capillary-like morphogenesis of endothelial cells.**

The branching morphogenesis of endothelial cells in three-dimensional matrix gels recapitulates several aspects of physiological capillary formation. Proliferation and migration of endothelial cells are both required for angiogenesis. To gain more relevant insight into angiogenic induction by MMT cells, we cultured endothelial cells upon mixtures of type I collagen and Matrigel™. MSS-31 cells formed a layer upon these matrix gels when cultured with 5% serum in the medium (Fig.2 a, A). Addition of conditioned media from MMT neo cells stimulated their morphogenesis (Fig.2 a, B), especially when MMT cells overexpressed Ets-1 (Fig.2 a, C). In contrast, dominant negative mutant DB expression in MMT cells reduced their ability to induce the morphogenesis of endothelial cells (Fig.2 a, D).

Matrix metalloproteinases are known to regulate endothelial cell morphogenesis. To assess their involvement in the ets-1-mediated stimulation of endothelial morphogenesis, we cultured endothelial cells in gels containing quenched type IV collagen. The cleavage of this modified collagen by gelatinases results in fluorescence. We performed these experiments in serum-free conditions, in

order to remove any effect from serum-derived proteases. Under these conditions, endothelial cells hardly proliferated, and most often kept a rounded shape (Fig.2 b, E). Nevertheless, addition of conditioned media from MMT cells favored their morphogenesis. Conditioned media from MMT Ets-1 cells promoted the morphogenesis of MSS-31 cells in a more pronounced manner, when compared to those of MMT neo cells, whereas DB expression in MMT cells reduced this effect (Fig.2 b, E,F, G and H). Gelatinases activity could be observed at the location of cells in all conditions (Fig.2 b, I,J, K and L), but no quantification of that fluorescence could be made. Media from MSS-31 cultures were harvested, just after or 24 hours after the addition of conditioned media from MMT cell sublines, to analyze their gelatinolytic activity by zymography. MMP-9 activity was mainly derived from MMT conditioned media, as there was almost no activity in the control condition (column 1, fig.2c). MMP-9 activity level ranked following this order: MMT DB cells < MMT neo cells < MMT ets-1 cells (respectively columns 4, 3 and 2, fig.2c). Twenty-four hours post-administration, MMP-9 activities were decreased in the media containing MMT cell conditioned media (columns 6, 7 and 8 compared to columns 2, 3 and 4, fig.2c). This decrease in activity was not due to heat degradation as the same samples were not affected by 24 hours acellular incubation at 37°C (data not shown). In parallel, MSS-31 cell membrane extracts gained MMP-9 activities, that correlated with MMP-9 activities present in MMT cell conditioned media (data not shown). This could however be due to either MMP-9 recruitment or production by MSS-31 cells. We hence performed short cellular incubations to eliminate the latter hypothesis. After an incubation of 5 minutes with MMT cell conditioned media or control medium, MSS-31 cells were thoroughly rinsed three times and lysed. While MSS-31 cell membrane extracts in control conditions displayed no evident activity (column 9 fig.2. c), those incubated with MMT cell conditioned media possessed MMP-9 activities corresponding to MMT cell productions (columns 10, 11 and 12, compared with columns 2, 3 and 4, fig.2. c).

Several growth factors have angiogenic effects. We focused our attention on HGF/SF (Hepatocyte Growth Factor / Scatter Factor) and VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), which is one of the most potent angiogenic factors. We studied whether Ets-1 controlled their level of expression and secretion in MMT cells, by Western blotting of the conditioned media from our MMT cell sublines. We had previously demonstrated that Ets-1 mediated HGF/SF activation in MMT cell lysates (Furlan et al, in press). In this study, HGF/SF was detected in MMT cell conditioned media as 50, 60 and 70kDa isoforms, which amounts were enhanced in MMT Ets-1 cells and reduced in MMT

DB cells, in comparison with MMT neo cells (respectively columns 2, 3 and 1 in Fig.2 d). Surprisingly Ets-1 overexpression reduced the levels of two VEGF isoforms of approximately 40 kDa in MMT conditioned media (Fig. 2e, column 2 compared with column 1), whereas the expression of the dominant negative mutant DB enhanced them (Fig. 2e, column 3 compared with column 1).

### **MSS-31 endothelial cells reduce proliferation and migration of MMT cells on plastic**

We then wondered whether MSS-31 endothelial cells could reciprocally modify MMT cell behavior. We first assessed the ability of their conditioned media to influence MMT cell proliferation. Interestingly, after several days of culture, the conditioned medium from MSS-31 cells greatly reduced the proliferation of our various MMT cell sublines (Fig.3 a). This conditioned medium was also administered to wounded MMT cell cultures, and similarly inhibited their migration, as could be visualized 24 hours post-treatment (Fig.3 b).

### **Coculture of fluorescently-labeled MMT and MSS-31 cells evidences stimulation of MMT cell morphogenesis by endothelial cells, and Ets-1-promoted MMT cell interactions with MSS-31.**

We further studied the communication between MMT and MSS-31 cells in direct coculture systems. We first cultured MSS-31 cells above matrix gels containing MMT cells. The morphogenesis of our MMT cell sublines under control conditions, i.e. without endothelial cells above them, was characteristic of previously described features, namely Ets-1 overexpression triggered bushy invasion (picture B, Fig.4 a) while dominant negative DB expression induced the expression of thicker tubules (picture C, Fig.4 a). Culture of MSS-31 cells above such gels induced a more scattered morphogenesis of underlying MMT cells (pictures D, E and F respectively compared to A, B and C, Fig.4 a).

The development of the endothelial cell capillary-like network, as evidenced by intravital fluorescent staining of MSS-31 cells with the fluorochrome diO (Molecular Probes), was enhanced when underlying MMT cells overexpressed Ets-1 and reduced when they expressed the DB mutant (pictures H and I respectively compared to picture G in Fig.4 b). We then respectively labeled MMT and MSS-31 cells with dil and diO prior to their seeding upon matrix coatings. Both MMT and MSS-31 developed small morphogenetic structures. Interestingly, the colocalization of cancer and endothelial

structures was reduced when MMT cells expressed the dominant negative mutant DB (picture L compared to pictures J and K in Fig.4 c)

**Ets-1 overexpression in MMT cells reduces their chemoattractive potential on endothelial cells, but promotes their migration towards and their adherence to MSS-31 endothelial cells.**

In order to understand whether the differences described above in the interactions between cancer and endothelial cells were linked to chemotactic events regulated by Ets-1, we performed coculture assays in Boyden chambers. MMT cells were seeded upon Transwell inserts in plates where endothelial MSS-31 cells, or their culture medium as a control, had been previously added on the bottom of the wells. The presence of MSS-31 cells in this assay repressed the migration of our different MMT cell sublines (Fig.5 a). MMT Ets-1 cells were the most motile among MMT cells, in the presence or absence of MSS-31 cells. The reciprocal experiment was carried out, MSS-31 cell migration through the inserts being assessed in the presence or absence of MMT cell sublines in the bottom compartment. Strikingly, Ets-1 overexpression in MMT cells dramatically reduced their chemoattractive potential on endothelial cells, whereas the expression on the DB mutant enhanced it (Fig.5 b).

The possibility that Ets-1 regulated processes of adhesion between cancer and endothelial cells was evaluated by fluorescently labeling our MMT cell sublines prior to their seeding on a confluent monolayer of MSS-31 cells. The amount of MMT Ets-1 cells that were adherent to this endothelial layer after an incubation of 30 minutes was greater than that of MMT neo cells, while that of MMT DB cells was reduced (Fig.5 c). The expression by MMT cells of molecules potentially involved in that adhesion was investigated. The expression of the endothelial adhesion molecule VE-cadherin was enhanced in MMT Ets-1 cells and reduced in MMT DB cells when compared to MMT neo cells (Fig.5 d)

**Ets-1 affects the vascularization of MMT cell tumors.**

We finally tested *in vivo* the relevance of our *in vitro* observations concerning this regulation by Ets-1 of the interactions between cancer and endothelial cells. The several MMT cell sublines had been previously subcutaneously injected in nude mice after mixing with Growth Factor reduced Matrigel™, in order to facilitate tumor take. We analyzed the pattern of vascularization of the primary



tumors that developed *in vivo*. Immunostaining of the endothelial marker CD31 was performed on the various tumor sections. While Ets-1 manipulation in MMT cells did not significantly affect the quantity of vessels in these tumors (Fig.6 a), it modified the phenotype of these vessels. Indeed, MMT DB tumors had vessels of larger diameter when compared to MMT neo tumors, whereas MMT Ets-1 tumor vessels were smaller (Fig.6 b).

## DISCUSSION

The overexpression of Ets-1 transcription factor in breast cancers is correlated with a poor prognosis (Span et al., 2002). In previous works, we demonstrated that Ets-1 orchestrated the invasion of mammary carcinoma cells within their matrix environment. The metastatic dissemination of cancer cells involves increased cell motility but also requires the interactions of cancer cells with blood vessels in order to gain distant localizations. In this study, we aimed at defining whether Ets-1 overexpression in mammary tumor cells could affect their angiogenic abilities. Cancer cell invasion and angiogenesis indeed share some common molecular actors, among which matrix proteases and growth factors.

In the present work, we provide evidence that Ets-1 controls the angiogenic potential of MMT cells both *in vitro* and *in vivo*. The first physiological mediators of interactions between cancer cells and endothelial cells are soluble factors that induce the recruitment of “distant” vessels or sprouting of neovessels. In our models, soluble factors contained in MMT cell conditioned media were able to stimulate the proliferation and migration of endothelial cells, which are important features for angiogenesis. Ets-1 overexpression in MMT cells enhanced the motile answer of endothelial cells, while it did not affect the proliferative induction, indicating that the impact of Ets-1 overexpression rather controlled the invasive feature of angiogenesis. This could also be observed in morphogenesis assays, in which invasive branching of endothelial cells was dramatically increased.

Ets-1 overexpression respectively induced the up-and down-regulation of HGF/SF and VEGF secretion by MMT cells. These opposite effects could reflect a complex role in the regulation of different angiogenic aspects. Indeed, it is possible that the balance between these two growth factors accounts for the absence of modulation of endothelial cell proliferation. Different angiogenic features, such as above-mentioned invasive morphogenesis or chemotactism, are however tightly controlled by Ets-1. With regard to chemotactism between cancer and endothelial cells, Ets-1 expression in MMT cancer cells displays a dual role. It indeed reduces the migration of endothelial cells towards cancer cells, in correlation with the decrease in VEGF secretion by these latter cells. Meanwhile, it also increases the motility of MMT cells, maybe in link with the enhanced HGF/SF activation previously described in (Furlan et al, in press), when these cells are alone but also when they are cultured in the presence of MSS-31 cells. The resulting addition of this opposite effects on chemoattraction between

cancer and endothelial cells is hard to define. Nonetheless, it is probable that, physiologically, dissociated cancer cells are more prone to migration than endothelial cells.

With regard to VEGF, we found two isoforms of molecular weights close to 40kDa, in the conditioned media of MMT cells. Recombinant murine VEGF migrated at the same distance in the gels. This molecular weight is described in the literature for VEGF under non-reducing conditions (Houck et al., 1992). It is possible that we detected non-reduced VEGF in our experiments, however more stringent reducing conditions did not allow us to reveal the presence of denatured VEGF in MMT cell conditioned media, probably due to reduced recognizing by the antibody we used. It is noteworthy that VEGF activity and bioavailability can be regulated at several levels. VEGF can indeed be sequestered by the extracellular matrix, and released from it subsequently to the cleavage of this matrix by plasmin or MMP-9 (Bergers et al., 2000; Houck et al., 1992). However proteases can also directly cleave the VEGF and affect its biological activities (Lee et al., 2005). Hence, the question of VEGF role in angiogenic induction, especially in three-dimensional matrix models is more complicated than a simple modulation of expression.

Despite the fact that they contain a lesser amount of VEGF, conditioned media from MMT Ets-1 cells were the most potent inducers of endothelial morphogenesis, suggesting that other secreted factors prevail over VEGF in our system. HGF/SF and MMPs could contribute to this morphogenetic effect. We previously demonstrated that Ets-1 activity in MMT cells induced HGF activation. In this study, we observed that 50, 60 and 70kDa isoforms were detected in the conditioned media, and that Ets-1 increased their amount in the conditioned medium. The smallest 50kDa isoform should correspond to the activated form present in the cell membrane extracts, as well as the bigger isoforms that could correspond to post-translational modifications such as glycosylation.

With regard to MMPs, we previously demonstrated that Ets-1 orchestrated their expression and activity in MMT cells. Among these MMPs, MMP-9 took our attention for several reasons. First, it is secreted in high amounts by MMT cells, and strongly controlled by Ets-1 in these cells. Second, tumor-secreted MMP-9 was demonstrated to induce angiogenesis (Mira et al., 2004). In our models, we found that MMP-9 latent form produced by mammary cancer cells was recruited by endothelial cells. As Ets-1 greatly promoted MMP-9 expression in MMT cells, the amount of proMMP-9 recruited by endothelial cells critically depended upon Ets-1 activity level in MMT cells. HGF/SF was also shown to enhance endothelial cell invasion through the up-regulation of MMPs (Wang and Keiser, 2000). It is

thus possible that the combined up-regulation by Ets-1 of both HGF/SF and MMP-9 levels act in concert to promote invasion.

HGF/SF-Met couple can stimulate angiogenesis (Michieli et al., 2004), but it was also described to favor adhesion of breast cancer cells to the endothelium (Mine et al., 2003). In that study, the authors could attribute this effect to up-regulation of CD44 expression. In our experiments we did not observe significant modulation by Ets-1 of CD44 expression, although Ets-1 promotes HGF/SF activation. This might be due to the direct regulation of CD44 by Ets-1, or to post-translational mechanisms. However that may be, Ets-1 overexpression promoted MMT cancer cell adhesion to MSS-31 endothelial cells. We identified VE-cadherin as a potential mediator of such an interaction. This adhesion molecule classically links adjacent endothelial cells, but can be expressed by aggressive cancer cells. This phenomenon, called vascular mimicry, can drive to the establishment of channels lined by cancer cells that can anastomose with endothelial vessels and are able to convey red blood cells (Hendrix et al., 2003; Maniotis et al., 1999). We observed in our systems the formation of morphogenetic structures composed of both cancer and endothelial cells (data not shown). Further investigation is now required to study the arrangement between these cells. In situ hybridization of the sequence that confers neomycine resistance will be soon performed to locate MMT cells and identify whether they are part of some vessel walls, and if Ets-1 influences this phenotype.

We postulate that VE-cadherin could also be involved in adhesion of cancer cells to the endothelium. In a previous study, we showed that Ets-1 up-regulated the expression of  $\beta 3$  integrin subunit. The integrin  $\alpha V\beta 3$  mediates cell adhesion to vitronectin. This interaction was described to contribute to the adhesion of ovarian cancer cells to endothelial cells (Leroy-Dudal et al., 2005). It is hence possible that the regulation by Ets-1 of the  $\beta 3$  subunit expression could partially account for this enhancement of adhesion.

Another striking observation of our study was the reciprocal communication between cancer and endothelial cells. The inhibition of MMT cancer cell proliferation and migration by endothelial cell conditioned media was quite surprising. TGF- $\beta$  is a known cytostatic factor that could be involved in this mechanism. Indeed, TGF- $\beta$  can also act synergistically with HGF/SF to promote morphogenesis (Soriano et al., 1998). Endothelial cell conditioned media in parallel triggered enhanced invasive phenotype of cancer cells in three-dimensional matrix gels. This reciprocal stimulation of invasive morphogenesis between cancer and endothelial cells is not surprising, given the fact that both

partners can express and share common molecular actors, such as HGF/SF and MMPs, for this process. Our study presents marked effects of endothelial cells on cancer cell proliferation, migration and morphogenesis. This stands in agreement with other works showing that endothelial cells affect cancer cell behavior beyond the supply of blood (Rak et al., 1996). It was indeed demonstrated that endothelial cells repress cancer cell apoptosis *in vivo* prior to the formation of vessels (Shan et al., 2004). It was also shown that primitive endothelial cells can control the developing endoderm during embryogenesis (Bahary and Zon, 2001). These data strongly suggest that additional attention should be paid to endothelial cells during tumor progression. Indeed, this cooperation for enhanced bushy morphogenesis in coculture assays suggests that a similar crosstalk could lead to enhanced invasion *in vivo*.

We hence studied whether tumor angiogenesis was affected by Ets-1 overexpression in MMT cancer cells. Histological staining for the endothelial marker CD31 revealed profound defects in the morphology of tumor vessels, as classically described. Although the average number of vessel units was not significantly modified, vessel morphology was considerably altered. While the expression of the DB dominant negative mutant in MMT cells led to the formation of vessels which diameter was larger when compared to that of MMT neo cells, MMT Ets-1 cells induced the development of thinner and collapsed vessels. This latest pattern is consistent with the abnormal phenotype of tumor angiogenesis and might indicate an aggressive behavior of MMT Ets-1 cells.

It is interesting to notice that although pseudo-tubule formation by endothelial cells was favored by Ets-1 expression in MMT cells in coculture assays, MMT Ets-1 tumors displayed smaller vessels. However, *in vitro* morphogenesis rather reflects the ability for cells to invade the matrix environment than the ability to develop large vessels. It is also possible that MMT DB tumors recruit or modify pre-existing vessels, and these events involve mechanisms different from those necessary for morphogenesis. Moreover, additional parameters influence the development of vessels *in vivo*, such as the blood flow shear stresses or the inflammatory cells recruited in the tumor stroma, parameters which are not recapitulated in *in vitro* models.

Ets-1 was previously demonstrated to favour MMT cancer cell scattering in their matrix environment (Furlan et al, in press). We show hereby that Ets-1 also promotes cancer cell communication and physical interactions with endothelial cells. Our *in vitro* experiments thus indicate that Ets-1 might act on the earlier steps of the metastatic process. Nguyen and Massague postulated

that several sets of genes could be necessary for the different steps of metastasis (Nguyen and Massague, 2007). In that point of view, Ets-1 would fall into the class of metastasis initiation genes, which notably underlie cancer cell motility, invasion and angiogenesis, and thus allow cells to escape from the primary tumor and find vessels to disseminate to distant organs. Unfortunately, there are so far few experimental approaches to assess these early steps in the metastatic cascade, and these models require sophisticated intravital imaging device (Sahai, 2007).

Taken together, these data constitute another step towards a better understanding of Ets-1 role in breast tumorigenesis. Besides its role in cell scattering and invasion, we show that Ets-1 also controls angiogenic potential of mammary cancer cells. This could facilitate the access to the systemic circulation for cancer cells, and contribute to the correlation between Ets-1 overexpression and poor prognosis.

## **MATERIAL AND METHODS**

### ***Cell culture***

Mouse Mammary Tumour epithelial cells (MMT, CCL-5, ATCC) were routinely cultured in DMEM (Biowhittaker) supplemented with penicillin, streptomycin, non essential amino acids, L-Glutamine and 10% fetal calf serum (Gibco). They were infected in parallel by supernatants from virus-producing GP+E86 cells transfected with MFG retroviral constructs to overexpress Ets-1 or a dominant negative mutant composed of the DNA Binding domain of Ets-1, as previously described in (Furlan et al, in press). Cultures were frequently reinitiated from deep-frozen stocks.

Murine endothelial MSS-31 (Mouse Spleen Stroma) cells were obtained from Dr N. Yanai (Yanai et al., 1991). They were grown in alpha MEM (Biowhittaker) supplemented with penicillin-streptomycin, glutamine and 10% fetal calf serum.

### ***Coculture models***

For two-dimensional and three-dimensional matrix models, we used a matrix substrate composed of type I collagen and Matrigels, as previously described in (Furlan et al., in press)

Conditioned media were prepared by respectively seeding  $3.10^6$  MMT or  $1.10^6$  MSS-31 cells suspended in 3mL appropriate medium upon 100mm-diameter Petri dishes coated with this matrix. Twenty-four hours later, cell culture supernatants were harvested, filtered through Millex 0.22 $\mu$ m filters, and stored at -80°C in Sorenson™ pre-lubricated tubes prior to their use.

For two-dimensional MSS-31 morphogenesis assays, 150 $\mu$ L of matrix was poured in 48-well plates and incubated for 30 minutes at 37°C. MSS-31 cells were then seeded at a density of 20 000 cells per well, in 5% FCS alphaMEM. An equal volume of conditioned medium from MMT cells, or DMEM as a control, was then added. Media were refreshed 4 days later, and the culture was pursued for two additional days. At the end of the experiment, cellular structures were stained with neutral red (0.1% in PBS) then fixed with 4% paraformaldehyde in PBS. Pictures were taken with a Leica DMIRB inverted microscope.

For three-dimensional MSS-31 morphogenesis assays, a first acellular layer of matrix was deposited in 48-well plates. Then DQ™ type IV collagen (D-12052, Molecular Probes) was added to the matrix solution, to reach a final concentration of 25 $\mu$ g/mL. MSS-31 cells were resuspended in that matrix

solution and seeded at a density of 25 000 cells per well. Serum-free conditioned media from MMT cells or DMEM were added and refreshed every four days. Pictures were taken under phase contrast light or epifluorescence with an Eclipse TE Nikon inverted microscope.

For direct coculture assays, MMT and MSS-31 cells were respectively labeled by dil and diO Vybrant™ Cell-Labeling solutions (V-22885 and V-22886, Molecular Probes), according to the manufacturer's instructions.

For three-dimensional cocultures, 4000 MMT cells suspended in 300 µL of matrix were seeded in 24-well plates above a first acellular layer matrix. Then a suspension of 2000 MSS-31 cells was added upon these gels. The morphogenesis of MSS-31 cells (Figure 4b) was photographed after one week of culture. Alternatively, we cultured in the same configuration 750 MMT cells in 100µL matrix and 1000 MSS-31 cells per well, to illustrate MMT cell morphogenesis (Figure 4a).

For two-dimensional cocultures, 500 MMT cells and 400 MSS-31 cells were seeded in matrix-coated wells of 16-well Lab-Tek chamber slides (Nunc™) and cultured for three days. Pictures were taken with a Leica DMIRB inverted microscope.

### ***Cell proliferation***

MSS-31 cells were seeded in 96-well plates at a density of 500 cells per well, and incubated with 30% of conditioned media from MMT cells, or DMEM as a control. Reciprocally, MMT cells were seeded at a density of 2000 cells per well, and incubated with a final proportion of 20% of conditioned media from MSS-31 cells or alphaMEM as a control. Media were refreshed every other day. Cell number was assessed by MTT assay.

MTT (M-2128, Sigma™) was added to the cell cultures to reach a final concentration of 0,5 mg/mL and plates were incubated for two hours at 37 °C. Viable cells transformed this salt in purple crystals, which were eventually dissolved by adding an equal volume of butan-2-ol/isopropanol/HCL 0,1N (4:2:1), and optical density was measured at 530nm.



### ***Wound assays***

MMT cells were seeded in 60mm diameter Petri dishes and grown until subconfluence. Wound was performed in the cell layer with a scrapper. Dishes were rinsed three times with fresh medium, then equal volumes of DMEM and conditioned medium from MSS-31 cells, or 5% FCS alphaMEM as a control, were added. Cell migration in the denuded area was recorded 24 hours later.

Alternatively, MSS-31 subconfluent cultures were wounded, and conditioned media from MMT cells or DMEM in control, in 5% FCS conditions, were added to a final proportion of 50%. Media were refreshed after five-day culture. Cell migration in the denuded area was photographed ten days after the wounding.

### ***Cell migration and invasion assays***

MSS-31 cells were seeded at a density of 20 000 cells per well in 24-well Companion plates (Falcon<sup>®</sup>). Twenty hours later, the medium of MSS-31 cells was refreshed by 5%FCS medium, and MMT cells were seeded under serum-free conditions in Transwell tissue culture filters with 8.0µm pore size (Falcon<sup>®</sup>), at a density of 25 000 cells per well. Conversely, 10 000 MMT cells per well were seeded in the wells of the Companion plates, and 15 000 MSS-31 cells per well were seeded upon the inserts. Cells were allowed to migrate for 30 hours, then non-migratory cells were removed from the top of the filter by swiping with humidified cotton swabs. Cells that had migrated through the filter pores to the lower face of the inserts were fixed in 4% paraformaldehyde in PBS, their nuclei were stained with Hoechst 5mg/L PBS, and counted. Values from the control conditions were set as the reference value of 1. Data are expressed as means of three independent experiments  $\pm$  SEs. Comparisons were made using the Mann and Whitney test. Results were considered statistically different when the *P* value was less than 0.05.

### ***Cell adhesion***

MMT cells were fluorescently labeled as described in the *Coculture models* chapter, and seeded in 12-well plates at a density of 50,000 cells per well, upon MSS-31 cell confluent monolayers. After 45 minutes of incubation, wells were rinsed three times by fresh medium, and plates were further incubated for 4 hours at 37°C in order that cells could complete their adhesion. Then cells were fixed with paraformaldehyde and observed under epifluorescence to count fluorescent MMT cells. Values from the control conditions were set as the reference value of 1. Results are means of three independent experiments  $\pm$  SEs. Comparisons were made using the Mann and Whitney test. Results were considered statistically different when the *P* value was less than 0.05.

### ***Western blot***

Cells cultured upon matrix coatings were subjected to hypotonic and thermic lysis as previously described in (Furlan et al., in press). Protein amounts were measured according to Bradford method. Proteins from membrane-enriched fractions or cell conditioned media were separated by PolyAcrylamide Gel Electrophoresis, then transferred to Nitrocellulose membranes. Blocking was performed with 5% non-fat dry milk in PBS Tween. Primary antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology Inc. for HGF/SF  $\alpha$ -chain (sc-7949), from R&D Systems for VEGF (AF-493-NA), and from Bender MedSystems™ for VE-cadherin (BMS158). Secondary peroxidase-conjugated antibodies were purchased from Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc. Peroxidase activity was recorded by chemoluminescent detection using ECL™ kit and Hyperfilm™ MP from Amersham Biosciences.

### ***Zymography***

Conditioned media or membrane-enriched fractions were analyzed for their gelatinolytic activities. Briefly, SDS-PAGE was performed under non-reducing conditions in 7.5% polyacrylamide gels containing 0.1% gelatin. Gels were then rinsed for 30 minutes in 10 mM Tris HCl / 2.5% Triton X-100 (pH8.0), and further incubated at 37°C for 20 hours in 50 mM Tris HCl, 0.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1  $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub> (pH 8.0) to restore gelatinases activity. Gels were stained in 0.25% Coomassie blue R250 and destained in 7% acetic acid plus 25% methanol. Gelatin degradation is detected by the appearance of translucent bands in the blue-stained gelatin background.

### ***In vivo experiments***

*In vivo* experiments were performed according to approved institutional guidelines. MMT cells were subcutaneously injected to female nu/nu BALB/c mice, with Growth Factor-Reduced Matrigel, at a density of 300 000 cells per 100 $\mu$ L plug. Four or five mice were used for each condition. Eight days later, mice were sacrificed and tumors fixed in PBS with 4% paraformaldehyde and processed for paraffin embedding. Immunohistodetection of the endothelial marker CD31/PECAM was performed as previously described in (Pourtier-Manzanedo et al., 2003). Briefly, deparaffinized 7 $\mu$ m tissue sections were deparaffinized and incubated for 30 minute at room temperature in PBS with 2.5 mg/mL to restore antigen accessibility. After inhibiting endogenous peroxidases, blocking was carried out in PBS containing 0.5% casein. Sections were incubated overnight at 4 °C with anti-CD31/PECAM antibodies (Pharmingen, 01951A), then sequentially incubated with biotinylated anti-rat immunoglobulins and avidin peroxidase. Peroxidase activity was revealed by DAB chromogen (Dako) and tissues were counterstained with Mayer hematoxylin.

### **AKNOWLEDGEMENTS**

This work was supported by le Ministère de l'Education Nationale, de la Recherche et des Technologies and by grants from Association pour la Recherche contre le Cancer, Comité du Nord de la Ligue Nationale contre le Cancer and la Société Française du Cancer.

