HAL
open science

Influence d'inhibiteurs tyrosine kinase sur la biologie et la survie de cellules de cancer colorectal

Paul Mésange

To cite this version:

Paul Mésange. Influence d'inhibiteurs tyrosine kinase sur la biologie et la survie de cellules de cancer colorectal. Pharmacologie. Université René Descartes - Paris V, 2014. Français. NNT : 2014PA05P635 . tel-01194876

HAL Id: tel-01194876

https://theses.hal.science/tel-01194876v1

Submitted on 7 Sep 2015

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

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

UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES

Thèse de doctorat de l'Université Paris Descartes

Spécialité Pharmacologie

Présentée et soutenue publiquement par

Paul MESANGE

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université Paris Descartes

Influence d'inhibiteurs tyrosine kinase sur la biologie et la survie de cellules de cancer colorectal

Le 5 Septembre 2014

Devant le jury composé de :

Directeur de thèse : Dr Annette Kragh Larsen
Président : Pr Aimery de Gramont
Rapporteur : Dr Catherine Monnot
Rapporteur : Dr Joseph Gligorov
Examinateur : Pr Marc Pocard

REMERCIEMENTS

Très chers membres du jury,

Je tenais en premier lieu à remercier le **Dr Annette K.Larsen**, ma directrice de thèse. Elle m'a permis de venir au sein de ce laboratoire alors que nous ne nous connaissions pas, m'a fourni un financement et permis de travailler pendant ces quatre années à l'hôpital Saint Antoine. Elle m'a fait confiance tout au long de ces quatre années en me permettant de présenter nos travaux dans de nombreux congrès internationaux et même de les publier dans de prestigieux journaux. Annette, je vous remercie donc pour ces années passées ensemble où nous avons conversé de nombreuses fois autant sur le plan scientifique que personnel. Je souhaitais aussi remercier **Mounah Nasrallah**, une femme de grande personnalité, qui m'a soutenu financièrement tout au long de ma thèse.

Je remercie le **Pr Aimery de Gramont** pour avoir accepté de présider mon jury de thèse. J'ai appris à vous connaître lors de nos rencontres à différentes réunions et congrès auquel vous m'avez permis de participer. Grâce à vous, ma thèse a pris une autre dimension scientifique. Ce fut un réel plaisir de vous côtoyer et j'espère de tout cœur que cela continuera ainsi.

Je remercie mes deux rapporteurs, le **Dr Catherine Monnot** et le **Dr Joseph Gligorov** qui me font l'honneur d'évaluer l'ensemble de la démarche scientifique de mon travail de thèse. Je vous remercie pour vos compétences, vos précieux conseils et pour l'enthousiasme avec lequel vous avez accepté d'être rapporteur de ce manuscrit.

Enfin, je remercie le **Pr Marc Pocard** qui me fera l'honneur d'être examinateur de ma thèse. Après la thèse de Karima El Ouadrani et notre rencontre lors de l'ESMO à Amsterdam, je suis heureux de pouvoir vous compter parmi les membres de mon jury de thèse.

Très chers collègues,

Je remercie le désormais **Pr Alexandre Escargeuil** pour ses précieux conseils scientifiques. Merci de m'avoir aidé dès le début de ma thèse lors de l'arrivée de Diana Bordin jusqu'à la publication du deuxième papier, sans compter les visites microscopiques chez Philippe Fontanges.

Merci à l'omniprésente **Dr Virginie Poindessous,** le lieutenant des armées du laboratoire, la seule personne pouvant simultanément s'occuper des études animales, donner des cellules, préparer des solutions de drogue anti-cancéreuse tout en épongeant le sol de la salle de culture qui a subi une énième fuite d'eau. Plus sérieusement, merci beaucoup de ta disponibilité notamment dans la relecture de ma thèse que tu dois maintenant connaître par cœur.

Merci au **Dr Elisa Laffitte** pour son expertise dans l'immunohistochimie tumorale, ainsi que le **Dr Jacques Bara.**

Je remercie les nouveaux membres de l'équipe AKL le **Dr Michèle Sabbah** (taaata miiiiichèle) et le **Dr Nathalie Ferrand** (avec qui j'ai souvent pousser la chansonnette) qui sont venus égayer notre étage.

Merci aux anciens qui sont désormais parti vers de nouvelles aventures. Merci à **Méloche** qui m'a quand même « recruté » et invité une semaine après à une de ces soirées (sans compter les nombreuses autres qui ont suivi). Merci à **Karima** avec qui j'ai partagé mon bureau durant l'écriture de sa thèse et avec qui j'ai eu de nombreuses discussions scientifiques. Merci aussi à **Djamila**, partie trop tôt rejoindre l'autre côté de la manche. Je remercie aussi Aude qui, même enceinte jusqu'aux yeux, continuait de travailler avec moi sur les IHC. Merci à **Danièle** pour sa joie de vivre et son accent chantant.

Je remercie les différents thésards qui m'ont soutenu lors de ce périple. Merci à **Mériam** avec qui j'ai commencé (et fini) ma thèse. Je remercie **Anaïs** (Lenny's biggest fan), **Thomas** (honey badger addict), **Hana** (« salut à tous »), **Anaïs** (mais celle du 6ème) et tous ceux avec qui j'ai pu échanger durant ces quatre années.

Merci à tous les stagiaires qui sont passés au laboratoire (**Baptiste, Lila, Claire, Maurice**), notamment à ceux que j'ai encadré **Arnaud, Anissa, Dina, Judith et Elodie**.

Je remercie aussi **Chacha** avec qui je partage ma vie depuis maintenant 2 ans avec notre chien Kynaï.

Je remercie **Thibaut** pour un peu tout**,** que je connais maintenant depuis bien trop longtemps^^.

Merci au BoB officiel, les sus nommé **Mika et Arnaud** ne serait-ce que pour les visites touristiques à Lille.

Merci à **Benoit** qui a failli (?) avant de nous quitter pour Toulouse avec sa femme Audrey.

Merci aux personnes des facs de dentaire de Garencière pour toutes les soirées passées ensemble.

Merci à la famille Reguigui pour tous les moments passés ensemble.

Enfin Merci à mes parents qui m'ont poussé et soutenu jusqu'au bout.

SOMMAIRE

ABREVIATIONS **1**

CONTEXTE SCIENTIFIQUE **3**

CHAPITRE 1 LE CANCER COLORECTAL 5

I- Epidémiologie *5*

II- Définition, symptômes, facteurs de risques et diagnostic *6*

III- Etiologie des cancers colorectaux *10*

1) Cancers du côlon héréditaires 11

2) Cancers du côlon sporadiques 12

IV- Biologie du cancer *16*

V- Classification de la progression tumorale *19*

1) Classification de DuKes 19

2) Classification TNM 19

CHAPITRE 2 TRAITEMENTS 21

I- La chirurgie *21*

1) Cancer du côlon non métastatique 21

2) Cancer du côlon métastatique 21

3) Surveillance post opératoire 22

II- La radiothérapie *22*

III- La Chimiotherapie *23*

1) Chimiothérapie conventionnelles 23

2) Les thérapies ciblées 28

CHAPITRE 3 ANGIOGENESE 29

I- Définition de l'angiogenèse *29*

II- L'angiogenèse tumorale *30*

1) Morphologie de la vascularisation tumorale 31

2) La notion de switch angiogénique 32

CHAPITRE 4 LA REGULATION DE L'ANGIOGENESE 34

I- Le VEGF, un facteur clé de la régulation *34*

II- Les recepteurs du VEGF *36*

1) VEGFR-1 37

2) VEGFR-2 38

3) NRP1 et NRP2 38

III- Les autres récepteurs impliqués dans l'angiogenèse *39*

1) Le Fibroblast Growth Factor Receptor (FGFR) 40

2) Le Platelet-Derived Growth Factor Receptor 41

IV- Signalisation autocrine du VEGF et traitement ciblé *42*

1) Variation d'expression des ligands VEGF et de leurs recepteurs dans les cellules CRC et les tumeurs 42

2) Signalisation VEGF autocrine 44

3) Régulation de VEGF et ses récepteurs 45

V- Inhibition de l'angiogenèse et survie des cellules de Cancer colorectal *47*

VI- Thérapies anti angiogéniques *48*

1) Avastin (Bevacizumab, Roche) 48

2) Nintedanib (BIBF 1120, Boerhinger ingelheim) 50

3) Le VEGF trap (Aflibercept, Sanofi Aventis) 52

CHAPITRE 5 ACTIVATION DE LA VOIE DE SIGNALISATION EGFR 54

I- Les récepteurs HER et leurs ligands *54*

1) Recepteurs HER 54

2) Ligands 55

II- Signalisation EGFR *57*
III- Expression d'EGFR dans les cancers *60*
IV- Cibler le recepteur EGFR *60*
1) anti-EGFR et statut Kras 60
2) anti-EGFR et statut BRAF 61
3) Anti-EGFR et la voie de signalisation PTEN 61
V- Thérapie anti EGFR *62*
1) Cetuximab (Erbitux, Merck) 62
2) Tarceva (Erlotinib, Roche) 63
3) Gilotrif (Afatinib, Boerhinger ingelheim) 64
OBJECTIFS DES TRAVAUX **66**
REVUE **68**
ARTICLE N°1 ..... **76**
ARTICLE N°2 ..... **89**
DISCUSSION **121**
BIBLIOGRAPHIE **129**
ANNEXE **145**
RESUME **148**

ABREVIATIONS

A

ADN : Acide Désoxyribonucléique

AKT : Alpha serine/threonine-protein kinase

ANG2 : Angiotensine 2

APC : Adenomatous polyposis coli

AREG : Amphireguline

ARN : Acide Ribonucléique

ATP : Adénosine TriphosPhate

B

Bcl2 : B-cell lymphoma 2

C

CIN : Chromosomal INstability

CRC : Cancer ColoRectal

F

FGF : Fibroblast Growth Factor

FGFR : Fibroblast Growth Factor Receptor

FLK-1 : Fetal Liver Kinase 1

FLT-1 : Fms-reLated Tyrosine Kinase 1

FLT-4 : Fms-reLated Tyrosine Kinase 4

FUTP : Fluoro-Uridine TriPhosphate

M

MSI : MicroSatellite Instability

MSS : Microsatellite Stability

N

NRP : Neuropilin

NSCLC : Non Small Cell Lung Cancer

O

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

OS : Overall Survival

P

PDGF : Platelet Derived Growht factor

PFS : Progression Free Survival

T

TKI : Tyrosine Kinase Inhibitor

V

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

VEGFR : VAscular Endothelial Grotwh Factor Receptor

W

Wt : Wild type

CONTEXTE SCIENTIFIQUE

Ce mémoire de thèse synthétise les travaux réalisés sous la direction scientifique du Docteur Annette Kragh Larsen, au sein du Centre de Recherche Saint Antoine, dans le laboratoire « Biologie et Thérapeutique du Cancer » de l'unité INSERM U938.

Chaque année, on dénombre plus d'un million de nouveaux cas de cancer colorectaux dans le monde. Le cancer colorectal, tous sexes confondus, est au premier rang des cancers en France et représente un véritable enjeu de santé publique. Si la chirurgie et la combinaison chirurgie-traitement adjuvant permettent de guérir les patients diagnostiqués pour un cancer localement avancé, les traitements par chimiothérapie administrés dans les cas de cancers colorectaux de stades avancés ont malheureusement une efficacité limitée. L'échec thérapeutique est en grande partie dû au développement d'une chimiorésistance par certaines cellules cancéreuses qui s'accompagne souvent d'un phénotype plus agressif. Des thérapies moléculaires plus ciblées ont été récemment développées pour traiter les CRC de stade avancé tout en limitant les effets délétères sur le reste de l'organisme.

La néovascularisation est requise pour la croissance de la majorité des tumeurs solides et pour la dissémination des cellules tumorales sur des sites secondaires. Le VEGF-A ou VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) est le principal médiateur de l'angiogenèse tumorale. Les cellules de cancer colorectal exprimé à la fois le VEGF et son récepteur le VEGFR. Deux agents dirigés contre le VEGF, le bevacizumab (avastin) et l'aflibercept (VEGF-Trap) sont approuvés pour le traitement de patients atteints de cancers colorectaux métastatiques. Ces agents montrent une excellente activité antitumorale chez certains patients tandis que d'autres y sont réfractaires pour des raisons encore mal comprises.

Le but de ma thèse a été de caractériser l'influence de la signalisation VEGF, particulièrement de la signalisation autocrine sur la biologie et la sensibilité/résistance aux drogues des cellules de cancers colorectaux. Plus spécifiquement, les objectifs étaient 1) de caractériser l'impact de la signalisation autocrine VEGF dans des modèles de cancer colorectal avec une résistance naturelle au bevacizumab, 2) de déterminer si un inhibiteur EGFR peut augmenter l'activité du bevacizumab.

Avant d'exposer les résultats obtenus au cours de ma thèse, je commencerai par introduire dans les premiers chapitres les différents types de cancers colorectaux ainsi que la diversité de leur traitement. Nous nous intéresserons par la suite au phénomène de l'angiogenèse pour détailler les signalisations VEGF(R) et EGFR.

Les résultats de mes travaux apparaissent dans ce manuscrit sous forme d'articles. Les différents autres projets auxquels j'ai participé et qui ont fait l'objet de publications, apparaitront en annexe, à la fin de ce mémoire.

CHAPITRE 1 LE CANCER COLORECTAL

I- EPIDEMIOLOGIE

Le cancer est une cause majeure de décès dans le monde puisque huit millions de personnes en meurent chaque année (*Données American Cancer Society, 2013*). D'après les différentes prévisions, la mortalité liée au cancer devrait atteindre les 13,1 millions en 2030. Le Cancer ColoRectal (CRC) est le troisième cancer le plus fréquent chez l'Homme (Tableau 1) et la deuxième cause de mortalité en France (*Données INCa, 2013*). Plus de 40000 nouveaux cas sont diagnostiqués chaque année. Les plus de 50 ans sont les plus touchés. L'âge moyen au moment du diagnostic est de 70 ans.

Tableau 1: Incidence et mortalité estimées des cancers en France métropolitaine en 2012

Localisation	Incidence (%)	Mortalité (%)
Prostate	15,0	6,0
Sein	13,7	8,0
Côlon-rectum	11,9	11,9
Poumons	11,1	20,2

Données : INCa 2013

En regardant l'évolution de l'incidence du cancer colorectal (Tableau 2), il est à noter que cette dernière n'a pas vraiment évolué ces dernières années.

Tableau 2: Evolution du taux d'incidence du CRC de 1980 à 2012

Année	1980	1990	2000	2005	2010	2012
Homme	34,7	38,1	39,4	39,2	38,8	38,4
Femme	23	24,5	24,6	24,3	23,9	23,7

Données : INCa 2013

L'évolution de la mortalité (Tableau 3) quant à elle a grandement diminué depuis les années 1980 et notamment avec l'arrivée en 2004 de protocoles de chimiothérapies et des thérapies ciblées.

Tableau 3: Evolution de la mortalité par CRC de 1980 à 2012

Année	1980	1990	2000	2005	2010	2012
Homme	19,9	18,2	16	14,9	13,8	13,3
Femme	12,5	10,6	9,2	8,6	8,1	7,9

Données : INCa 2013

Le CRC est globalement un cancer de bon pronostic lorsqu'il est diagnostiqué précocement [1]. En revanche, un diagnostic établi 5 ans après le développement de cellules cancéreuses fait diminuer les chances de survies à 56%.

II- DEFINITION, SYMPTOMES, FACTEURS DE RISQUES ET DIAGNOSTIC

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) définit le cancer comme un terme général appliqué à un ensemble de maladies pouvant toucher n'importe quelle partie de l'organisme. Le cancer est une structure où le nombre de cellules tumorales en prolifération est plus important que le nombre de cellules tumorales en état de mort cellulaire.

Le cancer colorectal est un cancer se développant dans le gros intestin ou côlon. Le côlon est un segment du tube digestif qui se divise en plusieurs parties successives : le caecum, le côlon ascendant, le côlon transverse, le côlon descendant et le côlon sigmoïde (Figure 1). Sa fonction principale est l'absorption hydrique et l'élimination des résidus alimentaires. Il mesure environ 1,5 mètre de long pour 7cm de diamètre.

D'un point de vue structurel, cet organe est composé de quatre tuniques différentes (Figure 1). La muqueuse contient un épithélium présentant de nombreuses cellules calciformes qui s'invaginent sous forme de cryptes appelées crypte de Lieberkühn. La sous-muqueuse correspond à un tissu conjonctif dense où sont retrouvés plusieurs éléments dont le réseau vasculaire. La musculeuse est composée de deux couches distinctes et, contrairement à l'intestin grêle, est discontinue et composée de faisceaux épais isolés. Enfin, la séreuse, lisse et brillante, est constituée d'un mésothélium et d'un tissu conjonctif.

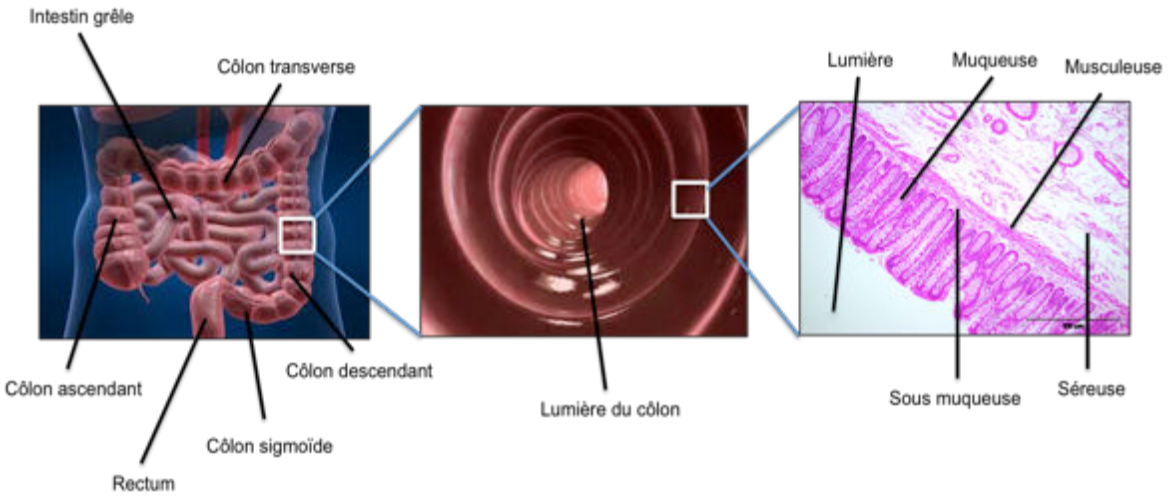


Figure 1: Anatomie et structure du colon sain (d'après Colitis IQ)

L'épithélium quant à lui est chargé de la fonction intestinale et est composé de deux types cellulaires : les cellules sécrétrices et les entérocytes. Parmi ces premières se trouvent les cellules calciformes, les cellules de Paneth et les cellules entéroendocrines. Ces cellules sécrétrices vont produire du mucus ainsi que des substances bactéricides et des hormones. Le deuxième type cellulaire épithélial, les entérocytes, va être impliqué dans l'absorption des nutriments. L'épithélium intestinal est structuré en cryptes où se divisent les cellules progénitrices, pouvant donner naissance aux différents types cellulaires. La prolifération ainsi que la différenciation cellulaire se fait le long de la crypte (Figure 2) [2], les cellules proliférives se trouvant à la base et les cellules différenciées au sommet.

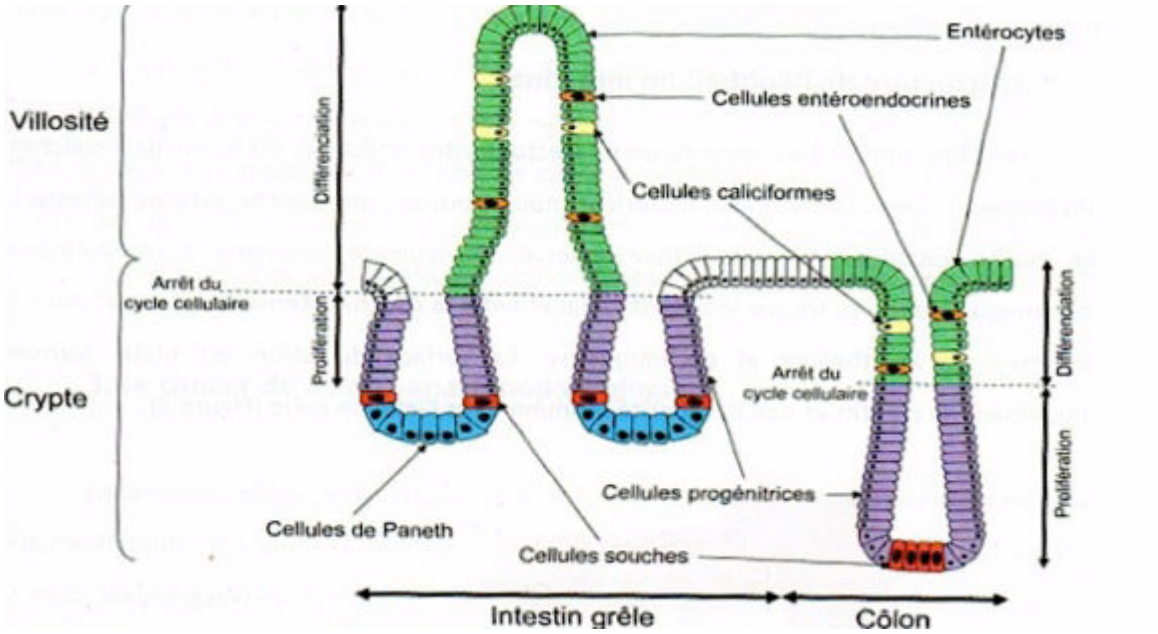


Figure 2: Structure de l'épithélium intestinal (Sancho, 2004)

Dans 60 à 80% des cas, la formation d'un adénome (tumeur bénigne) sous forme de polypes ou de formes plates, peut mener à un cancer colorectal (Figure 3). La prolifération anarchique de cellules à l'origine du cancer se déroule dans la muqueuse du côlon, majoritairement dans le sigmoïde. La probabilité de transformation d'adénome bénin en adénome cancéreux dépend de nombreux facteurs (taille, degré de dysplasie…) et se fait sur une durée variable allant de quelques mois à plusieurs années.

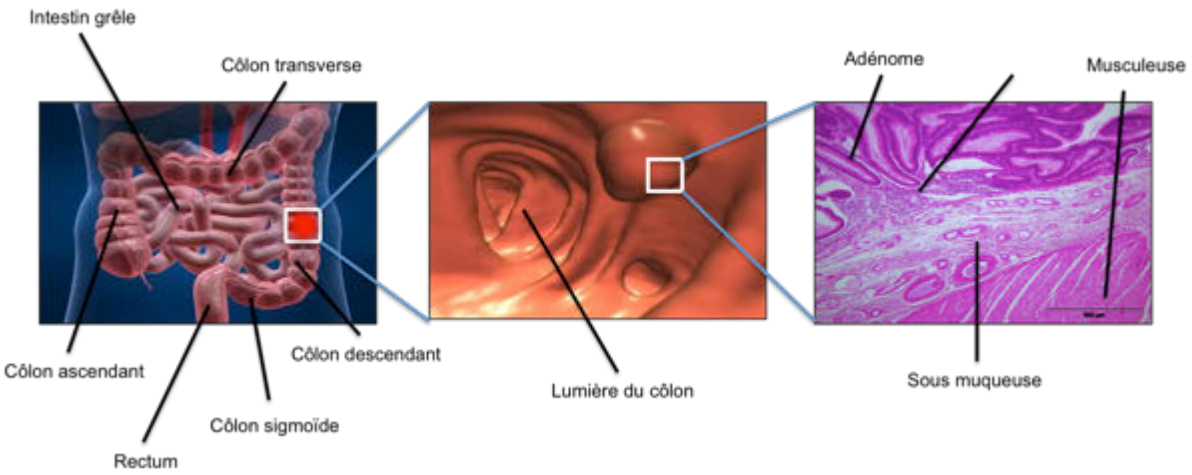


Figure 3: Anatomie et structure du côlon adénomateux (d'après Colitis IQ)

Plusieurs facteurs de risques de développement d'un cancer colorectal sont à noter. Parmi eux, on peut citer l'âge, les habitudes de vie et alimentaires, les MICI (Maladies Inflammatoire Chronique de l'Intestin), la présence de polypes ou des antécédents familiaux [3]. Il existe différents niveaux de risques de développement d'un CRC allant de moyen à très élevé :

- Les personnes à risques moyens sont des hommes et des femmes âgés de plus de 50 ans. Tous les deux ans, cette population a la possibilité de se soumettre à un test de recherche de sang dans les selles.
- Les personnes à risques élevés correspondent à une population ayant déjà eu un CRC ou un adénome dépassant la taille d'un centimètre. Sont aussi concernés les personnes ayant un membre apparenté correspondant aux mêmes critères ainsi que les personnes atteintes de MICI évoluant depuis plus de dix ans. Le suivi se fait alors par un examen coloscopique.
- Les personnes à risques élevés présentant une polypose adénomateuse familiale ou un syndrome de Lynch. Le suivi se basera alors sur une consultation oncogénétique avec une réalisation de chromocoloscopie.

Etant donné les multiples emplacements de développement du cancer, les symptômes et signes d'un cancer colorectal sont multiples. Néanmoins, une série de signes classiques est retrouvée :

- des symptômes digestifs (une constipation, une perte d'appétit…)
- des rectorragies
- des anémies ferriprives
- la présence d'une masse à la palpation
- un syndrome rectal (coliques)

Plusieurs causes possibles sont à l'origine de l'apparition de polypes qu'elles soient génétiques, épigénétiques ou environnementales. Il est intéressant de savoir que statistiquement, environ 10% des polypes atteindront la taille de 1 cm et 25% d'entre eux évolueront en cancer d'ici 10 à 20 ans. Du côté du diagnostic, une campagne de dépistage a été lancée en 2006 par la mise à disposition du test Hemoccult qui aura pour but la recherche de sang dans les selles [4], suite aux lésions éventuelles des polypes présents.

Hemoccult ou Faecal Occult Blood Test (FOBT) est un outil diagnostic utilisé à l'échelle mondiale pour le dépistage du cancer de l'intestin [5, 6]. Ce test peut déceler la présence de sang dans les selles, ce qui peut correspondre à la présence d'une lésion au niveau du côlon. En pratique, il suffit d'étaler un peu de selles sur l'outil diagnostic et d'envoyer le test dans un laboratoire. Le test est basé sur la détection d'activité péroxydase dans le sang. Le péroxyde d'hydrogène va réagir avec l'hémoglobine (si présence dans les selles) ce qui aura pour conséquence une oxydation donnant une couleur bleue.

En cas de test positif (présence de sang), un cancer du côlon est suspecté. Un examen clinique est alors réalisé (évaluation de l'état général, examen de l'abdomen…). La confirmation du diagnostic se fait par la pratique d'une coloscopie totale avec biopsie. Les marqueurs tumoraux sont ensuite dosés, notamment l'Antigène Carcino-Embryonnaire (ACE) ceci dans un intérêt pronostique. S'il est négatif, le test sera à refaire dans les deux ans.

Cependant, la fiabilité de ce test est remise en cause depuis les années 2000 par l'Académie de Médecine et de Pharmacie. En effet, la présence de sang ne signifie pas forcément la présence d'un cancer. D'autre part, il est possible que certains polypes ou cancers ne saignent pas au moment des prélèvements. L'alternative serait aujourd'hui un test immunologique qui serait plus précis quant à la quantification d'hémoglobine présente. Le Faecal Immunology Test ou FIT a été développé dans les années 1970 [7]. Le principe de ce test réside dans l'utilisation d'un anticorps marqué pouvant se lier à l'hémoglobine humaine. Il est en passe de remplacer l'Hemoccult [8].

III- ETIOLOGIE DES CANCERS COLORECTAUX

L´oncogenèse colorectale est une séquence complexe d´évènements qui conduit à la transformation de la cellule épithéliale colique normale en cellule tumorale maligne dont la prolifération induit la croissance tumorale continue et l´apparition de métastases. Nous pouvons distinguer différents types de cancers colorectaux. Dans 20% des cas, les origines du cancer du côlon sont héréditaires. Elles se divisent entre un contexte familial dans 15% des cas et une prédisposition génétique dans les 5% restants (Polyposes adénomateuses familiale, HNPCC) [9]. Dans 80% des cas, ceux-ci sont qualifiés de sporadiques (mutation somatique provenant d'une altération de l'ADN).

1) CANCERS DU COLON HEREDITAIRES

Anciennement appelé Syndrome de Lynch (LS), le cancer colorectal héréditaire sans polypose HNPCC (Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer) représente 4 à 6% des CRC [10] et a été détecté pour la première fois en 1861 par Lynch et al. Les patients atteints de LS ont des changements moléculaires caractéristiques qualifiés initialement de phénotype d'erreur de réplications [11]. Ces changements caractéristiques sont maintenant appelés instabilité des microsatellites (MSI) et sont causés par une mauvaise réparation des mésappariements de l'ADN (MMR, MisMatchRepair) [12]. Ce syndrome survient à la suite de mutations autosomiques dominantes de gènes (*MSH2*, *MSH6*, *PMS2*, *MLH1* et possiblement *MLH3*) qui codent pour des protéines impliquées dans le système MMR. Les mutations sont détectables par simple prise de sang. Lors d'une suspicion de Syndrome de Lynch, une analyse génétique moléculaire va ainsi évaluer l'instabilité de microsatellites. Une fois cela établi, nous chercherons à déterminer le gène muté et il sera alors possible de rechercher cette même mutation chez les personnes apparentées.

La polypose adénomateuse familiale (FAP) est une maladie autosomique dominante caractérisée par la présence de centaines/milliers de polypes au sein du côlon ou du rectum (Figure 4).

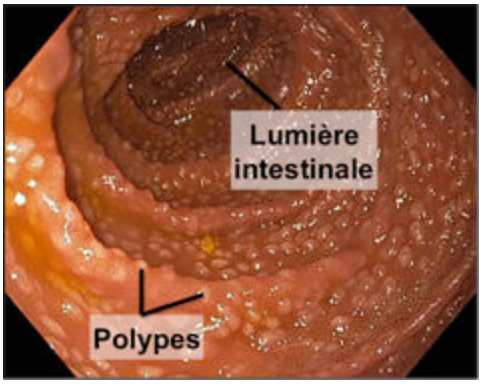


Figure 4: Formation de polypes dans le système digestif (Altafi, 2014)

Elle reste une pathologie qualifiée de rare (1 à 2 % des CRC). Ces polypes évolueront au fur et à mesure de leur croissance en un cancer colorectal s'ils ne sont pas traités. Une intervention chirurgicale sera donc nécessaire dès l'apparition des premiers polypes. Cette maladie, héréditaire, survient à la suite de mutations

autosomiques dominantes dues particulièrement à la mutation du gène *APC* (Adenomatous Polyposis Coli) [13], un gène suppresseur de tumeurs. Tout comme son homologue le syndrome de Lynch, les mutations peuvent être diagnostiquées par simple prise de sang suivie d'analyse génétique moléculaire.

2) CANCERS DU COLON SPORADIQUES

CANCER MSI (MICRO SATELLITE INSTABILITY)

Dans seulement 16% des cas, le processus de cancérisation aura pour origine une mutation des protéines impliquées dans les mécanismes de réparations. Il existe deux raisons majeures à ces mutations :

- Une hyperméthylation et un silençage du gène *MLH1* (75% des cas),
- Une mutation de la polymérase ε (POLE) [14].

C'est ce que l'on appelle une instabilité micro satellitaire. Ces tumeurs sont généralement de meilleurs pronostiques que les tumeurs non MSI (appelé MSS : micro satellite stability) de part la faible probabilité d'apparition de métastases (Figure 5) [15].

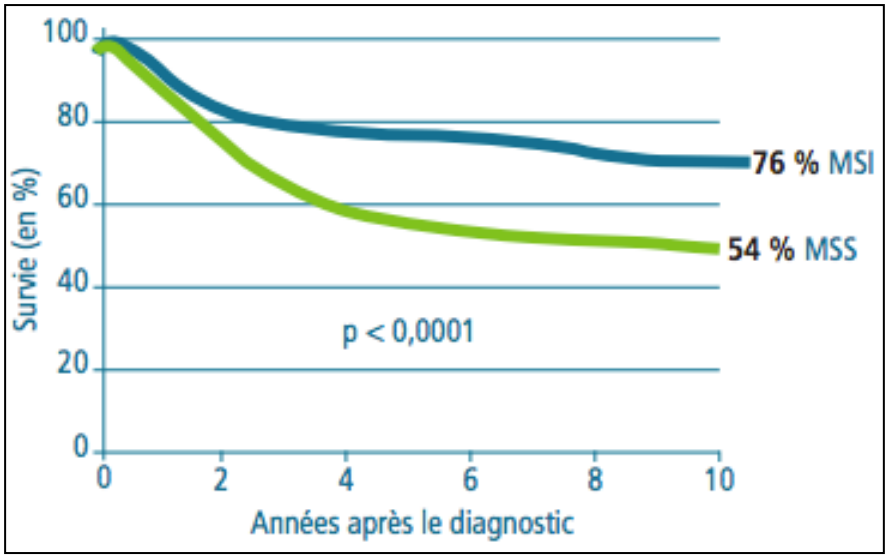


Figure 5: Survie globale sur 10 ans de la population pour un même traitement pour un cancer avec les statuts MSS ou MSI de la tumeur

Le caryotype des cellules de cancer MSI est dit normal, on parle alors de diploïdie. La responsabilité de cette instabilité micro satellitaire vient du système de réparation MMR : MisMatchRepair.

En temps normal, durant la synthèse de l'ADN, si certaines erreurs minimes telles qu'un mésappariement, une addition ou une substitution de bases se produisent, les enzymes du système MMR vont reconnaître le brin incorrect d'ADN pour tenter de réparer cette erreur. Dans le cas où ce système de réparation est défectueux, une accumulation d'erreurs se produit créant des fragments de microsatellite (séquences répétées d'ADN). Dans les cancers colorectaux MSI, on observe une perte d'expression des protéines MSH2 et MLH1 par méthylation [16], des protéines impliquées dans le MMR comme la protéine POLE.

TUMEURS CIN (INSTABILITE CHROMOSOMIQUE)

L'apparition du cancer du côlon peut se diviser en deux catégories majeures en se basant sur le mécanisme prédominant d'instabilité génétique. Dans 85% des cas, nous observons une instabilité numérique et structurelle menant à la perte d'hétérozygotie. Cela résulte d'agressions physiques ou chimiques sur les cellules de côlon, empêchant alors celles-ci de se diviser et d'accumuler des erreurs réplicatives. Le contenu en ADN sera alors plus élevé (hyperploïdie) et va engendrer des pertes alléliques. Cela conduira à l'inactivation d'un ou plusieurs gènes suppresseurs de tumeurs tels que *APC*, *KRAS/BRAF*, *DCC*, *SMAD2* et *SMAD4* [17] (Figure 6).

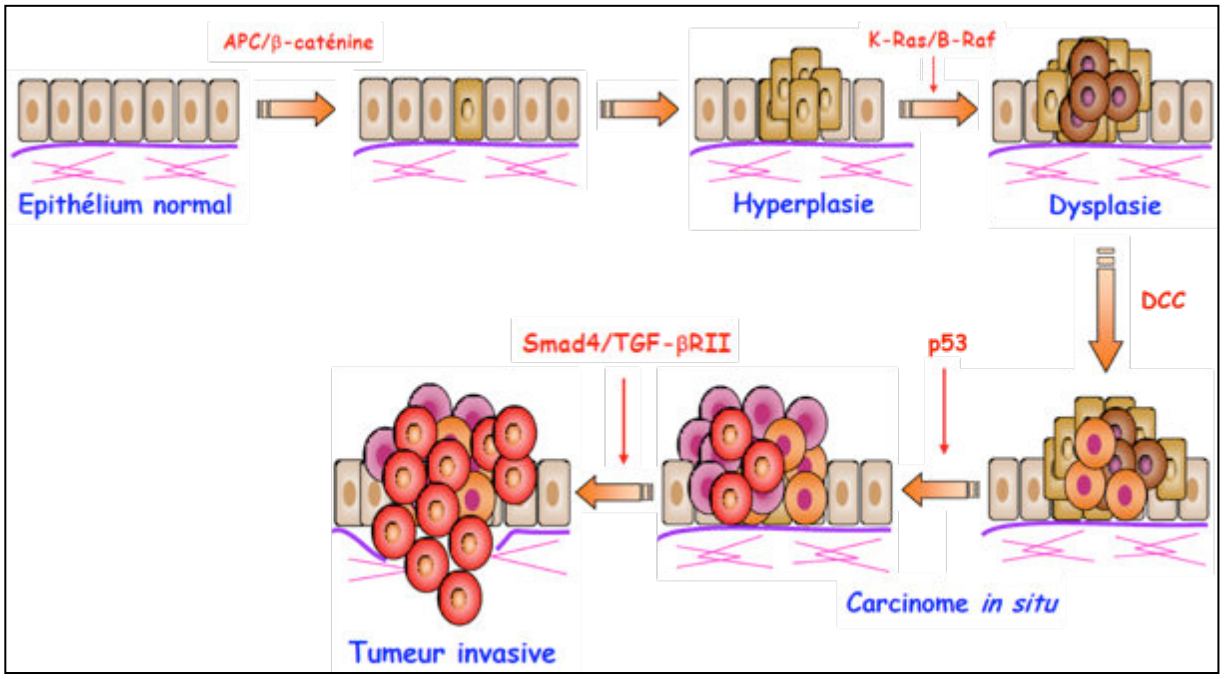


Figure 6: Mutation initiatrice de la cancérogénèse

Nous avons au départ un épithélium normal qui peut évoluer en une tumeur invasive à travers différentes étapes. La première est l'évolution d'un épithélium sain vers une hyperplasie tissulaire (augmentation de la prolifération cellulaire dans un tissu/organe sain) par la mutation du gène *APC*.

Adenomatous Polyposis Coli ou gène *APC* est définit comme un gène suppresseur de tumeurs jouant un rôle central dans la voie de signalisation Wnt, en régulant la dégradation de la ß-caténine par ubiquitination. Quand le gène *APC* est muté, la protéine ß-caténine ne sera pas dégradée et agira sur l'expression de plusieurs gènes dont *c-MYC*. L'expression de ce gène conduira à l'expression de la Polyamine Ornithine Decarboxylase (ODC), qui se trouve être un proto-oncogène, c'est à dire un régulateur positif de la prolifération cellulaire. Les deux allèles du gène *APC* doivent être mutés pour conduire à l'oncogenèse [18]. La mutation d'*APC* seule ne résulte pas en l'apparition d'un phénomène cancéreux. Il est aussi à noter que la protéine APC possède de multiples domaines de liaison avec une grande variété de protéines intracellulaires jouant un rôle important dans l'adhésion cellulaire, la transduction de signal et l'activation transcriptionnelle [14].

L'hyperplasie tendra alors vers une hyperplasie épithéliale (prolifération anarchique de cellules anormales) par la mutation *K-RAS/BRAF*.

K-ras ou Kirsten rat sarcoma viral oncogene homology est une protéine charnière dans l'oncologie, détectée dans environ 40% des cancers du côlon [19]. Elle fait partie de la famille des protéines Ras des protéines G impliquées dans la signalisation intracellulaire [20]. Les protéines Ras régulent la réponse cellulaire face à un grand nombre de *stimuli* extracellulaires comme des facteurs de croissance. Quand un ligand se fixe à un récepteur tyrosine kinase, un signal est transduit *via* l'activité GTPase pour activer différentes voies de signalisation dont la plus décrite est la voie Raf-MEK-ERK [21]. En cas de mutation active de KRAS, ces voies de signalisation sont constamment activées, participant ainsi à l'oncogenèse[22].

Braf v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1 est un gène codant pour une protéine impliquée dans la régulation des MAP kinases qui affecte la division et la différenciation cellulaire, ainsi que la sécrétion de facteur de croissance. BRAF est un effecteur de la protéine KRAS. 90% des mutations se font par substitution du glutamate par la valine en position 600 de la protéine : la mutation V600E. Cela cause une activation continue de cette protéine qui pourra alors mener

au développement cancéreux. Le gène *BRAF* représente une des différences majeures entre les tumeurs CIN et MSI. Les mutations de ce gène sont de plus mauvais pronostic dans les tumeurs CIN que MSI.

La dysplasie peut alors évoluer en carcinome, donc en cancer, par la mutation des gènes *DCC* et *TP53*.

Deleted in Colorectal Cancer ou *DCC* est un gène codant pour un récepteur à la nétrine-1 associé à l'origine au contrôle de la croissance neurale. En absence de ligand, cette protéine envoie des signaux apoptotiques et agit ainsi en tant que suppresseur de tumeur. Elle est fréquemment mutée ou sous régulée dans le cancer colorectal [23]. La mutation de ce gène est un événement tardif dans la progression tumorale.

P53 est une protéine codée par un gène *TP53* suppresseur de tumeurs. Cette protéine est considérée comme la « gardienne du génome » [24] et joue un rôle dans la réponse cellulaire face aux dommages de l'ADN et autres aberrations génomiques. L'activation de P53 peut soit mener à l'arrêt du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN ou à l'apoptose [25]. La mutation de *TP53* est la plus couramment observée dans les cancers humains [26] et code une protéine P53 mutée qui ne sera plus capable d'interagir avec l'ADN et d'exercer son activité antiproliférative et apoptotique.

Enfin, des mutations tardives sur *Smad4* vont permettre aux cellules cancéreuses d'acquérir des propriétés invasives et de se répandre dans d'autres tissus/organes.

Smad4 est un médiateur et co-activateur de la signalisation TGFß (Transforming Growth Factor ß). Les membres de la famille du TGFß sont des facteurs de croissance impliqués dans de nombreux processus biologiques comme la synthèse de la matrice extracellulaire, la réponse immunitaire ou l'angiogenèse. Au début de la progression tumorale, le TGFß est un inhibiteur de la prolifération de cellules épithéliales et *Smad4* agit sur la transduction du signal de ses récepteurs. Quand le ligand se fixe à son récepteur, il se produira un complexe protéique qui sera transloqué au noyau et contribuera à la transcription de gène impliqué dans le cycle cellulaire. L'activation du TGFß est associée à l'inhibition de cyclines (et l'augmentation d'inhibiteurs de cyclines) [27]. Une mutation de *Smad4* conduit à un phénotype tumoral plus agressif et à l'apparition de métastases.

IV- BIOLOGIE DU CANCER

Le processus cancéreux peut se définir comme un déséquilibre entre la croissance, la différenciation et la mort cellulaire. Différentes mutations génétiques discutées dans la partie précédente conduisent à une division cellulaire incontrôlée. Le cycle cellulaire est régulé par la balance entre les oncogènes qui activent la prolifération cellulaire (ex : *RAS* ou *BRAF*) et les gènes suppresseurs de tumeurs qui vont, quant à eux, inactiver cette prolifération (ex : *P53*). La fréquence de mutations, suivie de divisions de ces cellules aux gènes mutés va donner lieu à l'apparition de cellules cancéreuses (Figure 7).

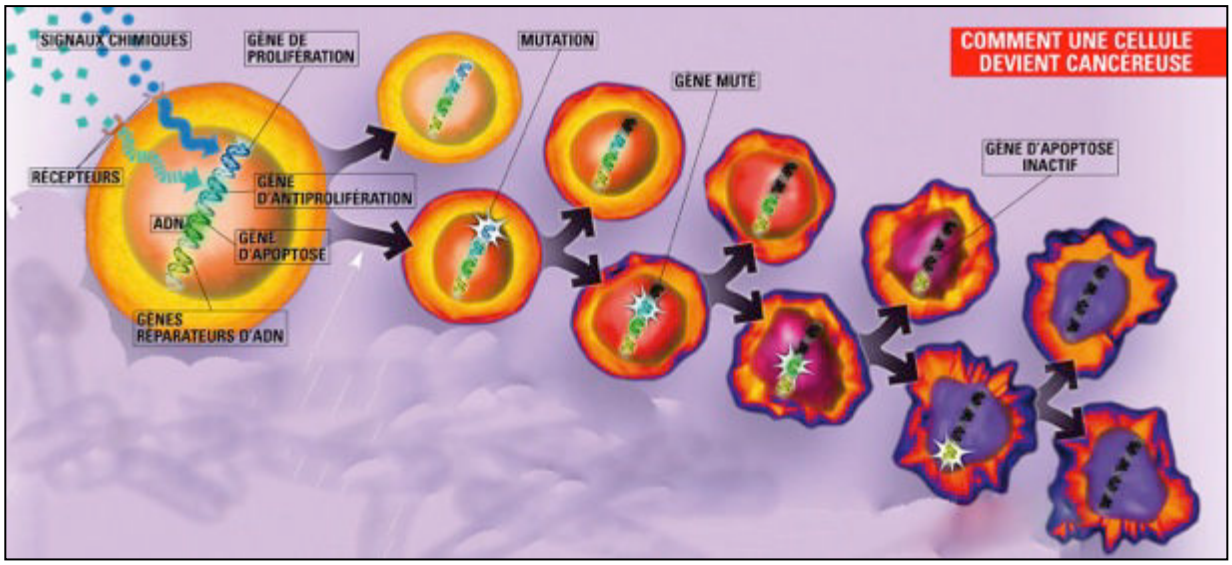


Figure 7: Schéma récapitulatif de la transformation d'une cellule saine en cellule cancéreuse (Cirade, CNRS)

Au cours de la prolifération tumorale, les cellules cancéreuses peuvent obtenir la capacité de franchir la lame basale et ainsi d'envahir les tissus situés à proximité pouvant mener à la formation de métastases. Ce processus dépend lui aussi de l'apparition d'événements génétiques. La cellule pourra acquérir des propriétés migratoires passant d'un phénotype cellulaire épithélial (interaction avec la lame basale membranaire) à un phénotype mésenchymateux (capacité migratoire et invasive accrues, forte résistance à l'apoptose), ce que l'on appelle communément la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT). L'EMT est un processus biologique qui induit une polarisation de cellules épithéliales pour *in fine* les rendre mésenchymateuses [28]. Les processus d'EMT peuvent être incomplets et sont réversibles dans de nombreux contextes biologiques, conduisant à l'existence de

nombreux phénotypes mésenchymateux intermédiaires. Concernant la perte des caractéristiques épithéliales, une réorganisation des jonctions adhérentes et des jonctions serrées a été observée au cours de l'EMT contribuant à la perte de cohésion intercellulaire et facilitant ainsi la motilité cellulaire. Il existe trois types majeurs d'EMT : l'EMT au cours de l'embryogenèse, l'EMT associée à la fibrose et la régénération tissulaire et l'EMT dans le cancer et la formation de métastases. Nous nous intéresserons plus particulièrement à cette dernière.

Bien que les bases moléculaires de l'EMT ne soient pas encore totalement clarifiées, plusieurs voies de signalisation interconnectées ainsi qu'un bon nombre de molécules de signalisation potentielles intervenant dans la migration et l'invasion des cellules épithéliales, ont été identifiées comme initiateurs de cette transition dans les cellules tumorales. Parmi eux, citons des facteurs de croissance qui agissent entre autres à travers les récepteurs tyrosine kinases, tels que TGFβ, EGFR, FGFR, HGFR et PDGFR, ainsi que les composants des voies de signalisation Wnt/β-caténine, Hedgehog et Notch. Ces voies de signalisation convergent vers une série de facteurs de transcription spécifiques qui contribuent à la régulation de gènes cibles de l'EMT impliqués dans les modifications phénotypiques et fonctionnelles associées au processus d'EMT [29]. Ces facteurs de transcription appartiennent pour la plupart aux familles Snail, ZEB et bHLH [30-34]. Un certain nombre d'acteurs et de marqueurs moléculaires (Figure 8) a été identifié (bien qu'une tumeur donnée ne présente pas nécessairement tous ces marqueurs).

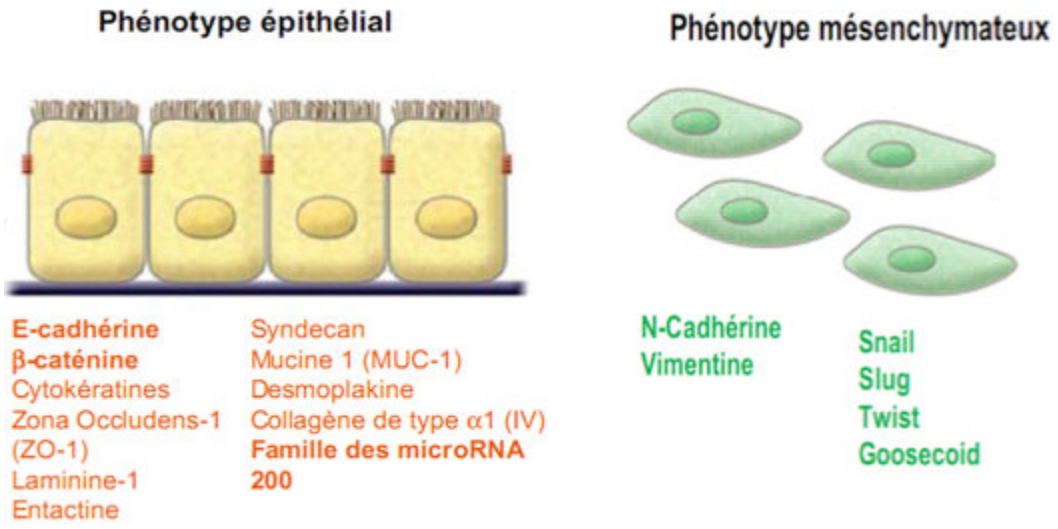


Figure 8: Transition épithélio-mésenchymateuse (Kalluri, 2009)

Le processus d'EMT semble donc être le mécanisme responsable de l'acquisition de phénotypes malins par les cellules tumorales épithéliales. L'EMT liée aux cancers se présente dans le contexte de la croissance tumorale et de la progression cancéreuse [28, 35], quand les cellules tumorales épithéliales se transforment en un phénotype plus mésenchymateux. Cela génère des cellules avec des propriétés invasives leur permettant de migrer vers la circulation sanguine et de se disséminer par voie systémique vers d'autres organes et ainsi de former des métastases [36]. De récents résultats montrent que le développement de l'EMT dans le cancer colorectal mène à un phénotype agressif et promeut la dissémination métastatique, cela augmentant les résistance au traitement thérapeutique néo adjuvante [37]. L'EMT a été identifié comme la signature transcriptionnelle majeure dans le cancer colorectal [38].

La colonisation métastatique nécessite une étape ultime de transition mésenchymato-épithéliale (ou MET), processus inverse à l'EMT, qui permet aux cellules tumorales mésenchymateuses d'envahir un site secondaire à distance de la tumeur primaire [39]. A l'inverse de l'EMT, la MET se caractérise principalement par la réexpression de l'E-cadhérine. Néanmoins de nombreux systèmes de signalisation participent à l'induction de la MET comme la voie Wnt, FGFR ou EGFR ainsi que les intéractions entre les cellules tumorales et leur microenvironnement.

Il a été montré un lien entre inflammation et cancer [40]. L'activation des oncogènes va induire une production de différentes cytokines et chimiokines qui ont des propriétés pro-inflammatoires pouvant mener à l'angiogenèse. Des leucocytes aux caractéristiques immunosuppressives seront alors recrutés. Ce phénomène donne lieu à une augmentation des possibilités thérapeutiques dans le traitement du cancer [41].

V- CLASSIFICATION DE LA PROGRESSION TUMORALE

Dans un but pronostic et pour traiter au mieux chaque stade de cancers, plusieurs systèmes de classification ont été mis au point.

1) CLASSIFICATION DE DUKES

En 1930, Le pathologiste britannique Cuthbert Dukes met au point un système de classification spécifique au cancer colorectal basé sur des données cliniques se traduisant par l'utilisation de 4 lettres : A, B, C, D [42].

- Stade A : Tumeur limitée à la muqueuse
- Stade B1 : Extension à la musculeuse sans la traverser
- Stade B2 : Extension à la musculeuse en traversant la sous séreuse ou la séreuse
- Stade C1 : B1 accompagné d'un envahissement ganglionnaire
- Stade C2 : B2 accompagné d'un envahissement ganglionnaire
- Stade D : Présence de métastases

Cependant, ce système est maintenant abandonné au profit d'une autre classification : TNM, jugée plus précise.

2) CLASSIFICATION TNM

Le système de classification TNM est un système de classification international qui permet de rendre compte du stade d'un cancer. Proposé dans les années 1950 par le Dr Pierre Denoix, plusieurs versions ont été mises à l'épreuve depuis [43]. Trois lettres sont utilisées : **T** pour Tumeur primitive, **N** pour lymph Node (ganglions lymphatiques en anglais) et **M** pour métastase. On attribue un nombre à chacune de ses lettres qui permettent de donner une indication sur l'avancée dans chaque catégorie (Figure 9).

TNM	Stade	Localisation
T	is	in situ
	1	Inflitration de la sous-muqueuse
	2	Inflitration de la musculeuse
	3	Inflitration de la séreuse (mésorectum)
	4	Atteinte des organes avoisinnants
N	0	Pas d'envahissement ganglionnaire
	1	Envahissement ganglionnaire: 1 à 3
	2	Envahissement ganglionnaore >3
M	0	Pas de métastase
	1	Métastase

Figure 9: Système de classification TNM

Un total de quatre stades sont à identifier dans cette classification en fonction des lésions cancéreuses (Figure 10) : la tumeur envahit la sous muqueuse (I), la tumeur envahit la musculeuse (II), les ganglions sont atteints (III), la tumeur s'étend au tissu voisin et peut induire des métastases (IV).

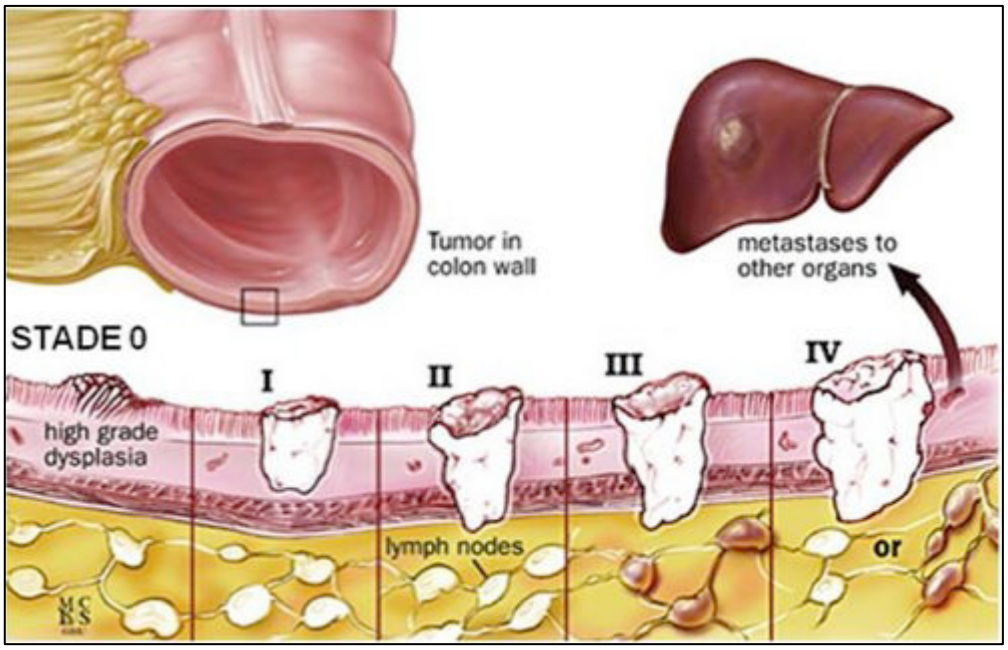


Figure 10: Classification des lésions cancéreuse (John Hopkins colon cancer center)

Il est possible de préciser par quel moyen la technique de classification a été réalisée en ajoutant une lettre :

- c : par examen clinique
- p : par examen anatomo-pathologique
- y : par ré-évaluation d'un traitement néo-adjuvant

CHAPITRE 2 TRAITEMENTS

I- LA CHIRURGIE

1) CANCER DU COLON NON METASTATIQUE

La chirurgie du cancer colorectal reste le plus efficace des traitements. Dès qu'un polype est considéré comme résécable lors d'un examen, soit il sera directement excisé lors de cet examen (ex :coloscopie), soit le patient sera dirigé vers le bloc opératoire afin de subir un acte chirurgical. Le polype sera alors excisé à l'aide d'une anse diathermique. Lors d'un recours à la chirurgie, il sera possible d'effectuer une à plusieurs coloctomie :

- coloctomie droite
- coloctomie gauche
- coloctomie subtotale
- sigmoïdectomie
- résection antérieur

2) CANCER DU COLON METASTATIQUE

Le processus métastatique débute par la pénétration endovasculaire des cellules métastatiques qui ont migré au travers du stroma tumoral pour rejoindre les circulations lymphatiques et sanguines (les premières métastases se développeront dans les ganglions lymphatiques). Ces cellules parviennent ensuite à déjouer les défenses immunitaires pour atteindre l´organe hôte. L'organe le plus souvent touché est le foie (suivi du poumon) de part son action de filtration de la circulation digestive *via* la veine porte. Cependant une étude de 2010 montrent que les métastases se développent préférentiellement dans le foie de part la prolifération de cellules myéloïde immunosuppressive [44]. L´adhésion aux parois des sinusoïdes hépatiques est ensuite suivie d'une multiplication cellulaire avec une croissance tumorale locale *de novo*. La croissance de cette greffe métastatique nécessite un échappement continu au système de défense immunitaire de l'hôte et l´établissement d´un apport sanguin suffisant pour entretenir le *« front »* invasif de la métastase. Le processus métastatique, ici sommairement résumé, apparait donc extrêmement complexe. Durant celui-ci, différentes altérations phénotypiques, transcriptionnelles et génétiques surviennent de façon temporaire ou permanente [45].

Au moment du diagnostic de métastases hépatiques, seul 10-20% des patients présentent des lésions résécables et la résection chirurgicale est aujourd'hui souvent associée à une chimiothérapie encadrant l'acte chirurgical.

Pour la majorité des patients présentant des métastases, le traitement est basé sur la seule chimiothérapie ou sur une chimiothérapie permettant une réduction significative de la tumeur permettant une excision chirurgicale. Ainsi, pour le CRC, la réponse à la chimiothérapie et radiothérapie (utilisée uniquement pour le cancer rectal) constitue un élément pronostic majeur chez les patients métastatiques.

3) SURVEILLANCE POST OPERATOIRE

Une surveillance post-opératoire est ensuite mise en place après une chirurgie dont le but premier est d'augmenter la survie et la qualité de vie. Il est souhaitable de diagnostiquer une récidive le plus précocement possible afin de procéder, si nécessaire, à une deuxième résection. Il est donc proposer de :

- Faire un examen clinique et doser l'ACE (Antigène Carcino Embryonnaire) tous les 3 mois pendant 2 ans puis tous les 6 mois pendant 3 ans.
- Faire une échographie hépatique afin de déceler toutes apparitions de métastases tous les 3 à 6 mois pendant au moins 2 ans puis une fois par an les années suivantes.
- Une radiographie pulmonaire pour les mêmes raisons ainsi qu'une coloscopie dans l'année suivant l'intervention puis tous les trois ans.

Dans le cas d'un CRC avec apparition de métastases, l'efficacité du traitement chimiothérapeutique est évaluée tous les trois mois par un examen clinique et le dosage de l'ACE accompagné d'une radiographie du thorax tous les 6 mois avec une échographie abdominale.

II- LA RADIOTHERAPIE

Développée au XXème siècle, la radiothérapie consiste en un traitement local-régional des cancers. Le principe consiste en un rayonnement par rayons X résultant d'une accélération linéaire d'électrons. Ces rayons vont détruire, sur une région restreinte, les cellules cancéreuses par blocage de l'activité nucléaire. Cela indique que, même avec un traitement radiothérapeutique, il y a une forte probabilité du développement d'une tumeur secondaire. Pour cela, la radiothérapie n'est pas un

traitement des plus indiqués dans le CRC. Elle peut toutefois être utilisée dans le traitement de métastases isolées.

III- LA CHIMIOTHERAPIE

La chimiothérapie correspond à un traitement médicamenteux agissant de manière non spécifique sur les mécanismes de la division cellulaire, la survie cellulaire, l'angiogenèse et l'invasion. Il existe de nombreux types de chimiothérapies avec différents modes d'administration. C'est un traitement qualifié de général. Elle peut avoir lieu avant la chirurgie ce qui aura pour effet de réduire la masse tumorale, ce que l'on appellera thérapie néo-adjuvante. Administrée après intervention chirurgicale, une thérapie dite adjuvante sera administrée pour les cancers les plus avancés (présence de métastases). Durant les 10 dernières années, les avancés scientifiques ont permis d'établir de nouvelles combinaisons thérapeutiques avec de nouveaux composés.

1) CHIMIOTHERAPIE CONVENTIONNELLES

5-FluoroUracile (5-FU, Teva-Pharma)

Les fluoropyrimidines ont été développés dans les années 1950 où il a été émis l'hypothèse que les métabolites de l'uracile pouvaient être une cible potentielle pour la chimiothérapie [46].

Figure 11: structure chimique de l'uracile

Considéré comme le traitement de référence dans le CRC [47], ce composé fait partie de la famille des anti-métabolites et plus particulièrement à une sous classe des analogues de la pyrimidine (Figure 11). Connu depuis presque un demi siècle, c'est l'un des plus anciens médicaments anti-cancéreux. Il reste encore un composé très utilisé dans le traitement des tumeurs solides. La structure chimique du 5-FU est très semblable à celle de l'uracile, qui entre dans la composition de l'ARN. Comme

on peut le voir sur la Figure 12, un atome de fluor a été ajouté en position 5 à la place d'un atome d'hydrogène sur le noyau pyrimidique.

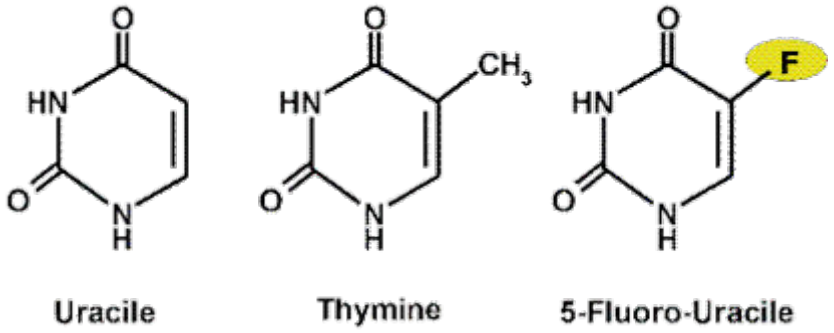


Figure 12: Différence chimique entre les 3 molécules

Les composés fluoropyrimidiques occupent une place prépondérante dans les traitements chimiothérapeutiques depuis le début des années 2000 avec la mise à disposition de nouvelles formes pharmaceutiques orales comme la capecitabine [48]. Cette nouvelle forme a d'ailleurs prouvé une efficacité supérieure face au 5-FU dans certains cas même si le bénéfice en termes de survie globale ou sans progression n'a pas été significatif.

Le 5-FU a une action sur la division cellulaire et sur la synthèse d'ARN. Il va inhiber le rôle de la thymidine synthétase [49], une enzyme clé de la formation de la thymidine (synthèse d'ADN) et/ou s'intégrer au sein même de l'ARN en se substituant à l'uracile. Le 5-FU est un pré médicament ou pro-drogue qui va être métabolisé en divers sous-composés par une cascade enzymatique. Dans la cellule, 80% du 5-FU est détoxifié. Les 20% restants sont transformés en trois métabolites actifs. Le FUTP s'incorpore aux ARNs et inhibe leur métabolisme, le FdUMP se lie à la thymidylate synthétase (enzyme nécessaire à la formation de l'ADN) et le FdUTP s'incorpore dans l'ADN pour inhiber son élongation [50] (Figure 13).

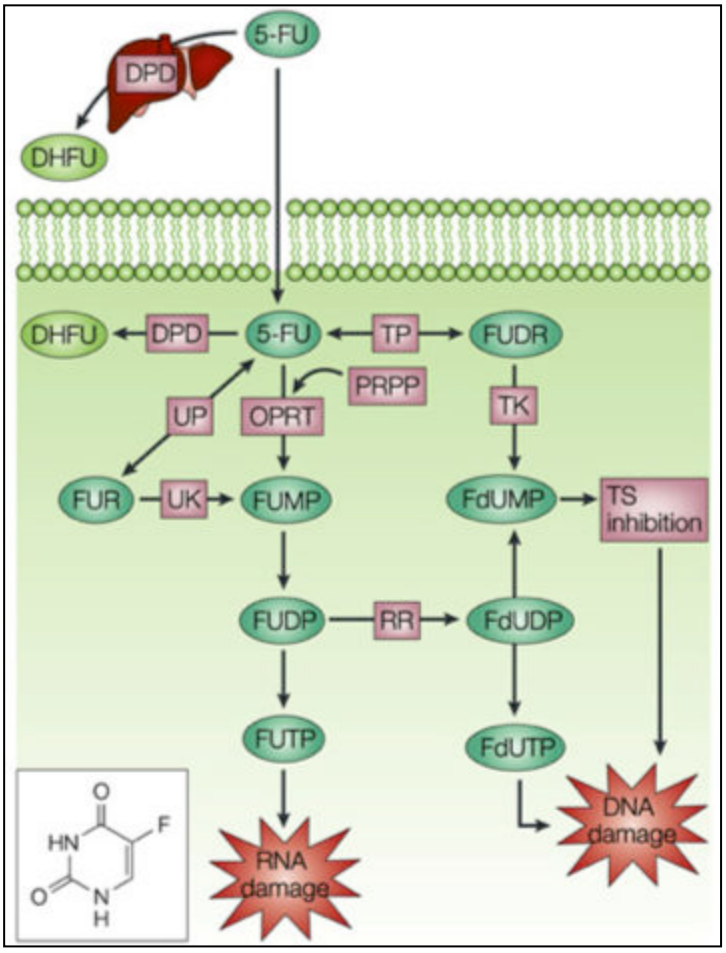


Figure 13: mécanisme d'action du 5-FU (Longley, 2003)

La posologie habituelle de 5-FU est de l'ordre de 3 à 4 g administrés en intraveineuse sur une durée totale de 45 heures. Comme toutes chimiothérapies, le 5-FU comporte une certaine toxicité:

- Troubles cutanées (syndrome main-pied)
- Toxicité cardiaque (insuffisance ou infarctus aigu du myocarde)
- Déficit en DihydroPyrimidine Déshydrogénase qui conduit à un surdosage (DPD, enzyme métabolisant le 5-FU)

Les premiers essais sur le 5-FU en clinique ont montré une grand efficacité quand celui-ci est combiné à l'acide folinique [51]. Depuis, les protocoles ont été améliorés en modulant les doses ou les voies d'administration [52]. Ce composé est même maintenant combiné à d'autres agents chimiothérapeutiques comme l'irinotécan ou l'Oxaliplatine [53]. Ces protocoles sont généralement administrés toutes les deux semaines par cycle de 12 semaines.

Oxaliplatine (Eloxtlin, Sanofi-Aventis)

L'oxaliplatine (Figure 14) est un composé dérivé du platine possédant une action alkylante [54]. Une fois absorbé, l'oxaliplatine est rapidement transformé par voie non enzymatique en un composé actif qui sera alors à même d'interagir avec l'ADN, de se fixer aux protéines permettant la transcription et d'interférer avec la synthèse d'ARN [55-57]. L'alkylation créée va engendrer un pont intra-brin entre deux guanines. La réplication de l'ADN sera alors impossible et la cellule ne sera plus à même de se diviser. Les adduits d'oxaliplatine ainsi formés sont létaux pour la cellule s'ils ne sont pas éliminés.

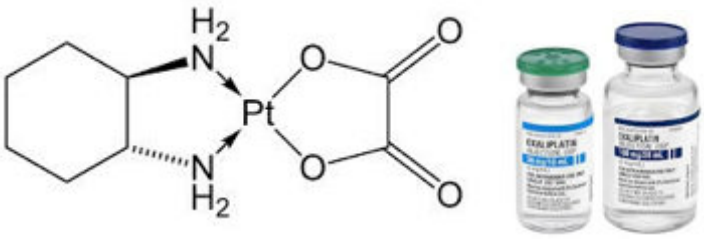


Figure 14: structure chimique de l'oxaliplatine

La dose usuellement utilisée est de 85 mg/m^2 par voie intraveineuse toutes les deux semaines. Quelques effets indésirables sont inhérents au produit tels que les nausées/vomissements ou neuropathies périphériques.

Les études cliniques ont démontré de bons résultats sur les tumeurs résistantes au Cisplatine [58]. L'oxaliplatine est généralement administré en combinaison avec le 5-FU en traitement de première ou deuxième ligne sous le nom de protocole FOLFOX (FOL : Acide folinique ou leucovorine F : Fluorouracile (5-FU) OX : Oxaliplatine). Encore aujourd'hui de nombreux essais cliniques sont fait sur la combinaison de ces molécules dans le cadre d'étude de thérapies adjuvantes [59].

Irinotécan (Campto, Pfizer)

L'irinotécan est un composé anti-tumoral qui est un dérivé semi synthétique de la camptothécine, un alcaloïde pentacyclique isolé de Camptotheca acuminata, un arbre répandu en Chine (Figure 15) [60].

Figure 15: Arbuste *Camptotheca acuminata* à l'origine de la camtothécine

L'irinotécan est constitué d'une structure pentacyclique (Figure 16) nécessaire à l'activité antitumorale. Le cycle possédant la fonction -OH est essentiel pour pénétrer à l'intérieur de la cellule et pour interagir avec la topoisomérase I.

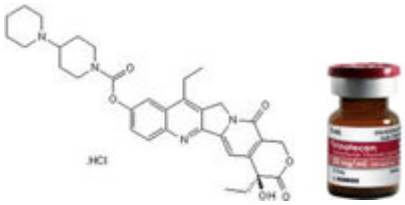


Figure 16: Structure chimique de l'irinotécan

L'irinotécan est en fait une pro drogue métabolisée par la carboxylestérase en SN38 dans le foie. Le métabolite actif (SN38) agit comme inhibiteur spécifique de l'ADN en ciblant la topoisomérase I. Il engendre donc des lésions simples brins avec un blocage de la fourche de réplication. L'irinotécan est administré généralement avec du 5-FU, une combinaison qui améliore significativement l'efficacité du traitement [61] notamment par l'inhibition de l'angiogenèse par l'irinotécan [62] qui inhibe HIF1-alpha (Hypoxia Inducible Factor) et de ses gènes cibles dont le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor). Nous détaillerons le mécanisme HIF-VEGF et son implication dans l'angiogenèse plus loin dans le manuscrit.

L'irinotécan est aussi considéré comme un standard chimiothérapeutique, utilisé seul ou en association avec le 5-fluorouracile et la leucovorin : le protocole FOLFIRI (FOL : Acide folinique ou leucovorin F : Fluorouracile (5-FU) IRI : Irinotécan). Cela permet d'augmenter la survie des patients résistants à la chimiothérapie au 5-FU [63-65].

2) LES THERAPIES CIBLEES

Au delà des chimiothérapies conventionnelles, des avancées dans la recherche fondamentale et appliquée ont permis de préciser les principaux mécanismes sous-jacents du développement tumoral. La stratégie des molécules ciblées vise à bloquer le récepteur ou le ligand *via* des anticorps monoclonaux ou de petites molécules synthétiques inhibitrices de tyrosine kinases (Tableau 4). Les thérapies ciblées ne concernent pas les thérapies adjuvantes (aucun bénéfice) mais sont utilisés chez les patients avec un cancer de stade avancé. Nous détaillerons leur nature et leur mode d'administration dans un chapitre dédié.

Tableau 4: liste non exhaustive de composés utilisés dans les thérapies ciblées

Nom	Nature	Cible
Bevacizumab	Anticorps monoclonal	VEGF-A
Nintedanib	Inhibiteur Tyrosine Kinase	VEGFR/FGFR/PDGFR
Aflibercept	Protéine de fusion	VEGF-A/VEGF-B/PlGF
Cetuximab	Anticorps monoclonal	EGFR
Tarceva	Inhibiteur Tyrosine Kinase	EGFRs
Gilotrif	Inhibiteur Tyrosine Kinase	EGFR/HER-2/HER-3

Il existe plus de 55 molécules en cours de développement clinique pour le traitement du cancer du côlon (source : Medicines in Development for Cancer 2011). Différentes voies/molécules/récepteurs sont ciblés. Parmi elles, Judah Folkman propose en 1971 de cibler l'angiogenèse afin de ralentir voire inhiber la croissance tumorale [66]. Les composés approuvés dans le traitement du CRC sont le bevacizumab, l'aflibercept, le cetuximab, le panitumumab (anticorps anti-EGFR) et un inhibiteur tyrosine kinase, le regorafenib.

CHAPITRE 3 ANGIOGENESE

I- DEFINITION DE L'ANGIOGENESE

L'angiogenèse se définit comme un processus de croissance de micro vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants. Ce mécanisme physiologique a lieu au cours de l'embryogenèse et la cicatrisation mais est aussi primordial dans la croissance tumorale [67]. La prolifération de cellules endothéliales (EC) est un marqueur caractéristique de développement de microvaisseaux. Ceux-ci ont la possibilité de se développer durant une grande période grâce à la migration de cellules endothéliales [68].

On peut diviser le mécanisme de l'angiogenèse en plusieurs étapes (Figure 17 [69]) :

1- La réception d'un stimulus pro-angiogénique
2- La dégradation de la lame basale. Les péricytes se détachent du vaisseau existant, les EC sont activées.
3- Une protrusion des EC se fait à mesure que le vaisseau se dilate.
4- La migration des EC se fait par la présence de tip cells qui vont relâcher des MMPs (Matrix MetalloProtease) à même de dégrader la membrane basale et de remodeler la matrice extra cellulaire. Les tip cells ne sont pas à même de proliférer mais migrent grâce à la présence de filopodes qui les guident vers les facteurs angiogénique (gradient VEGF).
5- La division des EC se fait alors par la présence de stalk cells.
6- La réorganisation des EC sous forme capillaire se fait par la prolifération des stalk cells qui vont relâcher des molécules permettant la liaison à la membrane extracellulaire et vont réguler la formation du nouveau vaisseau.
7- Une reconstruction de la lame basale consolide ainsi la structure. Des péricytes sont alors recrutés afin de stabiliser le vaisseau néoformé.

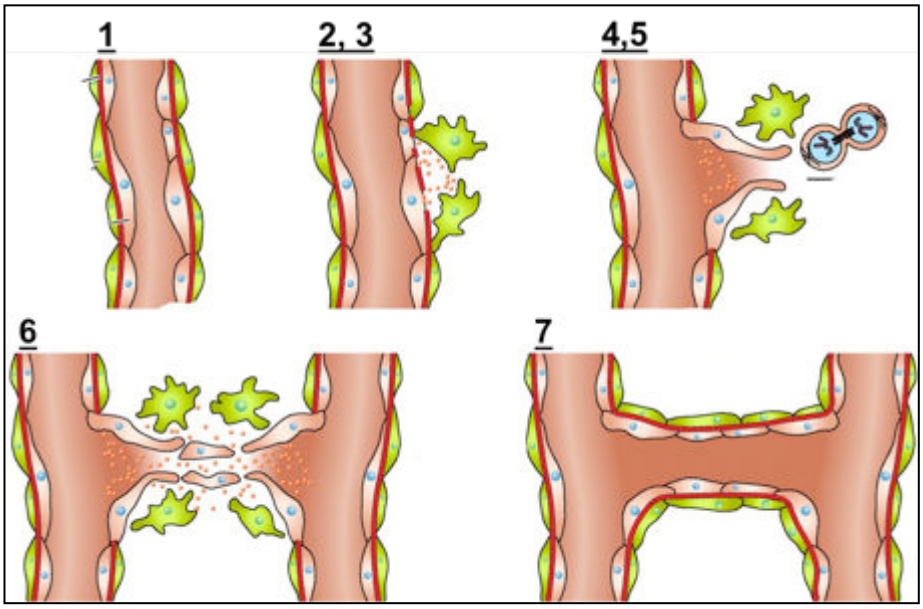


Figure 17: Etapes de l'angiogenèse (d'après Clapp et al, 2009)

II- L'ANGIOGENESE TUMORALE

Les cellules cancéreuses, dans leur développement, ont tout de même un facteur limitant : le besoin en oxygène et en nutriments. Au fur et à mesure des divisions cellulaires, il est possible d'atteindre des masses conséquentes (>1mm^3) pour les tumeurs solides. Cependant, le centre de la tumeur tend à devenir hypoxique et dépourvue de nutriments. Pour cela, la tumeur va induire la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux déjà formés dans l'organisme, un processus appelé angiogenèse tumorale [66, 70] (Figure 19).

Ces vaisseaux néoformés pourront alors permettre au tissu tumoral d'être irrigué mais favorisera par ce biais la dissémination de cellules cancéreuses vers d'autres tissus : les métastases [67].

L'angiogenèse tumorale correspond à la formation de nouveaux vaisseaux ayant pour but de répondre aux besoins métaboliques de la tumeur solide. Elle est caractérisée par une morphologie vasculaire anarchique accompagnée d'une perméabilité vasculaire.