## FIGURE LEGENDS

### **Figure 1. Ets-1 transcription factor modulates the ability of mammary cancer cells to induce the migration of endothelial cells, but not their proliferation.**

a. Schematic representation of MFG retroviral constructs used to infect MMT cells. b. MSS-31 cell density in response to conditioned media from MMT cells, or their control medium, was assessed by MTT assay after a 5-day culture and expressed in optical density units. Values are representative of three independent experiments. c. MSS-31 subconfluent cultures were wounded and incubated with conditioned media from MMT cells (B, C and D respectively correspond with MMT neo, MMT Ets-1 and MMT DB cells), or their control medium (A). Cultures were photographed 24 hours later. Scale bar 100 $\mu$ m.

### **Figure 2. Ets-1 transcription factor modulates the ability of mammary cancer cells to induce capillary-like morphogenesis of endothelial cells.**

a. MSS-31 cell morphogenesis on top of matrix gels, in response to conditioned media from MMT cells (B, C and D respectively correspond with MMT neo, MMT Ets-1 and MMT DB cells), or their control medium (A). Photographies were taken after a six-day culture. b. MSS-31 cell morphogenesis within matrix gels, in response to conditioned media from MMT neo (F and J), MMT Ets-1 (G and K) or MMT DB cells (H and L), or their control medium (E and I). Cells were cultured in serum-free conditions, in gels containing quenched type IV collagen. Photographies were taken after ten days culture, under phase contrast light (E, F, G and H) or epifluorescence (I, J, K and L). c. *Upper*. Gelatin zymography of supernatants from MSS-31 cultures, just after (columns 1, 2, 3 and 4) or 24 hours after (columns 5, 6, 7 and 8) the addition of conditioned media from MMT neo (lanes 2 and 6), MMT Ets-1 (columns 3 and 7) or MMT DB cells (columns 4 and 8), or their control medium (columns 1 and 5). Scale bars 100 $\mu$ m. *Lower*. Gelatin zymography of MSS-31 cell membrane extracts after 5 minutes incubation with conditioned media from MMT neo (lane 10), MMT Ets-1 (lane 11) or MMT DB cells (lane 12), or their medium in control (lane 9). d. HGF/SF secreted in the medium by MMT neo (lane 1), MMT Ets-1 (lane 2) or MMT DB cells (lane 3) was detected by Western blotting. e. VEGF secreted in the medium by MMT neo (lane 1), MMT Ets-1 (lane 2) or MMT DB cells (lane 3) was detected by Western blotting; recombinant murine VEGF was loaded as a control (lane 4).

**Figure 3. MSS-31 endothelial cells reduce proliferation and migration of MMT cells on plastic**

a. MMT cell density in response to conditioned media from MSS-31 cells, or their control medium, was assessed after a 4-day culture by MTT assay and expressed in optical density units. b. Subconfluent cultures of MMT neo (A and D), MMT Ets-1 (B and E) and MMT DB (C and F) cells were wounded and incubated with conditioned media from MSS-31 cells (D, E and F), or their control medium (A, B and C). Cultures were photographed 24 hours later. Scale bar 100µm.

**Figure 4. Coculture of fluorescently-labeled MMT and MSS-31 cells evidences stimulation of MMT cell morphogenesis by endothelial cells, and Ets-1-promoted MMT cell interactions with MSS-31.**

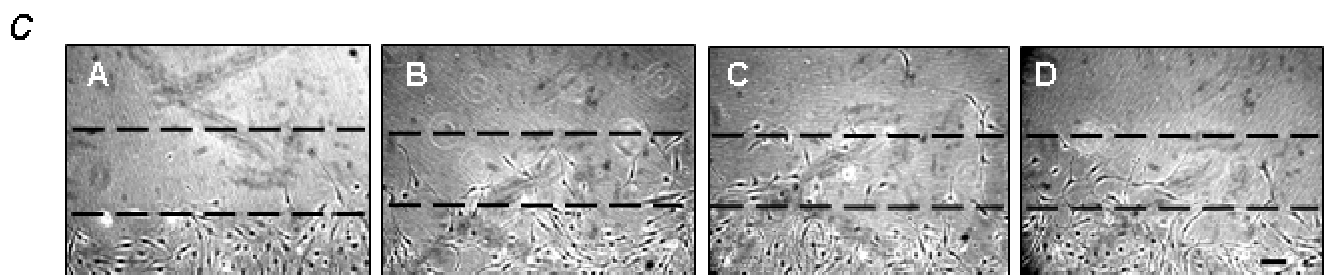
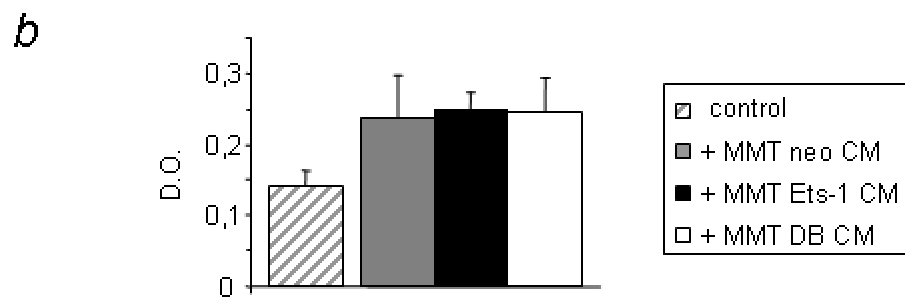
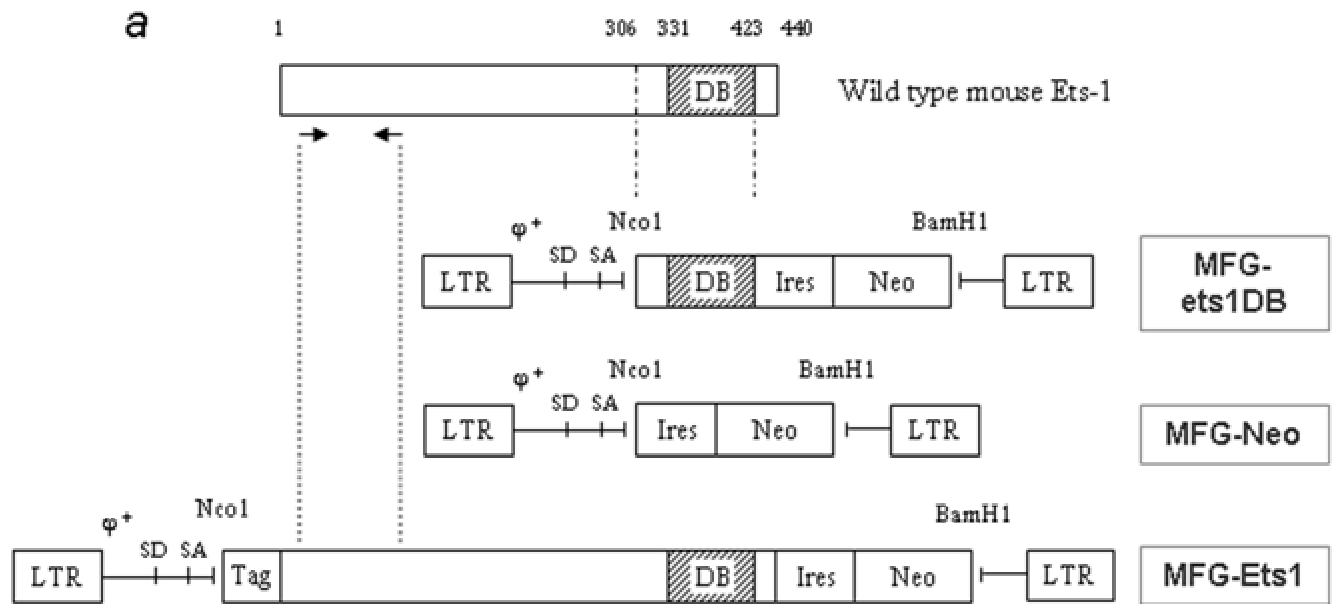
a. MMT neo (A, D), MMT Ets-1 (B, E) and MMT DB (C,F) cells were cultured within three-dimensional matrix gels, above which MSS-31 cells were deposited (D, E and F) or not (A, B and C). Photographies were taken after one-week culture. b. DiO-labeled MSS-31 cells cultured above MMT neo (G), MMT Ets-1 (H) or MMT DB (I) cells were visualized under epifluorescence prior to their fixation. c. Dil-labeled MMT neo (J), MMT Ets-1 (K) or MMT DB (L) cells were seeded with DiO-labeled MSS-31 cells upon matrix coatings and cultured for three days. Scale bar 100µm.

**Figure 5. Ets-1 overexpression in MMT cells reduces their chemoattractive potential on endothelial cells, but promotes their migration towards and their adherence on MSS-31 endothelial cells.**

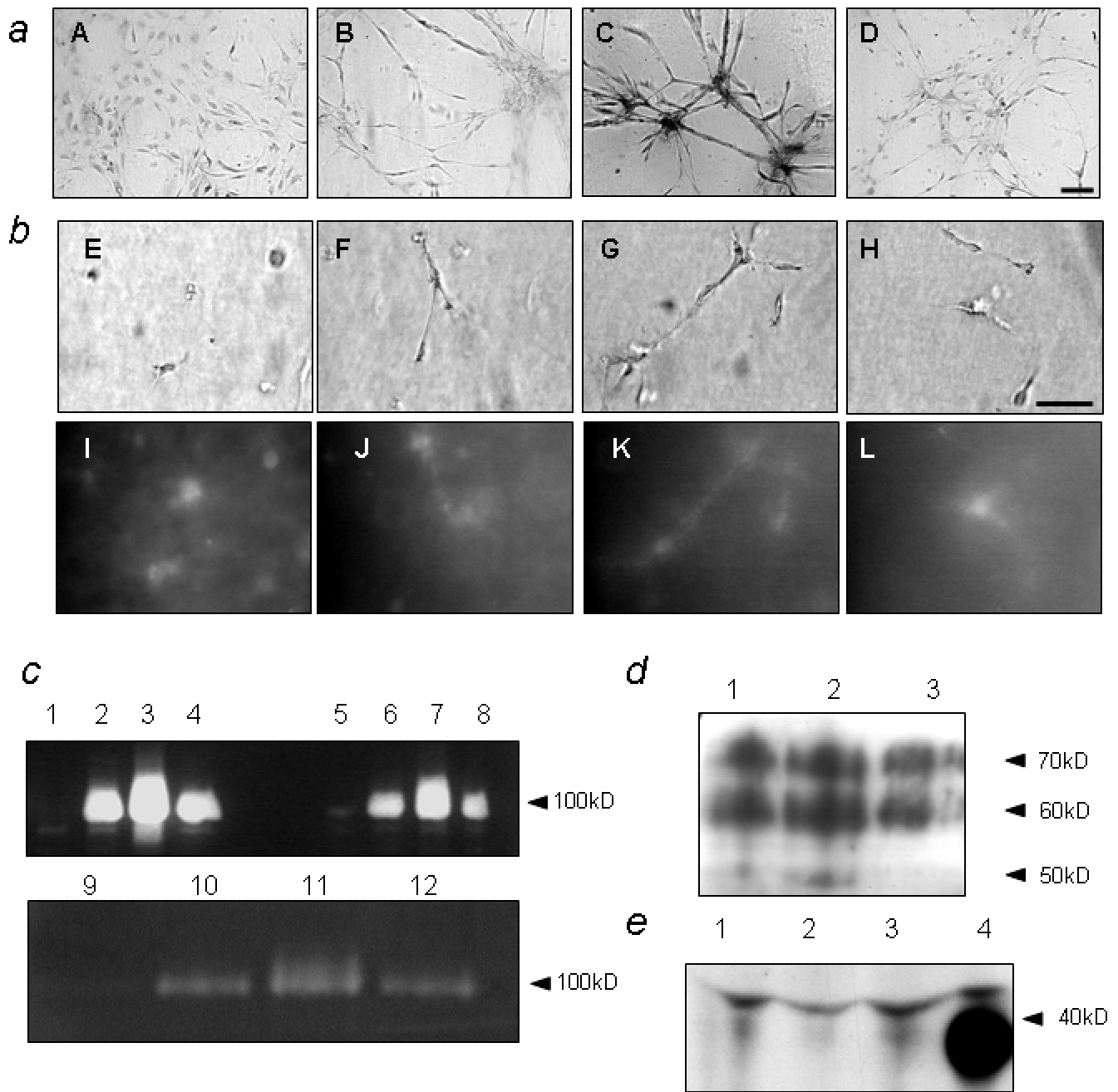
a. MMT cells were seeded upon Transwell® inserts, and allowed to migrate for 20 hours, in the presence or absence of MSS-31 cells in the lower chamber. Counts of cells that had migrated to the lower side of the filters are provided. Values are means of three experiments. \*  $P < 0.05$ . b. Conversely, MSS-31 cells were seeded upon Transwell® inserts, and transferred in wells where MMT cells had been seeded. c. MMT cell adhesion to endothelial cells was assessed 30 minutes after addition of suspensions of MMT cells upon confluent monolayers of MSS-31 cells. d. VE-cadherin expression was evaluated by Western blotting of MMT cell membrane extracts.

**Figure 6. Ets-1 affects the vascularization of MMT cell tumors.**

*a and b.* The angiogenic phenotype of tumors that developed from subcutaneous injections of our different MMT cell sublines in nude mice is illustrated by CD31 immunostaining of tumor sections. Two different magnifications are proposed in *a* and *b* to respectively show the overall angiogenic pattern of the tumors or the phenotype of the vessels. Scale bar 100 $\mu$ m. *c.* In situ hybridization of the sequence conferring neomycine resistance to MMT cells will be performed to visualize whether MMT cells contribute to the vessel walls.

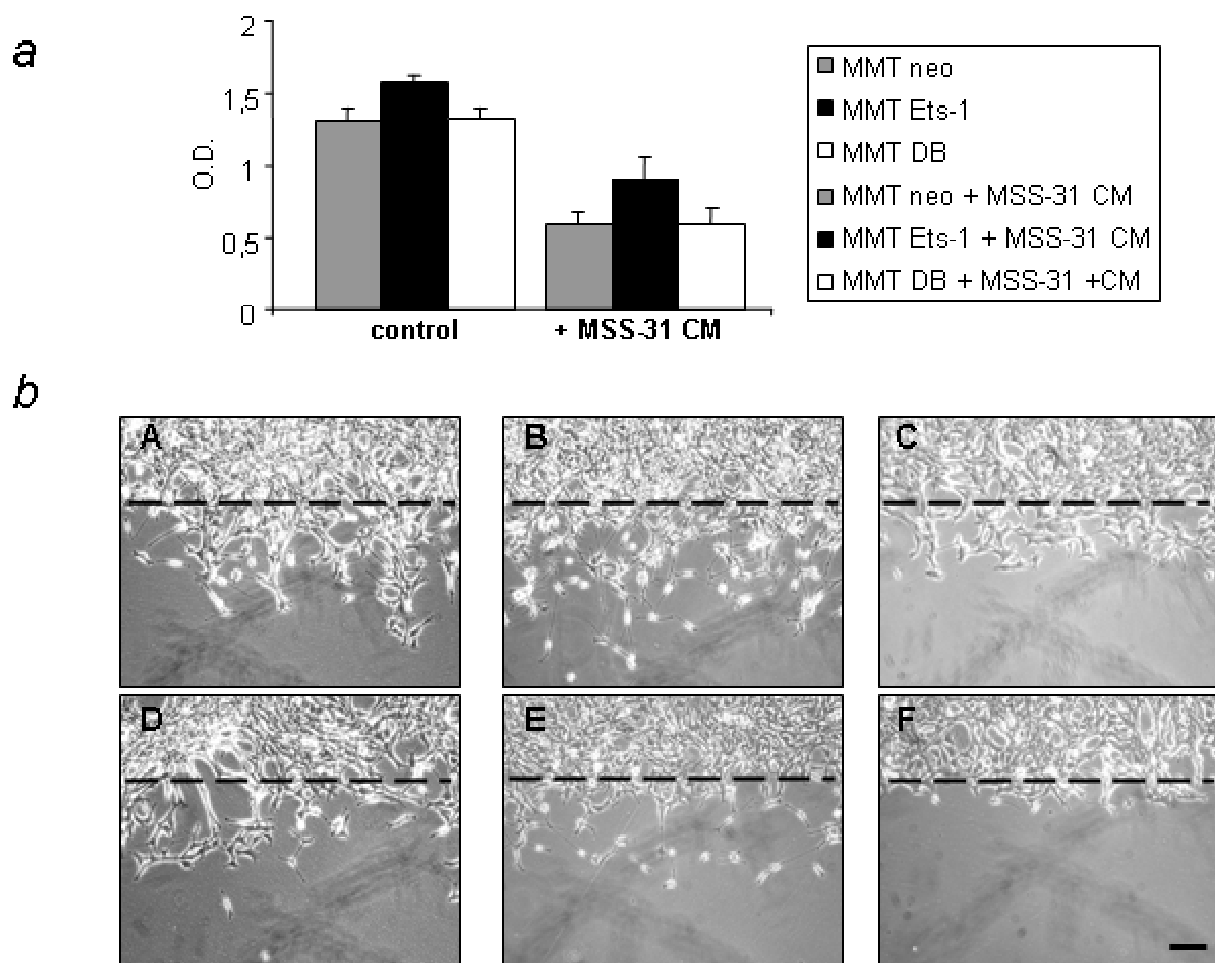


**FIGURE 1**

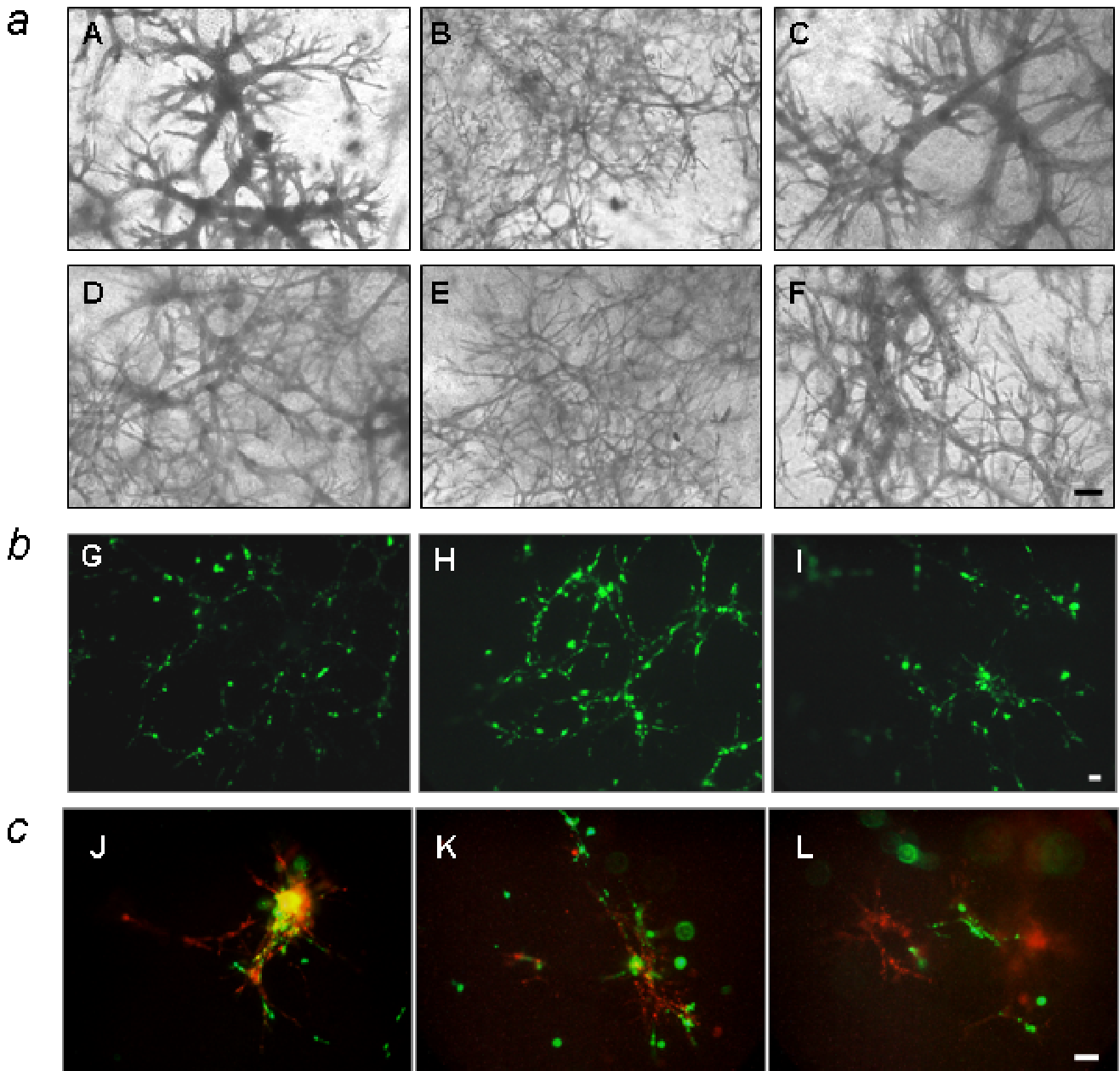


**FIGURE 2**

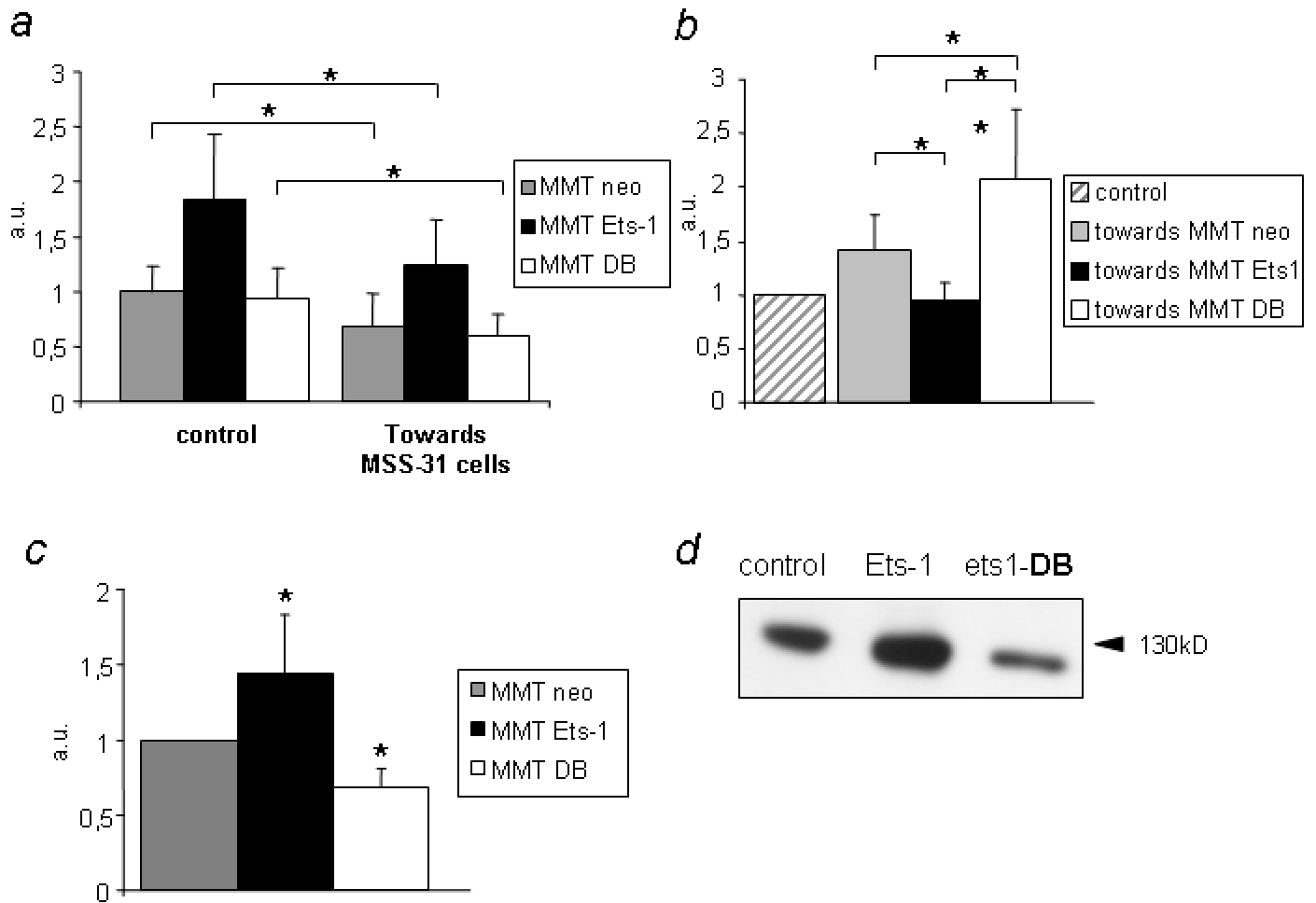




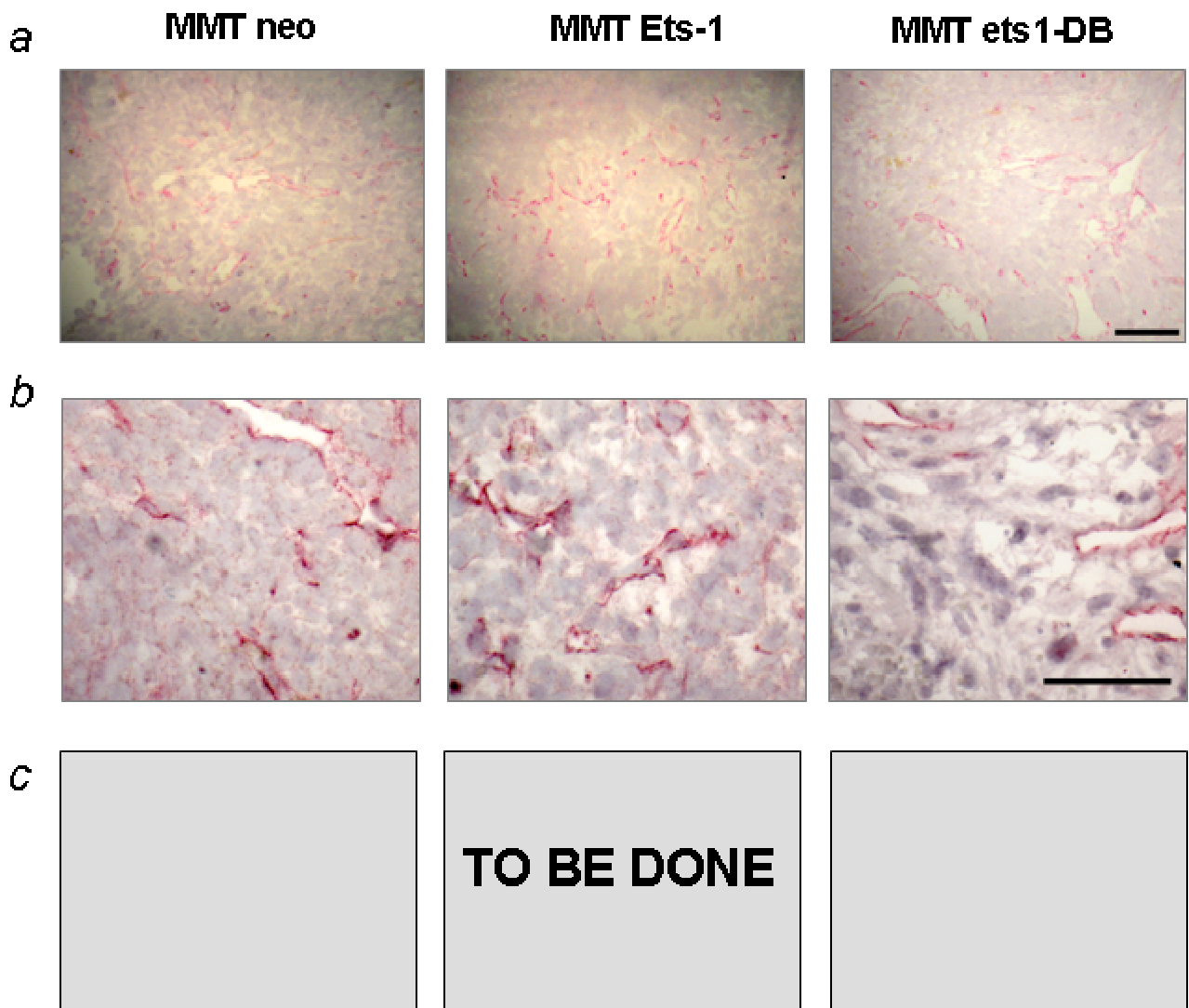
**FIGURE 3**



**FIGURE 4**



**FIGURE 5**



**FIGURE 6**

## BIBLIOGRAPHY

- Bahary, N. and Zon, L. I. (2001). Development. Endothelium--chicken soup for the endoderm. *Science* 294, 530-1.
- Bergers, G., Brekken, R., McMahon, G., Vu, T. H., Itoh, T., Tamaki, K., Tanzawa, K., Thorpe, P., Itohara, S., Werb, Z. et al. (2000). Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat Cell Biol* 2, 737-44.
- Furlan, A., Vercamer, C., Desbiens, X., and Pourtier, A. Ets-1 triggers and orchestrates the malignant phenotype of mammary cancer cells within their matrix environment, *accepted for publication in Journal of Cellular Physiology*.
- Hansen, S., Grabau, D. A., Sorensen, F. B., Bak, M., Vach, W. and Rose, C. (2000). The prognostic value of angiogenesis by Chalkley counting in a confirmatory study design on 836 breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 6, 139-46.
- Hashiya, N., Jo, N., Aoki, M., Matsumoto, K., Nakamura, T., Sato, Y., Ogata, N., Ogihara, T., Kaneda, Y. and Morishita, R. (2004). In vivo evidence of angiogenesis induced by transcription factor Ets-1: Ets-1 is located upstream of angiogenesis cascade. *Circulation* 109, 3035-41.
- Hendrix, M. J., Seftor, E. A., Hess, A. R. and Seftor, R. E. (2003). Vasculogenic mimicry and tumour-cell plasticity: lessons from melanoma. *Nat Rev Cancer* 3, 411-21.
- Houck, K. A., Leung, D. W., Rowland, A. M., Winer, J. and Ferrara, N. (1992). Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *J Biol Chem* 267, 26031-7.
- Jechlinger, M., Grunert, S. and Beug, H. (2002). Mechanisms in epithelial plasticity and metastasis: insights from 3D cultures and expression profiling. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 7, 415-32.
- Lee, S., Jilani, S. M., Nikolova, G. V., Carpizo, D. and Iruela-Arispe, M. L. (2005). Processing of VEGF-A by matrix metalloproteinases regulates bioavailability and vascular patterning in tumors. *J Cell Biol* 169, 681-91.
- Leprince, D., Gegonne, A., Coll, J., de Taisne, C., Schneeberger, A., Lagrou, C. and Stehelin, D. (1983). A putative second cell-derived oncogene of the avian leukaemia retrovirus E26. *Nature* 306, 395-7.
- Leroy-Dudal, J., Demeilliers, C., Gallet, O., Pauthe, E., Dutoit, S., Agniel, R., Gauduchon, P. and Carreiras, F. (2005). Transmigration of human ovarian adenocarcinoma cells through endothelial extracellular matrix involves alphav integrins and the participation of MMP2. *Int J Cancer* 114, 531-43.
- Maniotis, A. J., Folberg, R., Hess, A., Seftor, E. A., Gardner, L. M., Pe'er, J., Trent, J. M., Meltzer, P. S. and Hendrix, M. J. (1999). Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry. *Am J Pathol* 155, 739-52.
- Michieli, P., Mazzone, M., Basilico, C., Cavassa, S., Sottile, A., Naldini, L. and Comoglio, P. M. (2004). Targeting the tumor and its microenvironment by a dual-function decoy Met receptor. *Cancer Cell* 6, 61-73.
- Mine, S., Fujisaki, T., Kawahara, C., Tabata, T., Iida, T., Yasuda, M., Yoneda, T. and Tanaka, Y. (2003). Hepatocyte growth factor enhances adhesion of breast cancer cells to endothelial cells in vitro through up-regulation of CD44. *Exp Cell Res* 288, 189-97.
- Mira, E., Lacalle, R. A., Buesa, J. M., de Buitrago, G. G., Jimenez-Baranda, S., Gomez-Mouton, C., Martinez, A. C. and Manes, S. (2004). Secreted MMP9 promotes angiogenesis more efficiently than constitutive active MMP9 bound to the tumor cell surface. *J Cell Sci* 117, 1847-57.