1) MORPHOLOGIE DE LA VASCULARISATION TUMORALE

Les vaisseaux issus de l'angiogenèse tumorale ont une structure différente des vaisseaux sanguins qualifiés de normaux. En effet, dans le cas d'une vascularisation classique, les vaisseaux sanguins sont organisés, réguliers et fonctionnels. Quand des signaux pro-angiogéniques sont sécrétés par une tumeur, c'est pour répondre à un besoin important et rapide en nutriments. Pour cela, l'angiogenèse tumorale provoquera la formation de vaisseaux majoritairement désorganisés, de diamètre très variable, et présentant de nombreuses fuites (Figure 20) [71, 72].

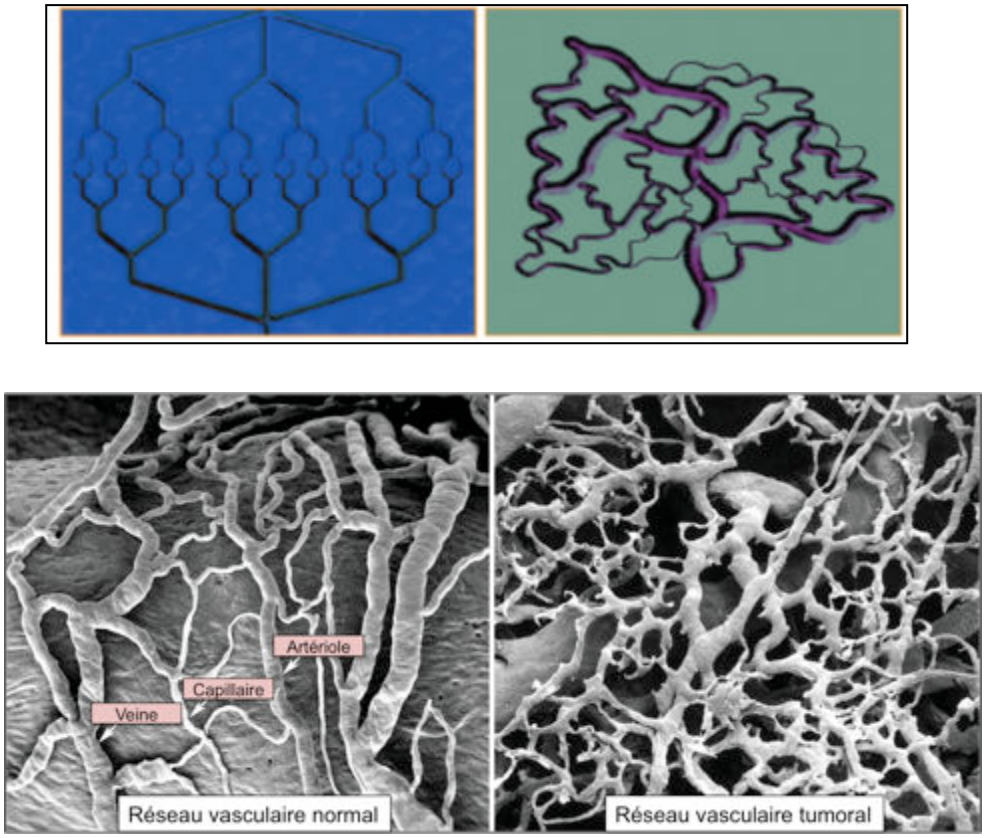


Figure 18: Comparaison schématique de la vascularisation tumorale et d'une vascularisation saine (McDonald, 2003)

Les réseaux vasculaires normaux et tumoraux ont les mêmes composants : cellules endothéliales, péricytes et membrane basale [73, 74]. Pourtant, dans le réseau vasculaire tumoral, les cellules sont désorganisées. Les cellules endothéliales ne forment pas une seule couche mais se présentent de façon anarchique. Des défauts au niveau des jonctions intercellulaires, de la membrane basale vasculaire et de la couverture péricytaire provoque des fuites au sein des vaisseaux tumoraux [75]. Cette anormalité du réseau vasculaire tumoral affecte la

croissance tumorale, favorise la dissémination de métastases et affecte le traitement anti cancéreux. Une thérapie ayant pour but la normalisation de ce phénomène pourrait être une nouvelle stratégie dans le traitement du cancer [76], bien qu'aucun résultats probants ne soient encore observés.

Cependant, il reste à savoir pourquoi et comment les tumeurs déclenchent ce phénomène angiogénique si important dans la progression et l'invasion tumorale.

2) LA NOTION DE SWITCH ANGIOGENIQUE

Judah Folkman montre en 1996 que les tumeurs solides sont angiogenèse dépendantes [77]. Un cancer devient détectable une fois qu'il atteint une taille supérieure à environ 1 mm^3 (Figure 21). Cependant, pour arriver à ce volume, la tumeur doit passer par l'angiogenèse tumorale afin d'augmenter l'apport sanguin, nécessaire à son développement. La capacité qu'a une tumeur de progresser d'un phénotype non angiogénique à un phénomène angiogénique est appelée le « switch » angiogénique [78]. La limite de diffusion de l'oxygène pour une cellule humaine est de 100µm ce qui signifie qu'un vaisseau sanguin doit se trouver dans ce périmètre pour éviter aux cellules d'être en état hypoxique [79]. Les conditions hypoxiques vont induire l'expression de plusieurs protéines pro angiogéniques comme le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) ou le PDGF (Platelet Derived Growth Factor) [80].

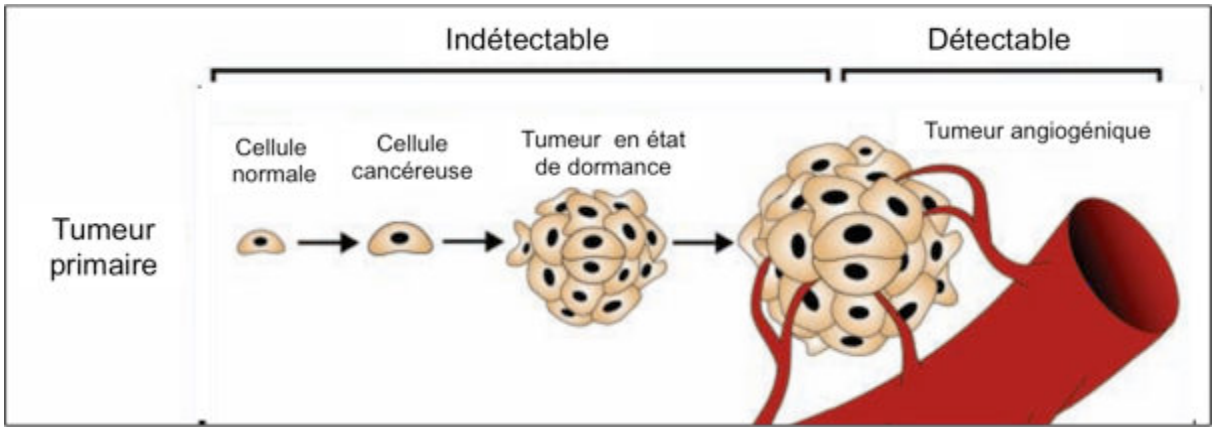


Figure 19: Etape de progression tumorale de la cellule normale à la tumeur angiogénique en passant par l'état de dormance (Naumov, 2006)

Le switch angiogénique peut aussi intervenir lors d'une rechute quelques mois ou années plus tard après le traitement primaire d'un cancer [81, 82]. De plus, lors d'autopsies pratiquées sur des personnes ayant succombées à des traumatismes comme des accidents de voiture, Black et Welch ont montré en 1993 qu'environ 50% de ces personnes présentaient des carcinomes microscopiques mais n'avaient pourtant jamais été diagnostiquées [83]. Une des raisons pour laquelle ces carcinomes ne se sont pas développés seraient qu'ils resteraient en état de dormance, un état qui empêche le « switch » angiogénique [84].

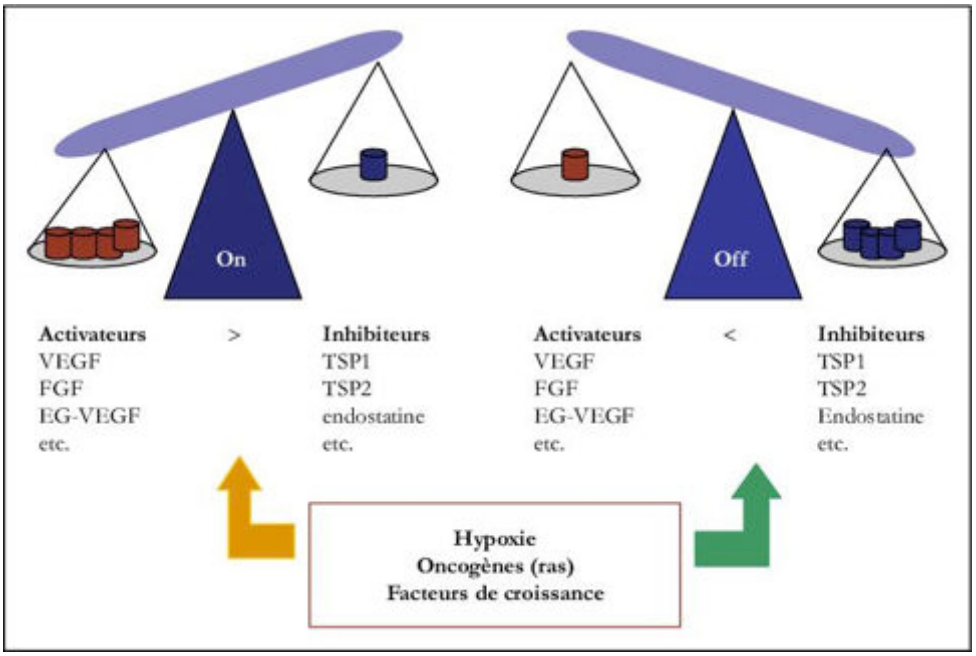


Figure 20: Régulation de l'angiogenèse tumorale (Bikfalvi, 2006)

Le « switch » angiogénique est sous le contrôle de différents facteurs (Figure 22) :

- L'augmentation de l'expression de protéines angiogéniques comme le VEGF et le FGF,
- L'augmentation de l'expression de protéines angiogéniques exprimées par les cellules stromales, les fibroblastes et les adipocytes,
- La diminution d'expression d'inhibiteurs de l'angiogenèse comme la thrombosporine 1/2 (TSP1/2).

Nous allons détailler les facteurs majeurs de l'angiogenèse en commençant par celui le plus documenté, le VEGF-A.

CHAPITRE 4 LA REGULATION DE L'ANGIOGENESE

I- LE VEGF, UN FACTEUR CLE DE LA REGULATION

Le VEGF joue un rôle central dans l'organisation du système vasculaire. Dans l'angiogenèse tumorale, cette molécule va jouer un rôle clé *via* ses récepteurs (VEGFR). Sept protéines font partie de la famille VEGF : VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, PlGF et VEGF-F [85-87].

Le VEGF-A ou plus communément appelé VEGF était initialement connu sous le nom de VPF : Vascular Permeability Factor [88]. C'est une cytokine sécrétée ayant une importance critique dans l'angiogenèse physiologique et tumorale [89]. Des isoformes du VEGF-A (communément appelé VEGF) sont générées après transcription du gène. Les masses moléculaires de ces composés sont différentes ainsi que leur fonction biologiques. Nous pouvons noter quatre isoformes matures : VEGF121, VEGF165, VEGF189 et le VEGF206 [90]. Le nombre caractérisant les isoformes correspond au nombre d'acides aminés de ces protéines. D'autres isoformes existent mais sont moins souvent exprimées dans le cancer colorectal : VEGF145 et VEGF183 [91]. La forme courte du VEGF121 est libérée dans la circulation sanguine alors que la forme lourde reste associé avec la matrice. C'est à l'isoforme VEGF165 (composé des variants VEGF165a et VEGF165b) que nous devons les principaux effets biologiques et qui est présent au niveau de la matrice extracellulaire et dans le système circulatoire. Le VEGF165a a un rôle dans la perméabilité, la vasodilatation et possède des propriétés angiogéniques tandis que le VEGF165b est un variant inhibant le VEGF [92]. C'est l'isoforme la plus abondante et la plus surexprimée dans les tumeurs solides.

Le VEGF est la protéine la plus documentée quant à son implication dans l'angiogenèse, la survie des cellules endothéliales, la croissance, la migration et la perméabilité vasculaire [85]. Il exerce son activité biologique par sa liaison aux récepteurs tyrosine kinase transmembranaires incluant : VEGFR-1/Flt-1, VEGFR-2/Flk-1 et les récepteurs à la neuropillines : NRP-1 et NRP-2.

Découvert il y 15 ans, le VEGF-B est exprimé dans le tissu adipeux et se présente sous deux isoformes. L'isoforme VEGF-B167 peut s'associer à la matrice extracellulaire [93] tandis que l'isoforme VEGF-B186 est diffusible et circule librement [94]. Contrairement au VEGF (comme nous l'avons vu précédemment), l'hypoxie n'induit pas l'expression du VEGF-B [95]. Les deux formes se lient au récepteur du VEGF et au récepteur de la neuropiline. Il apparaît que le VEGF-B peut induire la croissance de vaisseaux coronariens et une hypertrophie cardiaque, prévenant ainsi de dommages ischémiques. De plus, il est exprimé dans les tissus à hautes activités métaboliques [96].

Le VEGF-C appartient à la famille PDGF et se lie au VEGFR-2 et VEGFR-3 [97]. C'est un inducteur de la lymphangiogenèse (néoformation de vaisseaux lymphatiques) [98] et des études cliniques faites sur des patients atteints de cancer ont montré une corrélation entre le niveau d'expression de VEGF-C, l'invasion lymphatique, l'apparition de métastases lymphatiques et la survie du patient [99, 100].

Le VEGF-D stimule la croissance vasculaire et la croissance des cellules endothéliales lymphatiques en se fixant sur le VEGFR-3 [101]. Cette protéine joue un rôle majeur dans la lymphangiogenèse.

Le PlGF ou Placental like Growth Factor a été découvert comme son nom l'indique dans le placenta. Il existe 4 isoformes PlGF (PlGF-1, -2, -3 et -4) qui diffèrent dans leur taille et leur fonction biologique. Il se lie au VEGFR-1 et NRP-1. Une fixation de PlGF sur son récepteur induit l'angiogenèse *via* la stimulation de la voie de signalisation VEGFR [102]. Les différentes données sur l'expression du PlGF se contredisent. Il a été montré que le PlGF dans le cancer du côlon est en quantité faible en raison d'une hyperméthylation du promoteur lié au gène de cette protéine, ce qui a pour résultat une baisse de son expression [103]. Cependant les analyses par qPCR et analyse immunohistochimique de 94 tumeurs primaires de CRC comparés à des tissus sains ont montrées une expression de deux isoformes, PlGF-1 et PlGF-2 [104].

Le VEGF-E est un autre membre de la famille VEGF encodé par des virus qui peut se lier au VEGFR-2 [105]. Enfin le VEGF-F est un facteur identifié dans le venin de serpent (vipère).

II- LES RECEPTEURS DU VEGF

Les récepteurs au VEGF (VEGFR) sont des récepteurs tyrosine kinase impliqués dans des cascades de signalisation entrant dans la stimulation de l'angiogenèse. Ces récepteurs sont en général surexprimés dans les tumeurs, en particulier dans celles nécessitant de l'oxygène ou du glucose [106]. Il existe au total trois récepteurs VEGFR :

- VEGFR-1 ou Flt-1 ou fms-related kinase 4,
- VEGFR-2 ou Flk-1 (Fetalliver kinase 1) ou KDR (Kinase insert Domain Receptor),
- VEGFR-3 ou Flt-4 ou fms-related kinase 4.

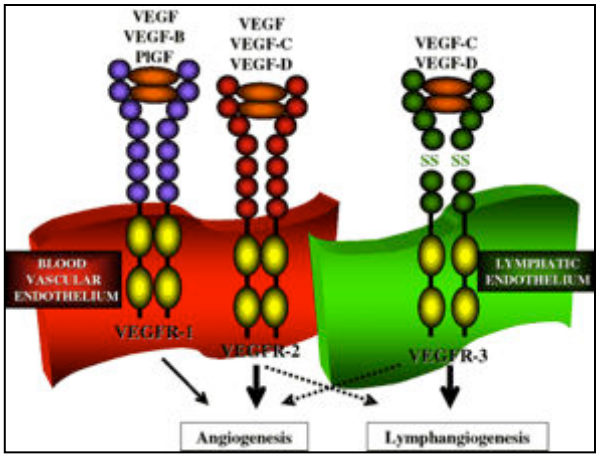


Figure 21: Les récepteurs au VEGF et leurs ligands (Tammela et al, 2005)

Comme nous pouvons l'observer sur la Figure 23, les récepteurs VEGFR-1 et VEGFR-2 sont plus spécifiques de l'angiogenèse tandis que le VEGFR-3 s'apparente davantage au processus de lymphogenèse. Chaque récepteur peut être activé par un ligand caractéristique.

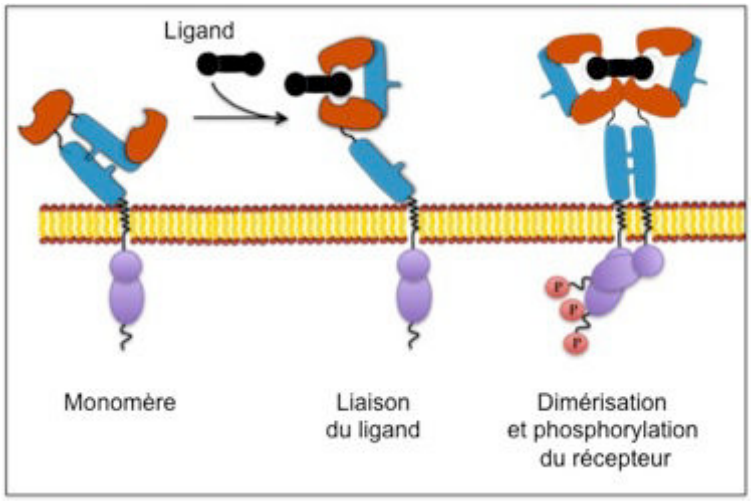


Figure 22: Vision schématique de la dimérisation et l'activation de récepteurs tyrosine kinases (d'après Marchini, 2013)

Il existe des monomères VEGFR qui, une fois le ligand VEGF fixé, vont se dimériser avec un autre monomère VEGFR [107] (Figure 24). Il existe aussi à la surface des cellules des dimères « préfixés » VEGFR mais non actif [108]. Le VEGF se fixera dans ce cas à un premier monomère puis au second, le dimère deviendra alors actif.

Il pourra alors y avoir autophosphorylation et activation de différents mécanismes physiologiques en fonction du récepteur activé comme nous allons le voir.

1) VEGFR-1

Le VEGFR-1 (fms-related tyrosine kinase) est un récepteur exprimé dans les cellules souches hématopoïétiques, les monocytes et les cellules endothéliales ainsi qu'à la surface de cellules tumorales [109, 110]. Ce récepteur est indispensable pour la migration des monocytes et des macrophages [111, 112]. Il est impliqué dans la survie cellulaire. Son expression est activée au cours de l'angiogenèse, ainsi qu'en conditions hypoxiques. Ce récepteur peut être lié au PlGF (Placental-like Growth Factor) ainsi qu'au VEGF-A et VEGF-B. Le VEGFR-1 joue un rôle clé dans l'endothélium vasculaire, non pas dans la régulation de l'angiogenèse, mais plus dans la sécrétion paracrine de facteurs de croissance [113]. Il existe aussi sous forme soluble et peut inhiber la prolifération de cellules endothéliales induites par le VEGF avec une grande affinité [114]. Son expression à la surface de cellule de CRC semble augmenter la progression tumorale étant donné sa forte expression dans le cancer du foie [109].

2) VEGFR-2

Le VEGFR-2 décrit en 1991 a été nommé KDR pour Kinase-insert Domain containing Receptor [115]. Il est exprimé sur les cellules endothéliales, sur les cellules endothéliales lymphocytaires et probablement à la surface des cellules tumorales (ce fait est controversé) [116]. Ce récepteur régule les fonctions vasculaires endothéliales. Le VEGFR-2 a été le plus étudié des récepteurs au VEGF de part son importance dans l'angiogenèse et dans le développement tumoral. Les sites majeurs d'autophosphorylation du VEGFR-2 sont situés sur la Tyrosine 1175 et la Tyrosine 1214 [117]. Cependant, seule l'autophosphorylation 1175 est nécessaire pour la prolifération de cellules endothéliales. Le VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D se lie au VEGFR-2 et induit une prolifération de ces cellules *via* l'activation de la voie Raf-MEK-ERK. L'activation de cette protéine peut être renforcée par des protéines adaptatrices dont la protéine Src (un non récepteur tyrosine kinase). Le VEGF se lie au VEGFR-2 avec 10 fois moins d'affinité qu'avec le VEGFR-1, bien que ce premier soit le principal médiateur de nombreux effets physiologiques.

3) NRP1 ET NRP2

Les neuropilines sont des récepteurs transmembranaires. Elles sont aussi bien exprimées dans les cellules endothéliales que dans les cellules tumorales. Elles agissent comme co-récepteur des VEGFRs (Figure 25).

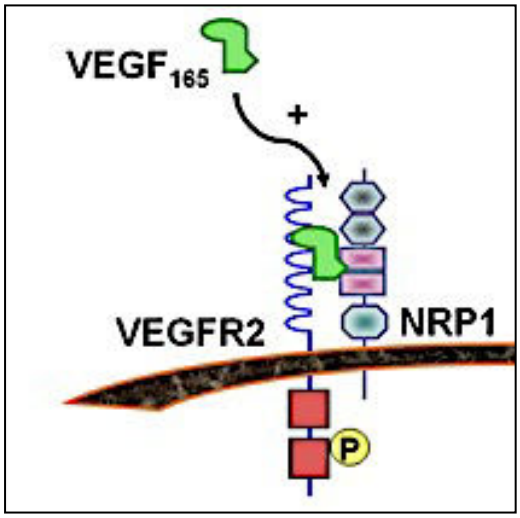


Figure 23: NRP1, un autre récepteur au VEGF (Yuhling, 2008)

Elles sont capables de fixer le VEGF mais aussi les sémaphorines de classe 3 (protéines impliquées dans le développement des axones) [118]. Les gènes de NRP1 et NRP2 ont des structures voisines. Cependant, ces protéines divergent par leurs ligands (différentes isoformes de VEGF) et leurs activités. Le couple NRP/VEGF favorise la néo angiogenèse tumorale [119].

La neuropiline 1 a été décrite comme jouant un rôle dans l'immunité, le développement cardiovasculaire, la guidance neuronale, la migration cellulaire, l'angiogenèse et la cancérogenèse [120-122]. Chez l'homme, NRP1 est exprimée dans les cellules dendritiques [123], l'endothélium artériel [124] et dans les cellules T du tissu lymphocytaire [125]. Récemment, un grand intérêt a été porté à NRP1 comme médiateur du développement et de la progression tumorale depuis que son expression a été observée dans la vascularisation tumorale.

NRP1 agit comme le co-récepteur de plusieurs ligands extracellulaires tels que le VEGF 165 [123, 126] ou le TGFß. NRP1 se lie avec VEGFR-2 pour augmenter l'affinité de l'isoforme du VEGF165 avec VEGFR2 [127]. Elle a été identifié pour toutes ces raisons comme une cible intéressante pour les thérapies anti-angiogéniques [128]. Des anticorps monoclonaux anti NRP1 ont été développés. Ils sont capables d'inhiber la progression et l'angiogenèse tumorale liées au VEGF165 [128-130]. Le MNRP1685A, un anticorps ciblant NRP1 est actuellement en phase I de développement en essai clinique chez des patients présentant des tumeurs solides [131]. Une réduction du volume tumoral par blocage de la voie de signalisation VEGF a pour l'instant été observée. Il a été montré qu'une utilisation de cet anticorps combiné avec le bevacizumab était très efficace [130].

III- LES AUTRES RECEPTEURS IMPLIQUES DANS L'ANGIOGENESE

Le VEGF et ses récepteurs ne sont pas les seuls impliqués dans le processus angiogénique. En effet, de nombreux récepteurs comme le FGFR (Fibroblast Growth Factor Receptor) et le PDGFR (Platelet-Derived Growth Factor Receptor) contribuent à la formation et la structure de nouveaux vaisseaux.

1) LE FIBROBLAST GROWTH FACTOR RECEPTOR (FGFR)

Les fibroblastes sont des composants majeurs du tissu conjonctif et leur principal rôle est de réparer les lésions à la suite d'un traumatisme. Ils peuvent se présenter sous forme contractée ou relâchée en fonction des signaux envoyés par les chimiokines. Il existe un total de 24 formes de FGF qui sont synthétisées par ces fibroblastes ou par les cellules endothéliales.

L'appellation FGF fait généralement allusion au FGF2 appelé FGF-ß ou bFGF (basic fibroblast growth factor). Cette protéine se lie au sulfate héparane et possède de nombreuses activités mitotiques et angiogéniques à travers l'activation des protéines Akt ou Erk (Figure 26). En effet, le bFGF induit une diminution de la thrombospondine, un inhibiteur de l'angiogenèse.

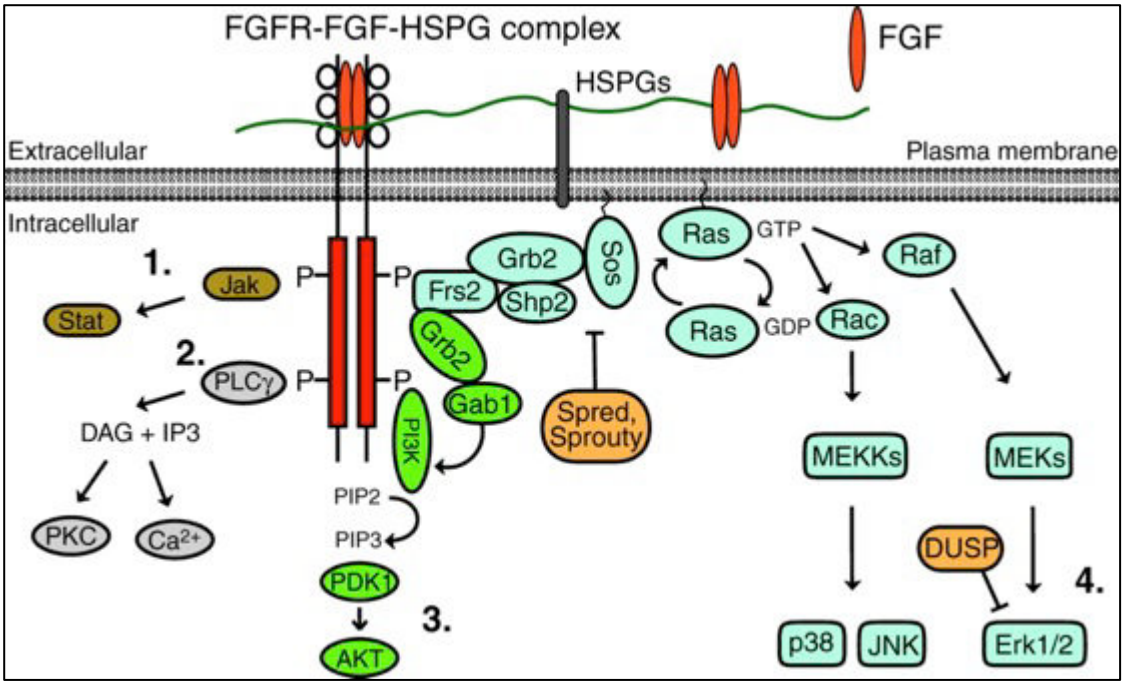


Figure 24: Différentes voies de signalisation impliquées après activation du récepteur FGF (Lanner, 2010)

Il existe 4 types de récepteurs au FGF situés sur la membrane cellulaire. Une fois le ligand (FGF) fixé, le récepteur se dimérise ce qui conduit à une activation tyrosine kinase par trans-autophosphorylation. Ceci conduit donc l'activation de différentes voies de signalisation protéique telles que AKT, RAS ou PI3K.

2) LE PLATELET-DERIVED GROWTH FACTOR RECEPTOR

Le Platelet-derived Growth Factor Receptor (ou PDGFR) est un récepteur tyrosine kinase. Il a été identifié dans les années 1970 comme une protéine sérique qui stimule la croissance et la migration des fibroblastes, des cellules musculaires lisses et des cellules gliales [132-134]. Il est exprimé sur les oligodendrocytes et les cellules dérivées de cellules souches mésenchymales comme les fibroblastes ou les cellules musculaires lisses. Le ligand de ce récepteur, le PDGF, est sécrété par des plaquettes activées mais aussi par d'autres types cellulaires comme les cellules endothéliales ou épithéliales. Le PDGFR peut être activé de manière indirecte, le VEGF induit alors la migration de cellules mésenchymales à travers l'activation de deux isoformes de PDGFR (PDGFRα et PDGFRß) [135]. Par ailleurs, la liaison directe du VEGF au PDGFR peut se faire mais seulement en condition supra-physiologiques [136]. La phosphorylation de ce récepteur induit plusieurs cascades de signalisation comme l'activation des voies MAP kinases, PI3K et phospho-lipase C (Figure 27). Il est responsable de la stimulation de la prolifération et de la migration cellulaire dans de nombreux mécanismes physiologiques [137].

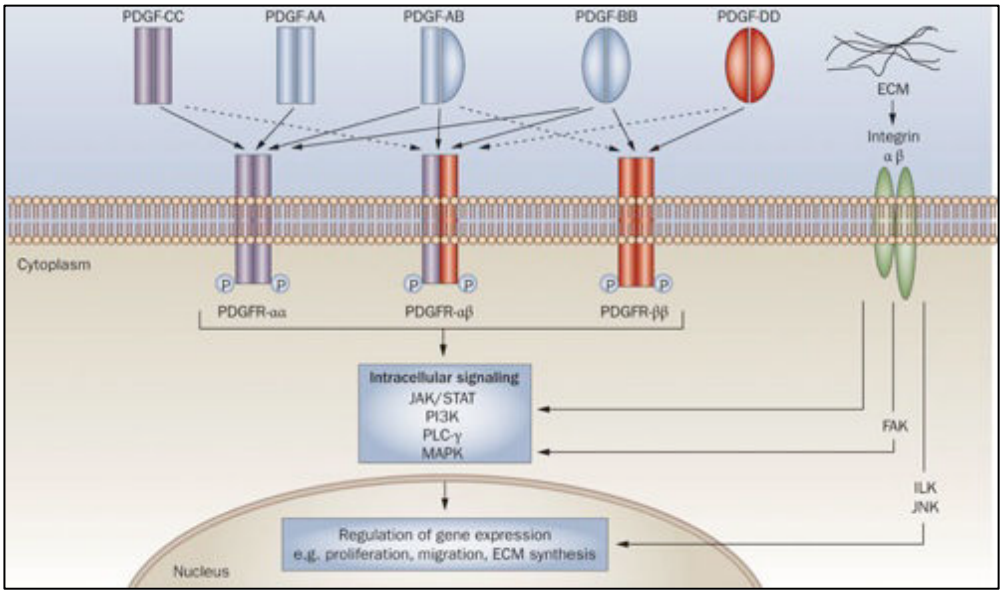


Figure 25: Voie de signalisation du PDGF/PDGFR (Boor, 2010)

Les ligands PDGF sont des proto-oncogènes qui peuvent être activés par de nombreuses altérations génétiques dans les cellules cancéreuses. La production de PDGF peut promouvoir l'angiogenèse et le développement de fibroblastes associés à la tumeur (cas des tumeurs solides) [138].

IV- SIGNALISATION AUTOCRINE DU VEGF ET TRAITEMENT CIBLE

En raison de l'importance du VEGF dans l'invasion et la progression tumorale, des traitements ciblés ont été mis au point par des compagnies pharmaceutiques dont le Bevacizumab (Avastin) et l'Aflibercept (Zaltrap) qui sont tous indiqués pour le traitement du CRC métastatique [139]. Ces agents ont une excellente activité anti-angiogénique chez certains patients tandis que d'autres y sont réfractaires.

Dans le CRC, les cellules tumorales et stromales sont considérées comme une source principale de VEGF. Sachant que les cellules tumorales présentes aussi des récepteurs au VEGF, on assiste à une signalisation autocrine et paracrine du VEGF (Figure 28).

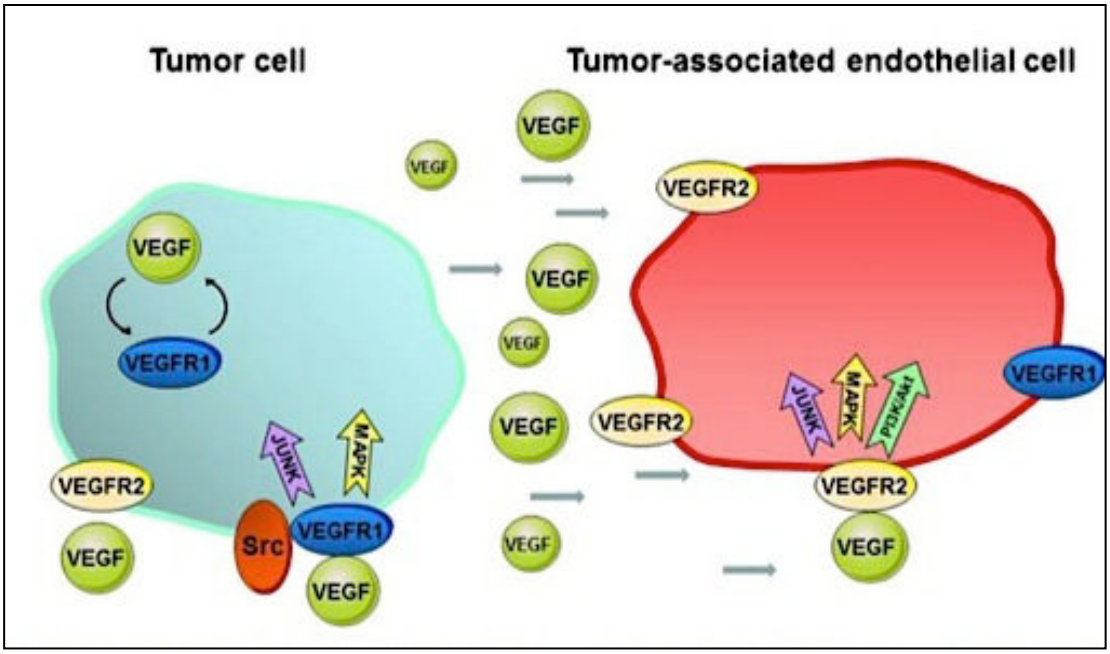


Figure 26: Signalisation VEGF autocrine et paracrine dans les cellules de cancer colorectal (Larsen, 2013)

1) VARIATION D'EXPRESSION DES LIGANDS VEGF ET DE LEURS RECEPTEURS DANS LES CELLULES CRC ET LES TUMEURS

La plupart des cellules provenant d'échantillons de cancer colorectal exprime les récepteurs VEGFR-1 et VEGFR-2 [106, 109, 140-144]. Dans une étude de 72 échantillons (tumeurs et tissus sains), les ARN messagers de VEGF et VEGFR-1 ont été observés comme étant surexprimés dans les adénocarcinomes comparés au tissu normal [106]. L'analyse immunohistochimique de 82 patients ayant contracté un CRC ont montré une surexpression tumorale de VEGF, VEGFR-1 et VEGFR-2 [145].

Cependant, seule l'expression de VEGFR-1 a pu être reliée aux bons pronostics du patient tandis que le VEGFR-2, bien que lié à un stade TNM avancé, n'a révélé aucun lien avec la survie [146]. Une forte expression de pVEGFR-2 (activation du récepteur par auto phosphorylation) dans les vaisseaux tumoraux a révélé une forte expression de VEGF et du facteur Hypoxia Inducible Factor 1 alpha (HIF 1 Alpha) dans les cellules tumorales. Le facteur le plus significatif quant à l'avenir du patient est l'invasion lymphatique suivi par l'expression de VEGF [141]. Une autre étude rapporte que le VEGFR-1 est exprimé dans les cellules tumorales et le stroma des vaisseaux de tissu de 91 patients en stade II/III tandis qu'une immunoréactivité avec VEGFR-2 et VEGFR-3 n'est rapportée que dans les vaisseaux [147].

Ces résultats suggèrent d'une part que les ligands VEGF et leurs récepteurs sont couramment surexprimés dans les tissus tumoraux comparés aux muqueuses saines et d'autre part que les cellules tumorales expriment VEGFR-1 (Figure 29) et parfois VEGFR-2 et que l'expression de VEGFR-1 mais pas VEGFR-2 peut être reliée à la survie chez des patients CRC de stade II/III.

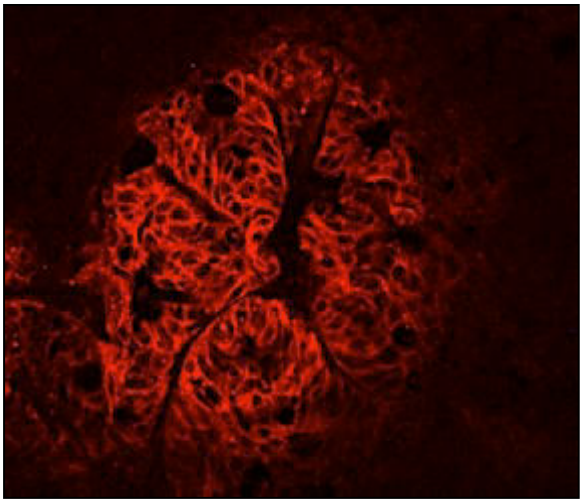


Figure 27: expression de pVEGFR-1 dans des xénogreffes de CRC (Mésange, 2014)

En conditions hypoxiques, l'ARN messager du VEGF et sa protéine sont augmentés alors que l'on assiste à une diminution de PlGF [148]. Cela suggère que les ligands au VEGF ont des effets différents. Les effets du blocage du PlGF d'un point de vue de l'angiogenèse physiologique et tumorale sont controversés. De récents résultats suggèrent que l'efficacité de traitement anti PlGF est corrélée à l'expression de VEGFR-1 dans les cellules tumorales mais sans processus angiogénique [149]. De plus, Le PlGF induit la signalisation VEGFR-1 et une réponse biologique dans les cellules tumorales sensibles aux traitements anti-PlGF mais pas

dans les cellules tumorales réfractaires au traitement ou dans les cellules endothéliales. Pour cela, les différents résultats suggèrent que les cellules tumorales et leur signalisation VEGFR-1 sont les principales cibles de thérapies anti-PlGF.