- Nguyen, D. X. and Massague, J. (2007). Genetic determinants of cancer metastasis. *Nat Rev Genet* 8, 341-52.
- Pourtier-Manzanedo, A., Vercamer, C., Van Belle, E., Mattot, V., Mouquet, F. and Vandebunder, B. (2003). Expression of an Ets-1 dominant-negative mutant perturbs normal and tumor angiogenesis in a mouse ear model. *Oncogene* 22, 1795-806.
- Rak, J., Filmus, J. and Kerbel, R. S. (1996). Reciprocal paracrine interactions between tumour cells and endothelial cells: the 'angiogenesis progression' hypothesis. *Eur J Cancer* 32A, 2438-50.
- Sahai, E. (2007). Illuminating the metastatic process. *Nat Rev Cancer* 7, 737-49.
- Shan, S., Robson, N. D., Cao, Y., Qiao, T., Li, C. Y., Kontos, C. D., Garcia-Blanco, M. and Dewhirst, M. W. (2004). Responses of vascular endothelial cells to angiogenic signaling are important for tumor cell survival. *Faseb J* 18, 326-8.
- Sivridis, E., Giatromanolaki, A. and Koukourakis, M. I. (2003). The vascular network of tumours--what is it not for? *J Pathol* 201, 173-80.
- Soriano, J. V., Pepper, M. S., Orci, L. and Montesano, R. (1998). Roles of hepatocyte growth factor/scatter factor and transforming growth factor-beta1 in mammary gland ductal morphogenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 3, 133-50.
- Span, P. N., Manders, P., Heuvel, J. J., Thomas, C. M., Bosch, R. R., Beex, L. V. and Sweep, C. G. (2002). Expression of the transcription factor Ets-1 is an independent prognostic marker for relapse-free survival in breast cancer. *Oncogene* 21, 8506-9.
- Wang, H. and Keiser, J. A. (2000). Hepatocyte growth factor enhances MMP activity in human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 272, 900-5.
- Wernert, N., Gilles, F., Fafeur, V., Bouali, F., Raes, M. B., Pyke, C., Dupressoir, T., Seitz, G., Vandebunder, B. and Stehelin, D. (1994). Stromal expression of c-Ets1 transcription factor correlates with tumor invasion. *Cancer Res* 54, 5683-8.
- Yanai, N., Satoh, T. and Obinata, M. (1991). Endothelial cells create a hematopoietic inductive microenvironment preferential to erythropoiesis in the mouse spleen. *Cell Struct Funct* 16, 87-93.

### **3.3. Conclusion**

Ets-1 se révèle donc être un orchestrateur clé du potentiel angiogénique des cellules cancéreuses mammaires, comme il l'était déjà au sujet de l'invasion. Son rôle dans l'angiogenèse est toutefois plus complexe et varie selon l'aspect considéré (cf tableau ci-dessous).

	MMT neo	MMT Ets-1	MMT DB
capacité des milieux conditionnés à stimuler la prolifération des cellules MSS-31 (2D/plastique)	+	+	+
capacité des milieux conditionnés à stimuler la morphogenèse des cellules MSS-31 (2D et 3D/matrice)	+	++	-
sécrétion d'HGF/SF (2D/matrice)	+	++	-
sécrétion de MMP-9 (2D/matrice)	+	++	-
pouvoir chimioattractant envers les cellules MSS-31	+	-	++
expression du VEGF (2D/matrice)	+	-	++
interactions avec les cellules MSS-31 (2D et 3D/matrice)	+	++	-
expression de la sous-unité d'intégrine $\beta 3$ (2D/matrice)	+	++	-
expression de la VE-cadhérine (2D/matrice)	+	++	-

L'ensemble de ces résultats montre que la surexpression d'Ets-1 dans les cellules MMT peut favoriser de diverses manières leur dialogue avec les cellules endothéliales. La surexpression d'Ets-1 augmente en effet le pouvoir angiogénique de leurs milieux conditionnés, mais stimule aussi l'interaction des cellules cancéreuses avec un tapis de cellules endothéliales. Différentes molécules potentiellement impliquées dans ces mécanismes ont été identifiées comme régulées par Ets-1, bien que leur importance fonctionnelle n'ait pas encore pu être démontrée pour l'instant.

Il faut noter qu'ici encore la surexpression d'Ets-1 dans les cellules MMT nous a dévoilé une nouvelle facette de ce facteur de transcription, qui réprime la sécrétion de VEGF par nos cellules cancéreuses mammaires. De manière intéressante, cette expression différentielle du VEGF corrèle avec le pouvoir chimioattracteur des cellules MMT. Etant donné que les cellules surexprimant Ets-1 sont plus motiles, la résultante de ces mouvements de migration des deux partenaires est difficile à estimer. Un premier élément de réponse nous a été apporté par la co-culture directe de nos deux types cellulaires marqués par des fluorochromes intravitaux différents et déposés sur, ou noyés dans

des gels de matrice. Dans ces modèles, les cellules MMT Ets-1 ont présenté une localisation avec les cellules endothéliales plus importante par rapport aux cellules contrôle ou aux cellules MMT DB. Ces différentes données soulignent l'importance d'apporter une précaution particulière au choix du système expérimental en fonction de l'aspect de l'angiogenèse que l'on souhaite étudier.

Nous avons ensuite cherché à comprendre la relevance physiologique de ces observations *in vivo*, dans les tumeurs primaires induites par nos différentes sous-lignées. Nous n'avons pas observé de différence significative en terme quantitatif mais observé un changement qualitatif du profil des vaisseaux dans ces tumeurs. Alors que les tumeurs MMT DB contenaient des vaisseaux assez importants à la périphérie des tumeurs, les tumeurs MMT Ets-1 présentaient beaucoup plus de vaisseaux écrasés, voire de chaînes de cellules endothéliales sans lumière apparente. L'impact physiologique de ces modifications reste à définir, en terme notamment d'irrigation ou de perméation.

Par ailleurs, nos résultats *in vitro* montrent qu'au-delà de leur importance dans la formation de vaisseaux transportant le sang, les cellules endothéliales peuvent de par leur simple présence modifier le comportement des cellules cancéreuses. Ces données sont en accord avec la production par les cellules endothéliales de différents facteurs de croissance notamment. De plus, il avait déjà été décrit que les cellules endothéliales pouvaient moduler la survie des cellules cancéreuses *in vivo* avant même la formation des vaisseaux (Shan et al., 2004). Dans le cas présent, le choix du modèle d'étude s'est une fois de plus avéré crucial dans la réponse observée. Les cellules endothéliales réduisent en effet la prolifération et la migration des cellules cancéreuses sur plastique, tandis qu'elles stimulent une morphogenèse de type branché et invasif dans un contexte matriciel. Parmi les molécules potentiellement impliquées dans de tels processus, le TGF $\beta$  apparaît comme un candidat intéressant, car il est décrit comme étant capable à la fois d'inhiber la prolifération et de favoriser l'invasion par d'autres côtés. Nous avons cherché à vérifier son implication par l'utilisation d'anticorps bloquants, mais n'avons pour l'instant pas réussi à obtenir d'informations intéressantes. La complexité de la question pose cependant de sérieuses difficultés, étant donné que ce facteur de croissance et ses récepteurs sont potentiellement exprimés par les deux partenaires, et que ses effets peuvent varier selon le contexte cellulaire et l'environnement de la cellule.

Dans l'ensemble, nos résultats indiquent quoi qu'il en soit que la surexpression d'Ets-1 dans les cellules cancéreuses mammaires affecte leur dialogue avec les cellules endothéliales, ce qui pourrait avoir de profondes conséquences sur la progression tumorale.



# DISCUSSION

Malgré plusieurs décennies de recherches intensives, le cancer du sein reste une cause majeure de mortalité chez les femmes en France. C'est le cancer le plus fréquent et le plus morbide chez ces femmes, et il est notamment la cause principale de décès chez les femmes de 45 à 64 ans, selon une récente étude épidémiologique (Aouba et al, 2007).

Il est toutefois à signaler que différentes connaissances en biologie des cancers ont depuis peu permis la mise au point de composés capables de bloquer des oncogènes cruciaux dans différents cancers, dont le cancer du sein (Dancey and Chen, 2006). Dans ce contexte, il apparaît primordial de mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans le développement et la progression de ces cancers, afin de mieux définir leurs caractéristiques et proposer de nouveaux traitements adaptés à celles-ci.

## 1. Ets-1 chef d'orchestre de l'invasion

A l'issue de cette thèse, Ets-1 apparaît comme un régulateur majeur du phénotype invasif des cellules cancéreuses mammaires dans leur environnement matriciel. Nos travaux ont en effet permis de démontrer une coordination complexe par Ets-1 de différentes classes de molécules nécessaires à l'invasion des cellules épithéliales.

### 1.1. La dissociation des cellules

Ce rôle important d'Ets-1 était suggéré par son expression lors des phénomènes de transitions épithélio-mésenchymateuses au cours du développement embryonnaire. De tels processus débutent par la dissociation des cellules, et nous avons montré qu'Ets-1 participait de différentes manières à cette étape. Il contribue d'une part à une diminution des interactions intercellulaires, dénotée par la faible agrégation des cellules MMT surexprimant Ets-1 cultivées sur agar, et stimule d'autre part la dispersion de ces mêmes cellules, ce qui a été un des premiers traits observés après obtention des clones stables. En ce qui concerne les capacités réduites de ces cellules à s'agréger, il semble que celles-ci dépendent de mécanismes E-cadhérine-indépendants. En effet, nous n'avons pas trouvé d'expression de la E-cadhérine sous sa forme complète, et la forme tronquée observée n'était pas localisée au niveau de la membrane plasmique. Toutefois, la surexpression d'Ets-1 semble favoriser le relargage dans le milieu de culture d'un fragment soluble de E-cadhérine. Des fragments de ce type ont été décrits précédemment et associés à la dispersion et l'invasion de cellules épithéliales, et il est donc possible que le clivage de la E-cadhérine observé contribue indirectement à la dispersion provoquée par la surexpression d'Ets-1. Cette notion d'effet plus ou moins direct d'Ets-1 sur l'expression ou l'activation des molécules est revenue régulièrement au cours de nos recherches. Il est en effet apparu qu'Ets-1 contribuait directement à l'expression de molécules de l'invasion en

stimulant leur transcription, mais aussi en augmentant leur activation, via sans doute la transcription des molécules impliquées dans ces activations. C'est le cas notamment en ce qui concerne l'HGF/SF et les MMPs. Pour ce qui est de l'HGF/SF, nous avons détecté une stimulation par Ets-1 du clivage activateur de la forme latente de ce facteur de croissance. Cette activation peut être l'oeuvre de différentes sérine protéases, parmi lesquelles l'uPA (Naldini et al., 1995), l'hepsine (Herter et al., 2005), ou la matriptase (Lee et al., 2000), dont l'orthologue murin est l'épithine. Il serait intéressant à l'avenir de comprendre lesquels de ces acteurs participent à cette activation de l'HGF/SF provoquée par la surexpression d'Ets-1. L'uPA a été précédemment décrit comme une cible des facteurs ETS (Delannoy-Courdent et al., 1998), et apparaît donc un candidat probable. Toutefois les autres protéases évoquées ne sont pas à négliger, étant donné leur importance dans les cancers du sein. La matriptase a notamment été initialement isolée à partir de cellules de cancer du sein et son expression a été corrélée à celle de l'HGF/SF et de son récepteur c-Met dans de tels cancers (Kang et al., 2003). L'effet d'Ets-1 sur son expression n'a jusqu'à présent pas été décrit.

En parallèle de l'activation de l'HGF/SF, Ets-1 favorise également la surexpression de c-Met, le récepteur de l'HGF/SF et, de manière intéressante, Ets-1 a été décrit comme une cible des voies de signalisation de ce récepteur. Ceci pourrait donc « entretenir » l'activité d'Ets-1, dans ce qui s'apparenterait à une forme de feedback positif. L'HGF/SF est également capable d'activer des voies distinctes d'Ets-1 afin de stimuler la dispersion, et il est probable que ces autres voies de signalisation contribuent indirectement aux conséquences de la surexpression d'Ets-1.

## **1.2. La migration et l'invasion cellulaire**

En ce qui concerne la promotion par Ets-1 de la motilité des cellules MMT, nous avons observé des changements dans l'organisation du cytosquelette et de l'ancrage des cellules, pouvant en rendre compte, du moins en partie. Particulièrement, la présence de points focaux suggérant une adhérence forte et plutôt statique dans les cellules exprimant le mutant dominant négatif semble peu propice à une migration rapide. Des travaux précédents avaient montré que le TGF $\beta$  était favorable à la création de fibres de stress d'actine et d'adhésions focales dans des fibroblastes transformés (Moustakas and Stournaras, 1999). Il est possible que la sensibilité accrue des cellules MMT DB au TGF $\beta$ , que nous avons enregistrée dans les modèles de matrice tridimensionnelle, contribue à la formation de ces plaques focales d'adhérence observées sur plastique. Cependant, il est important de signaler que les structures d'adhérence mises en oeuvre au cours de la motilité physiologique des cellules en trois dimensions sont souvent différentes de celles observées sur plastique (Even-Ram and Yamada, 2005). Bien que cela impose l'utilisation de protocoles d'observation plus complexes, il serait donc plus intéressant de mieux définir l'influence d'Ets-1 sur l'organisation du cytosquelette dans un contexte matriciel.

Par ailleurs, il a été suggéré que les intégrines jouaient un rôle crucial dans la perception par les cellules de leur environnement et contrôlaient ainsi le phénotype différencié ou non des cellules épithéliales, normales et cancéreuses (Weaver et al., 1997). Ets-1 orchestre une transition dans l'expression des intégrines par les cellules mammaires cancéreuses, en faveur de l'expression de sous-unités d'intégrines impliquées dans la motilité, comme les intégrines  $\beta$ 1 et  $\beta$ 3, qui sont par

ailleurs associées aux capacités métastatiques des cellules cancéreuses (Kren et al., 2007) (Zhao et al., 2007). Il est important de signaler ici que ces intégrines sont capables de recruter les métalloprotéases matricielles et de favoriser leur activité (Morini et al., 2000) (Brooks et al., 1996). L'exemple du contrôle par Ets-1 de l'activité des gélatinases illustre particulièrement le rôle de ce facteur de transcription dans la coordination d'un réseau d'acteurs moléculaires interconnectés, afin de favoriser l'invasion. Ets-1 agit en effet à différents niveaux pour augmenter l'activité de ces protéases. Il intervient tout d'abord au niveau transcriptionnel, en stimulant notamment leur transcription. En outre, la promotion par Ets-1 de l'expression des sous-unités d'intégrines  $\beta 1$  et  $\beta 3$  peut permettre le recrutement des MMPs à la surface cellulaire. De plus, il stimule aussi l'expression des enzymes chargées de leur activation, comme la MMP-3 et la MT1-MMP. Enfin, il réduit l'expression des inhibiteurs de l'activité des MMPs, TIMP-1 et -2. Ets-1 apparaît donc comme un véritable chef d'orchestre, dirigeant l'interprétation par différentes molécules d'une partition correspondant à des mécanismes d'invasion. On peut aussi ajouter à cet ensemble de molécules impliquées dans l'invasion et régulées par Ets-1, ICAM-1 (données non montrées), qui a récemment été décrit comme important pour l'invasion de cellules de cancer du sein (Rosette et al., 2005), selon des mécanismes moléculaires restant à définir.

Dans l'ensemble, nos travaux indiquent Ets-1 comme un coordinateur clé de l'invasion des cellules cancéreuses mammaires. Les phénomènes de migration mis en oeuvre par les cellules épithéliales lors du développement embryonnaire et de la progression tumorale étant proches, il n'est pas étonnant que divers facteurs de transcription impliqués dans l'embryogenèse soient retrouvés dans le cadre des processus d'invasion tumorale. Ainsi, pour n'en citer que quelques-uns, Twist et Goosecoid sont associés à la morphogenèse embryonnaire mais aussi au caractère invasif et métastatique de cellules cancéreuses (Yang et al., 2004) (Hartwell et al., 2006). L'expression d'Ets-1 est également détectée dans les processus de transitions épithélio-mésenchymateuses et de morphogenèse embryonnaire. Les données collectées au cours de ma thèse présentent donc Ets-1 comme un nouveau membre de cette classe de facteurs de transcription morphogènes responsables de programmes génétiques menant aussi à l'invasion des cellules cancéreuses. Les cellules tumorales individuelles motiles sont considérées comme la cause principale de dissémination systémique et de métastases (Friedl and Wolf, 2003). De ce point de vue, le fait qu'Ets-1 favorise une invasion plus individualisée des cellules MMT dans des matrices tridimensionnelles est à mettre en lien avec un caractère agressif de ces cellules.

## 2. La face cachée d'Ets-1

La plupart des publications au sujet de molécules impliquées dans le cancer présentent une vision plutôt manichéenne de ces acteurs. Expérimentalement, la croissance des tumeurs primaires est le paramètre classique d'évaluation du pouvoir oncogénique d'une molécule. De même, c'est par sa capacité à induire la régression de la tumeur primaire qu'est souvent jugé un traitement anti-cancéreux dans les essais pré-cliniques. Bien que cruciale pour le développement de la tumeur, sa capacité à croître en volume ne rend pas compte de la totalité de la progression tumorale. C'est ainsi que notamment la classification TNM des tumeurs du sein inclut deux autres paramètres majeurs pour estimer cette progression : l'atteinte ganglionnaire et la présence de métastases distantes, qui vont fortement influencer sur le pronostic vital de la patiente.

### **2.1. La croissance et l'invasion, deux aspects de la tumorigenèse**

Il apparaît de plus en plus clairement que la croissance des tumeurs est à distinguer de cette autre caractéristique fondamentale pour les cancers qu'est la motilité aberrante des cellules cancéreuses. Ainsi l'analyse de cancers colo-rectaux indique une faible prolifération au niveau du front d'invasion de ces tumeurs, en corrélation avec un mauvais pronostic (Palmqvist et al., 1999). En parallèle, d'autres études ont montré que des cancers du sein exprimant fortement la cycline E, un marqueur des cellules engagées dans le cycle cellulaire, présentaient un caractère faiblement invasif, et se développaient plutôt selon un profil d'accroissement du volume (Berglund et al., 2005).

Il semble donc que les modalités invasive ou proliférative d'expansion des tumeurs soient relativement exclusives. Par ailleurs, le groupe de John Condeelis a suggéré que les cellules invasives constituent une population qui n'est ni en prolifération ni apoptotique, mais simplement motile (Wang et al., 2005a). Pour cela, ils ont récupéré des cellules au sein de tumeurs primaires mammaires et ont comparé leur profil d'expression génique avec celui de cellules invasives attirées dans une microaiguille par chimioattraction (Wang et al., 2003). Ils ont ainsi montré que différents gènes associés à la prolifération cellulaire étaient moins exprimés dans les cellules invasives.

Dans notre modèle, nous avons observé que le facteur de transcription Ets-1 modulait cet équilibre entre croissance et invasion, ce pourquoi nous l'avons comparé dans le deuxième article présenté en préparation (cf p.) au dieu romain Janus, gardien des passages et des croisements, divinité du changement, de la transition. Aussi bien lors d'expériences de culture en matrice *in vitro* qu'*in vivo*, la surexpression d'Ets-1 dans les cellules cancéreuses mammaires a déclenché une invasion accrue et conjointement une réduction de la croissance cellulaire. Les mécanismes moléculaires responsables de cette dernière observation sont toutefois toujours mal définis. Des expériences préliminaires suggèrent qu'il y aurait dans les tumeurs de nos différentes sous-lignées MMT une proportion assez importante à la fois de cellules en prolifération, détectées par immunohistochimie dirigée contre Ki67, mais aussi de cellules mourantes, révélées par un marquage positif au TUNEL. Des zones de forte prolifération ou de mort sont ainsi éparpillées dans ces tumeurs. Cette hétérogénéité au sein des tumeurs rend difficile toute estimation chiffrée, mais est en accord avec le comportement physiologique des tumeurs. Il est bien évident que la surexpression d'Ets-1 ne

peut pas induire un caractère hautement motile dans toutes les cellules d'une tumeur solide de taille conséquente, mais que certaines populations de cellules vont être « coincées » par les autres, et que d'autres paramètres extérieurs vont affecter la prolifération ou la mort des cellules. L'expression d'Ets-1 viendrait moduler l'étendue de ces phénomènes. Des expériences doivent être réalisées sur des coupes sériées pour confronter ces différentes zones, et mieux comprendre comment Ets-1 influe sur celles-ci.

## **2.2. Les cibles moléculaires d'Ets-1 dans la croissance cellulaire**

Plusieurs molécules impliquées dans le cycle cellulaire ont été décrites comme des gènes-cibles potentiels d'Ets-1. On peut ainsi retrouver la cycline D1 (Albanese et al., 1995), cdc2 (Tommasi and Pfeifer, 1995), ou encore p21Cip1/Waf1 (Beier et al., 1999) et p16INK4a (Ohtani et al., 2001). Cette dernière protéine est un inhibiteur de cdk (cyclin-dependent kinases) et donc un médiateur de signaux cyostatiques, qui protège notamment les cellules contre l'hyperactivité de la voie Ras. La surexpression de Ras dans des fibroblastes normaux peut en effet induire un arrêt de croissance de type sénescence, via Ets-1 et Ets-2, et l'induction de p16 (Huot et al., 2002). p16 est un candidat intéressant pour essayer de comprendre comment Ets-1 freine la croissance des tumeurs MMT. La surexpression de p16 a en effet été décrite au front d'invasion de cancers colo-rectaux, et corrélée avec une prolifération réduite des cellules invasives (Palmqvist et al., 2000). C'est pourquoi nous sommes actuellement en train d'étudier l'expression de p16 dans les tumeurs primaires induites par nos différentes sous-lignées MMT. Il serait également intéressant de reproduire le type d'analyse de biopsies décrit ci-dessus dans le modèle colo-rectal, sur des échantillons de cancers du sein, pour voir si les mécanismes observés dans les cancers colo-rectaux sont généralisables au sein.

En parallèle d'un potentiel impact d'Ets-1 sur la prolifération cellulaire, nous souhaitons aussi évaluer sa capacité à moduler la mort des cellules. Différentes données contradictoires existent à ce sujet (pour revue, voir (Dittmer, 2003)). Ets-1 présente par certains aspects un rôle anti-apoptotique. Il protège ainsi les cellules musculaires lisses des vaisseaux de l'apoptose en activant p21Waf1 (Zhang et al., 2003a), et sa délétion dans des souris transgéniques provoque une apoptose accrue des lymphocytes T (Bories et al., 1995). D'un autre côté, Ets-1 favorise l'expression de divers gènes pro-apoptotiques dans les cellules endothéliales et est capable d'induire leur apoptose (Teruyama et al., 2001). Il est aussi nécessaire à l'induction de l'apoptose dans des cellules souches embryonnaires en réponse aux rayonnements ultraviolets (Xu et al., 2002). Dans notre modèle, il semble que l'expression d'Ets-1 soit plutôt favorable à l'apoptose des cellules MMT *in vivo*, bien que, comme c'était le cas pour la prolifération, ce phénomène soit hétérogène selon les régions de la tumeur.

Il est important de signaler que l'expression du mutant dominant négatif dans les cellules MMT provoque une augmentation du volume de la tumeur expérimentale plus importante que la réduction du volume induite par la surexpression d'Ets-1. Plusieurs hypothèses semblent pouvoir rendre compte de ce phénomène. Il est tout d'abord possible qu'Ets-1 soit induit par l'environnement dans les cellules MMT neo des tumeurs contrôles, et que de ce fait celles-ci présentent un comportement proche de celui des tumeurs surexprimant intrinsèquement Ets-1. Cette induction par l'environnement aurait un effet mineur dans les cellules MMT DB, où l'activité d'Ets-1 est inhibée de toute façon par le mutant

dominant négatif DB utilisé. Cet outil est constitué du domaine de liaison à l'ADN d'Ets-1 qui, en se fixant sur les EBS (ETS Binding Sites), entre en compétition avec les facteurs ETS endogènes. Ce domaine de liaison à l'ADN étant relativement bien conservé entre les différents membres de la famille ETS, le mutant DB bloque potentiellement les différents membres de cette famille exprimés dans ces cellules. Il est donc envisageable que le mutant DB bloque de concert l'activité de plusieurs facteurs ayant un effet cumulatif avec celui d'Ets-1. Des travaux précédents avaient en effet indiqué que la surexpression des facteurs ESX et Ets-2 dans des cellules épithéliales mammaires normales favorisait une transition épithélio-mésenchymateuse de celles-ci, accompagnée d'une synthèse réduite d'ADN lors de culture en gels de collagène (Schedin et al., 2004b). Ainsi, l'interférence du mutant dominant négatif DB avec les activités de tels facteurs de la famille ETS dans les cellules MMT pourrait expliquer son effet majeur sur la croissance tumorale.

### **2.3. La culture des cellules en gels de matrice**

Enfin, il est primordial de préciser que c'est la culture des cellules dans un environnement tridimensionnel qui a permis d'observer l'effet délétère d'Ets-1 sur la croissance des cellules MMT.

Cela fait maintenant plusieurs années que l'on sait que la culture des cellules primaires dans un environnement matriciel approprié est nécessaire au maintien d'un état physiologique fonctionnel, comme par exemple la production de protéines du lait par les cellules épithéliales mammaires (pour revue, voir (Bissell et al., 2003)). Les mécanismes de migration et d'invasion sont également plus proches des situations physiologiques dans ces gels matriciels par rapport aux cultures sur plastique (Even-Ram and Yamada, 2005) (Hooper et al., 2006). Il a également été montré que l'évaluation de traitements inducteurs de mort était plus pertinente dans ce genre de modèles (Haouzi et al., 2005; Ono et al., 2007).

Nos données indiquent que ces modèles peuvent aussi s'avérer nécessaires pour comprendre certains mécanismes de la croissance cellulaire. Ceci avait déjà été suggéré par les travaux de l'équipe de Pepper Schedin présentés ci-dessus où la surexpression d'ESX ou d'Ets-2 menait à une inhibition de la prolifération en gels de collagène, opposée à la hausse observée sur plastique (Schedin et al., 2004b).

L'analyse des mécanismes moléculaires mis en oeuvre dans des modèles tridimensionnels est beaucoup plus difficile comparativement à celle réalisée couramment en boîtes de Petri. Dans notre cas par exemple, il aurait été intéressant de définir comment Ets-1 affectait le cycle cellulaire par des expériences de cytométrie en flux, qui permettraient aussi de détecter éventuellement une population de cellules apoptotiques. Toutefois, pour cela, il faut réussir à déstabiliser la matrice sans affecter les cellules, et de plus, la quantité de cellules récupérées risque d'être insuffisante pour une analyse correcte. Il en est de même si on cherche à récupérer les protéines pour une expérience de Western blot, pour laquelle les protéines de la matrice peuvent de plus se révéler gênantes. Dans l'état actuel des méthodologies, l'immunocytochimie constitue la méthode classique d'étude des mécanismes moléculaires, bien que son caractère semi-quantitatif soit limitant.

Quoi qu'il en soit, nos données mettent donc en exergue l'importance de l'environnement des cellules cancéreuses mammaires sur le comportement de ces dernières.

### **3. Le microenvironnement tumoral**

Pour trouver des thérapies à des pathologies qui font intervenir des dialogues entre la tumeur et les cellules de son environnement, comme le cancer du sein, il est important de comprendre comment ces différents types cellulaires communiquent entre eux (Condeelis and Pollard, 2006). Une meilleure connaissance de ces processus devrait permettre de mieux définir le cadre du développement tumoral, et potentiellement d'innover en matière thérapeutique.

#### **3.1. Le dialogue entre l'épithélium et le stroma**

Les interactions entre épithélium et mésenchyme sont cruciales au cours du développement embryonnaire pour dicter le mouvement des cellules épithéliales ou au contraire le restreindre. En parallèle, de plus en plus d'études indiquent que la manifestation complète du potentiel malin des cellules épithéliales cancéreuses nécessite différentes interactions avec le stroma péri-tumoral. Ces observations ont donné lieu à la proposition par John Condeelis du concept de TMIM (Tumor Microenvironment Invasion Model), selon lequel l'environnement tumoral déclenche le phénotype invasif des cellules cancéreuses (Condeelis et al., 2005). D'après ce modèle, l'invasion tumorale est comparable à un programme morphogénétique induit par l'environnement et impliquant des changements d'expression de gènes menant à la motilité des cellules. Ce programme causerait des épisodes répétés d'invasion et de micrométastases aux endroits de la tumeur où le microenvironnement le déclenche. Ceci pourrait expliquer pourquoi les MMPs sont souvent exprimées par les cellules du front d'invasion et non par l'ensemble de la tumeur (pour revue, voir (Deryugina and Quigley, 2006)). De même, ces données sont en accord avec l'observation intravitale des tumeurs, où seulement une faible proportion de cellules est motile, et ceci dans des zones restreintes de la tumeur (Condeelis et al., 2005).

#### **3.2. L'induction de l'expression d'Ets-1**

Ets-1 semble être un candidat probable pour la réalisation de tels programmes d'invasion induite par le microenvironnement. Il est en effet exprimé dans les zones d'interaction épithélium-mésenchyme aussi bien lors du développement embryonnaire que cancéreux (Vandembunder et al., 1994a). Son expression a d'abord été détectée dans les cellules mésenchymateuses voisines des cellules épithéliales lors d'interactions inductives au cours de l'embryogenèse (Kola et al., 1993) et de la cancérisation (Wernert et al., 1994). Ets-1 est également exprimé par les cellules épithéliales migrant au cours des processus d'organogenèse (Fafeur et al., 1997), notamment par les cellules invasives des bourgeons épithéliaux mammaires (Delannoy-Courdent et al., 1996). L'expression d'Ets-1 est donc induite dans les compartiments épithélial et stromal lors de leurs interactions. Cette induction d'Ets-1 dans ces processus d'organogenèse est toutefois transitoire, et l'expression d'Ets-1 revient à des taux de base faibles dans les tissus épithéliaux formés. Il est probable que l'extinction d'Ets-1, suite à la perte des signaux environnementaux déclenchant son expression, contribue à la cohésion des épithéliums néo-formés.

Peu de choses sont connues quant aux mécanismes menant à l'expression d'Ets-1 dans les cellules épithéliales de cancers du sein. Des cas de translocations de facteurs ETS ont été décrits dans des sarcomes et certaines leucémies, et même très récemment dans des cancers de la prostate et du sein (Letessier et al., 2005; Tomlins et al., 2007). Cependant, aucune mutation activatrice ni amplification de gène n'a été à ma connaissance mise en évidence à ce jour en ce qui concerne Ets-1 dans les cancers du sein. L'expression d'Ets-1 semble donc liée soit à des modifications épigénétiques soit à une stimulation par les cellules de l'environnement. A l'appui de cette dernière hypothèse, de précédents travaux avaient montré l'expression d'Ets-1 dans les cellules épithéliales de cancers pré-invasifs au niveau de la zone d'interaction avec le stroma (Behrens et al., 2001). De plus, le facteur de transcription est classiquement induit en réponse aux facteurs de croissance, qui sont les médiateurs de différents dialogues intercellulaires (cf chapitre 7.2 b de l'introduction). On peut émettre l'hypothèse que l'expression d'Ets-1 soit transmise d'un compartiment à l'autre via la modulation de l'expression de ces facteurs solubles. L'expression d'Ets-1 dans les cellules stromales peut en effet être induite par plusieurs facteurs solubles retrouvés fréquemment dans les tumeurs (Gilles et al., 1996), et ceux-ci contribuent donc probablement à l'induction d'Ets-1 dans le stroma péri-tumoral. L'hypoxie est un autre signal environnemental capable d'induire l'expression d'Ets-1 dans les cellules cancéreuses (Oikawa et al., 2001). La surexpression de Met déclenchée par l'hypoxie a été définie comme un signal et un moyen pour les cellules de s'échapper de telles conditions (Pennacchietti et al., 2003). Il pourrait en être de même en ce qui concerne l'induction d'Ets-1 qui, de plus, est une cible de Met et favorise l'expression de ce dernier. La prolifération des cellules nécessite des dépenses énergétiques importantes, qui ne sont pas toujours disponibles dans les conditions dans lesquelles se trouvent les cellules dans les cancers. Le blocage du cycle pourrait s'avérer un moyen de préserver l'énergie, dans le but de migrer pour trouver des conditions plus favorables.

La réaction stromale, initialement perçue comme un moyen de circonscrire les tumeurs, peut aussi être propice à leur développement et métastatisation (Vandembunder et al., 1994b). Cette activation du stroma présente de nombreuses ressemblances avec celle observée dans les phénomènes de cicatrisation, d'où la métaphore énoncée par Harold Dvorak : « les cancers sont des blessures qui ne guérissent pas ». En support de ce concept, certains cancers peuvent être induits, ou du moins leur progression déclenchée, par des stress mécaniques répétés, des blessures ou des inflammations chroniques, comme la maladie de Crohn. Cette activation stromale de type inflammatoire générerait, selon le TMIM évoqué au début de ce chapitre, des signaux inducteurs de l'invasion des cellules cancéreuses. Cette réaction stromale est de plus classiquement associée à une angiogenèse soutenue.

### **3.3. Le rôle d'Ets-1 dans l'angiogenèse tumorale**

Les vaisseaux sanguins constituent des partenaires primordiaux pour les cancers solides, dont les cancers du sein. Certains modèles expérimentaux ont démontré l'importance de l'angiogenèse tumorale pour la progression cancéreuse (Bergers et al., 1999). Le processus d'angiogenèse correspond à un mécanisme de morphogenèse de branchement des cellules



endothéliales, proche de celui mis en oeuvre lors du développement des ramifications de l'arborescence épithéliale mammaire. Ce processus nécessite la production de protéases matricielles ainsi que l'expression d'intégrines appropriées pour la migration de ces cellules. Différents facteurs de croissance, dits angiogéniques, vont moduler l'expression de ces molécules et réguler ce processus. Plusieurs de ces facteurs sont classiquement retrouvés dans les cancers du sein (Relf et al., 1997), et peuvent être exprimés aussi bien par les cellules cancéreuses que par les cellules du stroma.

Dans notre modèle, nous avons observé qu'Ets-1 modulait de façon négative l'expression du VEGF et de façon positive l'activation de l'HGF/SF. La résultante de ces deux variations est difficile à appréhender et semble dépendre du contexte d'étude et du mécanisme étudié. Il apparaît ainsi que, dans notre modèle de co-culture, l'activation de l'HGF/SF puisse prédominer et induire une morphogénèse plus importante des cellules endothéliales, tandis que dans des expériences de chimiotactisme, le pouvoir attracteur des cellules cancéreuses corrèle avec l'expression du VEGF. Nous avons également mis en évidence un recrutement par les cellules endothéliales de la MMP-9 produite par les cellules cancéreuses. Nous n'avons toutefois pas déterminé l'importance de ce phénomène dans la morphogénèse des cellules endothéliales. Si l'on s'intéresse au caractère angiogénique des tumeurs MMT induites *in vivo*, on s'aperçoit que la surexpression d'Ets-1 ou l'inhibition de son activité ne modifient pas vraiment la quantité de vaisseaux sanguins, mais module leur phénotype. Les vaisseaux des tumeurs surexprimant Ets-1 présentent souvent un aspect plus écrasé, tandis qu'on dénote l'existence de vaisseaux assez larges à la périphérie des tumeurs MMT DB. Il est possible que les mécanismes mis en jeu soient différents dans ces deux cas. L'angiogenèse de bourgeonnement n'est en effet pas le seul moyen pour une tumeur d'être vascularisée. Le recrutement des vaisseaux pré-existants peut également s'opérer. Il est tentant de concevoir que les tumeurs DB cooptent ces vaisseaux car ces tumeurs étant plus volumineuses « colonisent », ou en tout cas se rapprochent, plus facilement des régions préalablement vascularisées.

Un autre processus de vascularisation par des moyens alternatifs à l'angiogenèse de bourgeonnement et qui est potentiellement à l'oeuvre dans les tumeurs MMT est le phénomène de mimétisme vasculaire. Ce mécanisme, par lequel les cellules cancéreuses présentent un phénotype de cellules endothéliales et peuvent former des canaux propres susceptibles d'anastomoser avec les vaisseaux sanguins, est à l'oeuvre dans des formes agressives de mélanomes et de cancers du sein (Hendrix et al., 2003). Dans notre modèle, les cellules MMT expriment *in vitro* la VE-cadhérine, qui est un marqueur endothélial, et Ets-1 favorise cette expression. Lors d'expériences de co-culture des cellules cancéreuses et endothéliales marquées par des fluorochromes intravitaux différents, il m'est arrivé d'observer des structures pseudo-tubulaires hybrides composées des deux types cellulaires. Cependant il m'a été impossible à l'époque où ces expériences ont été réalisées de documenter correctement ces phénomènes de par la difficulté de prendre en image des structures tridimensionnelles par épifluorescence. Nous disposons maintenant depuis quelques mois d'appareils permettant de réaliser des piles d'images dans différentes fluorescences, de les compiler, et de les déconvoluer. Il faudrait donc reproduire ces expériences, documenter correctement ces structures hybrides, et vérifier la relevance de telles observations *in vivo* pour définir correctement le rôle d'Ets-1 dans ce phénomène. Nous envisageons de réaliser une hybridation *in situ* dirigée contre la séquence

de résistance à la néomycine, afin d'étudier la participation éventuelle des cellules cancéreuses à la formation de la paroi des vaisseaux.

Ets-1 apparaît donc à nouveau comme coordinateur d'un réseau complexe de molécules impliquées dans l'angiogenèse, comme nous l'avons décrit pour les mécanismes d'invasion des cellules cancéreuses. Il est toutefois beaucoup plus difficile de définir la contribution des différents acteurs moléculaires dans cette induction angiogénique, pour plusieurs raisons. La principale raison réside dans le fait que de nombreuses molécules sont exprimées par les deux partenaires, et parfois retrouvées dans le sérum dans lequel ils sont cultivés. Prenons l'exemple de la MMP-9, qui est exprimée différemment par les différentes sous-lignées MMT et est susceptible d'influer sur la morphogenèse des cellules endothéliales. L'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques ou d'anticorps bloquants de cette molécule pourra nous informer sur son importance dans cette morphogenèse, sans forcément nous renseigner quant à la contribution des MMP-9 produites par les cellules MMT dans ce processus. Il en est de même pour des facteurs de croissance comme l'HGF/SF et le VEGF. Pour définir cette contribution, il faut inhiber spécifiquement dans un type cellulaire l'expression de la molécule d'intérêt ou son récepteur, par des stratégies d'ARN anti-sens ou d'interférence à l'ARN. Il serait donc intéressant d'inhiber l'expression de l'HGF/SF, du VEGF ou de la MMP-9 pour étudier leur impact sur le potentiel angiogénique des cellules cancéreuses.

Toutefois, ces stratégies sont beaucoup plus lourdes à mettre en place. J'ai réalisé des expériences d'interférence à l'ARN dans le but d'éteindre l'expression de la MMP-9 dans les cellules MMT surexprimant Ets-1 et voir si cela affectait la réponse des cellules endothéliales au milieu conditionné par ces cellules MMT. Les premiers résultats ne se sont pas montrés convaincants, bien qu'il faudrait améliorer le protocole d'interférence à l'ARN utilisé pour conclure définitivement à l'absence de fonction de la MMP-9 sécrétée par les cellules MMT sur la morphogenèse des cellules endothéliales. A cette première difficulté dans l'explication moléculaire de l'induction angiogénique s'ajoute la possibilité d'établir une vascularisation par différents processus autres que l'angiogenèse de bourgeonnement, impliquant d'autres mécanismes moléculaires.

Depuis de nombreuses années et les travaux pionniers de Judah Folkman, l'angiogenèse tumorale est considérée comme un moyen important pour apporter aux tumeurs des nutriments et de l'oxygène nécessaires à sa croissance. Plus récemment, des études ont indiqué que les cellules endothéliales stimulaient la survie des cellules cancéreuses par la sécrétion de facteurs solubles, avant même la formation de néo-vaisseaux par ces cellules (Shan et al., 2004). Nos expériences de co-culture *in vitro* confirment cette action paracrine des cellules endothéliales sur les cellules cancéreuses, et suggèrent un rôle promoteur d'une invasion plus dispersée des cellules cancéreuses dans des matrices tridimensionnelles.

Parmi les autres rôles de l'angiogenèse tumorale, un des plus importants à mieux caractériser est celui qu'elle a dans la dissémination systémique de cellules métastatiques.

## 4. Ets-1 et le processus de métastase

Les cancers traités à des étapes précoces, le sont souvent avec plus de succès que ceux détectés à des stades avancés. De ce point de vue, le dépistage de plus en plus précoce des cancers constitue une avancée majeure dans la lutte contre les cancers. Toutefois, malgré ces réels progrès effectués au cours des dernières décennies, la mortalité liée aux cancers reste encore élevée, et elle est même devenue depuis peu la première cause de décès en France (Aouba et al, 2007). Il faut bien sûr relativiser ce constat par le vieillissement de la population, à l'origine d'une hausse de l'incidence des cancers, et l'efficacité des traitements contre les maladies cardiovasculaires.

### **4.1. Le point faible des traitements actuels, les métastases**

Bien que les tumeurs primaires soient de mieux en mieux traitées, l'immense majorité des décès liés au cancer n'est pas le fait de ces tumeurs primaires mais est lié au développement de métastases à distance. Il arrive parfois que ces foyers métastatiques se manifestent plusieurs années ou décennies après qu'une tumeur primaire ait été traitée avec succès en apparence. Les cellules métastatiques échappent en effet le plus souvent aux thérapies, car elles acquièrent des avantages de prolifération/survie, et des résistances aux traitements anticancéreux (chimiothérapie et radiothérapie). De plus, la relativement faible prolifération des cellules invasives suggère que les traitements anti-prolifératifs pourraient se révéler inefficaces contre ces populations cellulaires pourtant responsables du caractère agressif des cancers. La colonisation de sites secondaires par ces cellules va altérer le fonctionnement correct des tissus atteints, peut être la cause de douleurs intenses, dans le cas des métastases osseuses notamment, mais surtout peut entraver le fonctionnement correct d'organes vitaux. C'est pourquoi il est urgent de mettre au point de nouvelles stratégies ciblant le processus métastatique, afin d'améliorer significativement la qualité de vie et le pronostic vital des patients atteints de cancer.

Les ganglions lymphatiques axillaires sont souvent le premier site colonisé par les cellules cancéreuses mammaires métastatiques, et ce phénomène constitue un des premiers signes cliniques du caractère métastatique. Il n'est toutefois pas défini si la métastase procède de façon séquentielle à partir de cette colonisation lymphatique, ou peut avoir lieu en parallèle par la voie hématogénique. Il n'y a cependant pas de voie lymphatique directe des ganglions lymphatiques jusqu'aux sites préférentiels des métastases des cancers du sein, suggérant que ces cellules auront de toute façon besoin d'emprunter la voie sanguine pour atteindre finalement ces sites (Chambers et al., 2002). Les interactions entre cellules cancéreuses et cellules endothéliales paraissent donc critiques pour le déroulement de ce processus.

### **4.2. Les interactions avec l'endothélium dans le processus de métastase**

Nous avons montré *in vitro* que la surexpression d'Ets-1 par les cellules cancéreuses mammaires favorisait leur adhérence à un tapis de cellules endothéliales, ce qui corrélait avec leur expression de différents médiateurs potentiels de cette adhérence, comme l'intégrine  $\alpha V\beta 3$ , ICAM-1 ou la VE-cadhérine. De plus, le caractère inflammatoire de la réaction stromale favorise l'expression

par l'endothélium de molécules induisant le recrutement des cellules immunitaires (Fox et al., 1995), en favorisant leur rolling et leur transmigration. Ces mécanismes semblent pouvoir également être empruntés par les cellules cancéreuses. Cette adhérence des cellules MMT observée *in vitro* reflète la capacité de ces cellules à interagir avec les parois des capillaires, bien qu'*in vivo* les cellules semblent avoir besoin d'interactions renforcées, via les plaquettes notamment, pour résister au flux sanguin et adhérer fermement à la paroi intérieure de l'endothélium. Il est également intéressant de noter que les vaisseaux tumoraux présentent souvent une perméabilité accrue, ce qui favorise le relargage de fibrine autour des vaisseaux. Cette fibrine va pouvoir servir de support de migration aux cellules endothéliales en bourgeonnement mais aussi potentiellement aux cellules cancéreuses. De plus, des discontinuités dans l'endothélium des vaisseaux tumoraux peuvent également faciliter l'accès des cellules endothéliales à la circulation systémique.

Les cellules de cancer du sein peuvent aussi provoquer la perte des jonctions entre les cellules endothéliales (Lewalle et al., 1997), favorisant ainsi les processus d'intra- et d'extravasation. Je n'ai cependant pas observé lors de mes expériences de telles figures de disjonction des cellules endothéliales, même après plusieurs heures d'incubation des deux types cellulaires. Il est possible toutefois qu'une réduction des interactions entre cellules endothéliales ait eu lieu, sans qu'elle soit observable phénotypiquement. La réalisation d'expériences d'immunocytochimie dirigées contre la VE-cadhérine permettrait sans doute de répondre à cette question.

#### **4.3. L'étude du rôle d'Ets-1 dans le processus de métastase**

Le fait que la surexpression d'Ets-1 dans les cellules cancéreuses MMT favorise leur adhérence aux cellules endothéliales suggérerait que ces cellules cancéreuses injectées dans la circulation sanguine des souris pourraient développer de plus nombreuses métastases. Ceci n'a toutefois pas été vérifié dans la pratique, et plusieurs raisons peuvent expliquer ce phénomène. La principale raison réside dans le fait que le piégeage des cellules métastatiques dans les capillaires et leur association avec les plaquettes sanguines semblent être le mécanisme classique d'arrêt de ces cellules dans les organes distants (Gupta and Massague, 2006). Lors de l'injection massive de cellules cancéreuses dans la circulation sanguine, il est plus que probable que les foyers métastatiques se développant le plus rapidement proviennent de paquets de cellules « coincés » dans les capillaires, sans que des mécanismes d'adhérence spécifique ne soient forcément requis. Au cours de notre expérience d'injection des cellules MMT dans la veine de la queue de la souris, nous avons essentiellement observé le développement de foyers métastatiques pulmonaires, ce qui est plutôt courant dans ce genre d'expérience. L'incidence des métastases pulmonaires, quant à elle, n'est pas significativement modulée dans notre modèle par l'expression d'Ets-1 dans les cellules cancéreuses. Par contre, cette expression d'Ets-1 influe fortement sur la croissance de ces métastases, comme observé déjà dans les tumeurs primaires. Notre expérience d'injection des cellules MMT en intra-veineuse semble donc plus correspondre à un test de colonisation du parenchyme pulmonaire qu'à une évaluation réelle des capacités métastatiques des cellules. Il est à noter ici que d'autres auteurs en sont venus aux mêmes conclusions concernant ce type d'expérience (Fantozzi and Christofori, 2006).

## 5. Perspectives fondamentales et thérapeutiques

Malgré une quantité importante de travaux sur le processus de métastase, celui-ci est encore loin d'être complètement compris. La difficulté d'appréhender correctement ce mécanisme vient notamment du fait qu'il affecte une population réduite de cellules, difficile à visualiser en comparaison avec le développement d'une tumeur primaire.

### **5.1. Les gènes importants pour le processus métastatique**

La plupart des modèles *in vitro* utilisés pour comprendre les métastases ne reflètent que partiellement certains aspects de celles-ci, sans réussir à rendre compte de tous. En parallèle, les modèles animaux de cancer actuels peinent à produire des métastases, la détection de ces métastases est souvent problématique, et certaines étapes de ce processus échappent encore à notre compréhension (pour revue, voir (Fantozzi and Christofori, 2006)). Des expériences ont été réalisées au cours des dernières années pour tenter de définir les gènes impliqués dans ce processus. Différentes signatures d'expression génique indicatrices du pronostic des patients ont ainsi été identifiées, qui ne se recoupent cependant pas toujours, comme on peut le voir en comparant deux signatures obtenues à partir de stades précoces de cancers du sein (van 't Veer et al., 2002; Wang et al., 2005b), (revu dans (Nguyen and Massague, 2007)). Cela suggère une certaine précaution quant à la pertinence de ces données dans l'absolu. Ceci peut s'expliquer notamment par le fait que l'analyse de l'expression de gènes exprimés par l'ensemble de la tumeur masque celle d'une sous-population de cellules métastatiques. Il a aussi été proposé que différentes batteries de gènes pourraient être nécessaires au cours des différentes étapes de la métastase.

Les gènes initiateurs de métastases sont impliqués dans la dissémination des cellules cancéreuses, et incluent les gènes impliqués dans la motilité, l'invasion et l'angiogenèse (Nguyen and Massague, 2007). L'invasion et l'angiogenèse sont des événements importants pour les étapes initiales de la métastatisation. Le caractère invasif fournit un avantage aux cellules cancéreuses pour migrer dans le microenvironnement à la recherche de différents éléments favorables (cellules, facteurs de survie...) et trouver les vaisseaux pour gagner la circulation systémique. Dans cette vision des choses, Ets-1 serait un gène initiateur de métastases. Nos travaux indiquent en effet qu'Ets-1 fournit un avantage aux cellules en terme de dissociation, de motilité et d'invasion, et favorise jusqu'aux interactions avec les cellules endothéliales, qui sont essentielles pour le processus d'intravasation. Ces gènes initiateurs de tumeurs ne sont cependant pas suffisants pour répondre à toutes les conditions nécessaires de formation des métastases. Leur rôle dans la tumorigenèse interviendrait séquentiellement après l'expression de gènes nécessaires à la croissance de la tumeur primaire, et avant celle de gènes impliqués dans la survie et la colonisation par les cellules cancéreuses de l'organe distant. Ces différentes classes de gènes ne seraient pas forcément exprimées tout au long du processus cancéreux. Leur expression pourrait être guidée par les signaux environnementaux et, de plus, les cellules exprimant les signatures d'expression moléculaire les plus adaptées à leur environnement seraient naturellement sélectionnées (Gupta and Massague, 2006) (Rinker-Schaeffer and Hickson, 2006).

## **5.2. La place d'Ets-1 dans le processus de métastase**

Il est ainsi possible que l'expression d'Ets-1 qui est propice à la dissémination initiale des cellules mais qui constitue un désavantage sélectif de croissance soit perdue dans la tumeur secondaire néo-formée. Cette hypothèse est d'autant plus réaliste que, comme nous l'avons déjà évoqué, la surexpression d'Ets-1 dans les cancers du sein est probablement induite par l'environnement. Ets-1 peut être induit par des facteurs solubles, dont les facteurs de croissance, ou des conditions environnementales, comme l'hypoxie. Une fois l'organe distant atteint, les cellules métastatiques ne sont en général plus stimulées par les mêmes facteurs que dans la tumeur primaire, et retrouvent des conditions normoxiques. L'expression d'Ets-1 par ces cellules pourrait de ce fait revenir à son niveau basal. Dans une vision finaliste des choses, Ets-1 serait le médiateur d'un signal perçu par les cellules les instruisant de migrer, et son expression s'annulerait en même temps que sa mission de dissémination serait accomplie avec l'accès à la circulation sanguine.

Les modèles de greffe de cellules tumorales en sous-cutané chez la souris sont décrits comme très peu métastatiques. Il avait déjà été préalablement déterminé que des tumeurs MMT obtenues ainsi ne formaient que quelques rares foyers métastatiques de quelques cellules, observés par hybridation in situ d'un nombre important de lames. Pour vérifier l'importance d'Ets-1 dans les phases initiales de métastatisation de telles tumeurs, il serait intéressant de mesurer la quantité de cellules tumorales circulantes dans le sang. Toutefois, ces cellules étant généralement rares, on a souvent recours pour ce genre d'expérimentation à des méthodes de PCR dirigées par exemple contre les séquences Alu du génome humain dans le cas de xénogreffes. Dans notre modèle, on pourrait imaginer d'amplifier la séquence conférant la résistance à la néomycine de nos sous-lignées MMT. Un problème majeur de ce genre d'approche est toutefois qu'on peut détecter aussi des cellules mortes ou fragmentées après apoptose, sans indication du nombre de cellules métastatiques vivantes capables de former des foyers secondaires.