2) SIGNALISATION VEGF AUTOCRINE

Une surexpression de l'isoforme 165 du VEGF augmente généralement la résistance à l'apoptose. Quand des cellules de CRC sont transfectées avec un siRNA atténuant le VEGF, le taux d'apoptose augmente après traitement au 5-FU. De manière intéressante, l'ARN messager à lui seul VEGF est biologiquement actifs. La région non codante 5' (5'UTR) a montré une activité anti-apoptotique à travers la surexpression de gène de survie comme EGFR et diminution de l'expression de gènes pro apoptotiques comme *FAS* ou *BAX*. Les tumeurs possédant un 5'UTR fonctionnel ont montré un taux d'apoptose inférieure à celles avec un 5'UTR mutant [150]. Une autre étude indépendante a montré qu'une sous régulation de l'ARN messager VEGF était accompagnée par une baisse de la prolifération et une hausse de l'apoptose [85]. La sous-régulation du VEGF a été accompagnée d'une sensibilité accrue au 5-FU (par mesure du taux d'apoptose).

La stimulation de cellules de CRC par le VEGF et VEGF-B a mené à une augmentation de la motilité et de l'invasion. La signalisation VEGF est associée à une activation de Erk1/2 (Extracellular signal-Regulated Kinase) et c-Jun amino terminal kinase/stress activated protein kinase (JNK/SAPK) ainsi qu'avec la translocation de la sous-unité p65 de NFkappaB dans le noyau cellulaire. Le blocage de VEGFR-1 par un anticorps a empêché des changements phénotypiques montrant l'importance de l'activité VEGFR-1 dans la signalisation VEGF [109]. D'autres études ont montré que le VEGF et le VEGF-B activaient les kinases de la famille Src dans les cellules de cancer colorectal. Cela a été accompagné par une augmentation de la migration pouvant être bloquée par inhibition de VEGFR-1 ou des Src kinases. Cela montre que le VEGFR-1 possède un rôle dans la migration des cellules tumorales à travers une signalisation dépendant de Src [151]. Le traitement par un inhibiteur pan-VEGFR appelé Cédiranib a inhibé la migration et l'invasion des cellules CRC, réduit la phosphorylation de VEGFR-1 ainsi que l'activation des Erk1/2 [143]. De façon intéressante, la stimulation avec des ligands VEGF est sans effet sur la prolifération des cellules CRC [109, 143, 151] bien que le VEGF et le VEGF-B puissent stimuler la formation de colonie sur de l'agar *in vitro.*

3) REGULATION DE VEGF ET SES RECEPTEURS

SIGNALISATION HIF

Le VEGF peut être activé par des oncogènes, par activation des intégrines ou par la stimulation de cytokines [152]. Cependant, pour la plupart des tumeurs solides, c'est l'environnement tumoral qui a l'effet le plus marqué sur l'expression de VEGF. Les niveaux de VEGF cellulaire sont augmentés en condition d'hypoxie et en déprivation de glucose dans des sphéroïdes multicellulaires [153] et dans les tumeurs solides [154]. D'autres études ont montré que la régulation transcriptionnelle de VEGF était activée par HIF-1 [155] et HIF-2 [156]. Les protéines HIFs sont des hétérodimères composés d'une unité régulée par l'oxygène appelée HIFα (HIF-1α ou HIF-2α) et d'un récepteur nucléaire (ARNT/HIF1ß). En condition hypoxique, HIF-1α est stabilisé et peut recruter le co-activateur transcriptionnel p300/CBP, puis se lie à l'HRE (Hypoxia-responseElement). Il s'ensuit une transcription de plusieurs gènes comme le VEGF ou le transporteur de glucose GLUT1 (Figure 30) qui joue un rôle dans l'angiogenèse, le métabolisme anaérobie et la survie cellulaire [157].

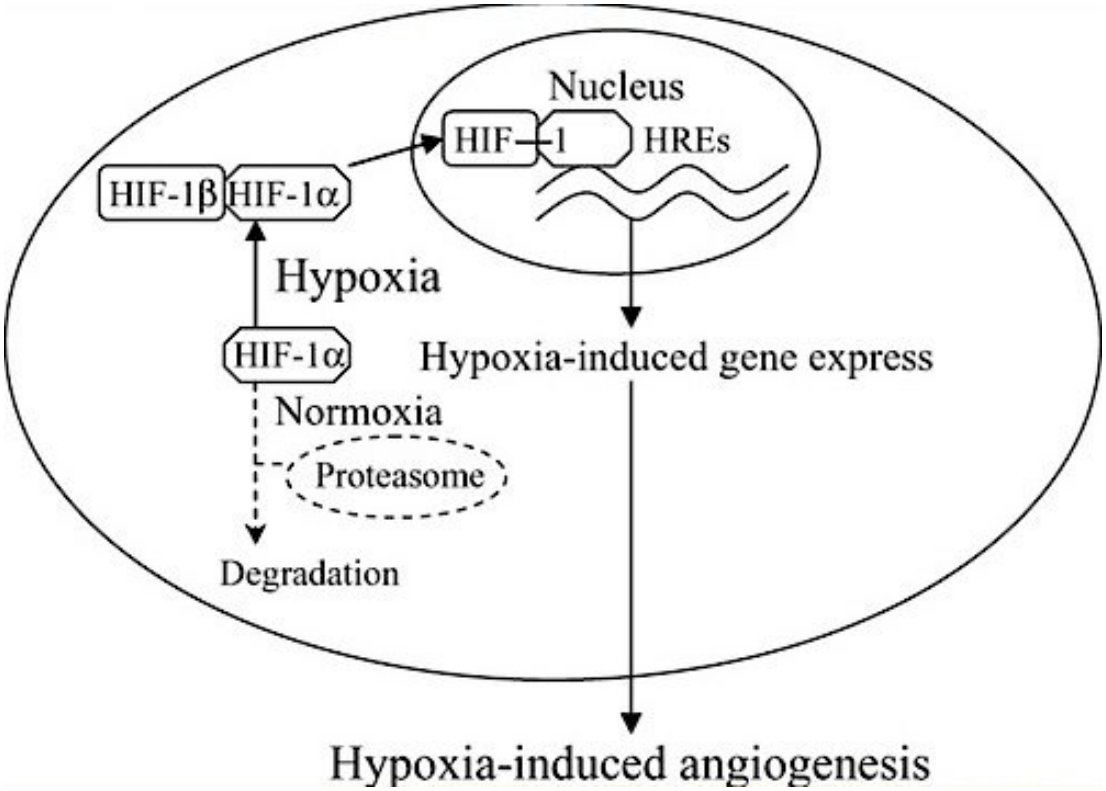


Figure 28: Signalisation de HIF1 alpha (Kenneth, 2008)

Il est à noter que l'hypoxie et l'hypoglycémie affectent la stabilité des ARN messagers de gènes cibles de HIF. Dans des conditions optimales (absence de tout stress), les ARN messagers de VEGF et de GLUT1 ont une demi vie que l'on qualifiera de courte (environ 30 minutes), durée qui peut s'étendre jusqu'à huit fois plus longtemps si un stress hypoxique ou hypoglycémique survient [158]. L'augmentation de la stabilité de ces ARN messagers est en partie médiée par l'AMP-activated protein kinase (AMP) et est couplée à la voie de signalisation JNK/SAPK [159].

Contrairement au VEGFR-2, Il a été reporté que VEGFR-1 contient une séquence HIF consensus sur son promoteur, ce qui a pour incidence une surexpression de VEGFR-1 en conditions hypoxiques [160]. D'un autre côté, il a été prouvé que VEGFR-2 était surexprimé en conditions hypoxiques dans des cellules souches embryonnaires [161] et dans différents modèles ischémiques expérimentaux [162, 163]. Les deux récepteurs VEGFR-1 et VEGFR-2 sont donc surexprimés en conditions hypoxiques.

SIGNALISATION P53

La protéine P53 est activée (50% des cas de CRC) par toutes sortes de stress cellulaires incluant l'hypoxie et entraîne la modification de l'expression de plusieurs gènes cibles [164]. Jusqu'à récemment, aucun lien clair entre p53 et le VEGF n'avait été établi. Cependant, il a été montré récemment que jusqu'à 6% de la population avait un polymorphisme (SNP) en amont du site de transcription de VEGFR-1, créant ainsi un élément de réponse putatif de p53. Ces résultats montrent que la protéine p53 peut stimuler différemment la transcription *via* un variant polymorphique du promoteur de VEGFR-1 liant la signalisation VEGF à la réponse au stress de P53 chez les humains [165].

SIGNALISATION WNT/BETA-CATENIN

La cascade de signalisation Wnt/beta-catenin est un régulateur clé du développement. De plus, la dérégulation de Wnt/beta-catenin est fortement corrélée avec des types tumoraux correspondant à des activations anormales des gènes cibles de Wnt. De récents résultats indiquent que les composants de cette voie de signalisation sont modifiés dans 95% des CRC. La beta-caténine est un régulateur transcriptionnelle de l'expression de VEGF. Cette activité est liée à la capacité de la

beta-caténine à moduler la chromatine près du gène VEGF [166]. De manière inattendue, le VEGFR-1 a été identifié comme un régulateur positif de la voie de signalisation Wnt [167]. Ces résultats indiquent une relation entre la signalisation VEGF et la signalisation Wnt/beta-catenin dans le cancer du côlon ce qui contribuerait à la sensibilité de ce type de tumeur à l'inhibition de l'angiogenèse.

V- INHIBITION DE L'ANGIOGENESE ET SURVIE DES CELLULES DE CANCER COLORECTAL

L'inhibition angiogénique provoque une boucle de rétro contrôle positif de VEGF dans la tumeur. La diminution du flux sanguin augmente l'hypoxie intra-tumorale induisant en compensation une production de VEGF. De nombreux résultats suggèrent qu'une réponse clinique à l'inhibition de l'angiogenèse dépendait du nombre de vaisseaux présents et de la capacité de la tumeur à s'adapter aux conditions hypoxiques [168]. Les plus importants facteurs de survie produits en situation de stress comme l'hypoxie sont ceux produits par HIF et les gènes contrôlés par HIF comme le VEGF. Le VEGF, ainsi que son ARN messager peuvent induire la survie des cellules tumorales à travers la réponse au stress [150, 152, 169]. L'effet d'un inhibiteur angiogénique se traduit par sa capacité à inhiber la densité microvasculaire et de la réponse de la tumeur face à l'hypoxie.

Une étude de 2011 faite par Nardo et al a montré par analyses histologiques et par analyses d'images d'animaux portant des tumeurs de cancer ovarien, traités par du bevacizumab, que le blocage du VEGF était accompagné par une forte déplétion en glucose et en ATP dans les tumeurs xénogreffées. En dépit de la réduction de la densité vasculaire par l'action du bevacizumab qui augmente ainsi l'hypoxie et induit HIF-1α, la réduction de la taille des tumeurs n'a été observée que dans des tumeurs très dépendantes du glucose et accompagnée de la présence de grandes régions nécrotiques dans les tumeurs [170]. Comme mentionné plus haut, la protéine AMPK est activée en cas de stress énergétique et contribue au maintien du niveau intracellulaire en ATP. Le blocage du VEGF est accompagné d'une activation d'AMPK dans les tumeurs glucose-dépendantes ce qui a pour résultat la survie cellulaire. L'inhibition d'AMPK a été suivie d'une augmentation de la consommation de glucose, de la production de lactate et de l'augmentation de la nécrose tumorale après blocage du VEGF.

Ces résultats suggèrent qu'une réponse thérapeutique à la thérapie angiogénique dépend de nombreux facteurs tels que :

- la réduction de la densité microvasculaire
- la capacité tumorale à produire des facteurs de survie en réponse au stress (hypoxie et glucose)
- du phénotype glycolytique de la tumeur
- de la capacité à réguler l'AMPK

La signalisation autocrine VEGF est importante dans la survie, l'invasion, la migration et la chimiorésistance dans le cancer colorectal. Les analyses immunohistochimiques des tumeurs de patients ont révélé que les ligands et récepteurs VEGF sont surexprimés dans les tissus tumoraux comparés aux muqueuses normales et que les cellules de CRC exprimaient des VEGFR-1 et VEGFR-2 fonctionnels. Cependant, l'expression de VEGFR-1 seule semble être corrélée à la survie de patients de stade II/III de CRC. Une réponse thérapeutique à la thérapie angiogénique dépend de nombreux facteurs. Les challenges futurs incluent l'identification de biomarqueurs fonctionnels capable de définir les patients pouvant bénéficier d'une thérapie dirigée contre le VEGF. VEGFR-1 est en passe de devenir un grand biomarqueur pronostic pour les patients de stade II/III mais nécessite une validation avec des recherches plus approfondies.

VI- THERAPIES ANTI ANGIOGENIQUES

L'angiogenèse est donc une cible thérapeutique de choix en cancérologie. Plusieurs pistes sont à envisager quant à la cible, impliquant un nombre important de composés disponibles. La cible principale reste le VEGF.

1) AVASTIN (BEVACIZUMAB, ROCHE)

Le bevacizumab (Figure 31) ou de son nom commercial Avastin, est un anticorps monoclonal humanisé dirigé contre le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor). Cette liaison empêche l'interaction avec son récepteur. Il est classé dans la catégorie des anti-angiogéniques. L'utilisation de ce composé réduit la croissance de nouveaux vaisseaux sanguins, inhibant ainsi l'angiogenèse. Il est capable de lier toutes les isoformes du VEGF-A mais n'est pas capable de se lier aux autres formes de VEGF (B-E).

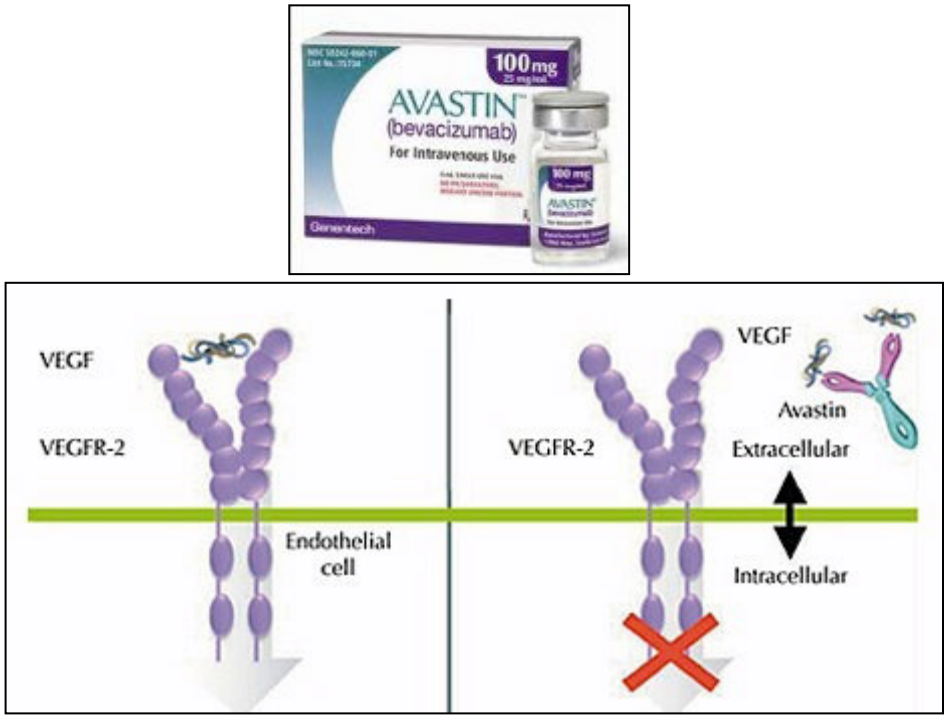


Figure 29: Avastin (Roche)

Bevacizumab inhibe la croissance tumorale *in vitro* dans de nombreuses lignées cellulaires cancéreuses (dont des lignées cellulaires de CRC) et *in vivo* dans les modèles animaux [171]. Une activité synergique du bevacizumab et d'autres agents cytotoxiques de chimiothérapie a été observée dans des modèles de souris xénogreffées avec des tumeurs solides [172]. Certains vaisseaux sanguins tumoraux parviennent à survivre en l'absence de VEGF. Néanmoins, le blocage thérapeutique du VEGF les rend moins perméables et morphologiquement plus semblables à un vaisseau dit normal ce qui réduit le risque d'entrée de cellules tumorales dans le système sanguin et donc réduit le risque de métastases [173]. Cette normalisation réduit aussi la pression intra-tumorale ce qui pourra améliorer la pénétration des molécules chimiothérapeutiques. Ces résultats ont été prouvés chez des patients atteints de CRC [174] pour lesquels le bevacizumab a diminué le volume et la densité micro-vasculaire ainsi que le nombre de cellules endothéliales circulantes.

Le bevacizumab associé à la chimiothérapie à base de fluoropyrimidine (5-FU) avec ou sans oxaliplatine ou irinotécan est utilisé en traitement de première et seconde ligne dans le cancer du côlon métastatique et a pour résultat une augmentation significative de la médiane de survie sans progression comparé à l'utilisation de la chimiothérapie seule (étude AVANT) [175] . Cela a été confirmé dans d'autres études accompagnées dans de nombreux cas d'un effet bénéfique quant à l'utilisation de cet anti-VEGF (étude OCEANS, ICON7…) [176, 177].

Ce composé présente tout de même des effets secondaires, spécialement chez les personnes âgées qui présentent un risque plus prononcé de problèmes vasculaires ou de problèmes de réparations cicatricielles allant jusqu'à, dans certains cas, des perforations gastro-intestinales. La demi-vie de cet anticorps est d'environ 20 jours après une administration de 1 à 20 mg/kg toutes les deux ou trois semaines.

2) NINTEDANIB (BIBF 1120, BOERHINGER INGELHEIM)

Un inhibiteur d'angiokinases (kinases impliquées dans le processus angiogénique) a été développé dans le domaine des thérapies ciblées dans la thérapie anti-tumorales : le nintedanib (Figure 32). Il s'agit d'une petite molécule inhibant l'angiogenèse, dérivée de l'indolinone qui bloque les activités kinases des récepteurs VEGF (VEGFR), Platelet-Derived Growth Factor Receptor (PDGFR), et des Fibroblastes Growth Factor Receptor (FGFR). Ce composé inhibe l'angiogenèse tumorale à travers le blocage de la voie de signalisation VEGF.

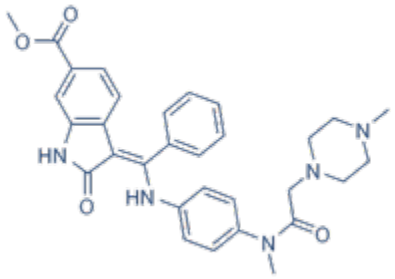


Figure 30: Structure chimique Nintedanib

Il inhibe l'activité mitotique des protéines kinases et Akt dans trois types de cellule jouant un rôle dans l'angiogenèse (Figure 33) :

- les cellules endothéliales
- les péricytes (cellules possédant des prolongements cytoplasmiques responsables de la régulation du débit sanguin)
- les cellules musculaires lisses

Cette inhibition entraîne une diminution de la prolifération cellulaire et de l'apoptose.

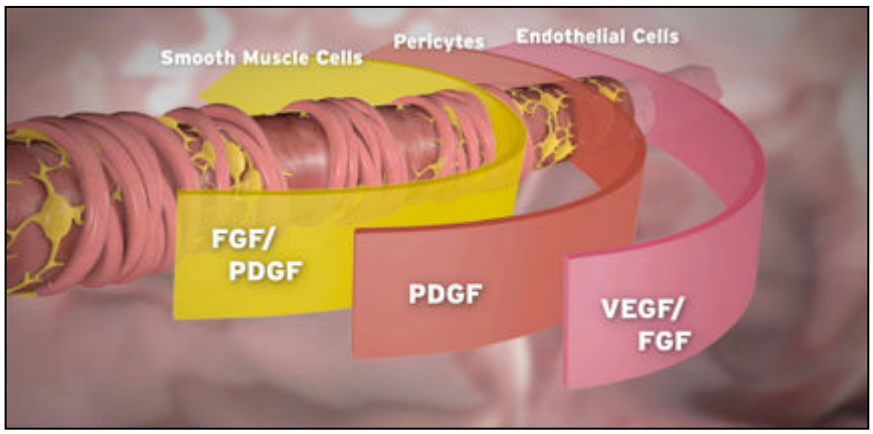


Figure 31: Cibles du composé nintedanib (Boerhinger, 2004)

Dans chaque modèle de tumeurs testé (tumeurs greffées sur des souris nude), le nintedanib est actif à des doses n'entraînant pas d'effets secondaires importants et provoque, après trois jours de traitement, une réduction du diamètre et de la densité des vaisseaux présents sur la tumeur. Après cinq jours de traitement, il est possible d'observer une inhibition significative de la croissance de la tumeur. Le Nintedanib est rapidement métabolisé *in vivo* par un clivage méthylester. Cependant, en administrant des doses orales quotidiennes, on note des résultats positifs sur le modèle de souris xénogreffées car le composé inhibe les RTK cibles durablement [178].

Le composé est actuellement en phase II et III de développement clinique dans de nombreuses pathologies tumorales comme le CRC, l'hépatocarcinome, le cancer du poumon non à petites cellules ou encore le cancer ovarien. L'avantage principale de ce composé est le mode d'administration oral qui peut être fait au domicile contrairement aux traitements au bevacizumab et aflibercept qui se donnent en intraveineuse.

3) LE VEGF TRAP (AFLIBERCEPT, SANOFI AVENTIS)

L'aflibercept est une protéine de fusion recombinante entièrement humanisée composée de deux domaines : VEGFR-1 et VEGFR-2 fusionnés avec une région constante d'immunoglobuline G1 humaine (Figure 34) [179]. L'aflibercept agit comme un récepteur VEGF qui inhibe ainsi l'angiogenèse.

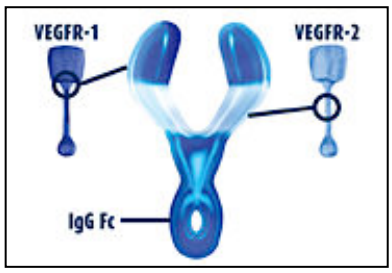


Figure 32: Composition des différents éléments de la protéine de fusion aflibercept (Zaltrap, Sanofi)

Cette protéine soluble possède une forte affinité pour les ligands VEGF-A, VEGF-B et PlGF (Figure 35). Son affinité pour le VEGF est plus grande que le bevacizumab [180]. Les essais *in vitro* sur les cellules endothéliales ont montré l'habileté de l'aflibercept à inhiber complètement la phosphorylation du VEGFR-1 et VEGFR-2 à travers le VEGF-A. En préclinique, cet anticorps est capable d'inhiber la croissance tumorale, l'angiogenèse et d'améliorer la survie de souris xénogreffées avec des cellules de cancer de pancréas, d'ovaires et de rein [179].

Figure 33: Cibles de l'aflibercept (Zaltrap, Sanofi)

Une autre étude préclinique a montré que l'aflibercept bloquait la croissance des micrométastases et causait la régression et la normalisation des vaisseaux présents au sein de la tumeur [181]. L'essai clinique de phase III VELOUR a étudié

la combinaison de l'aflibercept et du protocole chimiothérapeutique FOLFIRI en seconde ligne de traitement du CRC métastatique après échec de traitement avec l'oxaliplatine [182]. Le groupe traité avec l'aflibercept a montré une médiane de survie supérieure d'un mois et une PFS (Progression Free Survival) de deux mois de plus environ. La dose généralement utilisée est de 3mg/kg. Quelques effets secondaires sont notés comme une protéinurie ou des ulcérations rectales.

Voici en tableau 5 le récapitulatif des thérapies anti angiogénique :

Tableau 5: Récapitulatifs des thérapies anti angiogéniques

Nom	Nature	Cible	Etude Clinique	AMM
Bevacizumab	mAb	VEGF-A	• AVANT mCRC • OCEANS ovarian cancer • ICON7 ovarian cancer	• mCRC • cancer du sein métastatique • Cancer du poumon non à petites cellules • Cancer du rein • Cancer de l'ovaire • Glioblastome
Nintedanib	TKI	VEGFR/ FGFR/ PDGFR	• LUME lung-1 • LUME lung-2	Aucune
Aflibercept	Protéine de fusion	VEGF-A/VEGF-B/PIGF	• VELOUR mCRC	• mCRC

CHAPITRE 5 ACTIVATION DE LA VOIE DE SIGNALISATION EGFR

Bien que la voie de signalisation VEGF soit importante dans le développement des cancers, notamment par son implication dans l'angiogenèse, d'autres voies sont activées comme la voie de signalisation EGFR à travers l'activation des récepteurs HER par différents ligands. Cette voie EGFR est impliquée dans les mécanismes de survie tumoraux.

I- LES RECEPTEURS HER ET LEURS LIGANDS

1) RECEPTEURS HER

Ils existent plusieurs récepteurs de la famille HER (Human Epidermoid Receptor). Ce sont tous des RTK (Récepteur Tyrosine Kinase) :

- ErbB1 ou HER1 ou EGFR
- ErbB2 ou HER2 ou Neu
- ErbB3 ou HER3
- ErbB4 ou HER4

Un des premiers facteurs de croissance découvert fut l'EGF en 1979 [183]. Les récepteurs de facteur de croissance à l'EGF sont des glycoprotéines transmembranaires ayant un domaine de liaison extracellulaire avec l'Epidermal Growth Factor. Il possède aussi un domaine intracellulaire actif qui contient une tyrosine kinase.

Les différents récepteurs HER peuvent se combiner entre eux lors des dimérisations créant ainsi des homo/hétérodimères aboutissant à une grande diversité de voies activées (Figure 36).

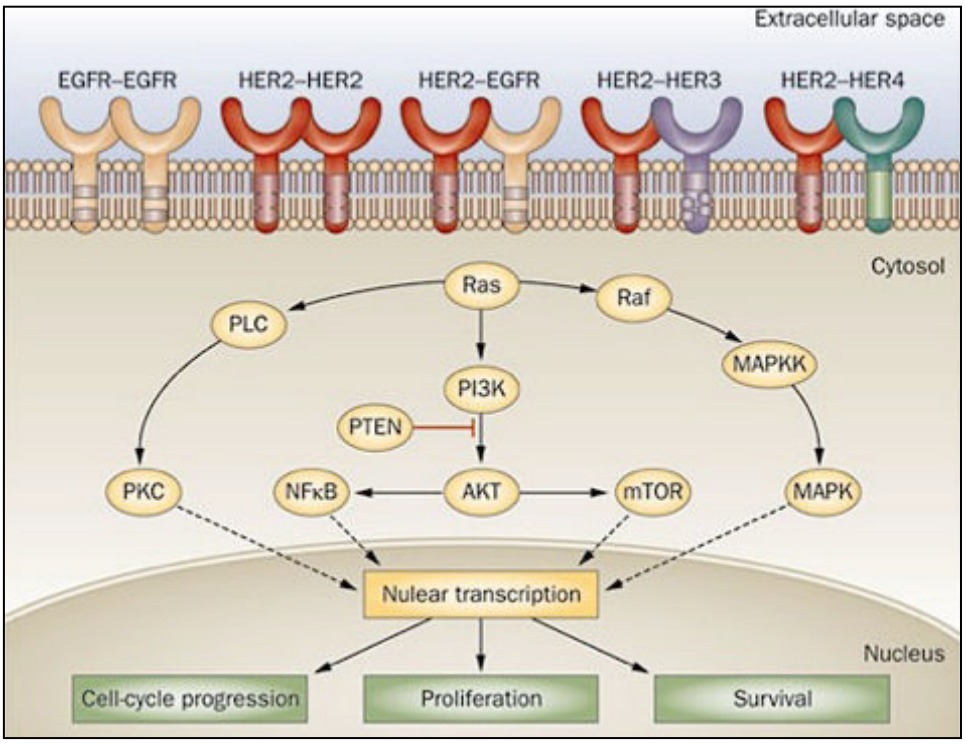


Figure 34: Dimérisation des récepteurs HER et effets cellulaires (Han, 2009)

La probabilité de dimérisation des récepteurs n'est tout de même pas laissé au hasard [184]. Les récepteurs HER1, HER3 et HER4 vont chercher à se dimériser préférentiellement avec HER2, récepteur qui ne possède pas de ligand connu [185, 186]. Ces hétérodimères préférentiellement formé avec HER2 proviennent du fait que ce dernier est très souvent surexprimé dans le tissu tumoral.

2) LIGANDS

Il n'y a pas que l'Epidermal Growth Factor (EGF) qui est capable de se lier aux récepteurs HERs. Un nombre important de ligands est à même de se lier et de provoquer une dimérisation des récepteurs. La plupart d'entre eux sont résumés dans le tableau suivant (Tableau 6). Nous détaillerons uniquement les trois premiers qui jouent un rôle principale dans l'étude préclinique et clinique DREAM.

Tableau 6: Ligands des récepteurs HER

Ligands Hers	Récepteurs reconnus
EGF	**EGFR**
TGF alpha	**EGFR**
Amphiregulin	**EGFR**
Epiregulin	**EGFR, HER4**
HB-EGF	**EGFR, HER4**
Betacellulin	**EGFR, HER4**
Neureguline 1 et 2	**HER3, HER4**
Neureguline 3 et 4	**HER4**

L'EGF fait parti d'un réseau complexe de facteurs de croissance et de récepteurs qui aident à moduler la croissance cellulaire. Ce facteur (de nature hydrophobe) est sécrété et peut se fixer sur un récepteur spécifique induisant une signalisation autocrine ou paracrine. Il induit des signaux mitotiques et la phosphorylation des MAP kinases dans quasiment la totalité des tissus humains, incluant une grande variété de cellules épithéliales et épidermales comme les fibroblastes ou les cellules endothéliales [187].

Le TGF alpha ou Transforming Growth Factor alpha, a été originellement isolé comme facteur sécrété par des fibroblastes transformés. Une exposition de ce facteur sur des fibroblastes initie l'émergence d'un phénotype malin [188]. Initialement, il avait été nommé sarcoma growth factor avant de rentrer dans la classe des cytokines de la famille EGF. La forme soluble mature de TGF alpha, une fois sécrétée, agit de façon autocrine et paracrine *via* une forte affinité à l'EGFR [189]. Ce facteur est surexprimé dans les tissus tumoraux et bien qu'il soit connu pour avoir une action sur la prolifération cellulaire et la différenciation, il est aussi impliqué dans l'angiogenèse et dans le métabolisme et la migration cellulaire. La différence entre le TGF alpha et l'EGF est que sa liaison à l'EGFR ne provoque pas la protéolyse du récepteur qui pourra être une nouvelle fois activé.

L'Amphireguline ou AREG ou encore SDGF (Schwannoma-derived Growth Factor) est un facteur de croissance largement exprimé. L'amphireguline soluble est sécrétée en réponse à une stimulation ATP, elle-même en réponse à une stimulation CXCL12 (un facteur stromale) de cellules épithéliales [190, 191]. L'AREG exerce une activité autocrine et paracrine sur les hétérodimères EGFR-HER2 [192]. Elle possède une fonction mitogène sur les cellules épithéliales, les kératinocytes, les cellules musculaires lisses et les fibroblastes. Dans les cancers, l'amphireguline est surexprimée par les cellules dendritiques associées à la tumeur [193]. Elle agit positivement sur la progression tumorale en augmentant la prolifération, l'invasion et l'angiogenèse [194]. Il est à noter que cette protéine contribue à la résistance des cellules tumorales au cisplatine.

II- SIGNALISATION EGFR

Les voies de signalisation EGFR ont été largement étudiées et des thérapies ont été mises au point visant ce récepteur. Quand un ligand se fixe (comme par exemple l'amphiregulin ou l'EGF), on assiste alors à un changement conformationnel du récepteur et à une homo ou hétérodimérisation avec d'autres membres de la famille HER. S'ensuit une autophosphorylation d'une tyrosine kinase qui sera à même d'activer différentes voies de signalisation (Figure 38) dont deux voies principales sont à noter :

- Ras/Raf/MAPK
- PI3K/AKT/mTOR

Ces voies vont stimuler la prolifération et vont avoir tendance à inhiber l'apoptose.

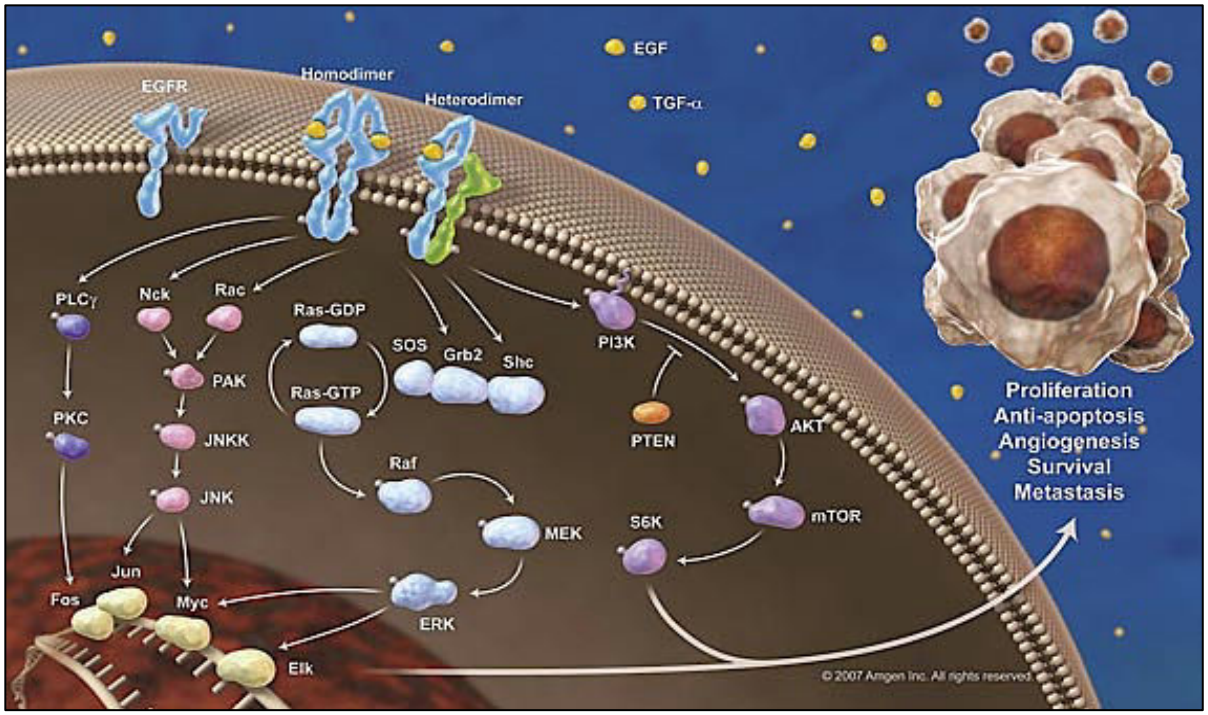


Figure 35: voie de signalisation EGFR (Amado, 2008)

Les données expérimentales suggèrent que la signalisation EGFR physiologique est impliquée dans l'homéostasie et le bon fonctionnement du système intestinal [195]. En effet, la signalisation EGFR contribue à l'intégrité et à la réponse aux dommages des muqueuses. Une étude de Miettinen et al a par exemple montré que des souris ne possédant pas le gène EGFR ont développé des entérocolites nécrosantes (NEC) [196] tandis qu' une autre a montré que la présence de ligand EGFR prévenait cette pathologie [197].

Les relations entre la signalisation EGFR et VEGF(R) dans le CRC peuvent être médiées par des signalisations autocrines et paracrines [198]. Les ligands EGFR sont à même de stimuler la production de VEGF dans différents modèles cellulaires [199, 200] alors que l'inhibition de la voie EGFR par un composé comme le cetuximab ou l'erlotinib est accompagnée d'une expression réduite de VEGF et d'une diminution de l'angiogenèse, au moins dans des modèles surexprimant EGFR [200-202]. La capacité du cetuximab (anticorps anti-EGFR) à atténuer l'expression du VEGF dans les cellules tumorales dans des conditions normoxiques ou hypoxiques se fait à travers la baisse d'expression de la protéine HIF-1α [203]. La surexpression de HIF-1α empêche la baisse d'expression du VEGF et confère une résistance à l'apoptose induite par le cetuximab [204]. Une exposition prolongée *in vivo* au cetuximab a vu l'émergence de résistance dans des xénogreffes de

carcinomes épidermoïdes. Un lien de causalité a relié la hausse de l'expression de VEGF au phénotype de résistance. En effet, la résistance *in vivo* à des anticorps dirigés contre l'EGFR a aussi été observée dans des cellules parentales transfectées avec un vecteur d'expression VEGF.

Sur la base de ces résultats, des inhibiteurs tyrosine kinase ou des anticorps monoclonaux ciblant l'EGFR ou VEGF(R) ont été combinés dans des modèles précliniques avec de bons résultats menant à de nombreux essais cliniques [144, 201, 205-209]. L'essai clinique le plus complet combinant des inhibiteurs EGFR et VEGF(R) a été réalisé chez des patients atteints de cancer du côlon métastatique. Une étude randomisée de patients atteints de CRC de stade avancé a révélé une activité encourageante de la combinaison de l'anticorps bevacizumab et cetuximab comparé aux patients traités uniquement avec cetuximab [210]. Cependant, des études plus récentes incluants presque1800 patients ont montré des résultats moins optimistes. L'essai CAIRO2 a montré que cette combinaison donnait des résultats inférieurs à ceux d'une chimiothérapie classique (FOLFOX avec bevacizumab) en terme de survie sans progression et de qualité de vie [211]. Des résultats similaires ont été observés dans l'essai clinique PACCE, dans lequel l'utilisation du bevacizumab en plus de la chimiothérapie avait été comparée au même traitement avec du panitumumab (anticorps anti-EGFR) [212]. Les raisons de ces résultats plutôt décevants sont assez difficiles à établir à cause d'un manque de données précliniques. Une des explications serait l'activité limitée des anticorps monoclonaux qui seraient incapables d'agir sur la signalisation de survie intracellulaire. Une autre possibilité serait que la combinaison des différents agents ait un effet cytotoxique nécessitant une diminution de la dose, réduisant ainsi l'efficacité du traitement.

III- EXPRESSION D'EGFR DANS LES CANCERS

Une dérégulation d'EGFR est souvent observée dans les tumeurs [213]. Cette protéine est notamment surexprimée dans 60 à 80% des cas de cancer colorectal (Tableau 6).

Tableau 7: Surexpression de l'EGFR dans les cancers

Cancers	Surexpression d'EGFR
CRC	60-80%
Epidermoïde de la tête et du cou	95-100%
Poumon	40-80%
Sein	15-90%
Ovaire	35-70%

Une surexpression du récepteur à l'EGF accompagnée de son activation va favoriser l'apparition de caractères cancéreux comme la croissance tumorale, la migration cellulaire, l'angiogenèse ou la résistance à l'apoptose. C'est cette surexpression d'EGFR qui justifie les thérapies anti-EGFR comme option thérapeutique. Cependant, les niveaux d'expression d'EGFR sont seulement rarement associé à une réponse à l'inhibition d'EGFR, en particulier pour le cancer du côlon métastatique [214-216].