Une approche plus intéressante pour mieux définir le rôle d'Ets-1 dans la tumorigenèse mammaire et la métastatisation serait de moduler l'expression d'Ets-1 dans des modèles de souris transgéniques. A ma connaissance, les seuls modèles de ce type décrits à ce jour consistent en une suppression totale de l'expression d'Ets-1 dans l'organisme entier. Ces souris ont permis de montrer qu'Ets-1 était crucial pour le développement des lymphocytes et des cellules NK (Natural Killer) (Bories et al., 1995) (Barton et al., 1998). Pour s'affranchir de tels problèmes, il faudrait donc réussir à restreindre la modulation d'expression d'Ets-1 à la glande mammaire. De plus, les tumeurs mammaires ne se produisant pas fréquemment de manière spontanée chez la souris, il serait sans doute nécessaire de croiser de telles souris avec des modèles menant à une incidence forte de tels cancers. Ce genre d'approche ne peut s'envisager qu'à long terme dans des infrastructures capables de générer et d'analyser de telles souris.

De façon plus pragmatique et plus proche de nous, il serait intéressant dans un premier temps d'étudier si l'impact d'Ets-1 sur la balance croissance/invasion observé dans notre modèle est spécifique à la tumorigenèse mammaire ou généralisable à d'autres types de cancers. Différents types de cancers présentent en effet une surexpression d'Ets-1 associée à un caractère agressif ou

métastatique, comme les cancers du poumon, de l'intestin, de l'endomètre ou de l'ovaire (cf introduction, chapitre 7.4.b).

### **5.3. Ets-1 en tant que cible des thérapies anti-cancéreuses**

Il est clair depuis plusieurs années que les cellules métastatiques sont le problème majeur des cancers solides. Les cellules cancéreuses disséminées au sein du tissu hôte sont comparables à une armée de guérilla constituée de petites unités dispersées sur une surface importante, et difficiles à circonscrire et éliminer (Tarin, 2006). Etant donné que cibler ces cellules ayant développé des résistances multiples semble hors d'atteinte à l'heure actuelle, il est tentant de concevoir le blocage initial de la dissémination de ces cellules pour empêcher la récurrence de lésions métastatiques après un traitement de la tumeur primaire réussi en apparence. C'est déjà un peu dans cette optique que sont réalisés actuellement les traitements néo-adjuvants administrés avant l'exérèse d'une tumeur, pour réduire au maximum son expansion et faciliter son retrait, en laissant le moins possible de cellules cancéreuses qui pourraient s'échapper. Cela suppose toutefois de pouvoir détecter les cancers à des stades suffisamment peu avancés, ce qui constitue le travail de toute une partie de la communauté scientifique et hospitalière.

Le facteur de transcription Ets-1 apparaît comme une cible intéressante pour ces stratégies thérapeutiques. De par son rôle de coordinateur, il offre la possibilité de bloquer simultanément différents mécanismes de l'invasion cellulaire précoce. De plus, dans des cellules présentant une forme mutée de p53, comme c'est le cas dans de nombreuses tumeurs, Ets-1 peut stimuler l'expression du gène *MDR1* impliqué dans la résistance aux agents chimiothérapeutiques (Sampath et al., 2001). Ets-1 est également exprimé par les cellules endothéliales lors de l'angiogenèse tumorale. Précédemment, l'administration systémique de notre dominant négatif sous forme rétrovirale s'est révélée efficace pour bloquer cette angiogenèse *in vivo* (Pourtier-Manzanedo et al., 2003). Lors de cette étude, cet outil a démontré des effets inhibiteurs également sur la réponse inflammatoire, et l'analyse de la moelle osseuse des souris a révélé un taux d'infection des cellules immunitaires très important. Ce type d'approche n'est donc pas envisageable chez l'humain, tant que la communauté scientifique ne disposera pas de méthodes pour cibler spécifiquement les cellules tumorales ou les cellules néo-angiogéniques.

Par ailleurs, des structures protéiques endogènes très proches du mutant dominant négatif utilisé ont récemment été mises en évidence (données confidentielles). Il serait intéressant de vérifier leur expression lors de la progression tumorale et leur impact sur celle-ci, pour mieux comprendre si elles peuvent y agir comme des inhibiteurs endogènes d'Ets-1, intervenant dans des boucles de rétrocontrôle négatif. Il serait alors tentant d'essayer de moduler la progression tumorale, via l'induction de l'expression de ces formes. Toutefois, il faudrait là encore s'assurer de ne pas affecter le système immunitaire. Le chemin reste donc encore très long avant de pouvoir transférer nos indications « from bench to bedside ». Quoiqu'il en soit, nous espérons que notre contribution s'avère utile à une meilleure compréhension des premières étapes de la dissémination métastatique, dans l'espoir de pouvoir mieux cibler ce processus.

Dans l'ensemble, nos travaux indiquent que le facteur de transcription Ets-1 favorise les capacités invasives et angiogéniques des cellules cancéreuses mammaires, ce qui pourrait contribuer à la corrélation de son expression avec un mauvais pronostic vital pour les patientes. Nos résultats confortent de plus de précédentes données menant à une nouvelle interprétation du lien entre les processus de croissance et d'invasion. Ets-1 apparaît comme un régulateur clé de ces mécanismes, et son niveau d'expression semble pouvoir aiguiller les cellules vers l'un ou l'autre de ces processus.



## **Valorisation des compétences un nouveau chapitre de la thèse**

chapitre réalisé en Septembre 2006 avec l'aide de François GEUZE dans le cadre d'une activité proposée par Claudine DUMONT, et réactualisé

# 1. CADRE GENERAL ET ENJEUX DE LA THESE

## **1) Présentation de la thèse**

Le cancer du sein est le cancer le plus fréquent et le plus mortel chez les femmes en France. Au cours de ma thèse, je me suis intéressé à un facteur de transcription surexprimé dans les cancers du sein, Ets-1, qui peut contrôler l'expression de gènes en lien avec l'invasion par les cellules de leur environnement. Ce comportement invasif est un trait caractéristique de la majorité des cancers du sein et favorise leur expansion.

Nous avons déterminé dans notre modèle un réseau régulé par Ets-1, de molécules impliquées dans le caractère invasif des cellules cancéreuses mammaires. Les tumeurs en formation stimulent par ailleurs la formation de vaisseaux sanguins, ce qui va leur permettre de se nourrir, se développer puis éventuellement se disséminer dans l'organisme et former des métastases. On parle de tumeurs angiogéniques. Pour parfaire la compréhension du rôle de Ets-1 dans la formation et l'évolution des tumeurs, nous avons donc en parallèle décrypté son impact sur le dialogue entre cellules de cancer du sein et vaisseaux sanguins.

Ces deux aspects de la tumorigenèse mammaire ont été étudiés en parallèle, et pour chacun d'eux, j'ai associé des observations de « comportement » des cellules avec l'étude de l'expression de molécules associées à ces phénomènes.

## **2) Contexte de la thèse**

L'équipe dans laquelle j'ai commencé ma thèse comprenait 3 titulaires : le Pr Xavier DESBIENS (chef du groupe), le Dr Albin POURTIER, le Dr Anne CHOTTEAU, ainsi que l'étudiante en thèse sous sa direction, au sein d'un laboratoire universitaire appartenant à l'Institut Fédératif de Recherche 118, ainsi qu'à la Cancéropôle Nord-Ouest.

Une restructuration de cette équipe d'accueil a eu lieu lors de la vague de contractualisation de 2005, et j'ai intégré au 01/01/2006, avec mes directeurs de thèse, une unité CNRS multidisciplinaire regroupant de nombreuses équipes de l'Institut de Biologie de Lille. L'équipe dans laquelle nous travaillons s'intitule « Initiation et Evolution des Cancers Epithéliaux ».

Au-delà des problèmes liés au déménagement, j'ai pu profiter d'échanges scientifiques au sein de deux environnements thématiques différents. Cela a été encore plus marqué dans mon dernier laboratoire, par le biais de réunions hebdomadaires, de fréquentes discussions thématiques et méthodologiques, et par la mise en commun de nos compétences.

Ma thèse a bénéficié de la collaboration de différents partenaires :

- le Centre Commun de Microscopie d'Imagerie Cellulaire, à l'Université des Sciences et Technologies de Lille
- l'Institut de Pathologie de Bonn
- la plateforme d'Imagerie du Centre Hospitalier Régional, à Lille

La molécule à laquelle je me suis intéressé, Ets-1, est décrite comme clé dans divers mécanismes liés à la cancérisation, et peut être exprimée par les cancers ou leur environnement proche. D'autre part, de plus en plus d'études mettent en évidence l'importance des interactions de la tumeur avec son environnement pour son développement. Cependant le choix des partenaires étudiés (cellules cancéreuses et cellules endothéliales), et encore plus l'étude de Ets-1 dans ces modèles expérimentaux, était original et nous a permis de profiter de nombreuses données bibliographiques sans souffrir de vraie concurrence.

Au cours du cursus préliminaire à ma thèse, j'ai effectué plusieurs stages dans différents laboratoires, sur des thématiques différentes. A la fin de mon année de maîtrise, j'ai contacté différentes personnes pour savoir si elles étaient intéressées par un étudiant en DEA pour l'année suivante. Le sujet que m'a proposé le Dr Albin POURTIER, en intégrant la participation de l'environnement de la tumeur à la progression de cette dernière, a suscité en moi de la curiosité ainsi qu'un vif intérêt.

## **2. DEROULEMENT, GESTION ET COUT DU PROJET DE THESE**

### **1) Préparation du projet**

Les thématiques que j'ai abordées au cours de ma thèse avaient été définies avant mon arrivée en DEA par le Dr Albin Pourtier.

Ces thématiques, ainsi que les techniques à mettre en oeuvre étant plutôt innovantes au sein du laboratoire, ces travaux ont constitué une certaine prise de risque. Après avoir validé la faisabilité de certains points, j'ai ensuite contribué à orienter ce projet en fonction des indices obtenus et de la littérature scientifique du sujet.

Ce projet a été mis en oeuvre grâce à différents moyens financiers. Tout d'abord, les équipes qui m'ont accueilli disposaient de financements de base, accordés par l'Université, puis par le CNRS. Ces moyens étant malheureusement insuffisants, d'autres financements pour des équipements ou des consommables ont dû être demandés auprès de différents organismes, comme la Ligue contre le Cancer, et l'Association pour la Recherche contre le Cancer. Par la rédaction de courts paragraphes, j'ai participé au montage de certains de ces dossiers de financement, ainsi qu'à la rédaction des rapports d'activité. J'ai par ailleurs personnellement rédigé, sous la direction du Dr Albin Pourtier, un projet présenté à la Société Française du Cancer, et qui m'a permis d'obtenir une bourse de 1300 Euros pour aller réaliser certaines expériences en Allemagne, en collaboration avec le Pr. Wernert à l'Institut de Pathologie de Bonn.

## **2) Cadrage et conduite du projet**

Au cours de l'année de préparation du DEA, j'ai tout d'abord validé des modèles d'étude que nous avons mis en place, en vérifiant la correcte expression par les cellules des modifications que nous y avons induites, puis l'adéquation de modèles *in vitro* à répondre aux questions que nous nous posions. Les premiers résultats obtenus ont été encourageants, et m'ont permis d'obtenir une allocation de thèse du ministère, en défendant un projet de thèse préparé avec l'aide de mes tuteurs.

Ce projet était basé sur deux axes majoritaires, que j'ai menés en parallèle. D'un côté, je me suis appliqué à décrire le rôle de Ets-1 dans le comportement invasif de cellules de cancer mammaire. D'autre part, j'ai mis en évidence un rôle de Ets-1 dans les capacités de ces cellules cancéreuses à induire le développement de pseudo-vaisseaux sanguins *in vitro*.


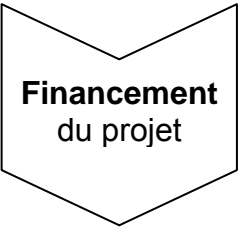

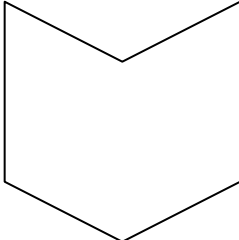
J'ai acquis au cours de cette thèse une autonomie croissante, en ce qui concerne la préparation des expériences, l'analyse des résultats, et la définition au quotidien des priorités nécessaires à l'avancement de mon projet.

Au cours de cette thèse, des problèmes d'ordre méthodologique se sont présentés. Différentes discussions avec d'autres chercheurs maîtrisant les techniques en question nous ont été très utiles, pour améliorer les protocoles expérimentaux utilisés. Par ailleurs, une lecture régulière de la littérature concernant les thèmes mais aussi les méthodes que nous abordions m'a permis de découvrir des solutions alternatives à nos problèmes.

Lors de mon année de DEA, j'ai eu des échanges quasi quotidiens avec le Dr Albin POURTIER, pour discuter des résultats, interpréter la façon dont ils éclairaient le projet, planifier les étapes suivantes. Puis, au fur et à mesure de mon gain d'autonomie, ces échanges se sont espacés pour laisser place à des entretiens de fréquence hebdomadaire et des bilans de fréquence mensuelle. Des réunions avec les membres des autres équipes ont été organisées, ponctuellement au sein de mon premier laboratoire, puis de façon hebdomadaire dans mon deuxième laboratoire d'accueil, ce qui m'a permis de présenter mes résultats une fois tous les deux mois. Par ailleurs des séminaires avec les autres membres de l'unité ont eu lieu également de façon quasi-hebdomadaire, dans le but de décloisonner nos recherches.

J'ai également présenté mes résultats lors de deux réunions du Réseau Lillois de Cancérologie, sous forme de poster et à l'oral. Mon tuteur a de plus exposé un poster concernant mes résultats au forum Eurocancer en 2006. Enfin, j'ai participé au congrès annuel de la Tumor Microenvironment Society en 2007, au cours duquel j'ai présenté la deuxième partie de mes résultats de thèse sous forme de poster.

Un résumé des différentes phases de ma thèse est présenté ci-dessous :

PHASE	ACTION	PRODUIT		
 <p><b>Préparation</b> du projet</p>	<p>Réalisation de stages dans différents laboratoires. Entretiens avec différents chercheurs. Lecture de la bibliographie associée au sujet.</p>			
 <p><b>Financement</b> du projet</p>	<p>Demandes de financement auprès de différents organismes (consommables, matériel, déplacement)</p>	<p>Obtention de <b>bourses</b> de la Ligue, de l'ARC et de la SFC</p>		
 <p><b>Réalisation</b> du projet</p>	<table border="1"> <tr> <td> <p><b><i>Ets-1 et invasion</i></b> Organisation Adhérence migration</p> </td> <td> <p><b><i>Ets-1 et angiogenèse</i></b> Coculture Stimulation</p> </td> </tr> </table>	<p><b><i>Ets-1 et invasion</i></b> Organisation Adhérence migration</p>	<p><b><i>Ets-1 et angiogenèse</i></b> Coculture Stimulation</p>	<p>Meilleure compréhension du rôle de Ets-1 dans l'évolution des cancers du sein</p>
<p><b><i>Ets-1 et invasion</i></b> Organisation Adhérence migration</p>	<p><b><i>Ets-1 et angiogenèse</i></b> Coculture Stimulation</p>			
	<p>Préparation des réunions, mise en forme des résultats, Présentation sous forme de poster et à l'oral Rédaction de rapports d'activités, d'articles</p>	<p>Posters Publications Thèse</p>		

### **3) Evaluation du coût du projet, et financement de ce projet**

<p>Si l'on s'intéresse au coût des salaires et des charges sociales des personnes intervenant dans ce projet, on considérera ma participation à temps plein, et celle de mes co-directeurs de thèse à un tiers temps étant donné leur charge d'enseignement</p> <p>Alessandro, thésard, plein temps, allocation du Ministère : 1400Euros brut/ mois x 48 mois,</p> <p>Pr. Xavier DESBIENS, tiers-temps : 1300 Euros brut/ mois x 48 mois</p> <p>Dr. Albin POURTIER, Maître de Conférence, tiers-temps : 700 Euros brut/ mois x 48 mois</p>	163200 Euros
<p>Il faut bien sûr également évaluer le coût de ce projet en termes de produits consommables (participation estimée à 40000 Euros, selon l'utilisation en deux ans d'une bourse de la Ligue d'un montant de 20000 Euros), et de matériel d'équipement (participation estimée à 10000 Euros).</p>	50000 Euros
<p>Je suis par ailleurs parti deux quinzaines de jours en Allemagne pour y apprendre les techniques de microdissection-laser suivie de RT-PCR semi-quantitative et les adapter à notre modèle de co-culture. J'ai pour cela sollicité et obtenu une bourse de 1300 Euros auprès de la Société Française du Cancer. Il faut également additionner assister à ces frais de déplacement 800 Euros grâce auxquels j'ai pu assister aux congrès internationaux du centenaire de la Société Française du Cancer à Bordeaux et de la Tumor Microenvironment Society à Florence.</p>	2100 Euros
<p>Enfin, il faut tenir en compte l'amortissement des bâtiments, les frais d'entretien, et les dépenses de type eau, électricité, chauffage, qui s'élèvent à 5000 Euros.</p>	5000 Euros
<b>TOTAL</b>	<b>220300 Euros</b>

Le coût total de ce projet est donc estimé à une valeur de 220300 Euros.

### **3. COMPETENCES ET QUALITES MISES EN OEUVRE**

En prenant du recul sur ce projet que j'ai mené, je m'aperçois qu'il m'a offert de progresser et de m'affirmer sur le plan scientifique mais également sur le plan humain.

#### **1. Compétences scientifiques**

Lors de cette thèse, de fréquentes recherches bibliographiques m'ont permis d'augmenter mon bagage de connaissances théoriques, mais aussi méthodologiques, dans les domaines de la cancérologie et de la biologie cellulaire et moléculaire.

Par ailleurs, j'ai développé des compétences techniques en biologie cellulaire, concernant entre autres : la co-culture de deux types cellulaires en 3D, l'interférence ARN, l'étude de l'expression de différentes classe de molécules, par RT-PCR, Western blot, et zymographie, ainsi que l'immunofluorescence, l'inclusion et la coupe de tissus, les colorations cytochimiques.

#### **2. Gestion du projet**

J'ai eu la possibilité de mettre en oeuvre des méthodologies variées d'étude de la cellule, et grâce à des discussions avec d'autres chercheurs ainsi qu'à des recherches bibliographiques, j'ai pu acquérir une conscience de la faisabilité des expériences, et une certaine réactivité afin d'apporter des solutions correctives à ces problèmes.

J'ai également acquis des capacités à organiser au mieux mon emploi du temps, afin de gérer plusieurs expériences simultanément (parfois sur des appareils utilisés en commun), ainsi que l'analyse des résultats, leur synthèse et mise en forme, la bibliographie.

L'échéancier défini au début de ma thèse, a dû être réévalué, et certains choix ont été nécessaires, en fonction de la vitesse d'avancée des travaux. En marge de la ligne conductrice du projet, différentes expériences ont été envisagées. Certaines pistes ont dû être mises de côté, d'autres ont apporté des éléments de réponse importants, venant éclairer mes résultats sous un autre angle.

#### **3. Capacités d'encadrement, expérience d'enseignement**

J'ai au cours de ma thèse eu la responsabilité d'étudiants venus effectuer un stage. Ceux-ci avaient des niveaux différents en termes de connaissances théoriques ou de pratique expérimentale (1<sup>ère</sup> année de BTS, 2<sup>ème</sup> ou 3<sup>ème</sup> année de licence). J'ai pris du temps pour leur expliquer l'intérêt de nos recherches et le but des expériences mises en oeuvre, mais aussi pour leur montrer la façon de préparer ces expériences en terme de gestion du temps et de manipulation proprement dite.

J'ai par ailleurs enseigné l'embryologie, des Amphibiens aux Mammifères, en travaux pratiques, à des étudiants de 1<sup>ère</sup> année de licence. Puis, au cours de cette dernière années, j'ai donné des enseignements sous forme de travaux dirigés à des étudiants de 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> années de

licence, au sujet de la matrice extracellulaire, des stratégies expérimentales, de l'utilisation des modèles animaux et des voies de signalisation intracellulaires. Ceci m'a permis de me confronter aux problématiques de pédagogie, de gestion humaine de groupe, ainsi que d'évaluation.

#### **4. Compétences en communication**

Tout d'abord, j'ai eu l'occasion au cours de ma thèse de m'entretenir, avec des chercheurs de différents niveaux, afin de partager des équipements, solliciter des conseils, ou des démonstrations, obtenir le prêt d'échantillons pour faire des tests, et inversement les aider, en bref de travailler en équipe. J'ai également réalisé des expériences en collaboration avec des chercheurs d'autres équipes, comme le Dr Anne-Sophie VERCOUTTER-EDOUART à l'Université des Sciences et Technologies de Lille, ou le Dr Sylvain JULIEN, actuellement au Cancer Institute de Londres.

Je me suis confronté aux problématiques de présentation de résultats. J'ai ainsi appris à synthétiser mes résultats et à les mettre en valeur, à l'écrit ou à l'oral, en des temps plus ou moins restreints. J'ai dû apprendre à m'affirmer et à prendre la parole en public, et faire preuve de persuasion. J'ai ainsi présenté mes résultats à l'oral ou sous forme de poster lors de la réunion de Réseau Lillois de Cancérologie et du congrès annuel de la Tumor Microenvironment Society respectivement. Ce dernier événement a également été l'occasion de tisser des contacts avec différents jeunes chercheurs étrangers.

Lors des réunions ou séminaires, j'ai également développé des capacités à écouter, à absorber des concepts, et à saisir l'intérêt immédiat ou à plus long terme d'une donnée.

Un des points les plus importants dans la valorisation de la thèse, en vue de postuler à un poste de chercheur, repose sur la rédaction en anglais de publications dans des journaux de haute renommée. J'ai développé au cours de ma thèse des capacités à lire en anglais, à rédiger en anglais, mais aussi à discuter en anglais. Cela s'est fait au gré des lectures, ou des discussions avec les chercheurs étrangers au sein de nos laboratoires, et encore plus lors de mon stage en Allemagne, où cela a constitué mon moyen de communiquer au quotidien. En parallèle, j'ai pris part à des cours d'anglais organisés par l'Ecole Doctorale et à la préparation du TOEIC (Test Of English for International Communication).

#### **5. Gestion budgétaire et administrative**

Au cours de cette thèse, j'ai appris à gérer les stocks de produits, à contacter différents fournisseurs, à effectuer des commandes en fonction des budgets et des priorités. J'ai par ailleurs dû remplir différentes procédures administratives, en terme de conventions de stage, d'ordres de mission, de rapports d'activités, de dossiers pour demander un financement...



## **6. Qualités personnelles**

J'ai appris à m'adapter au cours de ma thèse à deux laboratoires différents, puis à y participer activement. J'ai apporté ma convivialité dans ces deux laboratoires, au profit d'une atmosphère de travail plus chaleureuse. Cela m'a aidé à résister au stress qui s'accumule tout au long de la thèse, ainsi qu'à persévérer dans les périodes difficiles.

J'ai eu l'opportunité de développer mon esprit d'initiative et de création, et en contrepartie j'ai apporté toute mon énergie à la réalisation de ce projet.

## **4. RESULTATS ET IMPACT DE LA THESE**

Pour le laboratoire où j'ai effectué ma thèse, mes travaux ont permis la mise en place de modèles utiles dans l'étude d'autres interactions associées aux cancers. Ces travaux de recherche fondamentale apportent de nouveaux éléments dans la régulation du dialogue entre les cellules cancéreuses et leur environnement. J'ai ainsi participé à l'effort collectif de nombreux chercheurs, et des organismes qui nous ont financés, afin d'améliorer la compréhension des mécanismes de progression tumorale, notamment en ce qui concerne le processus de métastase, responsable de la majorité des décès par cancer. Ces données supplémentaires devraient permettre à terme de développer des nouvelles thérapeutiques.

Ce nouveau chapitre m'a permis de prendre du recul sur le travail effectué et les compétences mises en oeuvre. J'ai alors pu envisager la thèse comme une gestion de projet, dont j'avais inconsciemment appréhendé les différents aspects.

En ce qui concerne la définition de mon projet professionnel, ma thèse m'a conforté dans mon envie de m'investir dans la recherche bio-médicale. Mon objectif d'intégrer des organismes publics de recherche tels que l'INSERM ou le CNRS, m'a poussé à développer un réseau de contacts important dans le monde académique de la recherche publique. J'envisage cependant maintenant aussi la possibilité de réaliser ce projet au sein de secteurs « recherche et développement » d'entreprises privées.

# BIBLIOGRAPHIE

## Sources non référencées dans Pubmed:

**Jerzy E. Tyczynski, Freddie Bray, D. Maxwell Parkin**Tyczynski (2002) Breast Cancer In Europe. *European Network Of Cancer Registries* Vol. 2, December 2002

**Véronique Baron, Patricia Lebrun** (2001). Coopération entre les intégrines et les récepteurs à activité tyrosine kinase. *Médecine/Sciences*; 17 : 111-4

**Christophe Chantrain, Yves A. DeClerck** (2002). Les métalloprotéases matricielles et leurs inhibiteurs synthétiques dans la progression tumorale. *Médecine/Sciences*; 18 : 565-75

**Brigitte Lelongt, Pierre Ronco, Rémi Piedagnel** (2002). Métalloprotéases matricielles : infidélités à la matrice extracellulaire. *Médecine/Sciences* ; 18 : 519-21

**Arnaud Couzinet, Zoltán Hérics, Anne-Odile Hueber** (2002). Régulation de la mort cellulaire programmée : vers une conception plus dynamique. *Médecine/Sciences* ; 18 : 841-52

**Albertine Aouba, Françoise Péquignot, Alain Le Toullec, Eric Jouglu** (2007). Les causes médicales de décès en France en 2004 et leur évolution 1980-2004. *Bulletin épidémiologique hebdomadaire* ; 35-36 : 308-14

## Livre:

*Tumour Angiogenesis*, edited by **Roy Bicknell, Claire E. Lewis, et Napoleone Ferrara**, Oxford University Press

Chapitre 13. The Role of Collagens and Proteoglycans in Tumour Angiogenesis , Rooney, Kumar, Ponting & Kumar

**ISBN-13:978-0-19-854937-6 date de publication: 3 Juillet 1997**

## Sources Internet:

- *Anatomo-pathologie mammaire et du col utérin*, par le Pr J-P Bellocq et le Pr M-P Chenard ; site éditeur [Université Louis Pasteur de Strasbourg \(ULP\), Faculté de Médecine](#)

- <http://www.mammo.it/generalita.htm>

- source **GLOBOCAN 2002**, disponible sur le site <http://www-dep.iarc.fr>

- [http://www.ligue-cancer.net/IMG/pdf/cancer\\_sein\\_bat.pdf](http://www.ligue-cancer.net/IMG/pdf/cancer_sein_bat.pdf)

- Agarwal, D., Goodison, S., Nicholson, B., Tarin, D. and Urquidi, V.** (2003). Expression of matrix metalloproteinase 8 (MMP-8) and tyrosinase-related protein-1 (TYRP-1) correlates with the absence of metastasis in an isogenic human breast cancer model. *Differentiation* **71**, 114-25.
- Albanese, C., Johnson, J., Watanabe, G., Eklund, N., Vu, D., Arnold, A. and Pestell, R. G.** (1995). Transforming p21ras mutants and c-Ets-2 activate the cyclin D1 promoter through distinguishable regions. *J Biol Chem* **270**, 23589-97.
- Alipov, G., Nakayama, T., Ito, M., Kawai, K., Naito, S., Nakashima, M., Niino, D. and Sekine, I.** (2005). Overexpression of Ets-1 proto-oncogene in latent and clinical prostatic carcinomas. *Histopathology* **46**, 202-8.
- Andarawewa, K. L., Motrescu, E. R., Chenard, M. P., Gansmuller, A., Stoll, I., Tomasetto, C. and Rio, M. C.** (2005). Stromelysin-3 is a potent negative regulator of adipogenesis participating to cancer cell-adipocyte interaction/crosstalk at the tumor invasive front. *Cancer Res* **65**, 10862-71.
- Andreasen, P. A., Egelund, R. and Petersen, H. H.** (2000). The plasminogen activation system in tumor growth, invasion, and metastasis. *Cell Mol Life Sci* **57**, 25-40.
- Arlt, M., Kopitz, C., Pennington, C., Watson, K. L., Krell, H. W., Bode, W., Gansbacher, B., Khokha, R., Edwards, D. R. and Kruger, A.** (2002). Increase in gelatinase-specificity of matrix metalloproteinase inhibitors correlates with antimetastatic efficacy in a T-cell lymphoma model. *Cancer Res* **62**, 5543-50.
- Balbin, M., Fueyo, A., Tester, A. M., Pendas, A. M., Pitiot, A. S., Astudillo, A., Overall, C. M., Shapiro, S. D. and Lopez-Otin, C.** (2003). Loss of collagenase-2 confers increased skin tumor susceptibility to male mice. *Nat Genet* **35**, 252-7.
- Bandyopadhyay, S., Zhan, R., Chaudhuri, A., Watabe, M., Pai, S. K., Hirota, S., Hosobe, S., Tsukada, T., Miura, K., Takano, Y. et al.** (2006). Interaction of KAI1 on tumor cells with DARC on vascular endothelium leads to metastasis suppression. *Nat Med* **12**, 933-8.
- Barton, K., Muthusamy, N., Fischer, C., Ting, C. N., Walunas, T. L., Lanier, L. L. and Leiden, J. M.** (1998). The Ets-1 transcription factor is required for the development of natural killer cells in mice. *Immunity* **9**, 555-63.
- Basu, G. D., Liang, W. S., Stephan, D. A., Wegener, L. T., Conley, C. R., Pockaj, B. A. and Mukherjee, P.** (2006). A novel role for cyclooxygenase-2 in regulating vascular channel formation by human breast cancer cells. *Breast Cancer Res* **8**, R69.
- Battle, E., Sancho, E., Franci, C., Dominguez, D., Monfar, M., Baulida, J. and Garcia De Herreros, A.** (2000). The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat Cell Biol* **2**, 84-9.
- Bauvois, B.** (2004). Transmembrane proteases in cell growth and invasion: new contributors to angiogenesis? *Oncogene* **23**, 317-29.
- Behrens, P., Rothe, M., Wellmann, A., Krischler, J. and Wernert, N.** (2001). The Ets-1 transcription factor is up-regulated together with MMP 1 and MMP 9 in the stroma of pre-invasive breast cancer. *J Pathol* **194**, 43-50.
- Beier, F., Taylor, A. C. and LuValle, P.** (1999). The Raf-1/MEK/ERK pathway regulates the expression of the p21(Cip1/Waf1) gene in chondrocytes. *J Biol Chem* **274**, 30273-9.
- Belouzard, S. and Rouille, Y.** (2006). Ubiquitylation of leptin receptor OB-Ra regulates its clathrin-mediated endocytosis. *Embo J* **25**, 932-42.
- Bergers, G., Javaherian, K., Lo, K. M., Folkman, J. and Hanahan, D.** (1999). Effects of angiogenesis inhibitors on multistage carcinogenesis in mice. *Science* **284**, 808-12.
- Berglund, P., Stighall, M., Jirstrom, K., Borgquist, S., Sjolander, A., Hedenfalk, I. and Landberg, G.** (2005). Cyclin E overexpression obstructs infiltrative behavior in breast

cancer: a novel role reflected in the growth pattern of medullary breast cancers. *Cancer Res* **65**, 9727-34.

**Bertotti, A., Comoglio, P. M. and Trusolino, L.** (2005). Beta4 integrin is a transforming molecule that unleashes Met tyrosine kinase tumorigenesis. *Cancer Res* **65**, 10674-9.

**Berx, G., Cleton-Jansen, A. M., Nollet, F., de Leeuw, W. J., van de Vijver, M., Cornelisse, C. and van Roy, F.** (1995). E-cadherin is a tumour/invasion suppressor gene mutated in human lobular breast cancers. *Embo J* **14**, 6107-15.

**Bishop, E. T., Bell, G. T., Bloor, S., Broom, I. J., Hendry, N. F. and Wheatley, D. N.** (1999). An in vitro model of angiogenesis: basic features. *Angiogenesis* **3**, 335-44.

**Bissell, M. J., Rizki, A. and Mian, I. S.** (2003). Tissue architecture: the ultimate regulator of breast epithelial function. *Curr Opin Cell Biol* **15**, 753-62.

**Bonfil, R. D., Sabbota, A., Nabha, S., Bernardo, M. M., Dong, Z., Meng, H., Yamamoto, H., Chinni, S. R., Lim, I. T., Chang, M. et al.** (2006). Inhibition of human prostate cancer growth, osteolysis and angiogenesis in a bone metastasis model by a novel mechanism-based selective gelatinase inhibitor. *Int J Cancer* **118**, 2721-6.

**Bories, J. C., Willerford, D. M., Grevin, D., Davidson, L., Camus, A., Martin, P., Stehelin, D. and Alt, F. W.** (1995). Increased T-cell apoptosis and terminal B-cell differentiation induced by inactivation of the Ets-1 proto-oncogene. *Nature* **377**, 635-8.

**Bos, R., Zhong, H., Hanrahan, C. F., Mommers, E. C., Semenza, G. L., Pinedo, H. M., Abeloff, M. D., Simons, J. W., van Diest, P. J. and van der Wall, E.** (2001). Levels of hypoxia-inducible factor-1 alpha during breast carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* **93**, 309-14.

**Boulton, S. J.** (2006). Cellular functions of the BRCA tumour-suppressor proteins. *Biochem Soc Trans* **34**, 633-45.

**Bourguignon, L. Y., Gunja-Smith, Z., Iida, N., Zhu, H. B., Young, L. J., Muller, W. J. and Cardiff, R. D.** (1998). CD44v(3,8-10) is involved in cytoskeleton-mediated tumor cell migration and matrix metalloproteinase (MMP-9) association in metastatic breast cancer cells. *J Cell Physiol* **176**, 206-15.

**Boyd, N. F., Rommens, J. M., Vogt, K., Lee, V., Hopper, J. L., Yaffe, M. J. and Paterson, A. D.** (2005). Mammographic breast density as an intermediate phenotype for breast cancer. *Lancet Oncol* **6**, 798-808.

**Braun, S., Vogl, F. D., Naume, B., Janni, W., Osborne, M. P., Coombes, R. C., Schlimok, G., Diel, I. J., Gerber, B., Gebauer, G. et al.** (2005). A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer. *N Engl J Med* **353**, 793-802.

**Brooks, P. C., Stromblad, S., Sanders, L. C., von Schalscha, T. L., Aimes, R. T., Stetler-Stevenson, W. G., Quigley, J. P. and Cheresch, D. A.** (1996). Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin alpha v beta 3. *Cell* **85**, 683-93.

**Buggy, Y., Maguire, T. M., McGreal, G., McDermott, E., Hill, A. D., O'Higgins, N. and Duffy, M. J.** (2004). Overexpression of the Ets-1 transcription factor in human breast cancer. *Br J Cancer* **91**, 1308-15.

**Bussolino, F., Albin, A., Camussi, G., Presta, M., Viglietto, G., Ziche, M. and Persico, G.** (1996). Role of soluble mediators in angiogenesis. *Eur J Cancer* **32A**, 2401-12.

**Carmeliet, P., Dor, Y., Herbert, J. M., Fukumura, D., Brusselmans, K., Dewerchin, M., Neeman, M., Bono, F., Abramovitch, R., Maxwell, P. et al.** (1998). Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature* **394**, 485-90.

**Casanovas, O., Hicklin, D. J., Bergers, G. and Hanahan, D.** (2005). Drug resistance by evasion of antiangiogenic targeting of VEGF signaling in late-stage pancreatic islet tumors. *Cancer Cell* **8**, 299-309.

- Cavallaro, U. and Christofori, G.** (2004). Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nat Rev Cancer* **4**, 118-32.
- Chambers, A. F., Groom, A. C. and MacDonald, I. C.** (2002). Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer* **2**, 563-72.
- Cheng, N., Chytil, A., Shyr, Y., Joly, A. and Moses, H. L.** (2007). Enhanced hepatocyte growth factor signaling by type II transforming growth factor-beta receptor knockout fibroblasts promotes mammary tumorigenesis. *Cancer Res* **67**, 4869-77.
- Condeelis, J. and Pollard, J. W.** (2006). Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell* **124**, 263-6.
- Condeelis, J. and Segall, J. E.** (2003). Intravital imaging of cell movement in tumours. *Nat Rev Cancer* **3**, 921-30.
- Condeelis, J., Singer, R. H. and Segall, J. E.** (2005). The great escape: when cancer cells hijack the genes for chemotaxis and motility. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**, 695-718.
- Cowley, D. O. and Graves, B. J.** (2000). Phosphorylation represses Ets-1 DNA binding by reinforcing autoinhibition. *Genes Dev* **14**, 366-76.
- Czuwara-Ladykowska, J., Sementchenko, V. I., Watson, D. K. and Trojanowska, M.** (2002). Ets1 is an effector of the transforming growth factor beta (TGF-beta) signaling pathway and an antagonist of the profibrotic effects of TGF-beta. *J Biol Chem* **277**, 20399-408.
- Dancey, J. E. and Chen, H. X.** (2006). Strategies for optimizing combinations of molecularly targeted anticancer agents. *Nat Rev Drug Discov* **5**, 649-59.
- Davidson, B., Reich, R., Goldberg, I., Gotlieb, W. H., Kopolovic, J., Berner, A., Ben-Baruch, G., Bryne, M. and Nesland, J. M.** (2001). Ets-1 messenger RNA expression is a novel marker of poor survival in ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res* **7**, 551-7.
- de Launoit, Y., Chotteau-Lelievre, A., Beaudoin, C., Coutte, L., Netzer, S., Brenner, C., Huvent, I. and Baert, J. L.** (2000). The PEA3 group of ETS-related transcription factors. Role in breast cancer metastasis. *Adv Exp Med Biol* **480**, 107-16.
- Delannoy-Courdent, A., Fauquette, W., Dong-Le Bourhis, X. F., Boilly, B., Vandebunder, B. and Desbiens, X.** (1996). Expression of c-ets-1 and uPA genes is associated with mammary epithelial cell tubulogenesis or neoplastic scattering. *Int J Dev Biol* **40**, 1097-108.
- Delannoy-Courdent, A., Mattot, V., Fafeur, V., Fauquette, W., Pollet, I., Calmels, T., Vercamer, C., Boilly, B., Vandebunder, B. and Desbiens, X.** (1998). The expression of an Ets1 transcription factor lacking its activation domain decreases uPA proteolytic activity and cell motility, and impairs normal tubulogenesis and cancerous scattering in mammary epithelial cells. *J Cell Sci* **111** ( Pt 11), 1521-34.
- Delattre, O., Zucman, J., Plougastel, B., Desmaze, C., Melot, T., Peter, M., Kovar, H., Joubert, I., de Jong, P., Rouleau, G. et al.** (1992). Gene fusion with an ETS DNA-binding domain caused by chromosome translocation in human tumours. *Nature* **359**, 162-5.
- Deryugina, E. I. and Quigley, J. P.** (2006). Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev* **25**, 9-34.
- Dittmer, J.** (2003). The biology of the Ets1 proto-oncogene. *Mol Cancer* **2**, 29.
- Djonov, V., Andres, A. C. and Ziemiecki, A.** (2001). Vascular remodelling during the normal and malignant life cycle of the mammary gland. *Microsc Res Tech* **52**, 182-9.
- Dome, B., Hendrix, M. J., Paku, S., Tovari, J. and Timar, J.** (2007). Alternative vascularization mechanisms in cancer: Pathology and therapeutic implications. *Am J Pathol* **170**, 1-15.
- Dumont, N. and Arteaga, C. L.** (2000). Transforming growth factor-beta and breast cancer: Tumor promoting effects of transforming growth factor-beta. *Breast Cancer Res* **2**, 125-32.

- Dunon, D., Piali, L. and Imhof, B. A.** (1996). To stick or not to stick: the new leukocyte homing paradigm. *Curr Opin Cell Biol* **8**, 714-23.
- Edelman, G. M., Meech, R., Owens, G. C. and Jones, F. S.** (2000). Synthetic promoter elements obtained by nucleotide sequence variation and selection for activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 3038-43.
- Engels, K., Fox, S. B., Whitehouse, R. M., Gatter, K. C. and Harris, A. L.** (1997). Distinct angiogenic patterns are associated with high-grade in situ ductal carcinomas of the breast. *J Pathol* **181**, 207-12.
- Even-Ram, S. and Yamada, K. M.** (2005). Cell migration in 3D matrix. *Curr Opin Cell Biol* **17**, 524-32.
- Fafeur, V., Tulasne, D., Queva, C., Vercamer, C., Dimster, V., Mattot, V., Stehelin, D., Desbiens, X. and Vandembunder, B.** (1997). The ETS1 transcription factor is expressed during epithelial-mesenchymal transitions in the chick embryo and is activated in scatter factor-stimulated MDCK epithelial cells. *Cell Growth Differ* **8**, 655-65.
- Fantozzi, A. and Christofori, G.** (2006). Mouse models of breast cancer metastasis. *Breast Cancer Res* **8**, 212.
- Fedorov, Y., Anderson, E. M., Birmingham, A., Reynolds, A., Karpilow, J., Robinson, K., Leake, D., Marshall, W. S. and Khvorova, A.** (2006). Off-target effects by siRNA can induce toxic phenotype. *Rna* **12**, 1188-96.
- Ferreras, M., Felbor, U., Lenhard, T., Olsen, B. R. and Delaisse, J.** (2000). Generation and degradation of human endostatin proteins by various proteinases. *FEBS Lett* **486**, 247-51.
- Foekens, J. A., Peters, H. A., Grebenchtchikov, N., Look, M. P., Meijer-van Gelder, M. E., Geurts-Moespot, A., van der Kwast, T. H., Sweep, C. G. and Klijn, J. G.** (2001). High tumor levels of vascular endothelial growth factor predict poor response to systemic therapy in advanced breast cancer. *Cancer Res* **61**, 5407-14.
- Forrester, E., Chytil, A., Bierie, B., Aakre, M., Gorska, A. E., Sharif-Afshar, A. R., Muller, W. J. and Moses, H. L.** (2005). Effect of conditional knockout of the type II TGF-beta receptor gene in mammary epithelia on mammary gland development and polyomavirus middle T antigen induced tumor formation and metastasis. *Cancer Res* **65**, 2296-302.
- Fowlkes, J. L., Enghild, J. J., Suzuki, K. and Nagase, H.** (1994). Matrix metalloproteinases degrade insulin-like growth factor-binding protein-3 in dermal fibroblast cultures. *J Biol Chem* **269**, 25742-6.
- Fox, S. B., Turner, G. D., Gatter, K. C. and Harris, A. L.** (1995). The increased expression of adhesion molecules ICAM-3, E- and P-selectins on breast cancer endothelium. *J Pathol* **177**, 369-76.
- Friedl, P. and Wolf, K.** (2003). Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer* **3**, 362-74.
- Fujimoto, J., Aoki, I., Toyoki, H., Khatun, S. and Tamaya, T.** (2002). Clinical implications of expression of ETS-1 related to angiogenesis in uterine cervical cancers. *Ann Oncol* **13**, 1598-604.
- Furlan, A., Vercamer, C., Desbiens, X., and Pourtier, A.** Ets-1 triggers and orchestrates the malignant phenotype of mammary cancer cells within their matrix environment, *accepted for publication in Journal of Cellular Physiology*.
- Gallier, A. J. and Schiemann, W. P.** (2006). beta3 Integrin and Src facilitate transforming growth factor-beta mediated induction of epithelial-mesenchymal transition in mammary epithelial cells. *Breast Cancer Res* **8**, R42.
- Gentile, A. and Comoglio, P. M.** (2004). Invasive growth: a genetic program. *Int J Dev Biol* **48**, 451-6.

**Gilles, F., Raes, M. B., Stehelin, D., Vandenbunder, B. and Fafeur, V.** (1996). The c-ets-1 proto-oncogene is a new early-response gene differentially regulated by cytokines and growth factors in human fibroblasts. *Exp Cell Res* **222**, 370-8.

**Gobbi, H., Arteaga, C. L., Jensen, R. A., Simpson, J. F., Dupont, W. D., Olson, S. J., Schuyler, P. A., Plummer, W. D., Jr. and Page, D. L.** (2000). Loss of expression of transforming growth factor beta type II receptor correlates with high tumour grade in human breast in-situ and invasive carcinomas. *Histopathology* **36**, 168-77.

**Golub, T. R., Barker, G. F., Lovett, M. and Gilliland, D. G.** (1994). Fusion of PDGF receptor beta to a novel ets-like gene, tel, in chronic myelomonocytic leukemia with t(5;12) chromosomal translocation. *Cell* **77**, 307-16.

**Gomes, N., Vassy, J., Lebos, C., Arbeille, B., Legrand, C. and Fauvel-Lafeve, F.** (2004). Breast adenocarcinoma cell adhesion to the vascular subendothelium in whole blood and under flow conditions: effects of alphavbeta3 and alphaIIbbeta3 antagonists. *Clin Exp Metastasis* **21**, 553-61.

**Goswami, S., Sahai, E., Wyckoff, J. B., Cammer, M., Cox, D., Pixley, F. J., Stanley, E. R., Segall, J. E. and Condeelis, J. S.** (2005). Macrophages promote the invasion of breast carcinoma cells via a colony-stimulating factor-1/epidermal growth factor paracrine loop. *Cancer Res* **65**, 5278-83.

**Gottardi, C. J., Wong, E. and Gumbiner, B. M.** (2001). E-cadherin suppresses cellular transformation by inhibiting beta-catenin signaling in an adhesion-independent manner. *J Cell Biol* **153**, 1049-60.

**Graves, B. J. and Petersen, J. M.** (1998). Specificity within the ets family of transcription factors. *Adv Cancer Res* **75**, 1-55.

**Guo, W., Pylayeva, Y., Pepe, A., Yoshioka, T., Muller, W. J., Inghirami, G. and Giancotti, F. G.** (2006). Beta 4 integrin amplifies ErbB2 signaling to promote mammary tumorigenesis. *Cell* **126**, 489-502.

**Gupta, G. P. and Massague, J.** (2006). Cancer metastasis: building a framework. *Cell* **127**, 679-95.

**Gutierrez-Hartmann, A., Duval, D. L. and Bradford, A. P.** (2007). ETS transcription factors in endocrine systems. *Trends Endocrinol Metab* **18**, 150-8.

**Ha, H. Y., Moon, H. B., Nam, M. S., Lee, J. W., Ryoo, Z. Y., Lee, T. H., Lee, K. K., So, B. J., Sato, H., Seiki, M. et al.** (2001). Overexpression of membrane-type matrix metalloproteinase-1 gene induces mammary gland abnormalities and adenocarcinoma in transgenic mice. *Cancer Res* **61**, 984-90.

**Hamano, Y., Zeisberg, M., Sugimoto, H., Lively, J. C., Maeshima, Y., Yang, C., Hynes, R. O., Werb, Z., Sudhakar, A. and Kalluri, R.** (2003). Physiological levels of tumstatin, a fragment of collagen IV alpha3 chain, are generated by MMP-9 proteolysis and suppress angiogenesis via alphaV beta3 integrin. *Cancer Cell* **3**, 589-601.

**Hanemaaijer, R., Verheijen, J. H., Maguire, T. M., Visser, H., Toet, K., McDermott, E., O'Higgins, N. and Duffy, M. J.** (2000). Increased gelatinase-A and gelatinase-B activities in malignant vs. benign breast tumors. *Int J Cancer* **86**, 204-7.

**Hansen, S., Grabau, D. A., Sorensen, F. B., Bak, M., Vach, W. and Rose, C.** (2000). The prognostic value of angiogenesis by Chalkley counting in a confirmatory study design on 836 breast cancer patients. *Clin Cancer Res* **6**, 139-46.

**Haouzi, D., Baghdiguian, S., Granier, G., Travo, P., Mangeat, P. and Hibner, U.** (2005). Three-dimensional polarization sensitizes hepatocytes to Fas/CD95 apoptotic signalling. *J Cell Sci* **118**, 2763-73.

**Hartwell, K. A., Muir, B., Reinhardt, F., Carpenter, A. E., Sgroi, D. C. and Weinberg, R. A.** (2006). The Spemann organizer gene, Goosecoid, promotes tumor metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 18969-74.

- Hendrix, M. J., Seftor, E. A., Hess, A. R. and Seftor, R. E.** (2003). Vasculogenic mimicry and tumour-cell plasticity: lessons from melanoma. *Nat Rev Cancer* **3**, 411-21.
- Herter, S., Piper, D. E., Aaron, W., Gabriele, T., Cutler, G., Cao, P., Bhatt, A. S., Choe, Y., Craik, C. S., Walker, N. et al.** (2005). Hepatocyte growth factor is a preferred in vitro substrate for human hepsin, a membrane-anchored serine protease implicated in prostate and ovarian cancers. *Biochem J* **390**, 125-36.
- Hodkinson, P. S., Elliott, T., Wong, W. S., Rintoul, R. C., Mackinnon, A. C., Haslett, C. and Sethi, T.** (2006). ECM overrides DNA damage-induced cell cycle arrest and apoptosis in small-cell lung cancer cells through beta1 integrin-dependent activation of PI3-kinase. *Cell Death Differ* **13**, 1776-88.
- Hojilla, C. V., Mohammed, F. F. and Khokha, R.** (2003). Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors direct cell fate during cancer development. *Br J Cancer* **89**, 1817-21.
- Hooper, S., Marshall, J. F. and Sahai, E.** (2006). Tumor cell migration in three dimensions. *Methods Enzymol* **406**, 625-43.
- Huang, C. I., Kohno, N., Ogawa, E., Adachi, M., Taki, T. and Miyake, M.** (1998). Correlation of reduction in MRP-1/CD9 and KAI1/CD82 expression with recurrences in breast cancer patients. *Am J Pathol* **153**, 973-83.
- Huang, H. C., Liu, S. Y., Liang, Y., Liu, Y., Li, J. Z. and Wang, H. Y.** (2005). [Transforming growth factor-beta1 stimulates matrix metalloproteinase-9 production through ERK activation pathway and upregulation of Ets-1 protein.]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* **85**, 328-31.
- Huot, T. J., Rowe, J., Harland, M., Drayton, S., Brookes, S., Gooptu, C., Purkis, P., Fried, M., Bataille, V., Hara, E. et al.** (2002). Biallelic mutations in p16(INK4a) confer resistance to Ras- and Ets-induced senescence in human diploid fibroblasts. *Mol Cell Biol* **22**, 8135-43.
- Imai, K., Hiramatsu, A., Fukushima, D., Pierschbacher, M. D. and Okada, Y.** (1997). Degradation of decorin by matrix metalloproteinases: identification of the cleavage sites, kinetic analyses and transforming growth factor-beta1 release. *Biochem J* **322 ( Pt 3)**, 809-14.
- Ito, T., Nakayama, T., Ito, M., Naito, S., Kanematsu, T. and Sekine, I.** (1998). Expression of the ets-1 proto-oncogene in human pancreatic carcinoma. *Mod Pathol* **11**, 209-15.
- Ivaska, J. and Heino, J.** (2000). Adhesion receptors and cell invasion: mechanisms of integrin-guided degradation of extracellular matrix. *Cell Mol Life Sci* **57**, 16-24.
- Jain, R. K.** (2001). Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy: a new paradigm for combination therapy. *Nat Med* **7**, 987-9.
- Jain, R. K. and Munn, L. L.** (2000). Leaky vessels? Call Ang1! *Nat Med* **6**, 131-2.
- Jeffers, M., Fiscella, M., Webb, C. P., Anver, M., Koochekpour, S. and Vande Woude, G. F.** (1998). The mutationally activated Met receptor mediates motility and metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 14417-22.
- Ji, Z., Degerny, C., Vintonenko, N., Deheuninck, J., Foveau, B., Leroy, C., Coll, J., Tulasne, D., Baert, J. L. and Fafeur, V.** (2007). Regulation of the Ets-1 transcription factor by sumoylation and ubiquitinylation. *Oncogene* **26**, 395-406.
- Johansson, N., Ahonen, M. and Kahari, V. M.** (2000). Matrix metalloproteinases in tumor invasion. *Cell Mol Life Sci* **57**, 5-15.
- Jones, J. L., Shaw, J. A., Pringle, J. H. and Walker, R. A.** (2003). Primary breast myoepithelial cells exert an invasion-suppressor effect on breast cancer cells via paracrine down-regulation of MMP expression in fibroblasts and tumour cells. *J Pathol* **201**, 562-72.



- Joyce, J. A.** (2005). Therapeutic targeting of the tumor microenvironment. *Cancer Cell* **7**, 513-20.
- Kalluri, R.** (2003). Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer* **3**, 422-33.
- Kanda, K., Nakayama, T., Onizuka, S., Tomioka, T. and Kanematsu, T.** (2002). Expression of the Ets-1 proto-oncogene is linked to cell differentiation of human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* **49**, 747-51.
- Kang, J. Y., Dolled-Filhart, M., Ocal, I. T., Singh, B., Lin, C. Y., Dickson, R. B., Rimm, D. L. and Camp, R. L.** (2003). Tissue microarray analysis of hepatocyte growth factor/Met pathway components reveals a role for Met, matriptase, and hepatocyte growth factor activator inhibitor 1 in the progression of node-negative breast cancer. *Cancer Res* **63**, 1101-5.
- Katayama, S., Nakayama, T., Ito, M., Naito, S. and Sekine, I.** (2005). Expression of the ets-1 proto-oncogene in human breast carcinoma: differential expression with histological grading and growth pattern. *Histol Histopathol* **20**, 119-26.
- Kelsey, J. L. and Berkowitz, G. S.** (1988). Breast cancer epidemiology. *Cancer Res* **48**, 5615-23.
- Kemp, L. E., Mulloy, B. and Gherardi, E.** (2006). Signalling by HGF/SF and Met: the role of heparan sulphate co-receptors. *Biochem Soc Trans* **34**, 414-7.
- Kenney, N. J., Bowman, A., Korach, K. S., Barrett, J. C. and Salomon, D. S.** (2003). Effect of exogenous epidermal-like growth factors on mammary gland development and differentiation in the estrogen receptor-alpha knockout (ERKO) mouse. *Breast Cancer Res Treat* **79**, 161-73.
- Kleinberg, D. L., Feldman, M. and Ruan, W.** (2000). IGF-I: an essential factor in terminal end bud formation and ductal morphogenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **5**, 7-17.
- Kola, I., Brookes, S., Green, A. R., Garber, R., Tymms, M., Papas, T. S. and Seth, A.** (1993). The Ets1 transcription factor is widely expressed during murine embryo development and is associated with mesodermal cells involved in morphogenetic processes such as organ formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 7588-92.
- Koochekpour, S., Merzak, A. and Pilkington, G. J.** (1995). Extracellular matrix proteins inhibit proliferation, upregulate migration and induce morphological changes in human glioma cell lines. *Eur J Cancer* **31A**, 375-80.
- Kopp, J. L., Wilder, P. J., Desler, M., Kim, J. H., Hou, J., Nowling, T. and Rizzino, A.** (2004). Unique and selective effects of five Ets family members, Elf3, Ets1, Ets2, PEA3, and PU.1, on the promoter of the type II transforming growth factor-beta receptor gene. *J Biol Chem* **279**, 19407-20.
- Kren, A., Baeriswyl, V., Lehembre, F., Wunderlin, C., Strittmatter, K., Antoniadis, H., Fassler, R., Cavallaro, U. and Christofori, G.** (2007). Increased tumor cell dissemination and cellular senescence in the absence of beta1-integrin function. *Embo J* **26**, 2832-42.
- Kruger, A., Soeltl, R., Sopov, I., Kopitz, C., Arlt, M., Magdolen, V., Harbeck, N., Gansbacher, B. and Schmitt, M.** (2001). Hydroxamate-type matrix metalloproteinase inhibitor batimastat promotes liver metastasis. *Cancer Res* **61**, 1272-5.
- Kupferman, M. E., Fini, M. E., Muller, W. J., Weber, R., Cheng, Y. and Muschel, R. J.** (2000). Matrix metalloproteinase 9 promoter activity is induced coincident with invasion during tumor progression. *Am J Pathol* **157**, 1777-83.
- Kwan, J. A., Schulze, C. J., Wang, W., Leon, H., Sariahmetoglu, M., Sung, M., Sawicka, J., Sims, D. E., Sawicki, G. and Schulz, R.** (2004). Matrix metalloproteinase-2

(MMP-2) is present in the nucleus of cardiac myocytes and is capable of cleaving poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) in vitro. *Faseb J* **18**, 690-2.