IV- CIBLER LE RECEPTEUR EGFR

L'échec de certains essais cliniques a mis en lumière une influence génétique que ce soit au niveau des gènes *KRAS, BRAF* ou *PIK3CA.*

1) ANTI-EGFR ET STATUT KRAS

La mutation active *KRAS* est présente dans environ 40% des cancers colorectaux [217]. La majorité des mutations de *KRAS* (90-95%) se produit sur le codon 12 et 13 [218]. L'ASCO (American Society of Clinical Oncology) préconise un dépistage tumoral pour une mutation *KRAS* pour les patients candidats à une thérapie anti-EGFR. Les patients possédant une mutation sur le codon 12 ou 13 avec un CRC métastatique ne devraient pas recevoir de thérapie contenant

d'anticorps anti-EGFR [219]. Certaines remarques ont été émises sur le fait que les mutations *KRAS* pouvaient ne pas avoir de liens avec la résistance aux anticorps monoclonaux anti-EGFR. Ce point reste par ailleurs à être démontré plus amplement.

2) ANTI-EGFR ET STATUT BRAF

La mutation active *BRAF* est retrouvée en moyenne dans 5 à 10% des CRC métastatiques avec une mutation prédominante *V600E* [220]. Les mutations *BRAF* sont considérées comme un facteur pronostic négatif pour le patient. Des études ont cherché si un lien existait entre la mutation *BRAF* et l'échec/réussite d'une thérapie d'anticorps anti-EGFR. Il a été suggéré que cette mutation était associée à une absence de réponse ou à une réponse très inférieure aux anticorps monoclonaux (mAb) anti-EGFR comparé au *BRAF* non muté [221-223]. Une autre étude a montré qu'en dépit du statut *BRAF* muté, les patients étaient à même de bénéficier d'une thérapie de ce type (essai CRYSTAL et OPUS). Cependant, devant des résultats mitigés, l'utilisation en routine du statut *BRAF* n'est pas utilisée pour le cancer colorectal métastatique.

3) ANTI-EGFR ET LA VOIE DE SIGNALISATION PTEN

Plusieurs études tendent à dire qu'une mutation active sur le gène *PIK3CA* et/ou la perte d'expression de PTEN pourraient ne pas être corrélées à un bénéfice de traitement par mAb anti-EGFR [224]. Cependant, la taille de l'étude réalisée, le manque de standardisation du marquage histologique ainsi que l'analyse du spectre de mutations *PIK3CA* montre qu'une clarification serait nécessaire pour valider de tels résultats.

V- THERAPIE ANTI EGFR

La plupart des essais cliniques impliquant des inhibiteurs d'EGFR, que ce soit des anticorps monoclonaux ou des TKI (Tyrosine Kinase Inhibitor), n'ont pas été concluants. Cependant, de nouvelles molécules ont été développées et présentent un potentiel thérapeutique des plus intéressants.

1) CETUXIMAB (ERBITUX, MERCK)

Cetuximab est un anticorps monoclonal chimérique qui se lie spécifiquement à l'EGFR avec une forte affinité, empêchant tout ligand d'interagir avec ce récepteur. Il possède donc une affinité supérieure aux ligands TGF alpha et EGF et bloque la phosphorylation du récepteur [225] (Figure 38).

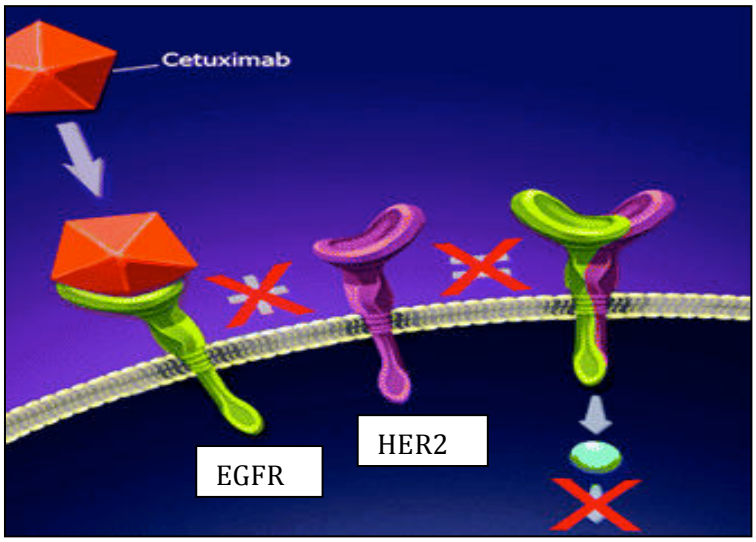


Figure 36: Activité du cetuximab (Bou-Assaly, 2010)

Des études précliniques ont montré que cet anticorps, par l'intermédiaire de l'inhibition EGFR, inhibe la voie de signalisation MAPK. Il existe une forte corrélation entre la concentration du composé nécessaire pour bloquer l'activation des MAPK et celle inhibant la prolifération cellulaire. Il y a de fortes raisons de penser que le cetuximab agit en provoquant l'internalisation du récepteur, réduisant ainsi le nombre de récepteurs disponibles à la surface cellulaire [226].

Dans le CRC, les essais cliniques de combinaison de cetuximab n'ont pas été très concluants. Les effets de la combinaison du cetuximab avec la capecitabine, l'oxaliplatine et le bevacizumab pour le cancer métastatique du côlon ont montré une

très légère survie sans progression avec une qualité de vie inférieure. La mutation du gène *KRAS* a été considérée dans cette étude comme un facteur prédictif du traitement [211].

2) TARCEVA (ERLOTINIB, ROCHE)

Tarceva est un inhibiteur tyrosine kinase qui cible l'activité kinase EGFR (Figure 39). Ce composé peut donc, en se fixant sur le récepteur, ralentir ou bloquer les signaux mitotiques et amener éventuellement la cellule à entrer en apoptose. Ce composé cible autant les cellules saines que les cellules tumorales.

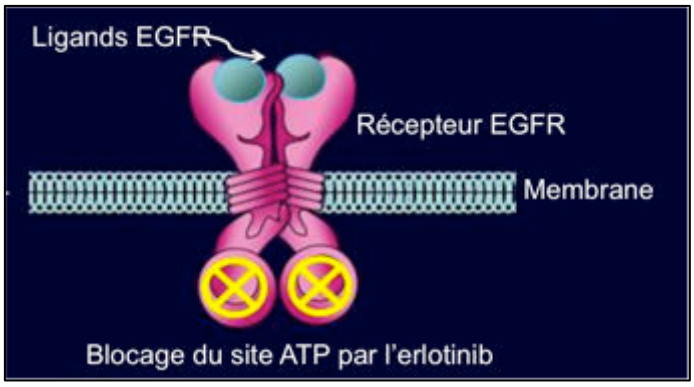


Figure 37: Mécanisme d'action Tarceva

Il est recommandé actuellement pour le traitement en première ligne du cancer du poumon, en thérapie de maintenance et en seconde et troisième thérapie des stades avancés de cancer du poumon non à petites cellules. Il est actuellement testé dans le cancer du côlon métastatique dans l'étude GERCOR DREAM.

3) GILOTRIF (AFATINIB, BOERHINGER INGELHEIM)

L'afatinib (Figure 42) a été conçu pour se lier de façon covalente et irréversible aux récepteurs tyrosine kinase de la famille HER.

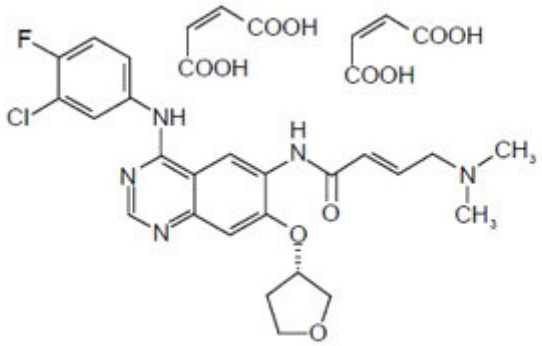


Figure 38 : Structure chimique Afatinib

Des essais *in vivo* ont été réalisés pour montrer l'efficacité du composé dans une série de modèles mutés pour le gène *EGFR* (conditions physiologiques dans le cancer du poumon mais pas dans le CRC). Le composé a aussi été testé dans des lignées insensibles à l'erlotinib. L'afatinib est supérieur à l'erlotinib dans tous les types de mutations et montre une forte activité causant une régression tumorale dans les adénocarcinomes murins [227]. Il est à noter que cet inhibiteur tyrosine kinase peut être utilisé en combinaison avec la rapamycine, un inhibiteur mTOR (mammalian Target Of Rapamycin), ce qui a pour effet une régression totale de la tumeur dans les modèles cancer du poumon [228]. L'afatinib est un inhibiteur tyrosine kinase des membres de la famille HER/ErbB potentiellement efficace dans les cancers dépendants de la signalisation EGFR/HER2. Cet inhibiteur de la voie EGFR, tout comme l'erlotinib, est utilisé dans le traitement de première ligne du cancer du poumon (NSCLC). L'essai clinique LUX-Lung 3 en 2011 a montré une amélioration de la médiane PFS de 4 mois ce qui constitue une amélioration majeur pour cette pathologie [229].

Voici en tableau 5 le récapitulatif des thérapies anti-EGFR/HER :

Tableau 8: Récapitulatif des thérapies enti-EGFR

Nom	Nature	Cible	Etude Clinique	AMM
Cetuximab	mAb	EGFR	• CAIRO2	• mCRC • Cancer de la tête et du cou
Tarceva	TKI	EGFR	• GERCOR DREAM mCRC	• mNSCLC
Gilotrif	TKI	HER family	• Lux Lung NSCLC	• Aucune

OBJECTIFS DES TRAVAUX

Le cancer colorectal est une pathologie majeure avec plus d'1,2 million de nouveaux cas chaque année. L'échec du traitement est lié à l'invasion et à la résistance aux drogues. Dans le CRC, les cellules tumorales sont la principale source de VEGF. De manière intéressante, les cellules de CRC expriment des récepteurs au VEGF à leur surface. De ce fait, les cancers colorectaux opèrent une signalisation VEGF autocrine et paracrine. Bien que l'influence d'inhibiteurs angiogéniques sur les cellules endothéliales associées à la tumeur aient déjà été grandement caractérisée, peu de choses sont connues sur le fonctionnement biologique et physiologique de la signalisation VEGF. C'est pour répondre à cette question que nous avons publié une revue.

Le but de ce travail de thèse a été de caractériser l'influence de la signalisation VEGF, particulièrement de la signalisation autocrine VEGF sur la biologie et la sensibilité/résistance aux médicaments anti-cancéreux des cellules de cancers colorectaux. Le but était donc de caractériser l'impact de la signalisation autocrine VEGF dans des modèles CRC avec une résistance innée au bevacizumab et de déterminer si un inhibiteur EGFR pouvait augmenter l'activité du bevacizumab.

1. Des modèles de CRC avec une résistance intrinsèque au bevacizumab montre une forte signalisation HIF-VEGF-VEGFR et sont sensibles à une petite molécule développée par Boerhinger Ingelheim : le nintedanib.

Beaucoup de patients atteints de CRC sont naturellement résistants au bevacizumab, un anticorps monoclonal ciblant le VEGF dans l'environnement tumoral. Pour l'instant, il n'y a pas d'éléments tangibles montrant que des tumeurs résistantes aux anticorps monoclonaux puissent être sensibles au traitement contenant des inhibiteur de récepteurs tyrosine kinases (RTK) comme le nintedanib, qui agissent sur la même voie de signalisation par inhibition de l'activité catalytique du récepteur VEGF. Nous avons voulu déterminer l'influence du bevacizumab et du nintedanib sur des modèles de souris xénogreffées avec différentes sensibilités au bevacizumab. De plus, nous avons souhaité déterminer l'influence de ces traitements sur la voie de signalisation VEGF.

L'ensemble des données obtenues est rapporté sous forme d'un article paru dans Oncotarget en 2014, sélectionné pour un commentaire éditorial dans

Oncoscience.

2. Combinaison du bevacizumab et d'inhibiteur EGFR : l'inhibition du VEGF est accompagné d'une activation d'EGFR dans des modèles de cancer colorectal indépendamment du statut KRAS supportant un rationnel pour la combinaison du bevacizumab et de l'erlotinib dans l'étude de phase III GERCOR DREAM.

Les voies de signalisation EGFR et VEGF(R) sont étroitement liées dans les modèles de CRC et le ciblage de ces deux voies montre au moins une activité synergique dans des modèles de CRC préclinique. Mes résultats indiquent que la combinaison du bevacizumab et d'une petite molécule ciblée anti-EGFR appelée erlotinib est significativement plus efficace que chacun des agents utilisés seuls dans des modèles de CRC avec différentes sensibilités au bevacizumab et de statuts KRAS. J'ai ensuite démontré que le bevacizumab activait la voie de signalisation EGFR comme cela avait déjà été décrit pour l'irinotécan et les irradiations ionisantes. Les résultats suggèrent que le statut mutant *KRAS* a une plus faible influence quand on utilise des TKIs anti-EGFR que lorsque l'on utilise des anticorps monoclonaux et que les cellules de CRC naturellement résistantes au bevacizumab peuvent être sensibles aux TKIs ciblant les mêmes voies de signalisation.

Mes résultats en cours de publication ont fourni les bases mécanistiques de l'étude positives DREAM, un essai clinique de phase III dirigé par les cliniciens de l'hôpital Saint Antoine dans lequel le bevacizumab est utilisé en combinaison avec l'erlotinib chez des patients CRC.

Curr Colorectal Cancer Rep (2013) 9:270–277
DOI 10.1007/s11888-013-0177-2

ADJUVANT THERAPY FOR COLON CANCERS (AB BENSON III AND A DE GRAMONT, SECTION EDITORS)

Functions and Clinical Implications of Autocrine VEGF Signaling in Colorectal Cancer

Annette K. Larsen · Aimery de Gramont · Virginie Poindessous · Anaïs Bouygues · Mériam Ayadi · Paul Mésange

Published online: 14 July 2013
© Springer Science+Business Media New York 2013

Abstract Vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling is linked to invasiveness and aggressive disease in colorectal cancer (CRC), and two VEGF-directed agents, bevacizumab and aflibercept, are currently approved for treatment of metastatic disease. CRC cells are a major source of VEGF that is secreted into the tumor environment where it can associate with VEGF receptors on neighboring endothelial cells thereby promoting tumor angiogenesis. In addition, the CRC cells express functional VEGF receptors giving rise to autocrine VEGF signaling. So far, the biological and clinical implications of autocrine VEGF signaling have attracted less attention than the classical paracrine VEGF signaling pathways. In this review we focus on the effect of autocrine VEGF signaling on the survival, invasion, and drug-resistance of CRC cells and on the prognostic value of expression of VEGF ligands and receptors in CRC patients. We then discuss the different factors associated with a therapeutic response to VEGF blockage and summarize future challenges.

Keywords Colorectal cancer · Vascular endothelial growth factor (VEGF) · Placental growth factor (PlGF) · Bevacizumab · Aflibercept · Paracrine signaling · Autocrine signaling · VEGFR1/Flt-1 · VEGFR2/Flk-1 · Migration · Invasion · 5-FU resistance · Hypoxia · Hypoxia-inducible factor (HIF) · AMP-activated protein kinase

A. K. Larsen (✉) · A. de Gramont · V. Poindessous · A. Bouygues · M. Ayadi · P. Mésange
Laboratory of Cancer Biology and Therapeutics, Saint-Antoine Research Center, Kourilsky Building 1st floor, Hôpital Saint-Antoine, 184 rue du Faubourg Saint-Antoine, 75571 Paris Cedex 12, France
e-mail: annette.larsen@upmc.fr

A. K. Larsen · A. de Gramont · V. Poindessous · A. Bouygues · M. Ayadi · P. Mésange
National Institute for Health and Medical Research (INSERM), U938, Paris, France

A. K. Larsen · A. de Gramont · V. Poindessous · A. Bouygues · M. Ayadi · P. Mésange
Pierre and Marie Curie University (UPMC), Paris, France

A. de Gramont
Department of Medical Oncology, Hôpital Saint-Antoine, Paris, France

M. Ayadi · P. Mésange
Université Paris Descartes, Paris 75006, France

Introduction

Neovascularization is required for growth of most solid tumors and for the dissemination of tumor cells to secondary sites. Vascular endothelial growth factor-A (hereafter called VEGF) is the best characterized mediator of tumor angiogenesis [1]. VEGF amplification is observed in a subset of colorectal cancer (CRC) patients and is associated with a remarkably aggressive disease characterized by a high incidence of vascular invasion [2•]. Therefore, in CRC, VEGF signaling is strongly linked to invasiveness and aggressive disease. Two VEGF-directed agents, bevacizumab (avastin) and aflibercept (VEGF-Trap), are approved for treatment of metastatic CRC patients. Bevacizumab is a recombinant humanized monoclonal antibody (mAb) that binds to all isoforms of human VEGF, thereby preventing receptor binding and activation. Aflibercept, a soluble decoy receptor based on VEGFR1 and VEGFR2 fused to a Fc segment of IgG1, binds to all isoforms of VEGF, and to VEGF-B and placental growth factor (PlGF), with high affinity [3]. These agents have excellent antitumor activity in some patients whereas other patients are refractory, for reasons not well understood. In colorectal cancer, the tumor cells are believed to be the principal source of VEGF, with the stromal component of relatively minor importance. Importantly, CRC cells also have VEGF receptors, so both autocrine and paracrine VEGF signaling is observed in CRC

(Fig. 1). Although the effect of angiogenesis inhibitors on tumor-associated endothelial cells has been extensively characterized, much less is known about the biological and clinical effects of autocrine VEGF signaling. In this review, we focus on the effect of autocrine VEGF signaling on the survival, invasion, and drug-resistance of CRC cells, and on the prognostic value of the expression of VEGF ligands and receptors in CRC patients. We then discuss the different factors associated with a therapeutic response to VEGF blockage and summarize future challenges.

VEGF Signaling

The VEGF family of factors consists of five related glycoproteins, VEGF-A, B, C, and D and PlGF. VEGF is coded by a single gene but is present in different isoforms because of variable splicing and proteolytic cleavage. The most abundant isoforms are VEGF165 and VEGF121, followed by VEGF189 and VEGF206. Although all VEGF isoforms act as dimers, they differ in their capacity to bind to heparin. VEGF121 is unable to bind heparin and is freely diffusible, VEGF165 has low heparin affinity whereas VEGF189 and VEGF206 have high heparin-affinity resulting in their accumulation in the extracellular matrix [4, 5]. VEGF-B and PlGF are also subject to variable splicing, resulting in the formation of different isoforms that differ in their capacity to bind heparin.

The VEGF ligands bind to three receptor tyrosine kinases, VEGFR1 (Flt-1), VEGFR2 (Flk-1/KDR), and VEGFR3, and to the neuropilins, membrane-associated co-receptors without tyrosine kinase activity [4, 5]. VEGF-B and PlGF bind exclusively to VEGFR1 whereas VEGF-A can bind to both VEGFR1 and VEGFR2. VEGF-C and VEGF-D bind to VEGFR3 and are involved in lymph angiogenesis [6].

Expression of VEGF Ligands and Receptors in CRC Cells and Tumors

There is general agreement that most, if not all, CRC cell lines express at least some VEGFR1 whereas there are conflicting data with regard to VEGFR2 [7••, 8 11, 12•]. Similar ambiguity exists for clinical studies, possibly because many investigators use their own antibodies rather than using commercial antibodies, which vary substantially. Also, some studies use antibodies directed against all forms of the receptor whereas others utilize antibodies that selectively detect the active, tyrosine phosphorylated form of the receptor.

An early study of 72 tumor samples and their corresponding normal tissues indicated that, at least at the mRNA level, both VEGFR1 and VEGF were upregulated in adenocarcinomas compared with the normal mucosa [13]. Immunohistochemical analysis of tissues from 82 CRC patients showed that expression of VEGF, VEGFR1, and VEGFR2 was significantly higher in tumor tissues than in the corresponding normal tissues [14]. In agreement, immunohistochemical analysis of VEGF, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGFR1, VEGFR2, and VEGFR3 in tissues from 387 mismatch repair-proficient CRC patients showed that all VEGF ligands and receptors were upregulated in tumor tissues compared with the corresponding normal tissues. However, only VEGFR1 expression was related to patient outcome whereas

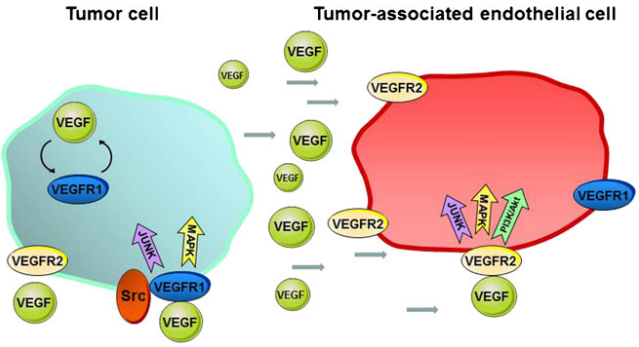


Fig. 1 VEGF signaling in colorectal cancer cells. CRC cells are a major source of VEGF that is secreted into the tumor environment. In the classical paracrine signaling pathway, tumor-derived VEGF associates with VEGF receptors on neighboring endothelial cells thereby inducing signaling pathways that promote endothelial cell survival, proliferation, and migration. These pathways include the Erk1/2 MAP kinase, JNK/SAPK, and PI3K-Akt pathways. In addition, the CRC cells express functional VEGF receptors giving rise to autocrine VEGF signaling. Activation of tumor-associated VEGFR1 is accompanied by activation of Erk1/2 MAP kinase, JNK/SAPK, and the Src family of non-receptor tyrosine kinases. Autocrine VEGF signaling in CRC cells promotes migration, invasion, survival, and anchorage-independent growth. In addition to the surface-associated receptors there is evidence of internal (intracrine) VEGF signaling in CRC cells (reviewed in Ref. [29])

a high VEGF/VEGFR2 ratio was linked to advanced TNM stage, but had no detectable effect on survival [15]. Similar analysis of tumor samples from 128 patients with stage II/III colorectal cancer revealed weak expression of phosphorylated VEGFR2 (pVEGFR2) in the normal mucosa, whereas pVEGFR2 was strongly expressed by the tumor cells and in the tumor-associated vasculature, in particular at the invading tumor edge. High expression of pVEGFR2 in the tumor vessels was correlated with high expression of VEGF and the hypoxia inducible factor HIF-1alpha in the tumor cells. Overall, the most significant predictors related to death were lympho-vascular invasion followed by VEGF expression, whereas pVEGFR2 expression was not correlated with survival [9]. A separate study reported that VEGFR1 was expressed by tumor cells and by stromal vessels in tissues from 91 patients with stage II/III disease whereas immunoreactive VEGFR2 and VEGFR3 were exclusively associated with the tumor vessels. Strong immunoreactivity of VEGFR1 was correlated with shorter post-operative survival whereas neither VEGFR2 nor VEGFR3 expression were correlated with survival [16]. Two studies with a limited number of patient samples confirm the presence of tumor cell-associated VEGFR1. In one study, strong heterogeneous expression of VEGFR1 was observed in the carcinoma cells whereas no VEGFR1 was detected in the surrounding normal colonic epithelium [7••]. A separate study detected faint VEGFR1 expression in eight of ten primary colon specimens but not in the nonmalignant surrounding mucosa. Interestingly, the same study reported strong VEGFR1 expression in six of nine evaluable liver metastases [8] suggesting that VEGFR1 expression may increase during tumor progression. Taken together, these studies suggest that VEGF ligands and receptors are usually upregulated in tumor tissues compared with the normal mucosa, that tumor cells express VEGFR1 and, possibly, VEGFR2, and that expression of VEGFR1, but not VEGFR2, may be related to survival of stage II/III colorectal cancer patients.

Expression and Function of Placental Growth Factor

PlGF is recognized by aflibercept and is the target for a wide range of therapeutic antibodies under clinical development. However, the published data regarding the function, regulation, and expression of PlGF are often conflicting. One explanation might be that the four PlGF splice forms (PlGF1–4) in humans may not be expressed in the same tissues or have similar biological activity. Other data are more difficult to explain. For example, it has been reported that expression of PlGF in CRC cell lines and tumor tissues is low because of hypermethylation of the PlGF promoter which is accompanied by transcriptional downregulation [17]. However, q-PCR and immunohistochemical analysis of 94 primary CRC tumors indicates that expression of the two PlGF isoforms, PlGF-1 and PlGF-2, is increased compared with background tissues [18]. In agreement, immunohistochemical analysis of PlGF expression in tissues from another 83 CRC patients revealed a significant correlation between PlGF expression and lymph node metastasis, tumor stage, and patient survival [19]. In patients with rectal cancer, plasma levels of PlGF and free VEGF were increased after bevacizumab treatment whereas exposure to classical cytotoxic agents had no effect [20]. In xenograft models, treatment with sFLT01, a fusion protein that neutralizes VEGF and PlGF caused a marked increase in circulating PlGF which principally represented a host response [21]. These results indicate that treatment with angiogenesis inhibitors affects expression and secretion of PlGF and VEGF by tumor and/or host cells. Currently, however, there are no conclusive data showing a clear correlation between circulating levels of VEGF ligands and tumor response to antiangiogenic therapy.

Interestingly, at least in the pre-eclamsia placenta, VEGF and PlGF are differentially regulated by oxygen. Under hypoxia, VEGF mRNA and protein are upregulated whereas PlGF mRNA and protein are decreased [22]. If these findings are applicable for CRC, one could speculate that the two VEGF ligands could have different effects during tumor development.

The effect of PlGF blockage on both physiological and pathological angiogenesis is also controversial, as illustrated by two articles published in the same issue of the journal "Cell", but with opposing conclusions [23, 24]. More recent results suggest that the efficiency of anti-PlGF treatment is strongly correlated with VEGFR1 expression in the tumor cells, but not with angiogenesis. Furthermore, PlGF induces VEGFR1 signaling and biological responses in tumor cell lines sensitive to anti-PlGF treatment, but not in refractory tumor cell lines or in endothelial cells [25•]. Therefore, current evidence suggests that the tumor cells and their associated VEGFR1 signaling pathways are the principal target of PlGF-directed therapy.

Autocrine VEGF Signaling

Attenuation of VEGF-A with siRNA in CRC cells increases apoptosis after 5-fluorouracil (5-FU) treatment whereas overexpression of VEGF165 increases the resistance to drug-induced apoptosis. Intriguingly, not only VEGF protein but also VEGF mRNA was biologically active. In particular, the 5′ non-coding region of VEGF mRNA (5′ UTR) was shown to have anti-apoptotic activity via upregulation of survival genes, for example *EGFR*, and downregulation of pro-apoptotic genes, for example *FAS* and *BAX*. When CRC cells stably expressing the 5′ UTR of VEGF, but not cells

expressing a mutant 5′ UTR, were implanted in nude mice, increased anchorage-independent growth in vitro and formation of progressive tumors were observed. Furthermore, tumors containing a functional 5′ UTR contained a significantly reduced fraction of apoptotic cells compared with tumors with the mutant 5′ UTR [26••]. These findings suggest that both VEGF protein and mRNA may promote the survival of CRC cells. In agreement, an independent study reported that VEGF downregulation by siRNA was accompanied by reduced proliferation and an increased rate of spontaneous apoptosis [14]. VEGF downregulation in two different CRC cell lines by homozygous VEGF deletion was accompanied by reduced cell viability and increased rates of spontaneous apoptosis when grown under low serum conditions, a form of cellular stress. Importantly, VEGF downregulation was also accompanied by increased sensitivity to 5-FU, as measured by the fraction of apoptotic cells. The increased apoptosis was associated with upregulation of the pro-apoptotic protein Bax and downregulation of the prosurvival mediator survivin. Interestingly, PlGF was elevated in the VEGF null cells, suggesting coordination between the expression levels of the two ligands [27].

Stimulation with VEGF or VEGF-B leads to a significant increase in the motility and invasiveness of CRC cells. VEGF signaling is associated with activation of Erk 1/2 (extracellular signal-regulated kinase) and c-Jun amino terminal kinase/stress activated protein kinase (JNK/SAPK), and translocation of the p65 subunit of nuclear factor-kappaB (NFkappaB) into the nucleus, but not with detectable Akt (*akt* oncogene protein kinase) activation. Blocking antibodies to VEGFR1 inhibited the phenotypic changes, clearly indicating crucial effect of VEGFR1 activity on VEGF-signaling [8]. Further studies revealed that both VEGF and VEGF-B activated the Src family kinases Src and Yes in CRC cells. This was accompanied by increased migration that was blocked by pharmacological inhibitors of VEGFR1 and Src kinase. VEGF treatment was characterized by enhanced formation of a VEGFR1/Src family kinase complex and increased tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase (FAK), p130 cas, and paxillin. These results suggest that VEGFR1 promotes migration of tumor cells through a Src-dependent pathway linked to activation of focal adhesion components [28]. An independent study confirmed the increased migratory activity of CRC cells after VEGF stimulation. Treatment with the pan-VEGFR inhibitor cediranib inhibited CRC cell migration and invasion and reduced VEGFR1 phosphorylation and activation of the downstream effector Erk1/2 [11]. Interestingly, stimulation with VEGF ligands has no detectable effect on CRC cell proliferation [8, 11, 28] although both VEGF and VEGF-B can potentiate colony formation in soft agar, suggesting a positive effect of VEGF signaling in the promotion of anchorage-independent growth [8].

Because most solid tumors are of epithelial origin, the epithelial–mesenchymal transition (EMT) has attracted much attention as a likely mediator of carcinoma progression. EMT is associated with a range of molecular and phenotypic changes that reduce cell–cell interactions and increase motility. To characterize CRC-associated EMT, a spheroid culture system that mimics the structure of the colonic epithelium was developed. These structures undergo EMT in response to cytokine stimulation by TNFalpha and TGFbeta [7••]. EMT induction was accompanied by increased cellular dispersion and migration and by increased expression of VEGF and VEGFR1, but not of PlGF or VEGFR2. Perturbation of VEGFR1 function caused selective apoptosis of cells that had undergone EMT. Subsequent studies showed that VEGFR1 function was critical for the survival of several invasive colon carcinoma cell lines [7••]. These results suggest that VEGFR1 mediates a survival signal that is crucial to the viability of disperse and invasive CRC cells that no longer benefit from homotypic cell–cell contact.

Regulation of VEGF Ligands and Receptors, and Their Cross-Talk with Other Signaling Pathways

HIF Signaling

VEGF can be upregulated by oncogene and integrin activation and by cytokine stimulation [27]. However, for most tumors, it is likely the tumor environment which has the greatest effect on VEGF expression. Cellular VEGF levels are upregulated by hypoxia and glucose deficiency in multicellular spheroids [30] and in solid tumors [31]. Subsequent studies have shown that transcriptional upregulation of VEGF is mediated via HIF-1 [32] and HIF-2 [33]. HIFs are heterodimeric proteins composed of an oxygen-regulated HIF-α subunit (HIF-1α or HIF-2α) and the ubiquitous aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT/HIF-β) subunit. Under hypoxia, HIF-α is stabilized, recruits the p300/CBP transcriptional coactivator and ARNT, and binds to the hypoxia-response element (HRE) in enhancers or promoters, for example VEGF, carbonic anhydrase IX (CAIX) and the glucose transporter GLUT1, to initiate the transcription of numerous hypoxia-inducible genes that promote angiogenesis, anaerobic metabolism, and cellular survival [34]. Importantly, both hypoxia and hypoglycemia affect the mRNA stability of at least some HIF-target genes. Under non-stressed conditions, VEGF and GLUT1 mRNA have a relatively short half-life of approximately 30 min which is extended up to eightfold when cells are deprived of oxygen or glucose [35]. The increased stability of VEGF mRNA is, at least in part, mediated by the AMP-activated protein kinase (AMPK) and is coupled to the JNK/SAPK signaling

pathway. This is consistent with the known function of AMPK as a cellular sensor of ATP which promotes cell survival in response to energy stress.

Interestingly, it has been reported that VEGFR1, but not VEGFR2, also contains an HIF-consensus binding side in its promoter, resulting in direct VEGFR1 upregulation under hypoxia [36]. In apparent contrast, hypoxia-induced upregulation of VEGFR2 has been observed in embryonic stem cells [37] and in different models of experimental ischemia [38, 39]. These findings suggest that both VEGFR1 and VEGFR2 can be upregulated by hypoxia, although further investigation of the underlying mechanisms is needed.

P53

The oncogene suppressor protein p53 is activated by different types of cellular stress, including hypoxia, and is accompanied by altered expression of a wide range of target genes [40]. Until recently, there was no clear link between the VEGF and the p53 signaling pathways. However, recent findings suggest that up to 6 % of the population have a C to T single nucleotide polymorphism (SNP) upstream of the transcriptional start site for VEGFR1, thereby creating a putative p53 response element. Subsequent studies showed that only the promoter with the T SNP was responsive to p53 when examined with reporter assays or by endogenous gene expression analysis. These results show that p53 can differentially stimulate transcription via a polymorphic variant of the VEGFR1 promoter and link VEGF signaling to the p53 stress-response network in some humans [41].

Wnt/beta-catenin

The Wnt/beta-catenin signaling cascade is a key regulator of development. In addition, Wnt/beta-catenin dysregulation is strongly associated with some tumor types by abnormal activation of Wnt target genes via beta-catenin-mediated transcription. Recent results indicate that components of the Wnt/beta-catenin signaling pathway are modified in 93 % of CRC. Although 16 different *wnt* pathway genes can be altered, the most common alterations were biallelic inactivation of the APC tumor suppressor plus activating mutations of beta-catenin, which was observed in 80 % of cases [42•]. Beta-catenin is a transcriptional regulator of VEGF expression. This activity is mediated via the capacity of β-catenin to modulate chromatin looping near the VEGF-A gene, thereby facilitating the recruitment and assembly of transcription complexes [43]. Unexpectedly, VEGFR1 was identified as a positive regulator of Wnt signaling that functions in a glycogen synthase kinase-3beta (GSK3beta)-independent manner [44•]. These results indicate there is intensive cross-talk between VEGF signaling and the Wnt/beta-catenin pathway in colon cancer which may contribute to the sensitivity of this tumor type of angiogenesis inhibition.

EGFR Signaling

Extensive cross-talk between the VEGF(R) and EGFR signaling pathways in CRC can be mediated via both autocrine and paracrine signaling (reviewed in Ref. [29]). EGFR ligands are able to stimulate production of VEGF in different cellular models [45, 46] whereas EGFR pathway inhibition by cetuximab, gefitinib, or erlotinib is accompanied by reduced VEGF expression and attenuation of angiogenesis [47–49]. The capacity of cetuximab to attenuate VEGF expression in tumor cells under both normoxia and hypoxia is mediated, at least in part, via downregulation of HIF-1α at the protein level [47]. In agreement, overexpression of HIF-1α prevents VEGF downregulation and confers resistance to cetuximab-induced apoptosis [50]. Prolonged in vivo exposure of EGFR-responsive A431 xenografts to cetuximab was accompanied by development of resistant variants. Five of six of these variants expressed increased levels of VEGF which paralleled an increase in angiogenic potential in vitro and tumor angiogenesis in vivo. Importantly, the increased VEGF expression was causally associated with the resistant phenotype, because in vivo resistance to EGFR-directed antibodies was also observed for parental cells transfected with a VEGF expression vector [51••].

On the basis of these results, different EGFR and VEGF(R)-targeting tyrosine kinase inhibitors or monoclonal antibodies have been combined in preclinical models, with encouraging results [12•, 48, 52–56], thereby providing a rationale for clinical trials. However, it should be noted that the combination which eventually went into large-scale clinical trials, the combination of bevacizumab, cetuximab or panitumumab, and cytotoxic agents, entered the clinic directly without previous testing in preclinical models [57].

The most extensive clinical trials of joint EGFR and VEGF (R) targeting have been conducted on patients with metastatic colorectal cancer. A randomized study of CRC patients with advanced disease (the BOND2 trial) revealed promising activity of cetuximab plus bevacizumab compared with historical control patients treated with cetuximab alone [58]. However, two more recent studies of almost 1800 patients were disappointing. The CAIRO2 study reported that addition of cetuximab to bevacizumab and chemotherapy gave inferior results, in terms of progression-free survival and quality of life, compared with bevacizumab and chemotherapy alone [59]. Similar findings were reported in the PACCE trial, in which bevacizumab plus chemotherapy was compared with the same regimen plus panitumumab [60]. The reason for these disappointing clinical findings is difficult to establish, because of the lack of preclinical data for this combination, not only with regard to the two mAbs and, but even more so, for the combination of the mAbs with chemotherapy. One explanation for the limited activity could be that the mAbs are unable to effect intracellular survival signaling. Another possibility is that the combination of targeted agents and cytotoxics have pronounced toxic side

effects which necessitate dose reduction, thereby reducing the efficacy of the treatment.

Angiogenesis Inhibition and CRC Cell Survival

Angiogenesis inhibition initiates a positive VEGF feedback loop within the tumor. Vascular pruning and the accompanying diminution in blood supply leads to increased tumor hypoxia, thereby inducing compensatory pathways that include increased VEGF production. In agreement with this, an increasing number of results suggest that a clinical response to angiogenesis inhibitors depends both on the depletion of the tumor microvasculature and the tumor response to the ensuing hypoxia [61]. The most important survival factors produced by the stressed, hypoxic tumors are likely to be those produced by HIF and HIF-regulated genes, for example VEGF. Both VEGF protein and mRNA are able to promote survival of tumor cells under stress such as hypoxia [26••, 27, 62]. Another HIF-regulated gene, carbonic anhydrase IX (CAIX), is also upregulated in CRC xenografts after bevacizumab treatment and seems to promote cell survival, because CAIX knockdown will enhance the effect of bevacizumab treatment [63].

A recent study combined histological and imaging analysis of tumor-bearing animals treated with bevacizumab. The results showed that VEGF blockage was accompanied by marked depletion of glucose and ATP levels in the tumor xenografts. Although bevacizumab reduced microvessel density, increased tumor hypoxia, and induced HIF-1alpha in all xenograft models, tumor size reduction was only observed for the highly glycolytic ("glucose-addicted") tumors and was accompanied by the formation of large necrotic areas within the tumors [64••]. As mentioned above, AMPK is a cellular sensor that is activated by energy stress and contributes to maintaining adequate levels of intracellular ATP. VEGF blockage was accompanied by strong AMPK activation in glucose-addicted tumors which promoted cellular survival, because AMPK silencing was accompanied by a marked increase in glucose consumption, lactate production and increased tumor necrosis after VEGF blockage. Taken together, these studies suggest that a therapeutic response to antiangiogenic therapy depends on multiple factors including, but not limited to, reduction of the microvascular density, the capacity of the tumor to produce survival factors in response to hypoxia and glucose stress, the glycolytic phenotype of the tumor, and the capacity to upregulate the energy sensor AMPK.