**Lagace, R., Grimaud, J. A., Schurch, W. and Seemayer, T. A.** (1985).

Myofibroblastic stromal reaction in carcinoma of the breast: variations of collagenous matrix and structural glycoproteins. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* **408**, 49-59.

**Lambert, E., Dasse, E., Haye, B. and Petitfrere, E.** (2004). TIMPs as multifacial proteins. *Crit Rev Oncol Hematol* **49**, 187-98.

**Lee, S. L., Dickson, R. B. and Lin, C. Y.** (2000). Activation of hepatocyte growth factor and urokinase/plasminogen activator by matriptase, an epithelial membrane serine protease. *J Biol Chem* **275**, 36720-5.

**Lehmann, K., Janda, E., Pierreux, C. E., Rytomaa, M., Schulze, A., McMahon, M., Hill, C. S., Beug, H. and Downward, J.** (2000). Raf induces TGFbeta production while blocking its apoptotic but not invasive responses: a mechanism leading to increased malignancy in epithelial cells. *Genes Dev* **14**, 2610-22.

**Lelievre, E., Lionneton, F., Mattot, V., Spruyt, N. and Soncin, F.** (2002). Ets-1 regulates fli-1 expression in endothelial cells. Identification of ETS binding sites in the fli-1 gene promoter. *J Biol Chem* **277**, 25143-51.

**Leprince, D., Gegonne, A., Coll, J., de Taisne, C., Schneeberger, A., Lagrou, C. and Stehelin, D.** (1983). A putative second cell-derived oncogene of the avian leukaemia retrovirus E26. *Nature* **306**, 395-7.

**Letessier, A., Ginestier, C., Charafe-Jauffret, E., Cervera, N., Adelaide, J., Gelsi-Boyer, V., Ahomadegbe, J. C., Benard, J., Jacquemier, J., Birnbaum, D. et al.** (2005). ETV6 gene rearrangements in invasive breast carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* **44**, 103-8.

**Levine, A. J.** (1997). p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* **88**, 323-31.

**Levine, B.** (2007). Cell biology: autophagy and cancer. *Nature* **446**, 745-7.

**Lewalle, J. M., Bajou, K., Desreux, J., Mareel, M., Dejans, E., Noel, A. and Foidart, J. M.** (1997). Alteration of interendothelial adherens junctions following tumor cell-endothelial cell interaction in vitro. *Exp Cell Res* **237**, 347-56.

**Lincoln, D. W., 2nd, Phillips, P. G. and Bove, K.** (2003). Estrogen-induced Ets-1 promotes capillary formation in an in vitro tumor angiogenesis model. *Breast Cancer Res Treat* **78**, 167-78.

**Lionneton, F., Lelievre, E., Baillat, D., Stehelin, D. and Soncin, F.** (2003). Characterization and functional analysis of the p42Ets-1 variant of the mouse Ets-1 transcription factor. *Oncogene* **22**, 9156-64.

**Lo, C. M., Wang, H. B., Dembo, M. and Wang, Y. L.** (2000). Cell movement is guided by the rigidity of the substrate. *Biophys J* **79**, 144-52.

**Lukashev, M. E. and Werb, Z.** (1998). ECM signalling: orchestrating cell behaviour and misbehaviour. *Trends Cell Biol* **8**, 437-41.

**Manabe, Y., Toda, S., Miyazaki, K. and Sugihara, H.** (2003). Mature adipocytes, but not preadipocytes, promote the growth of breast carcinoma cells in collagen gel matrix culture through cancer-stromal cell interactions. *J Pathol* **201**, 221-8.

**Mani, S. A., Yang, J., Brooks, M., Schwaninger, G., Zhou, A., Miura, N., Kutok, J. L., Hartwell, K., Richardson, A. L. and Weinberg, R. A.** (2007). Mesenchyme Forkhead 1 (FOXC2) plays a key role in metastasis and is associated with aggressive basal-like breast cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 10069-74.

**Maniotis, A. J., Folberg, R., Hess, A., Sefror, E. A., Gardner, L. M., Pe'er, J., Trent, J. M., Meltzer, P. S. and Hendrix, M. J.** (1999). Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry. *Am J Pathol* **155**, 739-52.

**Mann, D. L.** (2006). Targeted cancer therapeutics: the heartbreak of success. *Nat Med* **12**, 881-2.

**Maroulakou, I. G. and Bowe, D. B.** (2000). Expression and function of Ets transcription factors in mammalian development: a regulatory network. *Oncogene* **19**, 6432-42.

**Maskos, K.** (2005). Crystal structures of MMPs in complex with physiological and pharmacological inhibitors. *Biochimie* **87**, 249-63.

**Massague, J.** (2004). G1 cell-cycle control and cancer. *Nature* **432**, 298-306.

**Matrisian, L. M., Sledge, G. W., Jr. and Mohla, S.** (2003). Extracellular proteolysis and cancer: meeting summary and future directions. *Cancer Res* **63**, 6105-9.

**Maxwell, P. H., Dachs, G. U., Gleadle, J. M., Nicholls, L. G., Harris, A. L., Stratford, I. J., Hankinson, O., Pugh, C. W. and Ratcliffe, P. J.** (1997). Hypoxia-inducible factor-1 modulates gene expression in solid tumors and influences both angiogenesis and tumor growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 8104-9.

**Meyer, E., Vollmer, J. Y., Bovey, R. and Stamenkovic, I.** (2005). Matrix metalloproteinases 9 and 10 inhibit protein kinase C-potentiated, p53-mediated apoptosis. *Cancer Res* **65**, 4261-72.

**Mine, S., Fujisaki, T., Kawahara, C., Tabata, T., Iida, T., Yasuda, M., Yoneda, T. and Tanaka, Y.** (2003). Hepatocyte growth factor enhances adhesion of breast cancer cells to endothelial cells in vitro through up-regulation of CD44. *Exp Cell Res* **288**, 189-97.

**Mira, E., Lacalle, R. A., Buesa, J. M., de Buitrago, G. G., Jimenez-Baranda, S., Gomez-Mouton, C., Martinez, A. C. and Manes, S.** (2004). Secreted MMP9 promotes angiogenesis more efficiently than constitutive active MMP9 bound to the tumor cell surface. *J Cell Sci* **117**, 1847-57.

**Mitelman, F., Johansson, B. and Mertens, F.** (2007). The impact of translocations and gene fusions on cancer causation. *Nat Rev Cancer* **7**, 233-45.

**Moinfar, F., Man, Y. G., Arnould, L., Bratthauer, G. L., Ratschek, M. and Tavassoli, F. A.** (2000). Concurrent and independent genetic alterations in the stromal and epithelial cells of mammary carcinoma: implications for tumorigenesis. *Cancer Res* **60**, 2562-6.

**Montanez, E., Casaroli-Marano, R. P., Vilaro, S. and Pagan, R.** (2002). Comparative study of tube assembly in three-dimensional collagen matrix and on Matrigel coats. *Angiogenesis* **5**, 167-72.

**Morabito, A., Sarmiento, R., Bonginelli, P. and Gasparini, G.** (2004). Antiangiogenic strategies, compounds, and early clinical results in breast cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* **49**, 91-107.

**Morini, M., Mottolise, M., Ferrari, N., Ghiorzo, F., Buglioni, S., Mortarini, R., Noonan, D. M., Natali, P. G. and Albin, A.** (2000). The alpha 3 beta 1 integrin is associated with mammary carcinoma cell metastasis, invasion, and gelatinase B (MMP-9) activity. *Int J Cancer* **87**, 336-42.

**Moscow, J. A. and Cowan, K. H.** (1988). Multidrug resistance. *J Natl Cancer Inst* **80**, 14-20.

**Moustakas, A. and Stournaras, C.** (1999). Regulation of actin organisation by TGF-beta in H-ras-transformed fibroblasts. *J Cell Sci* **112** ( Pt 8), 1169-79.

**Myers, E., Hill, A. D., Kelly, G., McDermott, E. W., O'Higgins, N. J. and Young, L. S.** (2006). A positive role for PEA3 in HER2-mediated breast tumour progression. *Br J Cancer* **95**, 1404-9.

**Mylona, E. E., Alexandrou, P. T., Giannopoulou, I. A., Rafailidis, P. I., Markaki, S., Keramopoulos, A. and Nakopoulou, L. L.** (2006). Study of the topographic distribution

of ets-1 protein expression in invasive breast carcinomas in relation to tumor phenotype. *Cancer Detect Prev* **30**, 111-7.

**Naito, S., Shimizu, S., Maeda, S., Wang, J., Paul, R. and Fagin, J. A.** (1998). Ets-1 is an early response gene activated by ET-1 and PDGF-BB in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* **274**, C472-80.

**Nakayama, T., Ito, M., Ohtsuru, A., Naito, S., Nakashima, M., Fagin, J. A., Yamashita, S. and Sekine, I.** (1996). Expression of the Ets-1 proto-oncogene in human gastric carcinoma: correlation with tumor invasion. *Am J Pathol* **149**, 1931-9.

**Nakayama, T., Ito, M., Ohtsuru, A., Naito, S., Nakashima, M. and Sekine, I.** (1999). Expression of the ets-1 proto-oncogene in human thyroid tumor. *Mod Pathol* **12**, 61-8.

**Nakayama, T., Ito, M., Ohtsuru, A., Naito, S. and Sekine, I.** (2001). Expression of the ets-1 proto-oncogene in human colorectal carcinoma. *Mod Pathol* **14**, 415-22.

**Naldini, L., Vigna, E., Bardelli, A., Follenzi, A., Galimi, F. and Comoglio, P. M.** (1995). Biological activation of pro-HGF (hepatocyte growth factor) by urokinase is controlled by a stoichiometric reaction. *J Biol Chem* **270**, 603-11.

**Naumov, G. N., Bender, E., Zurakowski, D., Kang, S. Y., Sampson, D., Flynn, E., Watnick, R. S., Straume, O., Akslen, L. A., Folkman, J. et al.** (2006). A model of human tumor dormancy: an angiogenic switch from the nonangiogenic phenotype. *J Natl Cancer Inst* **98**, 316-25.

**Naumov, G. N., MacDonald, I. C., Weinmeister, P. M., Kerkvliet, N., Nadkarni, K. V., Wilson, S. M., Morris, V. L., Groom, A. C. and Chambers, A. F.** (2002). Persistence of solitary mammary carcinoma cells in a secondary site: a possible contributor to dormancy. *Cancer Res* **62**, 2162-8.

**Naumov, G. N., Townson, J. L., MacDonald, I. C., Wilson, S. M., Bramwell, V. H., Groom, A. C. and Chambers, A. F.** (2003). Ineffectiveness of doxorubicin treatment on solitary dormant mammary carcinoma cells or late-developing metastases. *Breast Cancer Res Treat* **82**, 199-206.

**Nawrocki-Raby, B., Gilles, C., Polette, M., Bruyneel, E., Laronze, J. Y., Bonnet, N., Foidart, J. M., Mareel, M. and Birembaut, P.** (2003). Upregulation of MMPs by soluble E-cadherin in human lung tumor cells. *Int J Cancer* **105**, 790-5.

**Nguyen, D. X. and Massague, J.** (2007). Genetic determinants of cancer metastasis. *Nat Rev Genet* **8**, 341-52.

**Nicosia, R. F.** (1998). What is the role of vascular endothelial growth factor-related molecules in tumor angiogenesis? *Am J Pathol* **153**, 11-6.

**Noe, V., Fingleton, B., Jacobs, K., Crawford, H. C., Vermeulen, S., Steelant, W., Bruyneel, E., Matrisian, L. M. and Mareel, M.** (2001). Release of an invasion promoter E-cadherin fragment by matrilysin and stromelysin-1. *J Cell Sci* **114**, 111-118.

**Noel, A., Maillard, C., Rocks, N., Jost, M., Chabottaux, V., Sounni, N. E., Maquoi, E., Cataldo, D. and Foidart, J. M.** (2004). Membrane associated proteases and their inhibitors in tumour angiogenesis. *J Clin Pathol* **57**, 577-84.

**Ohtani, N., Zebedee, Z., Huot, T. J., Stinson, J. A., Sugimoto, M., Ohashi, Y., Sharrocks, A. D., Peters, G. and Hara, E.** (2001). Opposing effects of Ets and Id proteins on p16INK4a expression during cellular senescence. *Nature* **409**, 1067-70.

**Oikawa, M., Abe, M., Kurosawa, H., Hida, W., Shirato, K. and Sato, Y.** (2001). Hypoxia induces transcription factor ETS-1 via the activity of hypoxia-inducible factor-1. *Biochem Biophys Res Commun* **289**, 39-43.

**Okada, H. and Mak, T. W.** (2004). Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. *Nat Rev Cancer* **4**, 592-603.

**Ono, A., Kanno, H., Hayashi, A., Nishimura, S., Kyuma, Y., Sato, H., Ito, S., Shimizu, N., Chang, C. C., Gondo, G. et al.** (2007). Collagen gel matrix assay as an in vitro chemosensitivity test for malignant astrocytic tumors. *Int J Clin Oncol* **12**, 125-30.

**Orimo, A., Gupta, P. B., Sgroi, D. C., Arenzana-Seisdedos, F., Delaunay, T., Naeem, R., Carey, V. J., Richardson, A. L. and Weinberg, R. A.** (2005). Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell* **121**, 335-48.

**Overall, C. M., Wrana, J. L. and Sodek, J.** (1991). Transcriptional and post-transcriptional regulation of 72-kDa gelatinase/type IV collagenase by transforming growth factor-beta 1 in human fibroblasts. Comparisons with collagenase and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase gene expression. *J Biol Chem* **266**, 14064-71.

**Palmqvist, R., Rutegard, J. N., Bozoky, B., Landberg, G. and Stenling, R.** (2000). Human colorectal cancers with an intact p16/cyclin D1/pRb pathway have up-regulated p16 expression and decreased proliferation in small invasive tumor clusters. *Am J Pathol* **157**, 1947-53.

**Palmqvist, R., Sellberg, P., Oberg, A., Tavelin, B., Rutegard, J. N. and Stenling, R.** (1999). Low tumour cell proliferation at the invasive margin is associated with a poor prognosis in Dukes' stage B colorectal cancers. *Br J Cancer* **79**, 577-81.

**Pande, P., Mathur, M., Shukla, N. K. and Ralhan, R.** (1999). Ets-1: a plausible marker of invasive potential and lymph node metastasis in human oral squamous cell carcinomas. *J Pathol* **189**, 40-5.

**Park, C. C., Bissell, M. J. and Barcellos-Hoff, M. H.** (2000). The influence of the microenvironment on the malignant phenotype. *Mol Med Today* **6**, 324-9.

**Paszek, M. J., Zahir, N., Johnson, K. R., Lakins, J. N., Rozenberg, G. I., Gefen, A., Reinhart-King, C. A., Margulies, S. S., Dembo, M., Boettiger, D. et al.** (2005). Tensional homeostasis and the malignant phenotype. *Cancer Cell* **8**, 241-54.

**Paumelle, R., Tulasne, D., Kherrouche, Z., Plaza, S., Leroy, C., Reveneau, S., Vandebunder, B. and Fafeur, V.** (2002). Hepatocyte growth factor/scatter factor activates the ETS1 transcription factor by a RAS-RAF-MEK-ERK signaling pathway. *Oncogene* **21**, 2309-19.

**Pennacchietti, S., Michieli, P., Galluzzo, M., Mazzone, M., Giordano, S. and Comoglio, P. M.** (2003). Hypoxia promotes invasive growth by transcriptional activation of the met protooncogene. *Cancer Cell* **3**, 347-61.

**Petersen, J. M., Skalicky, J. J., Donaldson, L. W., McIntosh, L. P., Alber, T. and Graves, B. J.** (1995). Modulation of transcription factor Ets-1 DNA binding: DNA-induced unfolding of an alpha helix. *Science* **269**, 1866-9.

**Pourtier-Manzanedo, A., Vercamer, C., Van Belle, E., Mattot, V., Mouquet, F. and Vandebunder, B.** (2003). Expression of an Ets-1 dominant-negative mutant perturbs normal and tumor angiogenesis in a mouse ear model. *Oncogene* **22**, 1795-806.

**Pozzi, A., Moberg, P. E., Miles, L. A., Wagner, S., Soloway, P. and Gardner, H. A.** (2000). Elevated matrix metalloprotease and angiostatin levels in integrin alpha 1 knockout mice cause reduced tumor vascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 2202-7.

**Prescott, J. D., Koto, K. S., Singh, M. and Gutierrez-Hartmann, A.** (2004). The ETS transcription factor ESE-1 transforms MCF-12A human mammary epithelial cells via a novel cytoplasmic mechanism. *Mol Cell Biol* **24**, 5548-64.

**Pufall, M. A., Lee, G. M., Nelson, M. L., Kang, H. S., Velyvis, A., Kay, L. E., McIntosh, L. P. and Graves, B. J.** (2005). Variable control of Ets-1 DNA binding by multiple phosphates in an unstructured region. *Science* **309**, 142-5.

- Radisky, D. C., Levy, D. D., Littlepage, L. E., Liu, H., Nelson, C. M., Fata, J. E., Leake, D., Godden, E. L., Albertson, D. G., Nieto, M. A. et al.** (2005). Rac1b and reactive oxygen species mediate MMP-3-induced EMT and genomic instability. *Nature* **436**, 123-7.
- Rakha, E. A., Abd El Rehim, D., Pinder, S. E., Lewis, S. A. and Ellis, I. O.** (2005). E-cadherin expression in invasive non-lobular carcinoma of the breast and its prognostic significance. *Histopathology* **46**, 685-93.
- Ramos-DeSimone, N., Hahn-Dantona, E., Siple, J., Nagase, H., French, D. L. and Quigley, J. P.** (1999). Activation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) via a converging plasmin/stromelysin-1 cascade enhances tumor cell invasion. *J Biol Chem* **274**, 13066-76.
- Raouf, A., Li, V., Kola, I., Watson, D. K. and Seth, A.** (2000). The Ets1 proto-oncogene is upregulated by retinoic acid: characterization of a functional retinoic acid response element in the Ets1 promoter. *Oncogene* **19**, 1969-74.
- Relf, M., LeJeune, S., Scott, P. A., Fox, S., Smith, K., Leek, R., Moghaddam, A., Whitehouse, R., Bicknell, R. and Harris, A. L.** (1997). Expression of the angiogenic factors vascular endothelial cell growth factor, acidic and basic fibroblast growth factor, tumor growth factor beta-1, platelet-derived endothelial cell growth factor, placenta growth factor, and pleiotrophin in human primary breast cancer and its relation to angiogenesis. *Cancer Res* **57**, 963-9.
- Reynolds, A., Leake, D., Boese, Q., Scaringe, S., Marshall, W. S. and Khvorova, A.** (2004). Rational siRNA design for RNA interference. *Nat Biotechnol* **22**, 326-30.
- Rinker-Schaeffer, C. W. and Hickson, J. A.** (2006). Stopping cancer before it colonizes. *Nat Med* **12**, 887-8.
- Rodrigo, I., Cato, A. C. and Cano, A.** (1999). Regulation of E-cadherin gene expression during tumor progression: the role of a new Ets-binding site and the E-pal element. *Exp Cell Res* **248**, 358-71.
- Rosette, C., Roth, R. B., Oeth, P., Braun, A., Kammerer, S., Ekblom, J. and Denissenko, M. F.** (2005). Role of ICAM1 in invasion of human breast cancer cells. *Carcinogenesis* **26**, 943-50.
- Sabeh, F., Ota, I., Holmbeck, K., Birkedal-Hansen, H., Soloway, P., Balbin, M., Lopez-Otin, C., Shapiro, S., Inada, M., Krane, S. et al.** (2004). Tumor cell traffic through the extracellular matrix is controlled by the membrane-anchored collagenase MT1-MMP. *J Cell Biol* **167**, 769-81.
- Sadlonova, A., Mukherjee, S., Bowe, D. B., Gault, S. R., Dumas, N. A., Van Tine, B. A., Frolova, N., Page, G. P., Welch, D. R., Novak, L. et al.** (2007). Human breast fibroblasts inhibit growth of the MCF10AT xenograft model of proliferative breast disease. *Am J Pathol* **170**, 1064-76.
- Saeki, H., Kuwano, H., Kawaguchi, H., Ohno, S. and Sugimachi, K.** (2000). Expression of ets-1 transcription factor is correlated with penetrating tumor progression in patients with squamous cell carcinoma of the esophagus. *Cancer* **89**, 1670-6.
- Sahai, E. and Marshall, C. J.** (2003). Differing modes of tumour cell invasion have distinct requirements for Rho/ROCK signalling and extracellular proteolysis. *Nat Cell Biol* **5**, 711-9.
- Sakurai, T., Kondoh, N., Arai, M., Hamada, J. I., Yamada, T., Kihara-Negishi, F., Izawa, T., Ohno, H., Yamamoto, M. and Oikawa, T.** (2007). Functional roles of Fli-1, a member of the Ets family of transcription factors, in human breast malignancy. *Cancer Sci.*
- Sampath, J., Sun, D., Kidd, V. J., Grenet, J., Gandhi, A., Shapiro, L. H., Wang, Q., Zambetti, G. P. and Schuetz, J. D.** (2001). Mutant p53 cooperates with ETS and selectively up-regulates human MDR1 not MRP1. *J Biol Chem* **276**, 39359-67.

- Sapi, E., Flick, M. B., Rodov, S. and Kacinski, B. M.** (1998). Ets-2 transdominant mutant abolishes anchorage-independent growth and macrophage colony-stimulating factor-stimulated invasion by BT20 breast carcinoma cells. *Cancer Res* **58**, 1027-33.
- Sasaki, H., Yukiue, H., Moiriyama, S., Kobayashi, Y., Nakashima, Y., Kaji, M., Kiriya, M., Fukai, I., Yamakawa, Y. and Fujii, Y.** (2001). Clinical significance of matrix metalloproteinase-7 and Ets-1 gene expression in patients with lung cancer. *J Surg Res* **101**, 242-7.
- Saulnier, R., Bhardwaj, B., Klassen, J., Leopold, D., Rahimi, N., Tremblay, E., Mosher, D. and Elliott, B.** (1996). Fibronectin fibrils and growth factors stimulate anchorage-independent growth of a murine mammary carcinoma. *Exp Cell Res* **222**, 360-9.
- Schedin, P., Mitrenga, T., McDaniel, S. and Kaeck, M.** (2004a). Mammary ECM composition and function are altered by reproductive state. *Mol Carcinog* **41**, 207-20.
- Schedin, P. J., Eckel-Mahan, K. L., McDaniel, S. M., Prescott, J. D., Brodsky, K. S., Tentler, J. J. and Gutierrez-Hartmann, A.** (2004b). ESX induces transformation and functional epithelial to mesenchymal transition in MCF-12A mammary epithelial cells. *Oncogene* **23**, 1766-79.
- Schneider, B. P. and Miller, K. D.** (2005). Angiogenesis of breast cancer. *J Clin Oncol* **23**, 1782-90.
- Sehgal, G., Hua, J., Bernhard, E. J., Sehgal, I., Thompson, T. C. and Muschel, R. J.** (1998). Requirement for matrix metalloproteinase-9 (gelatinase B) expression in metastasis by murine prostate carcinoma. *Am J Pathol* **152**, 591-6.
- Seiki, M.** (2002). The cell surface: the stage for matrix metalloproteinase regulation of migration. *Curr Opin Cell Biol* **14**, 624-32.
- Sementchenko, V. I. and Watson, D. K.** (2000). Ets target genes: past, present and future. *Oncogene* **19**, 6533-48.
- Shan, S., Robson, N. D., Cao, Y., Qiao, T., Li, C. Y., Kontos, C. D., Garcia-Blanco, M. and Dewhirst, M. W.** (2004). Responses of vascular endothelial cells to angiogenic signaling are important for tumor cell survival. *Faseb J* **18**, 326-8.
- Sharrocks, A. D.** (2001). The ETS-domain transcription factor family. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 827-37.
- Sheu, B. C., Hsu, S. M., Ho, H. N., Lien, H. C., Huang, S. C. and Lin, R. H.** (2001). A novel role of metalloproteinase in cancer-mediated immunosuppression. *Cancer Res* **61**, 237-42.
- Silberstein, G. B.** (2001). Tumour-stromal interactions. Role of the stroma in mammary development. *Breast Cancer Res* **3**, 218-23.
- Sivridis, E., Giatromanolaki, A. and Koukourakis, M. I.** (2003). The vascular network of tumours--what is it not for? *J Pathol* **201**, 173-80.
- Slamon, D. J., Leyland-Jones, B., Shak, S., Fuchs, H., Paton, V., Bajamonde, A., Fleming, T., Eiermann, W., Wolter, J., Pegram, M. et al.** (2001). Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* **344**, 783-92.
- Sloan, E. K., Pouliot, N., Stanley, K. L., Chia, J., Moseley, J. M., Hards, D. K. and Anderson, R. L.** (2006). Tumor-specific expression of alphavbeta3 integrin promotes spontaneous metastasis of breast cancer to bone. *Breast Cancer Res* **8**, R20.
- Somerville, R. P., Oblander, S. A. and Apte, S. S.** (2003). Matrix metalloproteinases: old dogs with new tricks. *Genome Biol* **4**, 216.
- Sounni, N. E., Roghi, C., Chabottaux, V., Janssen, M., Munaut, C., Maquoi, E., Galvez, B. G., Gilles, C., Frankenfe, F., Murphy, G. et al.** (2004). Up-regulation of vascular endothelial growth factor-A by active membrane-type 1 matrix metalloproteinase through activation of Src-tyrosine kinases. *J Biol Chem* **279**, 13564-74.

- Span, P. N., Manders, P., Heuvel, J. J., Thomas, C. M., Bosch, R. R., Beex, L. V. and Sweep, C. G.** (2002). Expression of the transcription factor Ets-1 is an independent prognostic marker for relapse-free survival in breast cancer. *Oncogene* **21**, 8506-9.
- Sporn, M. B.** (1996). The war on cancer. *Lancet* **347**, 1377-81.
- Sternlicht, M. D.** (2006). Key stages in mammary gland development: the cues that regulate ductal branching morphogenesis. *Breast Cancer Res* **8**, 201.
- Sternlicht, M. D., Lochter, A., Sympson, C. J., Huey, B., Rougier, J. P., Gray, J. W., Pinkel, D., Bissell, M. J. and Werb, Z.** (1999). The stromal proteinase MMP3/stromelysin-1 promotes mammary carcinogenesis. *Cell* **98**, 137-46.
- Strongin, A. Y., Collier, I., Bannikov, G., Marmer, B. L., Grant, G. A. and Goldberg, G. I.** (1995). Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease. *J Biol Chem* **270**, 5331-8.
- Suzuki, M., Raab, G., Moses, M. A., Fernandez, C. A. and Klagsbrun, M.** (1997). Matrix metalloproteinase-3 releases active heparin-binding EGF-like growth factor by cleavage at a specific juxtamembrane site. *J Biol Chem* **272**, 31730-7.
- Takai, N., Miyazaki, T., Fujisawa, K., Nasu, K. and Miyakawa, I.** (2000). Expression of c-Ets1 is associated with malignant potential in endometrial carcinoma. *Cancer* **89**, 2059-67.
- Takai, N., Miyazaki, T., Nishida, M., Nasu, K. and Miyakawa, I.** (2002). c-Ets1 is a promising marker in epithelial ovarian cancer. *Int J Mol Med* **9**, 287-92.
- Tanoue, T. and Takeichi, M.** (2004). Mammalian Fat1 cadherin regulates actin dynamics and cell-cell contact. *J Cell Biol* **165**, 517-28.
- Tarin, D.** (2006). New insights into the pathogenesis of breast cancer metastasis. *Breast Dis* **26**, 13-25.
- Teruyama, K., Abe, M., Nakano, T., Iwasaka-Yagi, C., Takahashi, S., Yamada, S. and Sato, Y.** (2001). Role of transcription factor Ets-1 in the apoptosis of human vascular endothelial cells. *J Cell Physiol* **188**, 243-52.
- Thiery, J. P.** (2002). Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* **2**, 442-54.
- Tomlins, S. A., Laxman, B., Dhanasekaran, S. M., Helgeson, B. E., Cao, X., Morris, D. S., Menon, A., Jing, X., Cao, Q., Han, B. et al.** (2007). Distinct classes of chromosomal rearrangements create oncogenic ETS gene fusions in prostate cancer. *Nature* **448**, 595-9.
- Tommasi, S. and Pfeifer, G. P.** (1995). In vivo structure of the human cdc2 promoter: release of a p130-E2F-4 complex from sequences immediately upstream of the transcription initiation site coincides with induction of cdc2 expression. *Mol Cell Biol* **15**, 6901-13.
- Toth, M., Chvyrkova, I., Bernardo, M. M., Hernandez-Barrantes, S. and Fridman, R.** (2003). Pro-MMP-9 activation by the MT1-MMP/MMP-2 axis and MMP-3: role of TIMP-2 and plasma membranes. *Biochem Biophys Res Commun* **308**, 386-95.
- Tuck, A. B., Park, M., Sterns, E. E., Boag, A. and Elliott, B. E.** (1996). Coexpression of hepatocyte growth factor and receptor (Met) in human breast carcinoma. *Am J Pathol* **148**, 225-32.
- Turner, D. P., Moussa, O., Sauane, M., Fisher, P. B. and Watson, D. K.** (2007). Prostate-derived ETS factor is a mediator of metastatic potential through the inhibition of migration and invasion in breast cancer. *Cancer Res* **67**, 1618-25.
- Udagawa, T., Fernandez, A., Achilles, E. G., Folkman, J. and D'Amato, R. J.** (2002). Persistence of microscopic human cancers in mice: alterations in the angiogenic balance accompanies loss of tumor dormancy. *Faseb J* **16**, 1361-70.