Conclusions

Current evidence suggests that autocrine VEGF signaling is important in the survival, migration, invasion, and chemoresistance of colorectal cancer cells. Immunohistochemical analysis of patient tumors reveals that VEGF ligands and receptors are upregulated in tumor tissues compared with the normal mucosa and that CRC cells express functional VEGFR1 and, most likely, VEGFR2. However, only VEGFR1 expression seems to be correlated with the survival of stage II/III colorectal cancer patients. A therapeutic response to antiangiogenic therapy depends on several factors including, but not limited to, reduction of the microvascular density, the capacity of the tumor to produce survival factors in response to hypoxia and glucose deprivation, the glycolytic phenotype of the tumor, and its capacity to upregulate AMP-activated protein kinase. Future challenges include the identification of functional biomarkers able to identify patients particularly likely, or not, to benefit from VEGF-directed therapy and to clarify the clinical situations in which targeting of multiple VEGF ligands rather than selective VEGF-A targeting would be beneficial. VEGFR1 is emerging as an attractive prognostic biomarker for stage II/III patients but will require further validation. Use of VEGF-targeted agents in adjuvant treatment remains an attractive option but will depend on the development of novel scheduling regimens different from those currently used to treat metastatic disease.

Acknowledgments This work was supported in part by Fondation Université Pierre et Marie Curie. Paul Mésange is a Mouna Nasrallah scholar.

Compliance with Ethics Guidelines

Conflict of Interest Annette K. Larsen is supported by research grants from Roche and Boehringer–Ingelheim; has received compensation from Sanofi–Aventis for the development of educational presentations; and has received reimbursement from Boehringer–Ingelheim for travel, accommodation, and meeting expenses.

Aimery de Gramont has received compensation from Sanofi–Aventis and Roche for serving as a board member and for lectures, including service on speakers bureaus.

Virginie Poindessous declares that she has no conflict of interest.

Anaïs Bouygues declares that she has no conflict of interest.

Mériam Ayadi declares that she has no conflict of interest.

Paul Mésange declares that he has no conflict of interest.

Human and Animal Rights and Informed Consent This article does not contain any studies with human or animal subjects performed by any of the authors.

References

Papers of particular interest, published recently, have been highlighted as:

- • Of importance
- •• Of major importance

1. Chung AS, Lee J, Ferrara N. Targeting the tumour vasculature: insights from physiological angiogenesis. Nat Rev Cancer. 2010;10:505–14.
2. • Vlajnic T, Andreozzi MC, Schneider S, et al. VEGFA gene locus (6p12) amplification identifies a small but highly aggressive

subgroup of colorectal cancer [corrected] patients. Mod Pathol. 2011;24:1404–12. *The authors show that VEGF amplification in patients with colorectal cancer is associated with a remarkably aggressive disease characterized by a high incidence of vascular invasion.*
3. Papadopoulos N, Martin J, Ruan Q, et al. Binding and neutralization of vascular endothelial growth factor (VEGF) and related ligands by VEGF Trap, ranibizumab and bevacizumab. Angiogenesis. 2012;15:171–85.
4. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. Nat Med. 2003;9:669–76.
5. Cross MJ, Dixelius J, Matsumoto T, et al. VEGF-receptor signal transduction. Trends Biochem Sci. 2003;28:488–94.
6. Alitalo K, Carmeliet P. Molecular mechanisms of lymphangiogenesis in health and disease. Cancer Cell. 2002;1:219–27.
7. •• Bates RC, Goldsmith JD, Bachelder RE, et al. Flt-1-dependent survival characterizes the epithelial-mesenchymal transition of colonic organoids. Curr Biol. 2003;13:1721–7. *This article identifies VEGFR1 as a survival factor for invasive CRC cells and demonstrates its expression in tumor cells from patients with colorectal cancer.*
8. Fan F, Wey JS, McCarty MF, et al. Expression and function of vascular endothelial growth factor receptor-1 on human colorectal cancer cells. Oncogene. 2005;24:2647–53.
9. Giatromanolaki A, Koukourakis MI, Sivridis E, et al. Activated VEGFR2/KDR pathway in tumour cells and tumour associated vessels of colorectal cancer. Eur J Clin Invest. 2007;37:878–86.
10. Calvani M, Trisciuoglio D, Bergamaschi C, et al. Differential involvement of vascular endothelial growth factor in the survival of hypoxic colon cancer cells. Cancer Res. 2008;68:285–91.
11. Morelli MP, Brown AM, Pitts TM, et al. Targeting vascular endothelial growth factor receptor-1 and -3 with cediranib (AZD2171): effects on migration and invasion of gastrointestinal cancer cell lines. Mol Cancer Ther. 2009;8:2546–58.
12. • Poindessous V, Ouaret D, El Ouadrani K, et al. EGFR- and VEGF(R)-targeted small molecules show synergistic activity in colorectal cancer models refractory to combinations of monoclonal antibodies. Clin Cancer Res. 2011;17:6522–30. *This work shows that joint targeting of VEGF(R) and EGFR by two small molecules inhibits intracrine signaling and is more effective than combinations of two monoclonal antibodies targeting the same pathways.*
13. André T, Kotelevets L, Vaillant JC, et al. Vegf, Vegf-B, Vegf-C and their receptors KDR, FLT-1 and FLT-4 during the neoplastic progression of human colonic mucosa. Int J Cancer. 2000;86:174–81.
14. Yin Y, Cao LY, Wu WQ, et al. Blocking effects of siRNA on VEGF expression in human colorectal cancer cells. World J Gastroenterol. 2010;16:1086–92.
15. Eppenberger M, Zlobec I, Baumhoer D, et al. Role of the VEGF ligand to receptor ratio in the progression of mismatch repair-proficient colorectal cancer. BMC Cancer. 2010;10:93.
16. Okita NT, Yamada Y, Takahari D, et al. Vascular endothelial growth factor receptor expression as a prognostic marker for survival in colorectal cancer. Jpn J Clin Oncol. 2009;39:595–600.
17. Xu L, Jain RK. Down-regulation of placenta growth factor by promoter hypermethylation in human lung and colon carcinoma. Mol Cancer Res. 2007;5:873–80.
18. Escudero-Esparza A, Martin TA, Davies ML, et al. PGF isoforms, PLGF-1 and PGF-2, in colorectal cancer and the prognostic significance. Cancer Genomics Proteomics. 2009;6:239–46.
19. Sung CY, Son MW, Ahn TS, et al. Expression of placenta growth factor in colorectal carcinomas. J Korean Soc Coloproctol. 2012;28:315–20.
20. Willett CG, Duda DG, di Tomaso E, et al. Efficacy, safety, and biomarkers of neoadjuvant bevacizumab, radiation therapy, and fluorouracil in rectal cancer: a multidisciplinary phase II study. J Clin Oncol. 2009;27:3020–6.
21. Bagley RG, Ren Y, Weber W, et al. Placental growth factor upregulation is a host response to antiangiogenic therapy. Clin Cancer Res. 2011;17:976–88.
22. Munaut C, Lorquet S, Pequeux C, et al. Hypoxia is responsible for soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1) but not for soluble endoglin induction in villous trophoblast. Hum Reprod. 2008;23:1407–15.
23. Bais C, Wu X, Yao J, et al. PlGF blockade does not inhibit angiogenesis during primary tumor growth. Cell. 2010;141:166–77.
24. Van de Veire S, Stalmans I, Heindryckx F, et al. Further pharmacological and genetic evidence for the efficacy of PlGF inhibition in cancer and eye disease. Cell. 2010;141:178–90.
25. • Yao J, Wu X, Zhuang G, et al. Expression of a functional VEGFR-1 in tumor cells is a major determinant of anti-PlGF antibodies efficacy. Proc Natl Acad Sci USA. 2011;108:11590–5. *This study indicates that effective PlGF-directed therapy is linked to inhibition of VEGFR1 signaling in the tumor cells rather than to inhibition of tumor angiogenesis.*
26. •• Masuda K, Teshima-Kondo S, Mukaijo M, et al. A novel tumor-promoting function residing in the 5′ non-coding region of vascular endothelial growth factor mRNA. PLoS Med. 2008;5:e94. *This pivotal study revealed an important effect of VEGF on tumor cell survival mediated by both VEGF mRNA and VEGF protein.*
27. Samuel S, Fan F, Dang LH, et al. Intracrine vascular endothelial growth factor signaling in survival and chemoresistance of human colorectal cancer cells. Oncogene. 2011;30:1205–12.
28. Lesslie DP, Summy JM, Parikh NU, et al. Vascular endothelial growth factor receptor-1 mediates migration of human colorectal carcinoma cells by activation of Src family kinases. Br J Cancer. 2006;94:1710–7.
29. Larsen AK, Ouaret D, El Ouadrani K, et al. Targeting EGFR and VEGF(R)pathway cross-talk in tumor survival and angiogenesis. Pharmacol Ther. 2011;131:80–90.
30. Shweiki D, Neeman M, Itin A, et al. Induction of vascular endothelial growth factor expression by hypoxia and by glucose deficiency in multicellspheroids: implications for tumor angiogenesis. Proc Natl Acad Sci USA. 1995;92:768–72.
31. Maxwell PH, Dachs GU, Gleadle JM, et al. Hypoxia-inducible factor-1 modulates gene expression in solid tumors and influences both angiogenesis and tumor growth. Proc Natl Acad Sci USA. 1997;94:8104–9.
32. Carmeliet P, Dor Y, Herbert JM, et al. Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. Nature. 1998;394:485–90.
33. Hu CJ, Sataur A, Wang L, et al. The N-terminal transactivation domain confers target gene specificity of hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha. Mol Biol Cell. 2007;18:4528–42.
34. Semenza GL. Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. Cell. 2012;148:399–408.
35. Stein I, Neeman M, Shweiki D, et al. Stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by hypoxia and hypoglycemia and coregulation with other ischemia-induced genes. Mol Cell Biol. 1995;15:5363–8.
36. Gerber HP, Condorelli F, Park J, et al. Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes. Flt-1, but not Flk-1/KDR, is up-regulated by hypoxia. J Biol Chem. 1997;272:23659–67.
37. Han Y, Kuang SZ, Gomer A, et al. Hypoxia influences the vascular expansion and differentiation of embryonic stem cell cultures through the temporal expression of vascular endothelial growth factor receptors in an ARNT-dependent manner. Stem Cells. 2010;28:799–809.
38. Suzuma K, Takagi H, Otani A, et al. KDR/Flk-1 (VEGFR-2) in murine model of ischemia-induced retinal neovascularization. Microvasc Res. 1998;56:183–91.

39. Kanellis J, Paizis K, Cox AJ, et al. Renal ischemia-reperfusion increases endothelial VEGFR-2 without increasing VEGF or VEGFR-1 expression. Kidney Int. 2002;61:1696–706.
40. Graeber TG, Peterson JF, Tsai M, et al. Hypoxia induces accumulation of p53 protein, but activation of a G1-phase checkpoint by low-oxygen conditions is independent of p53 status. Mol Cell Biol. 1994;14:6264–77.
41. Menendez D, Krysiak O, Inga A, et al. A SNP in the flt-1 promoter integrates the VEGF system into the p53 transcriptional network. Proc Natl Acad Sci USA. 2006;103:1406–11.
42. • Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. Nature. 2012;487:330–7. *This multi-center study provided novel insight into genetic alterations associated with colorectal cancer.*
43. Hwang I, Kim J, Jeong S. β-Catenin and peroxisome proliferator-activated receptor-δ coordinate dynamic chromatin loops for the transcription of vascular endothelial growth factor A gene in colon cancer cells. J Biol Chem. 2012;287:41364–73.
44. • Naik S, Dothager RS, Marasa J, et al. Vascular endothelial growth factor receptor-1 is synthetic lethal to aberrant {beta}-catenin activation in colon cancer. Clin Cancer Res. 2009;15:7529–37. *This study revealed that functional VEGFR1 is a positive mediator of the wnt/beta-catenin pathway in colorectal cancer cells.*
45. Goldman CK, Kim J, Wong WL, et al. Epidermal growth factor stimulates vascular endothelial growth factor production by human malignant glioma cells: a model of glioblastoma multiforme pathophysiology. Mol Biol Cell. 1993;4:121–33.
46. Detmar M, Brown LF, Claffey KP, et al. Overexpression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and its receptors in psoriasis. J Exp Med. 1994;180:1141–6.
47. Petit AM, Rak J, Hung MC, et al. Neutralizing antibodies against epidermal growth factor and ErbB-2/neu receptor tyrosine kinases down-regulate vascular endothelial growth factor production by tumor cells in vitro and in vivo: angiogenic implications for signal transduction therapy of solid tumors. Am J Pathol. 1997;151:1523–30.
48. Ciardiello F, Bianco R, Damiano V, et al. Antiangiogenic and antitumor activity of anti-epidermal growth factor receptor C225 monoclonal antibody in combination with vascular endothelial growth factor antisense oligonucleotide in human GEO colon cancer cells. Clin Cancer Res. 2000;6:3739–47.
49. Pore N, Jiang Z, Gupta A, et al. EGFR tyrosine kinase inhibitors decrease VEGF expression by both hypoxia-inducible factor (HIF)-1-independent and HIF-1-dependent mechanisms. Cancer Res. 2006;66:3197–204.
50. Li X, Lu Y, Liang K, et al. Requirement of hypoxia-inducible factor-1alpha down-regulation in mediating the antitumor activity of the anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody cetuximab. Mol Cancer Ther. 2008;7:1207–17.
51. •• Viloria-Petit A, Crombet T, Jothy S, et al. Acquired resistance to the antitumor effect of epidermal growth factor receptor-blocking antibodies in vivo: a role for altered tumor angiogenesis. Cancer Res. 2001;61:5090–101. *This study provides evidence of a close link between EGFR signaling and VEGF secretion which has important therapeutic implications.*
52. Shaheen RM, Ahmad SA, Liu W, et al. Inhibited growth of colon cancer carcinomatosis by antibodies to vascular endothelial and epidermal growth factor receptors. Br J Cancer. 2001;85:584–9.
53. Sini P, Wyder L, Schnell C, et al. The antitumor and antiangiogenic activity of vascular endothelial growth factor receptor inhibition is potentiated by ErbB1 blockade. Clin Cancer Res. 2005;11:4521–32.
54. Yokoi K, Thaker PH, Yazici S, et al. Dual inhibition of epidermal growth factor receptor and vascular endothelial growth factor receptor phosphorylation by AEE788 reduces growth and metastasis of human colon carcinoma in an orthotopic nude mouse model. Cancer Res. 2005;65:3716–25.
55. Tonra JR, Deevi DS, Corcoran E, et al. Synergistic antitumor effects of combined epidermal growth factor receptor and vascular endothelial growth factor receptor-2 targeted therapy. Clin Cancer Res. 2006;12:2197–207.
56. Naumov GN, Nilsson MB, Cascone T, et al. Combined vascular endothelial growth factor receptor and epidermal growth factor receptor (EGFR) blockade inhibits tumor growth in xenograft models of EGFR inhibitor resistance. Clin Cancer Res. 2009;15:3484–94.
57. Punt CJ, Tol J. More is less—combining targeted therapies in metastatic colorectal cancer. Nat Rev Clin Oncol. 2009;6:731–3.
58. Saltz LB, Lenz HJ, Kindler HL, et al. Randomized phase II trial of cetuximab, bevacizumab, and irinotecan compared with cetuximab and bevacizumab alone in irinotecan-refractory colorectal cancer: the BOND-2 study. J Clin Oncol. 2007;25:4557–61.
59. Tol J, Koopman M, Cats A, et al. Chemotherapy, bevacizumab, and cetuximab in metastatic colorectal cancer. N Engl J Med. 2009;360:563–72.
60. Hecht JR, Mitchell E, Chidiac T, et al. A randomized phase IIIB trial of chemotherapy, bevacizumab, and panitumumab compared with chemotherapy and bevacizumab alone for metastatic colorectal cancer. J Clin Oncol. 2009;27:672–80.
61. Selvakumaran M, Yao KS, Feldman MD, et al. Antitumor effect of the angiogenesis inhibitor bevacizumab is dependent on susceptibility of tumors to hypoxia-induced apoptosis. Biochem Pharmacol. 2008;75:627–38.
62. Barr MP, Bouchier-Hayes DJ, Harmey JJ. Vascular endothelial growth factor is an autocrine survival factor for breast tumour cells under hypoxia. Int J Oncol. 2008;32:41–8.
63. McIntyre A, Patiar S, Wigfield S, et al. Carbonic anhydrase IX promotes tumor growth and necrosis in vivo and inhibition enhances anti-VEGF therapy. Clin Cancer Res. 2012;18:3100–11.
64. •• Nardo G, Favaro E, Curtarello M, et al. Glycolytic phenotype and AMP kinase modify the pathologic response of tumor xenografts to VEGF neutralization. Cancer Res. 2011;71:4214–25. *The investigators combined imaging and immunohistochemistry to demonstrate that the antitumor effects of angiogenesis inhibition depend, in part, on the metabolic phenotype of the cancer cells.*

ARTICLE N°1

www.impactjournals.com/oncotarget/ Oncotarget, Advance Publications 2013

Intrinsic bevacizumab resistance is associated with prolonged activation of autocrine VEGF signaling and hypoxia tolerance in colorectal cancer cells and can be overcome by nintedanib, a small molecule angiokinase inhibitor.

Paul Mésange[1,2,3,4], Virginie Poindessous[1,2,3], Michèle Sabbah[1,2,3], Alexandre E. Escargueil[1,2,3], Aimery de Gramont[1,2,3,5] and Annette K. Larsen[1,2,3]

[1] Cancer Biology and Therapeutics, Centre de Recherche Saint-Antoine

[2] Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U938, Paris, France

[3] Université Pierre et Marie Curie, Paris, France

[4] Universite Paris Descartes, Paris, France

[5] Department of Medical Oncology, Hôpital Saint-Antoine, Paris, France

Correspondence to: *Annette K. Larsen*, ***email***: *annette.larsen@upmc.fr*

Keywords: resistance, angiogenesis inhibition, vascular endothelial growth factor (VEGF)-signaling, hypoxia, bevacizumab, ninte-danib,

Received: *December 9, 2013* ***Accepted***: *January 18, 2014* ***Published***: *January 20, 2014*

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

ABSTRACT:

Colorectal cancer (CRC) is a common tumor type with a high mortality rate, in part due to intrinsic drug resistance. Although bevacizumab, a VEGF-directed neutralizing antibody, is particularly active in this pathology, some patients never respond for reasons not well understood. We here wish to clarify the role of autocrine VEGF signaling in the response of CRC cells to angiogenesis inhibition. Our results show that CRC cells with intrinsic bevacizumab-resistance displayed pronounced upregulation of autocrine HIF-VEGF-VEGFR signaling in response to prolonged bevacizumab exposure whereas the same signaling pathway was downregulated in bevacizumab-sensitive xenografts. Importantly, both bevacizumab-sensitive and -resistant CRC xenografts were sensitive to nintedanib, a small molecule angiokinase inhibitor, which was associated with inhibition of mTORC1. *In vitro* studies revealed that bevacizumab-resistant cells displayed intrinsically higher HIF-VEGF signaling intensity and hypoxia tolerance compared to their bevacizumab-sensitive counterparts. Interestingly, although nintedanib showed comparable activity toward bevacizumab-sensitive cells under normoxia and hypoxia, the drug was three-fold more toxic to the resistant cells under hypoxia, suggesting that nintedanib attenuated the survival signaling that usually protects these cells from hypoxia-mediated cell death. In conclusion, our findings support a role for autocrine VEGF signaling in the survival of CRC cells to hypoxia and thus to angiogenesis inhibition. We further show that nintedanib, a small molecule angiokinase inhibitor, is active toward CRC models with intrinsic bevacizumab resistance supporting clinical trials of nintedanib in patients that do not respond to bevacizumab, alone or in combination with bevacizumab to increase angiogenesis inhibition.

INTRODUCTION

Neovascularization (sprouting angiogenesis) is required for the growth of most solid tumors and facilitates the spread of tumor cells to secondary sites [1] providing a rational basis for the clinical use of angiogenesis inhibitors. Vascular endothelial growth factor A (hereafter referred to as VEGF) is a key regulator of angiogenesis. Amplification of the VEGF locus is observed in a subset of patients with metastatic colorectal cancer (mCRC)

and is associated with a remarkably aggressive disease characterized by a high incidence of vascular invasion [2]. Recent data from more than 2000 mCRC patients indicate that high baseline plasma levels of VEGF might be a negative prognostic factor for both progression-free survival (PFS) and overall survival (OS) [3]. Therefore, VEGF signaling is linked to invasiveness and aggressive disease in CRC and appears as an attractive therapeutic target.

Several VEGF(R)-targeted agents are approved or are undergoing clinical trials for treatment of CRC. Bevacizumab (avastin), a VEGF-neutralizing monoclonal antibody [4], was the first angiogenesis inhibitor to be approved and represents the current benchmark. Although bevacizumab shows excellent activity in some patients, others never respond, for reasons not well understood. Nintedanib (BIBF 1120) is a small molecule tyrosine kinase inhibitor that inhibits several angiokinases including VEGFR1/Flt1, VEGFR2/Flk1/KDR and VEGFR3/Flt4 as well as FGFR1, FGFR2, FGFR3, PDGFR-alpha, PDGFR-beta and Flt3 [5]. Nintedanib is currently in phase III clinical trials in ovarian and non-small cell lung cancer (NSCLC), where it has been successful in combination with taxotere [6].

Although the mechanism of angiogenesis inhibitors is not fully elucidated, it is generally believed that pruning of the tumor microvasculature will decrease blood supply thereby diminishing tumor oxygenation and promoting tumor cell death [7-11]. Hypoxia is accompanied by activation of the hypoxia-inducible transcription factors HIF-1alpha and HIF-2alpha leading to increased expression of VEGF and other HIF targets [12, 13]. Binding of VEGF to its receptors triggers signaling pathways that modulate the phosphorylation, stability and/or activity of a variety of down-stream targets including HIF and VEGF [14-17], thereby initiating a positive feed-back loop. Thus, HIF-VEGF signaling intensity emerges as a key factor in determining the outcome of angiogenesis inhibition.

A striking feature of CRC is the capacity for both paracrine and autocrine VEGF-signaling. CRC cells are a major source of VEGF that interacts with VEGF receptors on tumor-associated endothelial cells thereby stimulating their growth, migration and survival [18]. In addition, CRC cells express VEGF receptors (VEGFRs) giving rise to autocrine VEGF signaling [19]. Results from different laboratories indicate that most, if not all, human CRC cells and tumors express functional VEGFR1 [20-23] as well as VEGFR2 [24-26]. Autocrine VEGF signaling promotes CRC survival under different types of stress including 5-fluorouracil exposure, low serum conditions and anchorage-independent growth [27-29]. Interestingly, VEGFR1-mediated VEGF signaling may be particularly important for the survival of invasive CRC cells that have undergone the epithelial-mesenchymal transition and no longer benefit from homotypic cell-cell contact [20].

Until now, most studies on both intrinsic and acquired bevacizumab resistance have focused on paracrine VEGF signaling and tumor-associated endothelial cells. However, the capacity of autocrine VEGF-signaling to promote CRC cell survival under different types of stress suggests that this pathway may also play a role during angiogenesis inhibition.

We now report that bevacizumab-resistant, but not bevacizumab-sensitive, CRC cells showed strong autocrine HIF-VEGF-VEGFR signaling in response to prolonged bevacizumab exposure *in vivo* and displayed intrinsically higher HIF-VEGF signaling intensity and hypoxia tolerance *in vitro*. We further show that tumors with intrinsic bevacizumab resistance remain sensitive to nintedanib, a small molecule angiokinase inhibitor. These data suggest that the antitumor activity of at least some small molecule angiokinase inhibitors is not limited by the mechanisms underlying natural bevacizumab resistance and provide a rational for clinical trials of nintedanib in CRC patients that do not respond to bevacizumab, alone or in combination with bevacizumab to increase angiogenesis inhibition.

RESULTS

HT-29 xenografts are naturally bevacizumab-resistant but remain sensitive to nintedanib, a small molecule angiokinase inhibitor.

Continued bevacizumab treatment of mice carrying human CRC xenografts revealed that HT-29 tumors are naturally bevacizumab-resistant with only 29% growth inhibition after 4 weeks drug exposure while the same scheduling resulted in 68% tumor growth inhibition for the bevacizumab-sensitive DLD-1 tumors (Figure 1A).

To establish if bevacizumab resistance is associated with cross-resistance to small molecules targeting the same pathways, nintedanib was administered to animals with DLD-1 or HT-29 xenografts. The results show that nintedanib displays comparable tumor growth inhibitory activity in the two tumor models (Figure 1A). No weight loss or other toxic side effects were noted for either bevacizumab or nintedanib (data not shown). Therefore, CRC tumors with intrinsic bevacizumab resistance remain sensitive to at least some small molecule angiokinase inhibitors.

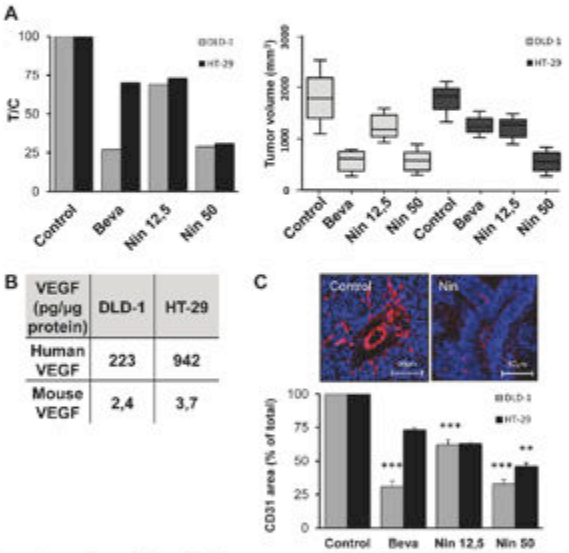
Bevacizumab-resistant xenografts express high levels of VEGF.

Since bevacizumab and nintedanib both interfere with VEGF signaling, tissue extracts were prepared from untreated DLD-1 and HT-29 tumors and the concentration of human VEGF was determined by ELISA analysis (Figure 1B). The amounts of VEGF were at least 4 times higher in tumor tissues from HT-29 xenografts compared to DLD-1 xenografts (942 pg vs. 223 pg VEGF/µg protein, respectively, $p < 0,001$).

Bevacizumab is specific for human VEGF, and will therefore only neutralize VEGF produced by the tumor cells, but not murine VEGF secreted by the tumor-associated stromal cells. To evaluate the contribution of stromal VEGF, tissue extracts were prepared from untreated DLD-1 and HT-29 tumors and the concentration of murine VEGF was determined by ELISA analysis. The results show that murine VEGF represents a minor fraction of the total VEGF (0,4 to 1.1%) in both tumor models (Figure 1B). Therefore, VEGF signaling is principally mediated by human, tumor-derived VEGF in both DLD-1 and HT-29 xenografts.

Bevacizumab has limited activity on the microvasculature in bevacizumab-resistant xenografts.

The microvascular density of DLD-1 and HT-29 xenografts was compared by IHC with a CD31-directed antibody followed by quantitative image analysis. The results (Figure 1C) indicate that bevacizumab reduces the microvascular density by 70% in DLD-1 xenografts, compared to the vehicle control. In contrast, the same schedule of bevacizumab only reduced the microvascular density by 27% in HT-29 xenografts. These results show that the microvascular density was less influenced by



VEGF (pg/µg protein)	DLD-1	HT-29
Human VEGF	223	942
Mouse VEGF	2,4	3,7

Figure 1: Influence of bevacizumab and nintedanib on tumor growth and angiogenesis in CRC xenografts. (A) Nude mice with DLD-1 (grey columns) or HT-29 (black columns) human CRC xenografts were dosed with vehicle (Control), bevacizumab at 5 mg/kg i.p. every 3 days (Beva), nintedanib at 12,5 mg/kg p.o. once daily (Nin 12,5) or nintedanib at 50 mg/kg p.o. once daily (Nin 50) for 4 weeks. Each treatment group corresponded to at least seven animals. Left, T/C values were determined as follows: average tumor volume of treated animals/average tumor volume of the vehicle controls x100. Right, box and whisker plot of the tumor volumes of DLD-1 (light grey boxes) or HT-29 (dark grey boxes) xenografts after 4 weeks treatment with bevacizumab or nintedanib. Lines, medians; boxes, 25th to 75th percentile interquartile ranges; whiskers, the highest and lowest values for a given treatment. (B) Total protein was extracted from DLD-1 and HT-29 xenografts (pool of 3 tumors per xenograft model) and the amounts of human (tumor-derived) and murine (stroma-derived) VEGF were determined by ELISA. (C) Top, representative images of xenografts from animals treated with vehicle or with nintedanib at 50 mg/kg p.o. once daily. CD31-positive blood vessels are outlined in red whereas the nuclei appear in blue. Bottom, quantitative image analysis of the CD31 signal for DLD-1 (grey columns) and HT-29 tumors (black columns). The data show the CD31-positive area, as % of total, and represent the average of at least 6 fields/tumor for at least 3 different tumors. The statistical analysis of experimental data was performed using a Student's paired t-test comparing the treatment group with the vehicle control. Bars, SD; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

bevacizumab in the bevacizumab-resistant xenografts whereas nintedanib had comparable activity in the two models.

Bevacizumab and nintedanib show a combination of cytostatic and cytotoxic activities.

Tumor growth inhibition may be due to both cytostatic (cell cycle arrest) and cytotoxic (cell death) effects. We therefore evaluated the influence of bevacizumab and nintedanib on *in vivo* DNA synthesis (EdU incorporation), apoptotic cell death (TUNEL assay) and necrotic cell death (Figure 2).

We first compared the influence of the two drugs. In DLD-1 xenografts, bevacizumab and nintedanib (50 mg/kg) have comparable antitumor activity. Both agents displayed a mixture of cytotostatic and cytotoxic effects without any striking differences between them: 43% vs 46% decrease in DNA synthesis as determined by EdU, 197% vs 178% increase in apoptotic cell death as determined by TUNEL, and 480% vs 353% increased necrosis for bevacizumab and nintedanib, respectively. (Figure 2). In HT-29 xenografts, bevacizumab and low dose nintedanib have comparable antitumor activity. Both agents displayed a mixture of cytostatic and cytotoxic effects without any striking differences between them: 37% vs 33% decrease in DNA synthesis, 265% vs 299% increased apoptosis, and 236% vs 209% increased necrosis for bevacizumab and nintedanib, respectively (Figure 2).

We then compared the influence of nintedanib in the two tumor models. Interestingly, both doses of nintedanib induced more apoptosis in HT-29 tumors (299% and 640%, for the low and high dose of nintedanib, respectively) than in DLD-1 tumors (126% and 178%, for the low and high dose of nintedanib, respectively), whereas the induction of necrosis was comparable (Figure 2).

Taken together, our findings indicate that treatment with both bevacizumab and nintedanib resulted in a mixture of cytostatic and cytotoxic effects. The pronounced apoptosis in nintedanib-treated HT-29 tumors suggests that nintedanib may not only display antivascular effects *in vivo* but also be able to interfere with survival

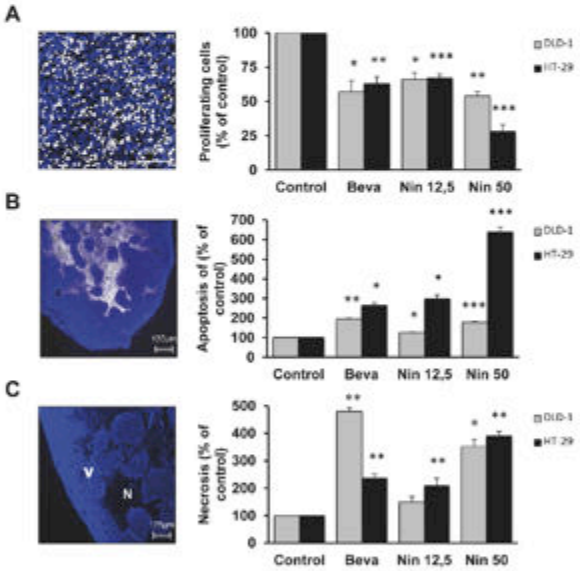


Figure 2: Cytostatic and cytotoxic effects of bevacizumab and nintedanib in CRC xenografts. Influence of bevacizumab and nintedanib on (A) DNA synthesis, (B) apoptosis and (C) necrosis in DLD-1 (grey columns) and HT-29 (black columns) tumors. Animals with CRC xenografts were dosed with vehicle (Control), bevacizumab at 5 mg/kg i.p. every 3 days (Beva), nintedanib at 12,5 mg/kg p.o. once daily (Nin 12,5) or nintedanib at 50 mg/kg p.o. once daily (Nin 50) for 4 weeks. The photos illustrate typical staining patterns. V, viable tissue; N, necrotic tissue. DNA synthesis is determined as the ratio between EdU-positive cells and the total number of viable cells and corresponds to the average of 6 fields/tumor (each field representing approximately 1700 cells) from at least 3 different tumors. Apoptosis is expressed as the area of TUNEL-positive cells, as % of the total area of viable cells, and is the average of 6 fields/tumor for at least 3 different tumors. For necrosis, the data indicates the surface of necrotic cells as % of the total surface and is the average of 6 fields/tumor for at least 3 different tumors. The statistical analysis of experimental data was performed using a Student's paired t-test comparing the treatment group with the vehicle control. Bars, SD; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

signaling in the CRC cells.

Angiogenesis inhibition has markedly different influence on HIF-VEGF signaling in bevacizumab sensitive and -resistant tumors.

Microvascular pruning limits oxygen supply to the tumor thereby activating the hypoxia-inducible transcription factors, HIF-1alpha and HIF-2alpha. This is accompanied by transcriptional upregulation of HIF targets like VEGF, thereby promoting autocrine VEGF signaling. The presence of HIF-1alpha, HIF-2alpha, VEGF and the active autophosphorylated forms of VEGFR1 and VEGFR2 in the two xenograft models was revealed by IHC followed by quantitative image analysis (Figure 3). The results revealed striking differences between DLD-1 and HT-29 xenografts, since all treatments were accompanied by attenuation of the HIF-VEGF-VEGFR axis in DLD-1 tumors, but activation of the same signaling components in HT-29 xenografts.

For DLD-1 tumors, there were no marked differences between nintedanib (50 mg/kg) and bevacizumab, two treatments with comparable antitumor activity, for most markers (Figure 3), although the downregulation of HIF-2alpha was more marked for nintedanib-treated tumors than for bevacizumab-treated tumors. In clear contrast, for HT-29 tumors, the signal for all markers was up to 3-fold higher following bevacizumab exposure than after exposure to nintedanib (12,5 mg/kg), in spite of their comparable antitumor and antivascular activities. In particular, for the nintedanib- and bevacizumab-treated tumors, the signal for pVEGFR1 was 110% vs 192% while the signal for pVEGFR2 was 75% vs 205%, respectively. These findings likely reflect a direct inhibitory effect of nintedanib on the tumor cell-associated VEGF receptors, consistent with the potent angiokinase inhibitory activity of this compound.

Taken together, these results reveal both tumor- and drug-specific differences with respect to HIF-VEGF-VEGFR signaling. For the bevacizumab-sensitive

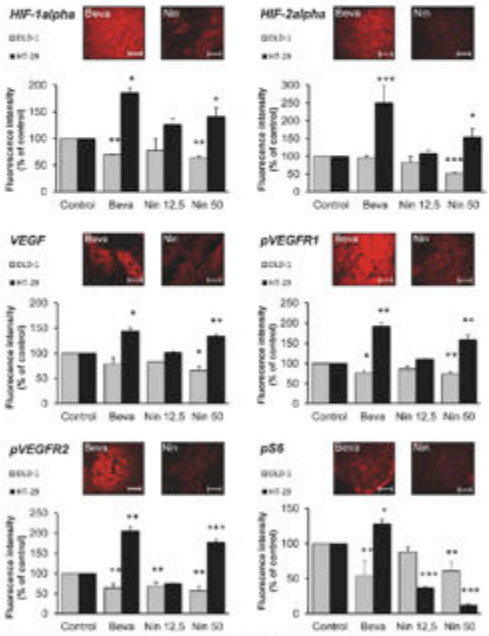


Figure 3: Influence of bevacizumab and nintedanib on HIF-VEGF-VEGFR signaling in CRC xenografts. Nude mice with DLD-1 (grey columns) or HT-29 (black columns) human CRC xenografts were dosed with vehicle (Control), bevacizumab at 5 mg/kg i.p. every 3 days (Beva), nintedanib at 12,5 mg/kg p.o. once daily (Nin 12,5) or nintedanib at 50 mg/kg p.o. once daily (Nin 50) for 4 weeks. The expression of HIF-1alpha, HIF-2alpha, VEGF, pVEGFR1, pVEGFR2 and pS6 was determined by immunohistochemistry followed by quantitative image analysis. The photos illustrate the typical staining patterns for tumors derived from animals treated with bevacizumab (Beva) or nintedanib (Nin, 12,5 mg/kg) that provided comparable tumor growth inhibition. For the quantitative analysis of the signal intensity, the data represent the average fluorescence intensity of treated tumors compared to the treatment intensity of control tumors and are the average of 6 fields/tumor for at least 3 different tumors. The statistical analysis of experimental data was performed using a Student's paired t-test comparing the treatment group with the vehicle control. Bars, SD; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

DLD-1 tumors, all treatments were accompanied by downregulation of the HIF-VEGF-VEGFR axis whereas the same treatments resulted in activation of autocrine VEGF signaling in the bevacizumab-resistant HT-29 tumors. Furthermore, for HT-29 tumors, bevacizumab treatment was associated with much stronger activation of autocrine VEGF signaling than was the case for nintedanib.

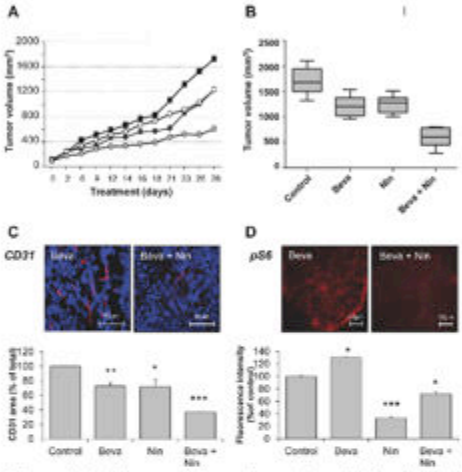


Figure 4: Influence of bevacizumab, nintedanib and their combination on tumor growth, microvessel density and mTORC1 activity in bevacizumab-resistant xenografts. Nude mice with HT-29 human CRC xenografts were dosed with vehicle (Control), bevacizumab at 5 mg/kg i.p. every 3 days (Beva), nintedanib at 12,5 mg/kg p.o. once daily (Nin 12,5) or with a combination of bevacizumab and nintedanib for 4 weeks. Each treatment group corresponded to at least seven animals. (A) Average tumor growth of HT-29 tumografts in mice treated with vehicle (black squares), bevacizumab (black circles), nintedanib (white circles) or their combination (light grey circles). (B) Box and whisker plot of the tumor volumes of HT-29 xenografts after 4 weeks treatment with bevacizumab, nintedanib or their combination. Lines, medians; boxes, 25th to 75th percentile interquartile ranges; whiskers, the highest and lowest values for a given treatment. The expression of CD31 (C) and pS6 (D) was determined by immunohistochemistry followed by quantitative image analysis. The photos illustrate typical staining patterns for tumors derived from animals treated with bevacizumab or with a combination of bevacizumab plus nintedanib. For the quantitative analysis of the signal intensity, the data represent the average fluorescence intensity of treated tumors compared to the treatment intensity of control tumors and are the averages of 6 fields/tumor for at least 3 different tumors. The statistical analysis of experimental data was performed using a Student's paired t-test comparing the treatment group with the vehicle control. Bars, SD; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Nintedanib, but not bevacizumab, attenuates mTORC1 activity in bevacizumab-resistant xenografts.