- van 't Veer, L. J., Dai, H., van de Vijver, M. J., He, Y. D., Hart, A. A., Mao, M., Peterse, H. L., van der Kooy, K., Marton, M. J., Witteveen, A. T. et al.** (2002). Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* **415**, 530-6.
- Vandenbunder, B., Pardanaud, L., Jaffredo, T., Mirabel, M. A. and Stehelin, D.** (1989). Complementary patterns of expression of c-ets 1, c-myb and c-myc in the blood-forming system of the chick embryo. *Development* **107**, 265-74.
- Vandenbunder, B., Queva, C., Desbiens, X., Wernert, N. and Stehelin, D.** (1994a). Expression of the transcription factor c-Ets1 correlates with the occurrence of invasive processes during normal and pathological development. *Invasion Metastasis* **14**, 198-209.
- Vandenbunder, B., Wernert, N. and Stehelin, D.** (1994b). [How tumors abuse their host: the transcription factor c-ets1 and the regulation of tumor angiogenesis or invasion]. *Contracept Fertil Sex* **22**, 656-60.
- Vellon, L., Menendez, J. A. and Lupu, R.** (2006). A bidirectional "alpha(v)beta(3) integrin-ERK1/ERK2 MAPK" connection regulates the proliferation of breast cancer cells. *Mol Carcinog* **45**, 795-804.
- Verger, A. and Duterque-Coquillaud, M.** (2002). When Ets transcription factors meet their partners. *Bioessays* **24**, 362-70.
- Wai, P. Y., Mi, Z., Gao, C., Guo, H., Marroquin, C. and Kuo, P. C.** (2006). Ets-1 and runx2 regulate transcription of a metastatic gene, osteopontin, in murine colorectal cancer cells. *J Biol Chem* **281**, 18973-82.
- Walpita, D. and Hay, E.** (2002). Studying actin-dependent processes in tissue culture. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 137-41.
- Wang, H. and Keiser, J. A.** (2000). Hepatocyte growth factor enhances MMP activity in human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **272**, 900-5.
- Wang, W., Goswami, S., Sahai, E., Wyckoff, J. B., Segall, J. E. and Condeelis, J. S.** (2005a). Tumor cells caught in the act of invading: their strategy for enhanced cell motility. *Trends Cell Biol* **15**, 138-45.
- Wang, W., Wyckoff, J. B., Frohlich, V. C., Oleynikov, Y., Huttelmaier, S., Zavadil, J., Cermak, L., Bottinger, E. P., Singer, R. H., White, J. G. et al.** (2002). Single cell behavior in metastatic primary mammary tumors correlated with gene expression patterns revealed by molecular profiling. *Cancer Res* **62**, 6278-88.
- Wang, W., Wyckoff, J. B., Wang, Y., Bottinger, E. P., Segall, J. E. and Condeelis, J. S.** (2003). Gene expression analysis on small numbers of invasive cells collected by chemotaxis from primary mammary tumors of the mouse. *BMC Biotechnol* **3**, 13.
- Wang, Y., Klijn, J. G., Zhang, Y., Sieuwerts, A. M., Look, M. P., Yang, F., Talantov, D., Timmermans, M., Meijer-van Gelder, M. E., Yu, J. et al.** (2005b). Gene-expression profiles to predict distant metastasis of lymph-node-negative primary breast cancer. *Lancet* **365**, 671-9.
- Wasylyk, B., Wasylyk, C., Flores, P., Begue, A., Leprince, D. and Stehelin, D.** (1990). The c-ets proto-oncogenes encode transcription factors that cooperate with c-Fos and c-Jun for transcriptional activation. *Nature* **346**, 191-3.
- Watanabe, D., Takagi, H., Suzuma, K., Suzuma, I., Oh, H., Ohashi, H., Kemmochi, S., Uemura, A., Ojima, T., Suganami, E. et al.** (2004). Transcription factor Ets-1 mediates ischemia- and vascular endothelial growth factor-dependent retinal neovascularization. *Am J Pathol* **164**, 1827-35.
- Weaver, V. M., Petersen, O. W., Wang, F., Larabell, C. A., Briand, P., Damsky, C. and Bissell, M. J.** (1997). Reversion of the malignant phenotype of human breast cells in three-dimensional culture and in vivo by integrin blocking antibodies. *J Cell Biol* **137**, 231-45.

- Weidner, N., Semple, J. P., Welch, W. R. and Folkman, J.** (1991). Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* **324**, 1-8.
- Werner, M. H., Clore, G. M., Fisher, C. L., Fisher, R. J., Trinh, L., Shiloach, J. and Gronenborn, A. M.** (1997). Correction of the NMR structure of the ETS1/DNA complex. *J Biomol NMR* **10**, 317-28.
- Wernert, N., Gilles, F., Fafeur, V., Bouali, F., Raes, M. B., Pyke, C., Dupressoir, T., Seitz, G., Vandenbunder, B. and Stehelin, D.** (1994). Stromal expression of c-Ets1 transcription factor correlates with tumor invasion. *Cancer Res* **54**, 5683-8.
- Wernert, N., Raes, M. B., Lassalle, P., Dehouck, M. P., Gosselin, B., Vandenbunder, B. and Stehelin, D.** (1992). c-ets1 proto-oncogene is a transcription factor expressed in endothelial cells during tumor vascularization and other forms of angiogenesis in humans. *Am J Pathol* **140**, 119-27.
- Westermarck, J. and Kahari, V. M.** (1999). Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *Faseb J* **13**, 781-92.
- Wewer, U. M., Shaw, L. M., Albrechtsen, R. and Mercurio, A. M.** (1997). The integrin alpha 6 beta 1 promotes the survival of metastatic human breast carcinoma cells in mice. *Am J Pathol* **151**, 1191-8.
- White, D. E., Kurpios, N. A., Zuo, D., Hassell, J. A., Blaess, S., Mueller, U. and Muller, W. J.** (2004). Targeted disruption of beta1-integrin in a transgenic mouse model of human breast cancer reveals an essential role in mammary tumor induction. *Cancer Cell* **6**, 159-70.
- Wiseman, B. S., Sternlicht, M. D., Lund, L. R., Alexander, C. M., Mott, J., Bissell, M. J., Soloway, P., Itohara, S. and Werb, Z.** (2003). Site-specific inductive and inhibitory activities of MMP-2 and MMP-3 orchestrate mammary gland branching morphogenesis. *J Cell Biol* **162**, 1123-33.
- Wiseman, B. S. and Werb, Z.** (2002). Stromal effects on mammary gland development and breast cancer. *Science* **296**, 1046-9.
- Wolf, K., Mazo, I., Leung, H., Engelke, K., von Andrian, U. H., Deryugina, E. I., Strongin, A. Y., Brocker, E. B. and Friedl, P.** (2003). Compensation mechanism in tumor cell migration: mesenchymal-amoeboid transition after blocking of pericellular proteolysis. *J Cell Biol* **160**, 267-77.
- Xing, X., Wang, S. C., Xia, W., Zou, Y., Shao, R., Kwong, K. Y., Yu, Z., Zhang, S., Miller, S., Huang, L. et al.** (2000). The ets protein PEA3 suppresses HER-2/neu overexpression and inhibits tumorigenesis. *Nat Med* **6**, 189-95.
- Xu, D., Wilson, T. J., Chan, D., De Luca, E., Zhou, J., Hertzog, P. J. and Kola, I.** (2002). Ets1 is required for p53 transcriptional activity in UV-induced apoptosis in embryonic stem cells. *Embo J* **21**, 4081-93.
- Yanai, N., Satoh, T. and Obinata, M.** (1991). Endothelial cells create a hematopoietic inductive microenvironment preferential to erythropoiesis in the mouse spleen. *Cell Struct Funct* **16**, 87-93.
- Yang, B. S., Hauser, C. A., Henkel, G., Colman, M. S., Van Beveren, C., Stacey, K. J., Hume, D. A., Maki, R. A. and Ostrowski, M. C.** (1996). Ras-mediated phosphorylation of a conserved threonine residue enhances the transactivation activities of c-Ets1 and c-Ets2. *Mol Cell Biol* **16**, 538-47.
- Yang, J., Mani, S. A., Donaher, J. L., Ramaswamy, S., Itzykson, R. A., Come, C., Savagner, P., Gitelman, I., Richardson, A. and Weinberg, R. A.** (2004). Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell* **117**, 927-39.
- Yao, E. S., Zhang, H., Chen, Y. Y., Lee, B., Chew, K., Moore, D. and Park, C.** (2007). Increased beta1 integrin is associated with decreased survival in invasive breast cancer. *Cancer Res* **67**, 659-64.

**Yu, Z., Xia, W., Wang, H. Y., Wang, S. C., Pan, Y., Kwong, K. Y., Hortobagyi, G. N. and Hung, M. C.** (2006). Antitumor activity of an Ets protein, PEA3, in breast cancer cell lines MDA-MB-361DYT2 and BT474M1. *Mol Carcinog* **45**, 667-75.

**Zahir, N., Lakins, J. N., Russell, A., Ming, W., Chatterjee, C., Rozenberg, G. I., Marinkovich, M. P. and Weaver, V. M.** (2003). Autocrine laminin-5 ligates alpha6beta4 integrin and activates RAC and NFkappaB to mediate anchorage-independent survival of mammary tumors. *J Cell Biol* **163**, 1397-407.

**Zeisberg, M., Hanai, J., Sugimoto, H., Mammoto, T., Charytan, D., Strutz, F. and Kalluri, R.** (2003). BMP-7 counteracts TGF-beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and reverses chronic renal injury. *Nat Med* **9**, 964-8.

**Zhan, Y., Brown, C., Maynard, E., Anshelevich, A., Ni, W., Ho, I. C. and Oettgen, P.** (2005). Ets-1 is a critical regulator of Ang II-mediated vascular inflammation and remodeling. *J Clin Invest* **115**, 2508-16.

**Zhang, C., Kavurma, M. M., Lai, A. and Khachigian, L. M.** (2003a). Ets-1 protects vascular smooth muscle cells from undergoing apoptosis by activating p21WAF1/Cip1: ETS-1 regulates basal and and inducible p21WAF1/Cip: ETS-1 regulates basal and inducible p21WAF1/Cip1 transcription via distinct cis-acting elements in the p21WAF/Cip1 promoter. *J Biol Chem* **278**, 27903-9.

**Zhang, Y. W., Su, Y., Volpert, O. V. and Vande Woude, G. F.** (2003b). Hepatocyte growth factor/scatter factor mediates angiogenesis through positive VEGF and negative thrombospondin 1 regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 12718-23.

**Zhao, Y., Bachelier, R., Treilleux, I., Pujuguet, P., Peyruchaud, O., Baron, R., Clement-Lacroix, P. and Clezardin, P.** (2007). Tumor alphavbeta3 integrin is a therapeutic target for breast cancer bone metastases. *Cancer Res* **67**, 5821-30.

## ANNEXES

### ANNEXE1 : Expression d'Ets-1 dans les cancers humains

Localisation du cancer	Type de cancer	Commentaires
cerveau	astrocytomes méningiomes	expression associée avec le grade tumoral expression dans les tumeurs invasives
sein	carcinomes invasifs	expression corrélée avec un mauvais pronostic
mâchoire	chondrosarcomes	
col utérin	carcinomes	expression corrélée avec un mauvais pronostic
rectum/colon	adénomes	expression vasculaire d'Ets-1 corrélée avec un mauvais pronostic
endomètre	carcinomes	expression corrélée avec le grade histologique
oesophage	carcinomes squameux	expression hétérogène, accrue aux sites d'invasion
foie/tractus biliaire	carcinomes du conduit biliaire ou hépatocellulaires	expression accrue dans les tumeurs bien différenciées expression accrue dans les tumeurs peu différenciées
poumon	adénocarcinomes	expression liée aux métastases ganglionnaires
tissu lymphoïde	leucémies immatures	
bouche	carcinomes squameux	expression corrélée avec le stade tumoral et les métastases ganglionnaires
ovaire	carcinomes	expression corrélée avec un mauvais pronostic
pancréas	adénocarcinomes	expression réduite dans les tumeurs peu différenciées
estomac	adénocarcinomes	
thymus	thymomes	expression accrue dans les tumeurs de haut grade
glande thyroïde	carcinomes	
système vasculaire	angiosarcomes	

**ANNEXE 2** : *ST6GalNAc I expression in MDA-MB-231 breast cancer cells greatly modifies their O-glycosylation pattern and enhances their tumourigenicity.*

S. Julien, E. Adriaenssens, K. Ottenberg, A. Furlan, G. Courtand, A.-S. Vercoutter-Edouart, F.-G. Hanisch, P. Delannoy, and X. Le Bourhis (2006) Glycobiology 16 (1), 54–64.

# ANNEXE 3 : poster exposé lors du congrès Eurocancer en Juin 2006.

## ETS-1 transcription factor coordinately regulates a panel of molecules contributing to invasion of mammary cancerous MMT cells.

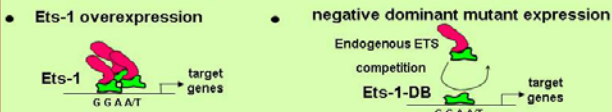


A. FURLAN, C. VERCAMER, X. DESBIENS, and A. POURTIER.  
UMR 8161, « Institut de Biologie de Lille » CNRS/Universités de Lille1 et Lille2/Institut Pasteur de Lille.



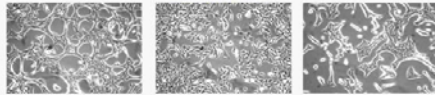
**Key words :** mammary tumoral cells, extracellular matrix gels, morphogenesis, ETS transcription factors, matrix metalloproteinases

ETS-1 transcription factor is often expressed in aggressive cancers. To investigate the role of ETS factors in mammary tumors, we manipulated the activity or the expression of ETS factors in Mouse Mammary Tumoral cell lines, through retroviral infection.

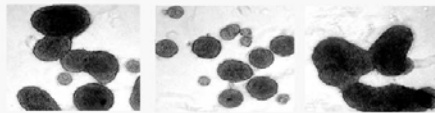


### 1 Routine plastic culture dishes show dramatic differences.

Control MMT-neo    MMT-Ets1-neo    MMT-Ets1-DB-neo



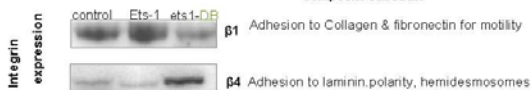
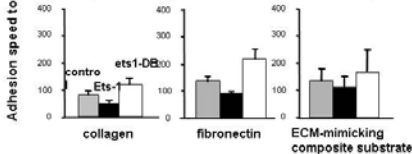
As well as aggregation assay on an agarose layer.



ETS-1 reduces MMT cells' aggregation.

Progression link: Ets1 promotes scattering.

### 2 Anchoring to ExtraCellularMatrices.



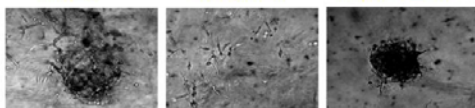
ETS-1-overexpressing cells adhere fastly to ECM substrates, through regulation of integrin subunits expression.

Progression link: Cellular interactions with ECM are modulated by ETS-1

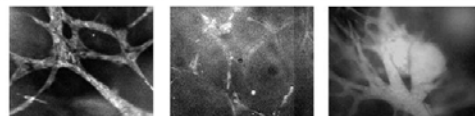
### 3 Morphogenesis of mammary tumoral cells within matrix-mimicking composite gels.

MMT-neo    MMT-Ets1-neo    MMT-Ets1-DB-neo

3D Type-I collagen gel



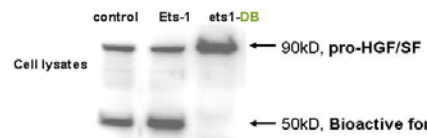
3D ECM-mimicking composite substrate gel (Neutral red staining)



ETS-1 overexpression in MMT cells enhances scattering and formation of thinner networks in reconstituted ECM.

Progression link: are these morphogenetic differences also related to growth factors expression and/or to proteolytic activities?

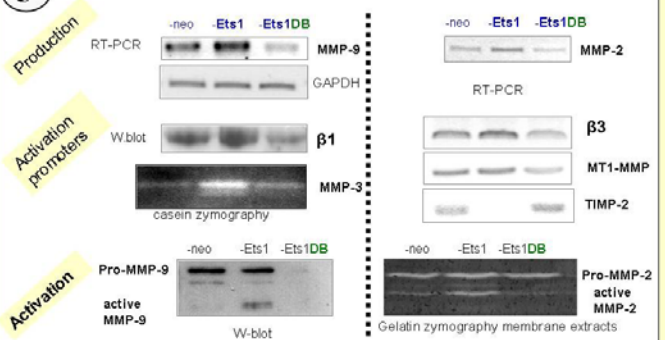
### 4 Local expression of HGF/ Scatter Factor is modulated



Activation of HGF/ Scatter Factor is enhanced by ETS-1 and abrogated by a dominant negative mutant.

Progression link: HGF/SF modulated by ETS-1 could be associated to enhanced scattering properties and signalling to MMPs production.

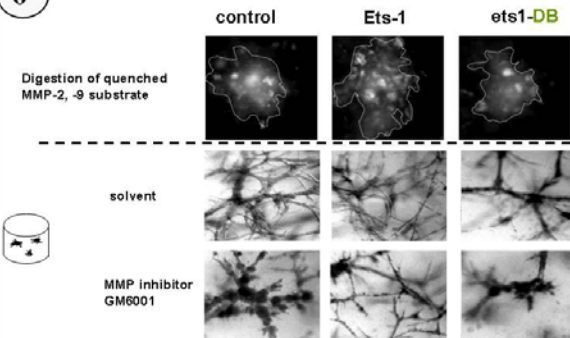
### 5 Description of the MMP-9 and MMP-2 expression and activation network



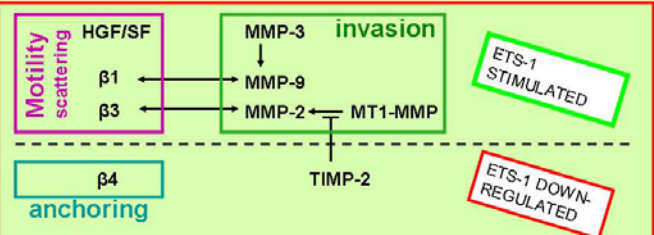
ETS1 promotes the production of MMP-2, -9 and their activators

Progression link: Is this network a major actor of the morphogenetic properties of MMT cancerous cells?

### 6 Matrix MetalloProteinases activity in 3D composite gels.



MMT cells' morphogenesis is dependent on MMP-2 and -9 activities. Morphogenesis of low-MMPs-expressing cells, is abrogated by MMP inhibitor, while scattering of Ets1-overexpressing cells is reduced.



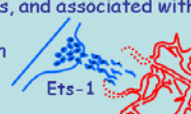


# ANNEXE 4 : poster exposé lors du congrès annuel de la Tumor Microenvironment Society en Mars 2007.

## Ets-1 transcription factor promotes mammary cancer cell exploratory phenotype and interactions with endothelial cells.

Alessandro FURLAN, Chantal VERCAMER, Xavier DESBIENS, and Albin POURTIER.  
UMR 8161, « Institut de Biologie de Lille » CNRS/Universités de Lille1 et Lille2/Institut Pasteur de Lille.  
Key words : mammary tumor cells, angiogenesis, extracellular matrix, ETS factors, MMPs, growth factors

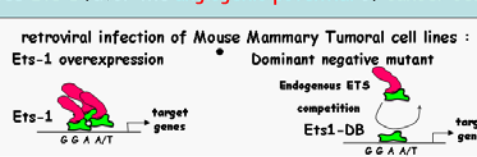
**Ets-1 transcription factor is overexpressed in aggressive breast cancers, and associated with invasive properties**

cancerisation /invasion  Breast cancers are often angiogenic

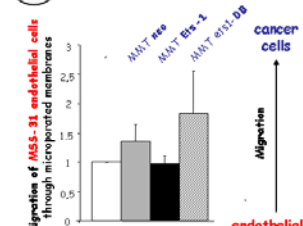
- How does Ets-1 regulate invasive properties of breast cancers ?
- Does Ets-1 favor the angiogenic potential of cancer cells ?

retroviral infection of Mouse Mammary Tumoral cell lines :

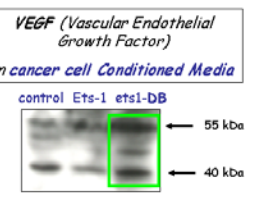
- Ets-1 overexpression
- Dominant negative mutant



**4 Chemo-attraction of endothelial cells by MMT cancer cells**



**VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) in cancer cell Conditioned Media**



Migration of MSS-31 endothelial cells through microperforated membranes

endothelial cells

Aligement

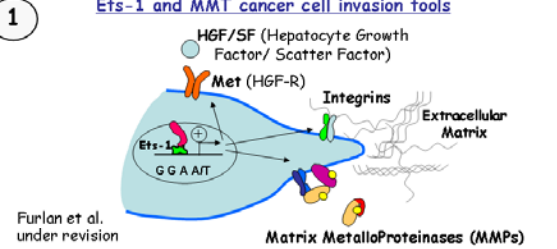
55 kDa

40 kDa

Control Ets-1 ets1-DB

Competition with Ets-1 in MMT cancer cells enhances their secretion of VEGF, and chemoattraction of endothelial cells.

**1 Ets-1 and MMT cancer cell invasion tools**



HGF/SF (Hepatocyte Growth Factor/ Scatter Factor)

Met (HGF-R)

Integrins

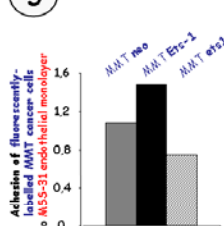
Extracellular Matrix

Matrix MetalloProteinases (MMPs)

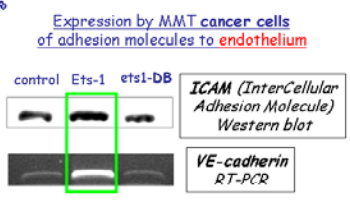
Furlan et al. under revision

Ets-1 coordinates multiple features of MMT cancer cells to promote motility and matrix invasion.

**5 MMT cancer cell adhesion to endothelial cells**



**Expression by MMT cancer cells of adhesion molecules to endothelium**



Adhesion of fluorescently-labeled MMT cancer cells to MSS-31 endothelial monolayer

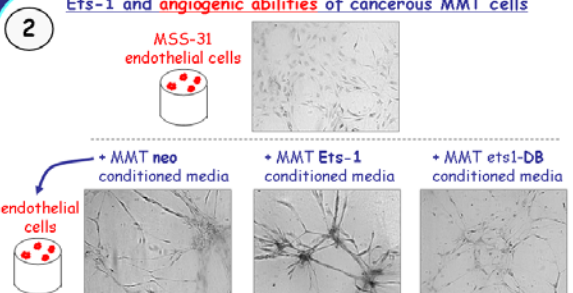
ICAM (InterCellular Adhesion Molecule) Western blot

VE-cadherin RT-PCR

control Ets-1 ets1-DB

Ets-1 promotes the expression by cancer MMT cells of molecules involved in interactions with endothelial cells, and promotes cancer cell adhesion to endothelial cells

**2 Ets-1 and angiogenic abilities of cancerous MMT cells**



MSS-31 endothelial cells

+ MMT neo conditioned media

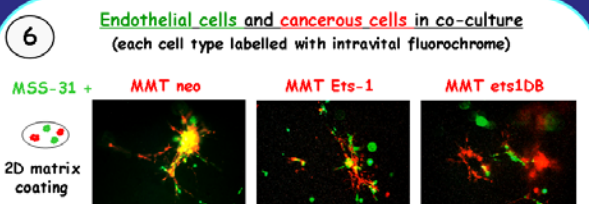
+ MMT Ets-1 conditioned media

+ MMT ets1-DB conditioned media

endothelial cells

Ets-1 mediates angiogenic abilities of MMT cancer cells.

**6 Endothelial cells and cancerous cells in co-culture (each cell type labelled with intravital fluorochrome)**



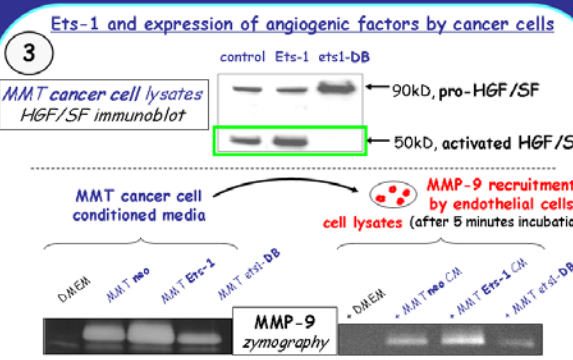
MSS-31 + MMT neo MMT Ets-1 MMT ets1-DB

2D matrix coating

This coculture model highlights stronger interactions between Ets-1 overexpressing cancer cells and endothelial cells.

These data suggest a critical role for Ets-1 in mammary cancer cell dissemination through metastatic process. (in vivo experiments are in progress)

**3 Ets-1 and expression of angiogenic factors by cancer cells**



control Ets-1 ets1-DB

MMT cancer cell lysates HGF/SF immunoblot

90kD, pro-HGF/SF

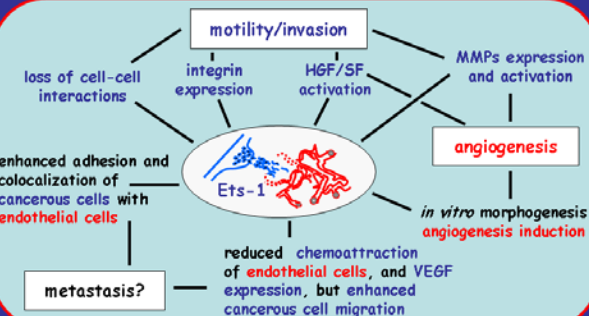
50kD, activated HGF/SF

MMT cancer cell conditioned media

MMP-9 recruitment by endothelial cells cell lysates (after 5 minutes incubation)

MMP-9 zymography

HGF/SF and MMP-9 in Ets-1 mediated angiogenic abilities of cancer cells? (blocking antibodies & RNAi)



motility/invasion

angiogenesis

metastasis?

loss of cell-cell interactions

integrin expression

HGF/SF activation

MMPs expression and activation

angiogenesis

in vitro morphogenesis angiogenesis induction

reduced chemoattraction of endothelial cells, and VEGF expression, but enhanced cancerous cell migration

enhanced adhesion and colocalization of cancerous cells with endothelial cells

Ets-1