VEGF receptors and other RTKs mediate multiple downstream signaling pathways that may be integrated at the level of mTORC1, the mammalian target of rapamycin (mTOR) complex 1 [30]. Recent findings suggest that inhibition of mTORC1 activity, as measured by tumor levels of Ser240/Ser244-phosphorylated S6 (pS6) is a robust biomarker for the antitumor activity of at least some protein kinase inhibitors such as inhibitors of mutant BRAF and PI3K [31, 32]. In the present study, all treatments reduced the expression of pS6 in DLD-1 tumors, which was most pronounced for bevacizumab and nintedanib at the 50 mg/kg dose (Figure 3). In HT-29 tumors, nintedanib induced a marked, dose-dependent decrease of pS6 levels reaching 12% for the high dose of nintedanib, compared to the vehicle control. In clear contrast, bevacizumab increased the levels of pS6 to ~130% in the same xenograft model.

Bevacizumab and nintedanib show synergistic activity toward bevacizumab-resistant xenografts.

The important differences in the activities of bevacizumab and nintedanib toward HT-29 xenografts prompted us to explore the combination of the two agents (Figure 4). Bevacizumab and low dose nintedanib showed comparable activity toward HT-29 xenografts as single agents with approximately 27% tumor growth inhibition. In comparison, the combination of bevacizumab and nintedanib was accompanied by 65% tumor growth inhibition ($p < 0,001$, bevacizumab alone vs bevacizumab and nintedanib). The combination was active toward both endothelial and tumor cells. The microvascular density, as determined by CD31 staining, decreased by ~28% when bevacizumab or nintedanib were given alone, to 63% when the two agents were given together ($p < 0,001$, bevacizumab alone vs bevacizumab and nintedanib). In addition, nintedanib was able to counteract the activation of mTORC1 in the tumor cells, as measured by pS6, from 131% (compared to the vehicle control) when bevacizumab was given alone to 72% when the two agents were given together ($p < 0,001$, bevacizumab alone vs bevacizumab and nintedanib).

Brief hypoxia is accompanied by HIF-1alpha expression in both DLD-1 and HT-29 cells.

The marked differences in HIF expression between DLD-1 and HT-29 xenografts raise the question if DLD-1 cells are unable to activate HIF, unable to maintain HIF signaling, or rather if HIF signaling intensity in DLD-1

tumors is weak compared to HT-29 tumors. To answer this question, DLD-1 and HT-29 cells were exposed to acute hypoxia (1% O_2) for 24 hrs and the expression of HIF-1alpha and HIF-2alpha was determined by Western blot analysis. The results show that the expression of the two HIF proteins is marginal under normoxia. In contrast, 24 hrs hypoxia is accompanied by HIF-1alpha induction in both cell lines whereas the expression of HIF-2alpha remains marginal (Figure 5A).

To establish if the HIF-1alpha protein was transcriptionally active, the expression of its downstream target, VEGF, was determined by qRT-PCR. Acute hypoxia was accompanied by a ~10-fold increase in VEGF expression for HT-29 cells, compared to the corresponding normoxic cells, whereas the corresponding increase in VEGF expression was ~3.5-fold for DLD-1 cells. Therefore, DLD-1 cells show a functional hypoxia response as indicated by upregulation of VEGF mRNA, although to a lesser degree than HT-29 (Figure 5B).

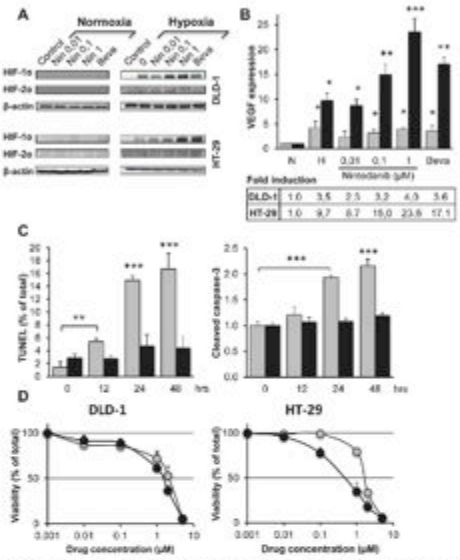


Figure 5: Influence of bevacizumab and nintedanib on CRC cells under normoxia and hypoxia. (A) Western blot analysis of HIF-1alpha, HIF-2alpha and beta-actin in DLD-1 and HT-29 cells after 24 hrs exposure to nintedanib (0,01, 0,1 or 1 μM) or bevacizumab (250 μg/ml) under normoxia or hypoxia (1% O_2). (B) Induction of VEGF mRNA in DLD-1 (grey columns) and HT-29 (black columns) cells following 24 hrs exposure to nintedanib (0,01, 0,1 or 1μM) or bevacizumab (250 μg/ml) under normoxia or hypoxia. VEGF expression was normalized with 36B4 mRNA and is the average of three independent experiments. The statistical analysis of experimental data was performed using a Student's paired t-test comparing the treatment group with the vehicle control. Bars, SD; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. (C) Hypoxia-induced apoptosis in DLD-1 (grey columns) and HT-29 (black columns) cells after hypoxia (1% O_2) exposure for the indicated times as measured by the TUNEL assay (left) or by the formation of catalytically active cleaved caspase 3 (right). Values are the averages of at least two independent experiments done in duplicate. The statistical analysis of experimental data was performed using a Student's paired t-test comparing the treatment group with the vehicle control. Bars, SD; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. (D) Viability of DLD-1 cells (left) or HT-29 cells (right) after 24 hrs exposure to the indicated concentrations of nintedanib under normoxia (grey circles) or hypoxia (black circles) for 24 hrs followed by 96 hrs post-incubation under normoxia and MTT determination. Bars indicate SD and are shown when they exceed symbol size. The data represents three independent experiments each done in duplicate.

Bevacizumab and nintedanib upregulate HIF-1alpha in both bevasizumab-sensitive and -resistant cells.

We next explored if angiogenesis inhibitors might have a direct effect on HIF-VEGF signaling in CRC cells. Our results indicate that the presence of nintedanib or bevacizumab had no detectable effect on the expression of HIF-1alpha or HIF-2alpha under normoxia (Figure 5A). However, under hypoxia, nintedanib activated the expression of HIF-1alpha in a dose-dependent manner in both cell lines (2 to 3-fold, compared to the normoxia control) (Figure 5A). In addition, bevacizumab was able

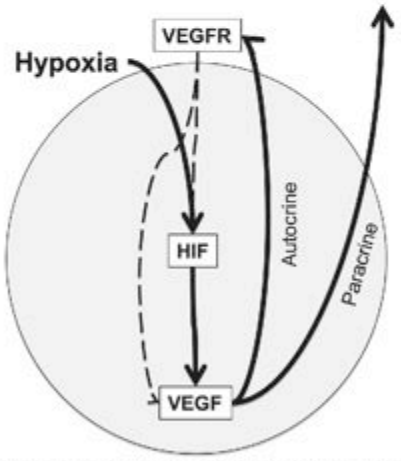


Figure 6: HIF-VEGF-VEGFR signaling in CRC cells. Hypoxia exposure activates HIF, thereby increasing the expression of VEGF, a HIF-transcriptional target. Subsequent binding of VEGF to its receptor on either CRC cells (autocrine pathway) or tumor-associated endothelial cells (paracrine pathway) leads to activation of VEGFR and its downstream signaling pathways. Receptor tyrosine kinases like VEGFR are able to activate and/or stabilize HIF and VEGF, thereby promoting a positive feed-back loop.

to induce HIF-1alpha almost 4-fold in the HT-29 cells whereas its influence was marginal in DLD-1 cells (Figure 5A).

The drug-induced increase of HIF-1alpha protein had modest influence on the expression of VEGF mRNA in hypoxic DLD-1 cells (Figure 5B). In clear contrast, for hypoxic HT-29 cells, nintedanib-exposure was accompanied by a dose-dependent increase in mRNA VEGF expression that reached ~2,4 times the levels of the untreated controls, whereas bevacizumab increased mRNA VEGF expression ~1.8-fold. Therefore, although drug exposure was associated with increased HIF-1alpha accumulation under short-term hypoxia in both cell lines, VEGF mRNA expression was only increased for HT-29 cells.

Bevacizumab-resistant cells show increased hypoxia tolerance.

Next, DLD-1 and HT-29 cells were exposed to hypoxia for up to 48 hrs and the fraction of apoptotic cells was determined by the TUNEL assay (Figure 5C left). The results show that hypoxia exposure was accompanied by rapid apoptosis in DLD-1 cells to reach almost 17% apoptotic cells by 48 hrs, whereas the level of apoptosis stayed below 5% for HT-29. These findings were confirmed by a caspase 3 assay that measures the formation of catalytically active cleaved caspase 3 (Figure 5C right).

Nintedanib shows increased toxicity toward bevacizumab-resistant cells under hypoxia.

To determine the influence of hypoxia on nintedanib toxicity, cells were exposed to different doses of nintedanib for 24 hrs under hypoxia or normoxia followed by 96 hrs post-exposure under normoxia and MTT determination. The results show that nintedanib is slightly (~30%) more toxic for DLD-1 cells under hypoxia compared to normoxia (Figure 5D left). In comparison, nintedanib was almost 3 times more toxic to HT-29 cells under hypoxia, suggesting that nintedanib attenuates the survival signaling that usually protects HT-29 from hypoxia-mediated cell death (Figure 5D right).

DISCUSSION

Bevacizumab shows excellent activity in a subset of mCRC patients while others never respond. A key question is if bevacizumab-resistance is limited to this particular agent or rather is indicative of a general resistance to angiogenesis inhibition. To clarify this question, we identified the HT-29 xenograft model as naturally bevacizumab-resistant in contrast to DLD-1 xenografts that are bevacizumab-sensitive. Prolonged (28 days) exposure to the angiokinase inhibitor nintedanib showed that DLD-1 and HT-29 xenografts are both sensitive to nintedanib at doses with no detectable toxic side effects. These findings suggest that the antitumor activity of at least some small molecule angiokinase inhibitors is not limited by the mechanisms underlying natural bevacizumab resistance.

Next, we characterized the differences between bevacizumab-sensitive and -resistant cells, with special attention to VEGF signaling. Comparison of the vascular density in DLD-1 and HT-29 tumors by IHC analysis reveals that bevacizumab treatment is associated with important vascular pruning in the sensitive DLD-1, but not in the resistant HT-29 xenografts. In clear contrast, nintedanib showed comparable effects on the microvascular density in both xenograft models. To establish if the intrinsic bevacizumab resistance of HT-29 xenografts might be linked to elevated levels of stroma-derived VEGF, the concentrations of human and murine VEGF were determined. The results show that for both tumor types, murine VEGF represents, at the most, 1% of the total amount of VEGF and is therefore unlikely to influence the response to angiogenesis inhibition. Interestingly, HT-29 tumors express at least four times more human VEGF, compared to the DLD-1 tumors, which likely contributes to the bevacizumab-resistant phenotype.

To establish the mechanistic basis for tumor growth inhibition, the levels of DNA synthesis, apoptosis and necrosis were determined. The results show that prolonged exposure to the two drugs resulted in a mixture of cytostatic and cytotoxic effects, independent of the tumor model. However, nintedanib exposure was associated with significantly more apoptosis in HT-29 than in DLD-1 xenografts, suggesting that in this tumor model, nintedanib may not only act on the microvasculature, but also attenuate the survival response of the tumor cells to environmental stress.

To characterize the signaling intensity of the HIF-VEGF signaling pathway (summarized in Figure 6), the expression of HIF-1alpha, HIF-2alpha, VEGF and the active, autophosphorylated forms of VEGFR1 and VEGFR2 was determined by IHC followed by quantitative image analysis. The results revealed striking differences between the two tumor models. Drug treatment was accompanied by a general downregulation of all signaling components of the HIF-VEGF-VEGFR autocrine loop in DLD-1 tumors, in clear contrast to HT-29 tumors, where the same pathway was upregulated. Interestingly, for HT-29 tumors, treatment with bevacizumab was accompanied by much higher activation of autocrine VEGF signaling than nintedanib, thereby identifying a key difference between the two agents.

mTORC1 integrates multiple signaling pathways downstream of activated receptor tyrosine kinases. Accordingly, recent findings suggest that the degree of

mTORC1 activity, as determined by the levels of the Ser240/Ser244 phosphorylated form of the ribosomal S6 protein (pS6), serve as a robust biomarker for the antitumor activity of at least some signaling pathways inhibitors. Quantitative IHC analysis showed that treatment with both bevacizumab and nintedanib was accompanied by downregulation of mTORC1 activity in DLD-1 tumors. In clear contrast, bevacizumab exposure was associated with upregulation of mTORC1 activity in HT-29 tumors whereas nintedanib treatment was associated with a marked decrease of mTORC1 activity, compared to the vehicle control. For the bevacizumab-treated HT-29 tumors, the increase in mTORC1 activity is fully coherent with the elevated levels of active, phosphorylated VEGFR1 and VEGFR2. In contrast, the strong downregulation of mTORC1 in the nintedanib-treated HT-29 tumors was unexpected. The downregulation is unlikely to rely on VEGF-signaling alone, but likely involves other nintedanib targets like FGFR (fibroblast growth factor receptor) and PDGF (platelet-derived growth factor receptor receptor) family members [5].

Another unexpected finding was that HIF-1alpha was upregulated in the nintedanib-treated HT-29 tumors in spite of the marked downregulation of mTORC1, a well-established negative regulator of HIF-1alpha translation. The upregulation of HIF-1alpha is coherent with the loss of tumor-associated microvessels that results in tumor hypoxia and activation of autocrine VEGF signaling. Furthermore, it should be noted that the regulation of HIF-1alpha is complex and is mediated at several levels including transcription, translation as well as protein stability. Even on the translational level, our previous results suggest that HIF-1alpha expression can be modulated by (at least) two different agents, rapamycin via mTORC1, and irinotecan, that acts in a mTORC1-independent manner [33].

Interestingly, the beva-resistance of the HT-29 xenografts could be overcome by combining bevacizumab with low dose nintedanib. The additional antitumor effect was characterized by a diminution, rather than an increase, of mTORC1 activity as well as by increased inhibition of the tumor microvasculature.

A crucial question is if bevacizumab-sensitive cells are unable to activate HIF-signaling in response to hypoxia, unable to maintain HIF activation, or if the HIF signaling pathway is functional, but less prominent compared to bevacizumab-resistant cells. To answer this question, DLD-1 and HT-29 cells were incubated under hypoxia for 24 hrs and the induction of HIF-1alpha and HIF-2alpha was determined. The results show that both cell lines express little, if any, HIF-1alpha or HIF-2alpha under normoxia. In contrast, hypoxia is accompanied by robust HIF-1alpha induction in both cell lines whereas the induction of HIF-2alpha is marginal. These findings are coherent with previous work reporting that HIF-1alpha drives the initial response to hypoxia whereas HIF-2alpha is needed for the chronic response [34]. Next, we determined the capacity of HIF to increase the expression of VEGF mRNA. The results reveal that although VEGF was induced by hypoxia in both cell lines, the increase in VEGF levels was more prominent for HT-29 cells (~10-fold increase) than for DLD-1 cells (~3-fold increase). Interestingly, the differences in VEGF expression *in vitro* were comparable to the differences in VEGF expression observed for the corresponding xenografts. Therefore, the *in vivo* differences in basal VEGF levels appear to be a result of an intrinsically higher HIF-VEGF signaling intensity in bevacizumab-resistant cells.

Unexpectedly, the hypoxia-mediated up-regulation of HIF-1alpha protein was further increased in the presence of nintedanib and bevacizumab, suggesting that the two agents can influence tumor cells directly under cellular stress. The activity of nintedanib is consistent with previous findings, where nintedanib was shown to modulate cell cycle progression and viability of a wide range of CRC cell lines [35]. The influence of bevacizumab is more unexpected considering that bevacizumab is a ligand-targeted agent that is unable to enter the tumor cells. However, two recent articles report that chronic *in vitro* exposure of CRC cells to bevacizumab was accompanied by the emergence of a more migratory and invasive phenotype [36, 37], which is coherent with a direct effect of bevacizumab on the tumor cells, as observed here.

HT-29 cells were more resistant to hypoxia-induced apoptosis compared to DLD-1 cells consistent with their bevacizumab-resistant phenotype *in vivo*. If the increased survival of HT-29 cells under hypoxia depends on their potent kinase activity including autocrine VEGF-signaling, we would predict that nintedanib should be more cytotoxic under hypoxic conditions than under normoxia. In contrast, we would expect a smaller difference for DLD-1 cells that are inherently hypoxia-sensitive and appear to have weaker angiokinase signaling. In agreement, the results showed almost three-fold increased activity of nintedanib under hypoxia in HT-29 cells, whereas nintedanib was only marginally more active under hypoxia toward DLD-1 cells. The increased activity of nintedanib under hypoxia is a noticeable feature, since other tyrosine kinase inhibitors like gefitinib have been reported to show less, rather than more, cytotoxic activity under hypoxia [38].

Taken together, our data indicate that intrinsic bevacizumab-resistance is multifactorial and associated with i) the high levels of VEGF in the tumor environment that renders the endothelial cells more resistant to bevacizumab, ii) strong VEGFR1 and VEGFR2 signaling in the tumor cells that leads to mTORC1 activation as well as iii) resistance to hypoxia-induced apoptosis. We further show that all these resistance mechanisms can be overcome by nintedanib. These findings suggest that

the antitumor activity of at least some small molecule angiokinase inhibitors is not limited by the mechanisms underlying natural bevacizumab resistance and provide a rational for clinical trials of nintedanib in CRC patients that do not respond to bevacizumab, alone or in combination with bevacizumab.

MATERIALS AND METHODS

Xenograft models.

The antitumor activity of bevacizumab and nintedanib was evaluated in athymic mice (female NMRI-Fox 1nu, 6 weeks old) from Taconic (Skensved, Denmark) bearing DLD-1 or HT-29 CRC xenografts. Two (HT-29) or five (DLD-1) million cells were injected into the right flank, and the treatments were started when the tumors were palpable (median tumor volume ~100 mm^3). The animals were weighted daily and the tumor size was determined three times per week. Tumor volumes (mm^3) were calculated according to formula: [(length² x width)/2]. Treated/Control (T/C) values were calculated as follows: average tumor volume of treated animals/average tumor volume of control animals x100. Each treatment group was composed of at least 7 animals. Animals were treated according to institutional guidelines.

Immunohistochemistry.

Biomarker analysis was carried out with tumors collected after 28 days of treatment. To measure *in vivo* DNA synthesis, the thymidine analog 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU, Life Technologies) was administered 48 hrs before sacrifice (500 µg *i.p.*). The incorporated EdU was revealed by a fluorescent-azide coupling reaction (Click-iT # C10337, Life Technologies) of paraffin-embedded tumor samples and counterstained by DAPI to reveal the nuclei of individual cells. The proportion of apoptotic tumor cells was scored by the TUNEL assay (In Situ Cell Death Detection kit, Roche Applied Science # 11684795910).

The following antibodies were used for immunohistochemistry (IHC) analysis: anti-CD31 (BD Bioscience # 550274), anti-HIF-1alpha (BD Bioscience # 610958), anti-HIF-2alpha (Novus Biological NB-100122), anti-VEGF (Santa Cruz # sc-152), anti-pVEGFR1 (Millipore 07-758) that recognizes phospho-Tyr1213 VEGFR1, anti-pVEGFR2 (Santa Cruz # sc-101819) that recognizes phospho-Tyr1175 VEGFR2, and anti-pS6 (Cell Signaling # 2211) that recognizes phospho-Ser240/244 S6. The relevant Cy3-conjugated secondary antibodies were obtained from Jackson ImmunoResearch. All images were captured by a fluorescence microscope and the fluorescence intensities were determined by the MetaMorph software (Universal Imaging Corporation) for quantitative image analysis.

Blood vessel density is expressed as the CD31-positive area, in % of total, and represents the averages of at least 6 fields/tumor for at least 3 different tumors. DNA synthesis is determined as the ratio between EdU-positive cells and the total number of viable cells and is the average of 6 fields/tumor (each field representing approximately 1700 cells) from at least 3 different tumors. Apoptosis is expressed as the % area of TUNEL-positive cells compared to the total area of viable cells, and is the average of 6 fields/tumor for at least 3 different tumors. For necrosis, the data indicates the surface of necrotic cells as % of the total surface and is the average of 6 fields/tumor for at least 3 different tumors.

For the quantitative analysis of the signal intensity for HIF-1alpha, HIF-2alpha, VEGF, pVEGFR1, pVEGFR2 and pS6, the data represents the average fluorescence intensity of treated tumors compared to the treatment intensity of control tumors and is the average of 6 fields/tumor for at least 3 different tumors.

ELISA assay for VEGF.

Healthy tumor tissues were collected from untreated, frozen tumors (three tumors per xenograft model), and protein extracts were prepared in RIPA buffer according to the manufacturer's instructions. VEGF levels were determined by Quantikine ELISA (R&D System # DVE00 (human, tumor-derived VEGF) and MMV00 (murine, stroma-derived VEGF). The values represent the average of 3 independent experiments, each done in duplicate.

Tumor cells, apoptosis and viability assays.

HT-29 cells were kindly provided by Richard Camalier, Division of Cancer Treatment and Diagnosis tumor repository (NCI, US) whereas DLD-1 cells were a generous gift from Richard Hamelin (Saint-Antoine Research Center, Paris, France).

To determine the induction of hypoxia-induced apoptosis, HT-29 and DLD-1 cells were seeded on coverslips in DMEM medium with 5% fetal calf serum under hypoxia (1% O_2). Cover slips were removed after 0, 12, 24 and 48 hrs hypoxia and subjected to TUNEL analysis. Alternatively, hypoxia-induced apoptosis was determined by the capacity of catalytically active cleaved caspase-3 to generate fluorescent reaction products (Caspase 3 fluorescence assay kit, Cayman chemical, #10009135).

Cellular viability was determined by the MTT (methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide) viability assay as described previously [39] with minor modifications. Cells were incubated with different concentrations of nintedanib under normoxia or hypoxia

(1% O_2) for 24 hrs followed by 96 hrs post-incubation under normoxia and MTT determination.

Real-time RT (reverse transcription)-PCR and Western blot analysis.

Total RNA was extracted from CRC cells using the TRIzol® RNA purification reagent. RNA quantity and purity were determined by using a NanoDrop ND-1000. Total RNA (1 µg) from each sample was reverse transcribed and real-time RT-PCR measurements were performed as described previously [40, 41] using a Mx3000P apparatus (Agilent) with the corresponding SYBR Green kit. PCR primers were designed with Primer 3 (Agilent) as follows: VEGF, upper, 5'-CGAAGTGGTGAAGTTCATGGATG-3', lower, 5'-TTCTGTATCAGTC TTTCCTGGTGAG. 36B4 (also known as RPLP0), upper, 5′-GATTGGCTACCCAACTGTTG-3′; lower, 5′-CAGGGGCAGCAGCCAC AAA-3′. Gene expression was normalized to 36B4.

Western blot analysis was carried out as described previously [42]. The primary antibodies were directed against HIF-1alpha (BD Bioscience # 610958), HIF-2alpha (Novus Biological # NB-100122) or beta-actin (Santa Cruz # sc-47778), while the corresponding secondary antibodies were purchased from Jackson ImmunoResearch.

Statistical analysis.

The statistical analysis of experimental data was performed using a Student's paired *t*-test, and results are presented as mean ± standard deviation (SD).

ACKNOWLEDGMENTS

This work was financed in part by research funding to Annette K. Larsen from Boehringer Ingelheim. The sponsors had no role in the study design, data collection and analysis, interpretation of the results, the preparation of the manuscript, or the decision to submit the manuscript for publication. We like to acknowledge the contribution of Olivier Bernadini, Tatiana Ledent and Delphine Muller from the animal facilities at Saint-Antoine Research Center and Sylvie Dumont and Fatiha Merabtene from the pathology platform at Hôpital Saint-Antoine. Paul Mésange is supported by a Mouna Nasrallah fellowship.

REFERENCES

1. Chung AS, Lee J, Ferrara N. Targeting the tumour vasculature: insights from physiological angiogenesis. Nat Rev Cancer. 2010; 10: 505-514.
2. Vlajnic T, Andreozzi MC, Schneider S, Tornillo L, Karamitopoulou E, Lugli A, Ruiz C, Zlobec I, Terracciano L. VEGFA gene locus (6p12) amplification identifies a small but highly aggressive subgroup of colorectal cancer patients. Mod Pathol. 2011; 24: 1404-1412.
3. Jürgensmeier JM, Schmoll HJ, Robertson JD, Brooks L, Taboada M, Morgan SR, Wilson D, Hoff PM. Prognostic and predictive value of VEGF, sVEGFR-2 and CEA in mCRC studies comparing cediranib, bevacizumab and chemotherapy. Br J Cancer. 2013; 108: 1316-1323.
4. Ferrara N, Hillan KJ, Gerber HP, Novotny W. Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. Nat Rev Drug Discov. 2004; 3: 391-400.
5. Hilberg F, Roth GJ, Krssak M, Kautschitsch S, Sommergruber W, Tontsch-Grunt U, Garin-Chesa P, Bader G, Zoephel A, Quant J, Heckel A, Rettig WJ. BIBF 1120: triple angiokinase inhibitor with sustained receptor blockade and good antitumor efficacy. Cancer Res. 2008; 68: 4774-4782.
6. Reck M, Kaiser R, Mellemgaard A, Douillard JY, Orlov S, Krzakowski MJ, Von Pawel J, Gottfried M, Bondarenko I, Liao M, Barrueco J, Gaschler-Markefski B, Novello S. Nintedanib (BIBF 1120) plus docetaxel in NSCLC patients progressing after first-line chemotherapy: LUME Lung 1, a randomized, double-blind phase III trial. J Clin Oncol. 31, 2013 (suppl; abstr LBA8011).
7. Willett CG, Duda DG, di Tomaso E, Boucher Y, Ancukiewicz M, Sahani DV, Lahdenranta J, Chung DC, Fischman AJ, Lauwers GY, Shellito P, Czito BG, Wong TZ, Paulson E, Poleski M, Vujaskovic Z, et al. Efficacy, safety, and biomarkers of neoadjuvant bevacizumab, radiation therapy,and fluorouracil in rectal cancer: a multidisciplinary phase II study. J Clin Oncol. 2009; 27: 3020-3026.
8. Van der Veldt AA, Lubberink M, Bahce I, Walraven M, de Boer MP, Greuter HN, Hendrikse NH, Eriksson J, Windhorst AD, Postmus PE, Verheul HM, Serné EH, Lammertsma AA, Smit EF. Rapid decrease in delivery of chemotherapy to tumors after anti-VEGF therapy: implications for scheduling of anti-angiogenic drugs. Cancer Cell. 2012; 21: 82-91.
9. Pastuskovas CV, Mundo EE, Williams SP, Nayak TK, Ho J, Ulufatu S, Clark S, Ross S, Cheng E, Parsons-Reponte K, Cain G, Van Hoy M, Majidy N, Bheddah S, dela Cruz Chuh J, Kozak KR, et al. Effects of anti-VEGF on pharmacokinetics, biodistribution, and tumor penetration of trastuzumab in a preclinical breast cancer model. Mol Cancer Ther. 2012; 11: 752-762.
10. Eichten A, Adler AP, Cooper B, Griffith J, Wei Y, Yancopoulos GD, Lin HC, Thurston G. Rapid decrease in tumor perfusion following VEGF blockade predicts long-term tumor growth inhibition in preclinical tumor models. Angiogenesis. 2013; 16: 429-441.
11. Rapisarda A, Melillo G. Overcoming disappointing results with antiangiogenic therapy by targeting hypoxia. Nat Rev Clin Oncol. 2012; 9: 378-390.

12. Shweiki D, Neeman M, Itin A, Keshet E. Induction of vascular endothelial growth factor expression by hypoxia and by glucose deficiency in multicell spheroids: implications for tumor angiogenesis. Proc Natl Acad Sci USA. 1995; 92: 768-772.
13. Maxwell PH, Dachs GU, Gleadle JM, Nicholls LG, Harris AL, Stratford IJ, Hankinson O, Pugh CW, Ratcliffe PJ. Hypoxia-inducible factor-1 modulates gene expression in solid tumors and influences both angiogenesis and tumor growth. Proc Natl Acad Sci USA. 1997; 94: 8104-8109.
14. von Marschall Z, Cramer T, Höcker M, Finkenzeller G, Wiedenmann B, Rosewicz S. Dual mechanism of vascular endothelial growth factor upregulation by hypoxia in human hepatocellular carcinoma. Gut. 2001; 48: 87-96.
15. Das B, Yeger H, Tsuchida R, Torkin R, Gee MF, Thorner PS, Shibuya M, Malkin D, Baruchel S. A hypoxia-driven vascular endothelial growth factor/Flt1 autocrine loop interacts with hypoxia-inducible factor-1alpha through mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway in neuroblastoma. Cancer Res. 2005; 65: 7267-7275.
16. Harada H, Itasaka S, Kizaka-Kondoh S, Shibuya K, Morinibu A, Shinomiya K, Hiraoka M. The Akt/mTOR pathway assures the synthesis of HIF-1alpha protein in a glucose- and reoxygenation-dependent manner in irradiated tumors. J Biol Chem. 2009; 284: 5332-5342.
17. Nilsson MB, Zage PE, Zeng L, Xu L, Cascone T, Wu HK, Saigal B, Zweidler-McKay PA, Heymach JV. Multiple receptor tyrosine kinases regulate HIF-1alpha and HIF-2alpha in normoxia and hypoxia in neuroblastoma: implications for antiangiogenic mechanisms of multikinase inhibitors. Oncogene 2010; 29: 2938-2949.
18. Larsen AK, Ouaret D, El Ouadrani K, Petitprez A. Targeting EGFR and VEGF(R) pathway cross-talk in tumor survival and angiogenesis. Pharmacol Ther. 2011; 131: 80-90.
19. Larsen AK, de Gramont A, Poindessous V, Bouygues A, Ayadi M, Mésange P. Functions and clinical implications of autocrine VEGF signaling in colorectal cancer. Current Colorectal Cancer Reports. 2013; 9: 270-277.
20. Bates RC, Goldsmith JD, Bachelder RE, Brown C, Shibuya M, Oettgen P, Mercurio AM. Flt-1-dependent survival characterizes the epithelial-mesenchymal transition of colonic organoids. Curr Biol. 2003; 13: 1721-1727.
21. Fan F, Wey JS, McCarty MF Belcheva A, Liu W, Bauer TW Somcio RJ, Wu Y, Hooper A, Hicklin DJ, Ellis LM. Expression and function of vascular endothelial growth factor receptor-1 on human colorectal cancer cells. Oncogene. 2005; 24: 2647-2653.
22. Okita NT, Yamada Y, Takahari D, Hirashima Y, Matsubara J, Kato K, Hamaguchi T, Shirao K, Shimada Y, Taniguchi H, Shimoda T. Vascular endothelial growth factor receptor expression as a prognostic marker for survival in colorectal cancer. Jpn J Clin Oncol. 2009; 39: 595-600.
23. Naik S, Dothager RS, Marasa J, Lewis CL, Piwnica-Worms D. Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 Is Synthetic Lethal to Aberrant {beta}-Catenin Activation in Colon Cancer. Clin Cancer Res. 2009; 15: 7529-7537.
24. Mulkeen AL, Silva T, Yoo PS, Schmitz JC, Uchio E, Chu E, Cha C. Short interfering RNA-mediated gene silencing of vascular endothelial growth factor: effects on cellular proliferation in colon cancer cells. Arch Surg. 2006; 141: 367-374.
25. Giatromanolaki A, Koukourakis MI, Sivridis E, Chlouverakis G, Vourvouhaki E, Turley H, Harris AL, Gatter KC. Activated VEGFR2/KDR pathway in tumour cells and tumour associated vessels of colorectal cancer. Eur J Clin Invest. 2007; 37: 878-886.
26. Calvani M, Trisciuoglio D, Bergamaschi C, Shoemaker RH, Melillo G. Differential involvement of vascular endothelial growth factor in the survival of hypoxic colon cancer cells. Cancer Res. 2008; 68: 285-291.
27. Masuda K, Teshima-Kondo S, Mukaijo M, Yamagishi N, Nishikawa Y, Nishida K, Kawai T, Rokutan K. A novel tumor-promoting function residing in the 5' non-coding region of vascular endothelial growth factor mRNA. PLoS Med. 2008; 5: e94.
28. Yin Y, Cao LY, Wu WQ, Li H, Jiang Y, Zhang HF. Blocking effects of siRNA on VEGF expression in human colorectal cancer cells. World J Gastroenterol. 2010; 16: 1086-1092.
29. Samuel S, Fan F, Dang LH, Xia L, Gaur P, Ellis LM. Intracrine vascular endothelial growth factor signaling in survival and chemoresistance of human colorectal cancer cells. Oncogene. 2011; 30: 1205-1212.
30. Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling at a glance. J Cell Sci. 2009; 122(Pt 20): 3589-3594.
31. Corcoran RB, Rothenberg SM, Hata AN, Faber AC, Piris A, Nazarian RM, Brown RD, Godfrey JT, Winokur D, Walsh J, Mino-Kenudson M, Maheswaran S, Settleman J, Wargo JA, Flaherty KT, Haber DA, Engelman JA. TORC1 Suppression Predicts Responsiveness to RAF and MEK Inhibition in BRAF-Mutant Melanoma. Sci Transl Med. 2013; 5: 196ra98.
32. Elkabets M, Vora S, Juric D, Morse N, Mino-Kenudson M, Muranen T, et al. Tao J, Campos AB, Rodon J, Ibrahim YH, Serra V, Rodrik-Outmezguine V, Hazra S, Singh S, Kim P, Quadt C, et al. mTORC1 Inhibition Is Required for Sensitivity to PI3K p110α Inhibitors in PIK3CA-Mutant Breast Cancer. Sci Transl Med. 2013; 5: 196ra99.
33. Pencreach E, Guérin E, Nicolet C, Lelong-Rebel I, Voegeli AC, Oudet P, Larsen AK, Gaub MP, Guenot D. Marked activity of irinotecan and rapamycin combination toward colon cancer cells in vivo and in vitro is mediated through cooperative modulation of the mammalian target of rapamycin/hypoxia-inducible factor-1alpha axis. Clin Cancer Res. 2009; 15:1297-1307.
34. Koh MY, Powis G. Passing the baton: the HIF switch.

Trends Biochem Sci. 2012; 37: 364-372.

35. Poindessous V, Ouaret D, El Ouadrani K, Battistella A, Mégalophonos VF, Kamsu-Kom N, Petitprez A, Escargueil AE, Boudou P, Dumont S, Cervera P, Fléjou JF, André T, Tournigand C, Chibaudel B, de Gramont A, Larsen AK. EGFR- and VEGF(R)-targeted small molecules show synergistic activity in colorectal cancer models refractory to combinations of monoclonal antibodies. Clin Cancer Res. 2011; 17: 6522-6530.
36. Fan F, Samuel S, Gaur P, Lu J, Dallas NA, Xia L, Bose D, Ramachandran V, Ellis LM. Chronic exposure of colorectal cancer cells to bevacizumab promotes compensatory pathways that mediate tumour cell migration. Br J Cancer. 2011; 104: 1270-1277.
37. Yamagishi N, Teshima-Kondo S, Masuda K, Nishida K, Kuwano Y, Dang DT, Dang LH, Nikawa T, Rokutan K. Chronic inhibition of tumor cell-derived VEGF enhances the malignant phenotype of colorectal cancer cells. BMC Cancer. 2013; 13: 229.
38. Minakata K, Takahashi F, Nara T, Hashimoto M, Tajima K, Murakami A, Nurwidya F, Yae S, Koizumi F, Moriyama H, Seyama K, Nishio K, Takahashi K. Hypoxia induces gefitinib resistance in non-small-cell lung cancer with both mutant and wild-type epidermal growth factor receptors. Cancer Sci. 2012; 103: 1946-1954.
39. Soares DG, Escargueil AE, Poindessous V, Sarasin A, de Gramont A, Bonatto D, Henriques JA, Larsen AK. Replication and homologous recombination repair regulate DNA double-strand break formation by the antitumor alkylator ecteinascidin 743. Proc Natl Acad Sci USA. 2007; 104: 13062-13067.
40. Fritah A, Saucier C, De Wever O, Bracke M, Bieche I, Lidereau R, Fritah Gespach C, Drouot S, Redeuilh G, Sabbah M. Role of WISP-2/CCN5 in the maintenance of a differentiated and noninvasive phenotype in human breast cancer cells. Mol Cell Biol. 2008; 28: 1114-1123.
41. Petitprez A, Poindessous V, Ouaret D, Regairaz M, Bastian G, Guérin E, Escargueil AE, Larsen AK. Acquired irinotecan resistance is accompanied by stable modifications of cell cycle dynamics independent of MSI status. Int J Oncol. 2013; 42: 1644-1653.
42. Escargueil AE, Poindessous V, Soares DG, Sarasin A, Cook PR, Larsen AK. Influence of irofulven, a transcription-coupled repair-specific antitumor agent, on RNA polymerase activity, stability and dynamics in living mammalian cells. J Cell Sci. 2008; 121: 1275-1283.

ARTICLE N°2

VEGF inhibition is accompanied by EGFR activation

in colorectal cancer models independent of *KRAS* status

providing a rational for combinations of bevacizumab and erlotinib in the GERCOR phase III DREAM study

Paul Mésange[1,2,3,4], Virginie Poindessous[1,2,3], Anaïs Bouygues[1,2,3], Delphine Muller[1,2,3], Ariel Savina[5], Benoist Chibaudel[1,2,3,6], Christophe Tournigand[7], Thierry André[1,2,3,6], Aimery de Gramont[1,2,3,6] and Annette K. Larsen[1,2,3]

Authorship note: Paul Mésange and Virginie Poindessous contributed equally to this work

[1]Laboratory of Cancer Biology and Therapeutics, Centre de Recherche Saint-Antoine, Paris 75571, France

[2]Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U938, Paris 75013, France

[3]Université Pierre et Marie Curie, Paris 75005 France

[4]UNIVERSITE PARIS Descartes, Paris 75006, France

[5]Roche Scientific Partnerships, Boulogne-Billancourt 92650, France

[6]Department of Medical Oncology, Hôpital Saint-Antoine, Paris 75571, France

[7]Deparment of Medical Oncology, Hôpital Henri Mondor, 94000 Créteil, France

Running title: Erlotinib enhances the activity of bevacizumab in colorectal cancer models

Keywords: Combination of targeted agents, Joint EGFR and VEGF inhibition, bevacizumab, erlotinib, colorectal cancer, KRAS tumor-associated endothelial cells, epithelial growth factor signaling, amphiregulin, TGF-alpha,

Financial support: This work was financed in part by Roche. P. M. is a Mouna Nasrallah Scholar

Corresponding author: Annette K. Larsen. Laboratory of Cancer Biology and Therapeutics, Kourilsky Research Building 1st floor, Hôpital Saint-Antoine, 184 rue du Faubourg Saint-Antoine, 75571 PARIS Cedex 12. E-mail: annette.larsen@upmc.fr

Potential conflict of interest: This work was financed in part by research funding to A. K. L. from Roche. The sponsors had no role in the study design, data collection and analysis, interpretation of the results, the preparation of the manuscript, or the decision to submit the manuscript for publication.

Word & Figure count:

1 table, 4 Figures

Word count: 3570 words

Translational significance

Although combinations of EGFR and VEGF(R)-targeted agents have predominantly shown at least additive activity in preclinical colorectal cancer (CRC) models; the clinical activity of bevacizumab in combination with EGFR-directed antibodies has been disappointing, in particular for patients with mutant *KRAS*. We now show that combinations of bevacizumab and erlotinib are significantly more active than bevacizumab alone in CRC models with different *KRAS* status and bevacizumab sensitivity. We further show that bevacizumab activates EGFR-mediated survival signaling in the tumor cells as well as in the tumor-associated endothelial cells which is attenuated in the presence of erlotinib. In addition, erlotinib down-regulates the production of the EGFR ligands TGF-alpha and amphiregulin. These results indicate that the combination of bevacizumab and erlotinib might be more active in maintenance therapy than bevacizumab alone, even for patients with mutant *KRAS* status, thereby providing the rational basis for the positive GERCOR phase III DREAM trial.

Background. We have recently shown that EGFR- and VEGF(R)-targeted small molecules showed synergistic activity in colorectal cancer (CRC) models refractory to combinations of monoclonal antibodies independent of *KRAS* status. We here wished to determine the activity of bevacizumab in combination with erlotinib and to elucidate the molecular basis for the activity of the combination.

Material and methods. Three human CRC xenograft models, SW48 (*KRAS* wt, bevacizumab sensitive), HT-29 (*KRAS* wt, bevacizumab resistant) and SW620 (*KRAS* mutant, bevacizumab sensitive) were established in nude mice. Animals were treated with bevacizumab and erlotinib, alone and in combination, and the influence on tumor growth, and the presence of activated EGFR was determined. The influence of erlotinib on the viability of CRC cells and EGFR ligand expression was established under normoxia, hypoxia and hypoxia/reoxygenation.

Results. Combinations of bevacizumab and erlotinib were significantly more active than bevacizumab alone for all three xenograft models. Quantitative IHC analysis showed that bevacizumab activated EGFR in the tumor cells as well as in the tumor-associated endothelial cells which was attenuated by erlotinib. Erlotinib was more cytotoxic toward CRC cells under hypoxia and hypoxia/reoxygenation than under normoxia and was able to downregulate the EGFR ligands TGF-alpha and amphiregulin under all experimental conditions.

Conclusions. We here show that combinations of bevacizumab and erlotinib are significantly more active than bevacizumab alone in CRC

models with different *KRAS* status and bevacizumab sensitivity. These findings provided the rational basis for the positive GERCOR phase III DREAM trial.

Introduction

Therapies directed against oncogenic signaling pathways are approved for multiple tumor types. Often, the clinical outcome has been less than expected, in part due to activation of compensatory survival signaling in response to pathway blockage. As a result, there is increasing interest in joint inhibition of multiple pathways (1 Gossage & Eisen, 2010). The epidermal growth factor receptor (EGFR) and the vascular endothelial growth factor (VEGF(R)) pathways are validated targets for the treatment of patients with metastatic colorectal cancer (mCRC). There is extensive cross-talk between these two signaling pathways leading to promotion of tumor cell proliferation, survival and dissemination (for review, see 2 Larsen et al., 2011). In agreement, combinations of VEGF(R)- and EGFR-directed compounds have consistently shown at least additive activity in preclinical CRC models (3-8 Ciardiello et al., 2000; Shaheen et al., 2001; Ciardiello et al., 2004; Sini et al., 2005; Yokoi et al., 2005; Tonra et al., 2006) as well as in xenograft models for pancreatic cancer, non-small cell lung cancer (NSCLC) and melanoma (8-10 Tonra et al., 2006; Naumov et al., 2009; Schicher et al., 2009). These positive findings prompted two large clinical trials, CAIRO2 and PACCE, where EGFR-targeted antibodies (mAbs) were added to bevacizumab and chemotherapy for treatment of patients with mCRC (11,12 Tol et al., 2009; Hecht et al., 2009). However, the addition of EGFR-targeted mAbs to bevacizumab plus chemotherapy was no better than bevacizumab plus chemotherapy alone, even for patients with wild-type *KRAS* tumors and was detrimental for patients with *KRAS* mutant tumors.

To determine if these disappointing results were pathway- or agent-related, we compared the antitumor activity of the combination of two mAbs, bevacizumab and cetuximab, with the combination of two small molecule tyrosine kinase inhibitors (TKIs), nintedanib and afatinib, in the same CRC xenograft model (13 Poindessous et al., 2011). The results showed that the combination of the two antibodies was no more active than either agent alone, in agreement with the clinical findings. In contrast, the combination of the TKIs showed synergistic antitumor activity, suggesting that the disappointing results of the clinical trials were due to an incompatibility between the mAbs. Unexpectedly, the TKI combination was also active in CRC models with mutant *KRAS* status (13 Poindessous et al., 2011) suggesting that mutant *KRAS* may not be a limiting factor for EGFR-directed TKIs like it is for the EGFR-directed mAbs (14 Normanno et al., 2009). These findings point to potential differences between mAbs and TKIs targeting the same pathway, which is concordant with clinical trials in NSCLC where EGFR mutations were associated with sensitivity to TKIs but not to cetuximab (15 Mukohara et al. 2005).

Erlotinib is a small molecule tyrosine kinase inhibitor approved for treatment of locally advanced or metastatic NSCLC and pancreatic cancer (16,17 Shepherd et al., 2005; Moore et al., 2007). Erlotinib is highly selective for the EGFR family of receptor tyrosine kinases at physiological concentrations of ATP (18 Kitagawa et al., 2013).

We now show that bevacizumab exposure is accompanied by EGFR activation in the tumor cells as well as in the tumor-associated endothelial cells (TECs) which can be attenuated by erlotinib. Accordingly, combinations of bevacizumab and erlotinib were significantly more active than bevacizumab alone in different CRC models, independent of *KRAS* status and bevacizumab sensitivity.

These findings provided the rational basis for the positive GERCOR phase III DREAM trial.

Materials and Methods

Drugs and chemicals

Bevacizumab (Avastin) was provided by Roche while erlotinib (Tarceva) was purchased from LC Laboratories.

Xenograft models

The antitumor effects of bevacizumab, erlotinib and their combination were evaluated in athymic mice (female NMRI-Foxn1n, 6 weeks old) from Taconic bearing SW48, HT-29 or SW620 xenografts. Two to five million cells were injected into the right flank, and the treatments were started when the tumors were palpable (median tumor volume ~100 mm^3). The animals were weighed daily and the tumor size was determined three times per week as described previously (19 Mésange et al., 2014). Tumor volumes (mm^3) were calculated according to formula: [(length² x width)/ 2]. Boxplot analysis of the weights and tumor volumes was carried out using the GraphPad Prism version 5.00 software (GraphPad Software). Treated/Control (T/C) values were calculated as follows: average tumor volume of treated animals/average tumor volume of control animals x 100. Animals were treated according to institutional guidelines.

ELISA assay for VEGF

Healthy tumor tissues were collected from untreated, frozen tumors (three tumors per xenograft model), and protein extracts were prepared in RIPA buffer according to the manufacturer's instructions. VEGF levels were determined by Quantikine ELISA (R&D System # DVE00 (human, tumor-derived VEGF) and MMV00 (murine, stroma-derived VEGF). The values represent the average of 3 independent experiments, each done in duplicate.

Immunohistochemistry

Biomarker analysis was carried out with tumors collected after 4 weeks of treatment. The following antibodies were used for immunohistochemistry (IHC) analysis: anti-pEGFR (sc-12351, Santa Cruz Biotechnology) that recognizes phospho-Tyr 1173, anti-EGFR (sc-03, Santa Cruz Biotechnology), anti-pHER3 (#4791 Cell Signaling) that recognizes phospho-Tyr1289 and anti-CD31 (BD Bioscience # 550274) to determine the vascular density. The relevant Cy3-conjugated secondary antibodies were obtained from Jackson ImmunoResearch. All images were captured by a fluorescence microscope and the fluorescence intensities were determined by the MetaMorph software (Universal Imaging Corporation) for quantitative image analysis. For the quantitative analysis of the signal intensity for pEGFR, EGFR and pHER3, the data represents the average fluorescence intensity of treated tumors compared to the treatment intensity of control tumors and is the average of 6 fields/tumor for at least 3 different tumors. Blood vessel density is expressed as the CD31-positive area, in % of total, and represents the averages of at least 6 fields/tumor for at least 3 different tumors.

For the determination of pEGFR expression by the tumor-associated endothelial cells, double labeling was carried out for pEGFR and CD31 and the degree of colocalization was determined by semi-quantitative analysis as illustrated in Figure 3. Only blood vessels where the entire rim could be assessed were included in the analysis with at least 12 blood vessels per treatment.

Tumor cells and viability assays

HT-29 and SW620 cells were kindly provided by Richard Camalier, Division of Cancer Treatment and Diagnosis tumor repository (NCI, US) whereas SW48 cells were a generous gift from Richard Hamelin (Saint-Antoine Research Center, Paris, France).

Cellular viability was determined by the MTT (methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide) viability assay after 120 hrs drug exposure as described previously (20,21 Poindessous et al., 2003; Soares et al., 2007) with minor modifications. Cells were plated in 24-well plates and allowed to attach for 18 hrs under standard culture conditions (normoxia, 21% O_2). Then, cells were exposed to the indicated concentrations of erlotinib for 120 hrs according to one of the following three protocols: 1) 120 hrs under normoxia, 2) 48 hrs hypoxia (1% O_2) followed by 72 hrs under normoxia, or 3) 24 hrs hypoxia followed by 24 hrs normoxia, 24 hrs hypoxia and 48 hrs normoxia (hypoxia/reoxygenation).

ELISA assays for EGF, TGF-alpha and amphiregulin

Cells were seeded and allowed to attach for 24 hrs followed by 24 hrs incubation in serum-free media under normoxic or hypoxic conditions.

The conditioned media was collected and concentrated using Amicon ultracentrifugal filter units. The levels of secreted EGF, TGF-alpha and amphiregulin were determined by Quantikine ELISA (R&D System # DEG00 for EGF, # DTGA00 for TGF-alpha and # DAR00 for amphiregulin) according to the manufacturer's instructions. The values represent the average of 3 independent experiments, each done in duplicate.

Statistical analysis

The statistical analysis of experimental data was performed using a Student's paired *t*-test, and results are presented as mean ± standard deviation (SD).

Results

Erlotinib increases the antitumor activity of bevacizumab in colorectal cancer models

Three different xenograft models were used to establish the influence of erlotinib on the antitumor effects of bevacizumab. This includes SW48 that is *KRAS* wt and bevacizumab sensitive, HT-29 that is *KRAS* wt and bevacizumab resistant (19 Mésange et al., 2014) and SW620 that is *KRAS* mutant and bevacizumab sensitive. To facilitate the detection of a synergistic effect between the two drugs, bevacizumab was administered at a lower dose (1 mg/kg *i.p.* every 3 days) to mice with SW48 and SW620 tumor xenografts than to mice with HT-29

xenografts (5 mg/kg *i.p.* every 3 days), while the dose of erlotinib was the same for all three models (100 mg/kg *p.o.* once daily).

No lethality or weight loss was observed for any of the treatment groups, although the weight gain was less for mice receiving erlotinib-containing regimens than for mice treated with vehicle or bevacizumab alone (data not shown).

The antitumor activities of both bevacizumab and erlotinib were comparable for SW48 and SW620 xenografts with T/C values (average tumor volume of treated animals/average tumor volume of control animals x100) of 54 and 53 for bevacizumab and 64 and 69 for erlotinib, respectively (Figure 1). Combined treatment with bevacizumab and erlotinib increased the antitumor activity to T/C values of 31 and 36, respectively, which is significantly different from bevacizumab alone ($p < 0.01$). To confirm the activity of the bevacizumab plus erlotinib combination toward the *KRAS* mutant SW620 tumors at clinically relevant bevacizumab concentrations, the experiment was repeated in the presence of a standard dose of bevacizumab (5 mg/kg). Under these conditions, the T/C value was 27 for bevacizumab alone and 16 for the combination ($p < 0.001$) (data not shown).

High dose bevacizumab was accompanied by modest tumor growth inhibition for HT-29 xenografts (T/C: 68) whereas erlotinib treatment was associated with an unexpected strong antitumor activity (T/C: 36). The combination of the two drugs gave a T/C value of 27, which is significantly ($p < 0.001$) more than what was observed for bevacizumab alone (Figure 1).

Therefore, the bevacizumab plus erlotinib combination was significantly more active than bevacizumab alone in all three xenograft models independent of bevacizumab sensitivity and *KRAS* status.

VEGF is principally of human origin in CRC xenografts

Bevacizumab is specific for human VEGF, and will therefore only neutralize VEGF produced by the tumor cells, but not murine VEGF secreted by the tumor-associated stromal cells. To evaluate the contribution of stromal VEGF, tissue extracts were prepared from untreated SW48, HT-29 and SW620 tumors and the concentration of murine and human VEGF was determined by ELISA analysis. (data not shown). The result show that murine VEGF represents a minor fraction of the total VEGF (2.5 to 5.3%), in agreement with previous findings (19 Mésange et al.,2014). Therefore, VEGF signaling is principally mediated by tumor-derived, human VEGF in all three CRC xenograft models.

Influence of bevacizumab, erlotinib and their combination on EGFR signaling in colorectal cancer models

To explore the mechanistic basis for the activity of the bevacizumab plus erlotinib combination, the levels of total and phosphorylated EGFR were determined by immunhistochemistry followed by quantitative image analysis. The results show that prolonged erlotinib exposure was accompanied by decreased levels of the active, autophosphorylated form of EGFR which was most pronounced for SW48 (66% inhibition, compared to the vehicle control) followed by SW620 (50% inhibition) and HT-29 xenografts (35% inhibition). Unexpectedly, bevacizumab treatment was accompanied by EGFR activation ranging from ~140% for the bevacizumab-sensitive SW48 and SW620 xenografts to ~200% for the bevacizumab-resistant HT-29 xenografts. The addition of erlotinib to bevacizumab was accompanied by a highly significant ($p < 0.001$) decrease in pEGFR levels for all three CRC models (Figure 2).

To probe the reasons for the altered pEGFR levels, immunohistochemistry analysis was carried out for total EGFR. The results show that bevacizumab had no detectable influence on EGFR levels whereas erlotinib alone or in combination was accompanied by a modest increase of total EGFR that never reached significance. Therefore, the drug-associated changes in the levels of phosphorylated EGFR are not linked to altered expression of EGFR protein.

The antitumor activity of erlotinib and gefitinib is not only mediated *via* their effect on EGFR homodimers, but also *via* inhibition of EGFR-HER3/ErbB3 heterodimers (22,23 Engelman et al., 2005; Buck et al., 2006). In agreement, erlotinib decreased the levels of pHER3 whereas bevacizumab had no detectable effects (Figure 2). The addition of erlotinib to bevacizumab was accompanied by a significant ($p < 0.01$) decrease in the levels of pHER3 compared to bevacizumab alone, which was most marked for the HT-29 xenografts.

Taken together, these results show that the combination of bevacizumab plus erlotinib decreases the levels of pEGFR and pHER3 in colorectal cancer xenografts, compared to bevacizumab alone.

Influence of bevacizumanb, erlotinib and their combination on tumor-associated endothelial cells

The microvascular density of SW48, HT-29 and SW620 xenografts was compared by IHC with a CD31-directed antibody followed by quantitative image analysis. The results (Figure 2) indicate that bevacizumab reduces the microvascular density by ~ 65% in the bevacizumab-sensitive SW48 and SW620 xenografts compared to ~ 30% for the bevacizumab-resistant HT-29 xenografts. In contrast, erlotinib treatment was accompanied by a reduction of the vascular

density in all 3 xenograft models. Interestingly, the addition of erlotinib to bevacizumab doubled the reduction of the microvascular density for HT-29 xenografts (70% vs 36% for bevacizumab alone compared to bevacizumab plus erlotinib) suggesting that EGFR-signaling contributed to the bevacizumab resistance of these tumors. The combination of bevacizumab plus erlotinib was also more effective than bevacizumab alone for SW48 and SW620 tumors, although this only reached significance for SW620.

Endothelial cells in the microenvironment of colorectal tumors (TECs) often express functional EGF receptors (7,24 Yokoi et al., 2005; Amin et al., 2006). To determine the influence of bevacizumab, erlotinib and their combination on the endothelial EGFRs, we developed a semi-quantitative approach as illustrated in Figure 3, top. Tumors were double-labeled for pEGFR and CD31 and the degree of colocalization was determined for blood vessels where the entire vessel rim could be assessed. Endothelial blood vessels exclusively labeled with CD31 received a score of 0, endothelial vessels displaying some colocalization between CD31 and pEGFR received a score of 1 whereas blood vessels with strong colocalization received a score of 2. The results show that bevacizumab treatment was accompanied by an increase in TEC-associated pEGFR whereas TEC-associated pEGFR was attenuated following treatment with erlotinib. The combination of bevacizumab plus erlotinib was associated with a highly significant ($p < 0.001$) decrease in pEGFR compared to bevacizumab alone in all three xenograft models.

Therefore the addition of erlotinib to bevacizumab was accompanied by decreased microvessel density as well as by a reduction of TEC-associated pEGFR levels, compared to bevacizumab alone.

Cytotoxic activity of erlotinib toward colorectal cancer cells under normoxia, hypoxia and hypoxia/reoxygenation

It has been reported that gefitinib is less active under hypoxia than under normoxia toward NSCLC cells expressing wt EGFR protein (25 Minakata et al., 2012). Considering that treatment with angiogenesis inhibitors such as bevacizumab is typically accompanied by either transient or prolonged hypoxia in solid tumors, we determined the sensitivity of SW48, HT-29 and SW620 cells to erlotinib under normoxia, hypoxia or hypoxia/reoxygenation as outlined in material and methods. The results (Table 1) show that all cell lines were relatively resistant to erlotinib *in vitro* which was most pronounced for the SW620 cells. Importantly, erlotinib showed stronger cytotoxic activity under hypoxia or hypoxia/reoxygenation than under normoxia for all three cell lines ($p < 0,05$).

Secretion of EGFR-ligands in colorectal cancer cells under normoxia and hypoxia

The activity of EGFR is principally mediated by EGFR ligands. We therefore compared the levels of selected EGFR ligands including EGF, TGF-alpha and amphiregulin in the conditioned media of SW48, HT-29 and SW620 cells. The results show that all cell lines expressed very low levels of EGF, below 1 pg/µg of total protein (data not shown). TGF-alpha was expressed at higher levels ranging from ~ 15 pg/µg total protein for SW48 and HT-29 cells to ~ 37 pg/µg total protein for SW620 cells under standard culture conditions (Figure 4A). Hypoxia was accompanied by a 2.5-fold increase in TGF-alpha secretion for SW48 cells, but had modest influence on HT-29 and SW620 cells (Figure 4A).

Amphiregulin was highly expressed by all 3 cell lines ranging from 445 pg/µg protein for SW620 cells to 1345 pg/µg protein for SW48 cells and 3901 pg/µg protein for HT-29 cells (Figure 4B). The expression of amphiregulin was further increased under hypoxia, in particular for SW48 cells and, to a lesser degree, for HT-29 cells. In comparison, hypoxia was accompanied by a small, non significant decrease of amphiregulin secretion for SW620 cells. We next determined the influence of erlotinib (10 µM) on amphiregulin secretion. Erlotinib reduced the secretion of amphiregulin by ~ 30% for all cell lines under normoxia (Figure 4C). The capacity of erlotinib to attenuate amphiregulin secretion was further enhanced under hypoxia, where amphiregulin levels were reduced up to 80%.

Taken together, these results show that all three cell lines express high levels of amphiregulin, which was further upregulated under hypoxia in *KRAS* wt cells. The presence of erlotinib was accompanied by reduced amphiregulin secretion whatever the oxygen concentration and *KRAS* phenotype.

Discussion

We here show that the combination of bevacizumab and erlotinib was significantly more active than bevacizumab alone in all CRC xenograft models studied, independent of bevacizumab sensitivity and *KRAS* status. Biomarker analysis revealed that bevacizumab exposure activated EGFR in the tumor cells as well as in the tumor-associated endothelial cells (TECs) which could be attenuated by erlotinib. Although this is, to the best of our knowledge, the first report documenting the activation of EGFR by bevacizumab, the result is fully coherent with the

well-documented role of EGFR in survival signaling that is activated by different types of cellular stress including hypoxia. Stress-induced EGFR activation can proceed via several, not necessarily mutually exclusive, pathways including 1), upregulation of EGFR ligands such as amphiregulin (26,27 O'Reilly et al., 2006; Bordoli et al., 2011) and TGF-alpha (25 Minakata et al., 2012) thereby stimulating EGFR autophosphorylation; 2), Src upregulation (28 Petitprez & Larsen 2013) leading to increased transphosphorylation of EGFR; 3), Hypoxia-mediated membrane modifications increasing the local EGFR concentration (29,30 Lee et al., 2009; Wang et al., 2012); 4), attenuation of endocytosis (31 Wang et al., 2009) thereby prolonging receptor signaling at the plasma membrane; and 5), translational upregulation of EGFR (32 Franovic et al., 2007). Among these possibilities, our biomarker analysis does not provide support for EGFR upregulation in any of the bevacizumab-treated tumors whereas the *in vitro* data suggest that TGF-alpha and amphiregulin is upregulated by hypoxia in the *KRAS* wt cell lines.

Erlotinib exposure was accompanied by decreased microvascular density in agreement to what has been observed for cetuximab (3,33,34 Perrotte et al., 1999; Ciardiello et al., 2000; Bruns et al., 2000). Active EGF receptors are expressed on the surface of TECs from surgical samples and tumor xenografts (7,24,35 Yokoi et al., 2005; Amin et al., 2006; Sasaki et al., 2008) and are considered a direct target for EGFR-directed therapies (34,36,37 Bruns et al., 2000; Amin et al., 2008; Kuwai et al., 2008). In agreement, active phosphorylated EGFR was expressed by TECs in all three CRC xenograft models and could be attenuated by erlotinib. Interestingly, bevacizumab increased the levels of phosphorylated EGFR in the tumor cells as well as in the TECs,

consistent with the activation of a hypoxia-induced survival signaling pathway.

It has been reported that wt EGFR protein may provide resistance of NSCLC cells to gefitinib during hypoxia via hypoxia-inducd upregulation of TGF-alpha which is accompanied by activation of EGFR survival signaling (25 Minakata et al., 2012). This observation is of concern since most CRC cells express wt EGFR which might limit the activity of erlotinib under hypoxia. However, in the present study, erlotinib showed increased, rather than decreased, cytotoxic activity toward all three CRC cell lines under hypoxia and hypoxia/reoxygenation compared to normoxia, indicating that wt EGFR status is unlikely to limit the activity of erlotinib in CRC. Both TGF-alpha and amphiregulin form a self-reinforcing feed-back loop with EGFR (38,39 Coffey et al., 1987; Panupinthu et al., 2013). In agreement, erlotinb exposure was accompanied by decreased secretion of TGF-alpha and amphiregulin under both normoxic and hypoxic conditions for all cell lines.

The activity of erlotinib toward the *KRAS* mutant xenograft model is of particular interest considering that *KRAS* is mutationally activated in up to 43% of CRC patients (40 Cancer Genome Atlas Network, 2012) and is a recognized negative predictive factor for EGFR-directed antibodies (14,41 Normanno et al., 2009; Allegra et al., 2009). Intriguingly, all *KRAS* mutations do not seem of equal importance (42-44 Span et al., 1996; Winder et al., 2009; Pentheroudakis et al., 2013) suggesting that the modified response to EGFR-directed antibodies may somehow be linked to the precise conformation of the mutated *KRAS* protein and the way this conformation affects downstream signaling. In lung cancer, the association between *KRAS* status and the response to EGFR-directed TKIs is weak compared to the impact of EGFR mutations whereas *KRAS* status is not predictive for the response to cetuximab (45

Roberts and Stinchcombe, 2013). In the current study, *KRAS* status was not predictive for the response to erlotinib in line with our previous results for afatinib, an irreversible inhibitor of the HER/ErbB2 family (13 Poindessous et al., 2011). This is also in agreement with a small clinical study where erlotinib was administered to patients with mCRC in combination with chemotherapy (46 Ma et al., 2013) Together, these data suggest that the activity of EGFR-directed TKIs may not be limited by mutant *KRAS* as being the case for the EGFR-directed mAbs.

Taken together, our results suggest that the combination of bevacizumab and erlotinib might be more active than bevacizumab alone in maintenance therapy, even for patients with mutant *KRAS* status, thereby providing a rational basis for the positive GERCOR phase III DREAM trial.

Acknowledgements

We like to acknowledge the contribution of Olivier Bernadini, Tatiana Ledent and Delphine Muller from the animal facilities at Saint-Antoine Research Center and Sylvie Dumont and Fatiha Merabtene from the pathology platform at Hôpital Saint-Antoine. Paul Mésange is supported by a Mouna Nasrallah fellowship.

References

1. Gossage L, Eisen T. Targeting multiple kinase pathways: a change in paradigm. Clin Cancer Res 2010;16:1973-8.

2. Larsen AK, Ouaret D, El Ouadrani K, Petitprez A. Targeting EGFR and VEGF(R) pathway cross-talk in tumor survival and angiogenesis. Pharmacol Ther 2011;131:80-90.

3. Ciardiello F, Bianco R, Damiano V, Fontanini G, Caputo R, Pomatico G, et al. Antiangiogenic and antitumor activity of anti-epidermal growth factor receptor C225 monoclonal antibody in combination with vascular endothelial growth factor antisense oligonucleotide in human GEO colon cancer cells. Clin Cancer Res 2000;6:3739-47.

4. Shaheen RM, Ahmad SA, Liu W, Reinmuth N, Jung YD, Tseng WW, et al. Inhibited growth of colon cancer carcinomatosis by antibodies to vascular endothelial and epidermal growth factor receptors. Br J Cancer 2001;85:584-9.

5. Ciardiello F, Bianco R, Caputo R, Damiano V, Troiani T, Melisi D, et al. Antitumor activity of ZD6474, a vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, in human cancer cells with acquired resistance to antiepidermal growth factor receptor therapy. Clin Cancer Res 2004;10:784-93.

6. Sini P, Wyder L, Schnell C, O'Reilly T, Littlewood A, Brandt R, et al. The antitumor and antiangiogenic activity of vascular endothelial

growth factor receptor inhibition is potentiated by ErbB1 blockade. Clin Cancer Res 2005;11:4521-32.

7. Yokoi K, Thaker PH, Yazici S, Rebhun RR, Nam DH, He J, et al. Dual inhibition of epidermal growth factor receptor and vascular endothelial growth factor receptor phosphorylation by AEE788 reduces growth and metastasis of human colon carcinoma in an orthotopic nude mouse model. Cancer Res 2005;65:3716-25.

8. Tonra JR, Deevi DS, Corcoran E, Li H, Wang S, Carrick FE, Hicklin DJ. Synergistic antitumor effects of combined epidermal growth factor receptor and vascular endothelial growth factor receptor-2 targeted therapy. Clin Cancer Res 2006;12:2197-207.

9. Naumov GN, Nilsson MB, Cascone T, Briggs A, Straume O, Akslen LA, et al. Combined vascular endothelial growth factor receptor and epidermal growth factor receptor (EGFR) blockade inhibits tumor growth in xenograft models of EGFR inhibitor resistance. Clin Cancer Res 2009;15:3484-94.

10. Schicher N, Paulitschke V, Swoboda A, Kunstfeld R, Loewe R, Pilarski P, et al. Erlotinib and bevacizumab have synergistic activity against melanoma. Clin Cancer Res 2009;15:3495-502.

11. Tol J, Koopman M, Cats A, Rodenburg CJ, Creemers GJ, Schrama JG, et al. Chemotherapy, bevacizumab, and cetuximab in metastatic colorectal cancer. N Engl J Med 2009;360:563-72.

12. Hecht JR, Mitchell E, Chidiac T, Scroggin C, Hagenstad C, Spigel D, et al. A randomized phase IIIB trial of chemotherapy, bevacizumab, and panitumumab compared with chemotherapy and bevacizumab alone for metastatic colorectal cancer. J Clin Oncol 2009;27:672-80.

13. Poindessous V, Ouaret D, El Ouadrani K, Battistella A, Mégalophonos VF, Kamsu-Kom N, et al. EGFR- and VEGF(R)-targeted small molecules show synergistic activity in colorectal cancer models refractory to combinations of monoclonal antibodies. Clin Cancer Res 2011;17:6522-30.

14. Normanno N, Tejpar S, Morgillo F, De Luca A, Van Cutsem E, Ciardiello F. Implications for KRAS status and EGFR-targeted therapies in metastatic CRC. Nat Rev Clin Oncol 2009;6:519-27.

15. Mukohara T, Engelman JA, Hanna NH, Yeap BY, Kobayashi S, Lindeman N, et al. Differential effects of gefitinib and cetuximab on non-small-cell lung cancers bearing epidermal growth factor receptor mutations. J Natl Cancer Inst 2005;97:1185-94.

16. Shepherd FA, Rodrigues Pereira J, Ciuleanu T, Tan EH, Hirsh V, Thongprasert S, et al. National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer. N Engl J Med. 2005;353:123-32.

17. Moore MJ, Goldstein D, Hamm J, Figer A, Hecht JR, Gallinger S, et al. Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the

National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. J Clin Oncol 2007;25:1960-6.

18. Kitagawa D, Yokota K, Gouda M, Narumi Y, Ohmoto H, Nishiwaki E, et al. Activity-based kinase profiling of approved tyrosine kinase inhibitors. Genes Cells 2013;18:110-22.

19. Mésange P, Poindessous V, Sabbah M, Escargueil AE, de Gramont A, Larsen AK. Intrinsic bevacizumab resistance is associated with prolonged activation of autocrine VEGF signaling and hypoxia tolerance in colorectal cancer cells and can be overcome by nintedanib, a small molecule angiokinase inhibitor. Oncotarget in press

20. Poindessous V, Koeppel F, Raymond E, Comisso M, Waters SJ, Larsen AK. Marked activity of irofulven toward human carcinoma cells: comparison with cisplatin and ecteinascidin. Clin Cancer Res 2003;9:2817-25.

21. Soares DG, Escargueil AE, Poindessous V, Sarasin A, de Gramont A, Bonatto D, et al. Replication and homologous recombination repair regulate DNA double-strand break formation by the antitumor alkylator ecteinascidin 743. Proc Natl Acad Sci USA 2007;104:13062-7.

22. Engelman JA, Jänne PA, Mermel C, Pearlberg J, Mukohara T, Fleet C, et al. ErbB-3 mediates phosphoinositide 3-kinase activity in gefitinib-sensitive non-small cell lung cancer cell lines. Proc Natl Acad Sci USA 2005;102:3788-93.

23. Buck E, Eyzaguirre A, Haley JD, Gibson NW, Cagnoni P, Iwata KK. Inactivation of Akt by the epidermal growth factor receptor inhibitor erlotinib is mediated by HER-3 in pancreatic and colorectal tumor cell lines and contributes to erlotinib sensitivity. Mol Cancer Ther 2006;5:2051-9.

24. Amin DN, Hida K, Bielenberg DR, Klagsbrun M. Tumor endothelial cells express epidermal growth factor receptor (EGFR) but not ErbB3 and are responsive to EGF and to EGFR kinase inhibitors. Cancer Res 2006;66:2173-80.

25. Minakata K, Takahashi F, Nara T, Hashimoto M, Tajima K, Murakami A, et al. Hypoxia induces gefitinib resistance in non-small-cell lung cancer with both mutant and wild-type epidermal growth factor receptors. Cancer Sci 2012;103:1946-54.

26. O'Reilly SM, Leonard MO, Kieran N, Comerford KM, Cummins E, Pouliot M, et al. Hypoxia induces epithelial amphiregulin gene expression in a CREB-dependent manner. Am J Physiol Cell Physiol 2006;290:C592-600.

27. Bordoli MR, Stiehl DP, Borsig L, Kristiansen G, Hausladen S, Schraml P, et al. Prolyl-4-hydroxylase PHD2- and hypoxia-inducible factor 2-dependent regulation of amphiregulin contributes to breast tumorigenesis. Oncogene 2011;30:548-60.

28. Petitprez A, Larsen AK. Irinotecan resistance is accompanied by upregulation of EGFR and Src signaling in human cancer models. Curr Pharm Des 2013;19:958-64.

29. Lee SH, Koo KH, Park JW, Kim HJ, Ye SK, Park JB, et al. HIF-1 is induced via EGFR activation and mediates resistance to anoikis-like cell death under lipid rafts/caveolae-disrupting stress. Carcinogenesis 2009;30:1997-2004.

30. Wang Y, Roche O, Xu C, Moriyama EH, Heir P, Chung J, et al. Hypoxia promotes ligand-independent EGF receptor signaling via hypoxia-inducible factor-mediated upregulation of caveolin-1. Proc Natl Acad Sci USA 2012;109:4892-7.

31. Wang Y, Roche O, Yan MS, Finak G, Evans AJ, Metcalf JL, et al. Regulation of endocytosis via the oxygen-sensing pathway. Nat Med 2009;15:319-24.

32. Franovic A, Gunaratnam L, Smith K, Robert I, Patten D, Lee S. Translational up-regulation of the EGFR by tumor hypoxia provides a nonmutational explanation for its overexpression in human cancer. Proc Natl Acad Sci USA 2007;104:13092-7.

33. Perrotte P, Matsumoto T, Inoue K, Kuniyasu H, Eve BY, Hicklin DJ, et al. Anti-epidermal growth factor receptor antibody C225 inhibits angiogenesis in human transitional cell carcinoma growing orthotopically in nude mice. Clin Cancer Res 1999;5:257-65.

34. Bruns CJ, Harbison MT, Davis DW, Portera CA, Tsan R, McConkey DJ, et al. Epidermal growth factor receptor blockade with C225 plus gemcitabine results in regression of human pancreatic carcinoma growing orthotopically in nude mice by antiangiogenic mechanisms. Clin Cancer Res 2000;6:1936-48.

35. Sasaki T, Nakamura T, Rebhun RB, Cheng H, Hale KS, Tsan RZ, et al. Modification of the primary tumor microenvironment by transforming growthfactor alpha-epidermal growth factor receptor signaling promotes metastasis in an orthotopic colon cancer model. Am J Pathol 2008;173:205-16.

36. Amin DN, Bielenberg DR, Lifshits E, Heymach JV, Klagsbrun M. Targeting EGFR activity in blood vessels is sufficient to inhibit tumor growth and is accompanied by an increase in VEGFR-2 dependence in tumor endothelial cells. Microvasc Res 2008;76:15-22.

37. Kuwai T, Nakamura T, Sasaki T, Kim SJ, Fan D, Villares GJ, et al. Phosphorylated epidermal growth factor receptor on tumor-associated endothelial cells is a primary target for therapy with tyrosine kinase inhibitors. Neoplasia 2008;10:489-500.

38. Coffey RJ Jr, Derynck R, Wilcox JN, Bringman TS, Goustin AS, Moses HL,Pittelkow MR. Production and auto-induction of transforming growth factor-alpha in human keratinocytes. Nature 1987;328:817-20.

39. Panupinthu N, Yu S, Zhang D, Zhang F, Gagea M, Lu Y, et al. Self-reinforcing loop of amphiregulin and Y-box binding protein-1 contributes to poor outcomes in ovarian cancer. Oncogene 2013 Jul 15.

40. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. Nature 2012;487:330-7.

41. Allegra CJ, Jessup JM, Somerfield MR, Hamilton SR, Hammond EH, Hayes DF, et al. American Society of Clinical Oncology provisional clinical opinion: testing for KRAS gene mutations in patients with metastatic colorectal carcinoma to predict response to anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody therapy. J Clin Oncol 2009;27:2091-6.

42. Span M, Moerkerk PT, De Goeij AF, Arends JW. A detailed analysis of K-ras point mutations in relation to tumor progression and survival in colorectal cancer patients. Int J Cancer 1996;69:241-5.

43. Winder T, Mündlein A, Rhomberg S, Dirschmid K, Hartmann BL, Knauer M, et al. Different types of K-Ras mutations are conversely associated with overall survival in patients with colorectal cancer. Oncol Rep 2009;21:1283-7.

44. Pentheroudakis G, Kotoula V, De Roock W, Kouvatseas G, Papakostas P, Makatsoris T, et al. Biomarkers of benefit from cetuximab-based therapy in metastatic colorectal cancer: interaction

of EGFRligand expression with RAS/RAF, PIK3CA genotypes. BMC Cancer 2013;13:49.

45. Roberts PJ, Stinchcombe TE. KRAS mutation: should we test for it, and does it matter? J Clin Oncol 2013;31:1112-21.

46. Ma BB, Chan SL, Ho WM, Lau W, Mo F, Hui EP, et al. Intermittent versus continuous erlotinib with concomitant modified "XELOX" (q3W) in first-line treatment of metastatic colorectal cancer: correlation with serum amphiregulin and transforming growth factor alpha. Cancer 2013;119:4145-5

Table and Figure Legends

Table 1. The growth inhibitory effect of erlotinib was determined by the MTT viability assay after 120 hrs continuous drug exposure under normoxia (N), hypoxia (H, 48 hrs hypoxia (1% O_2) followed by 72 hrs normoxia or under hypoxia/reoxygenation (H + R, 24 hrs hypoxia, followed by 24 hrs normoxia, 24 hrs hypoxia and 48 hrs normoxia) and is expressed as IC_{50} values (drug concentration inhibiting cell growth by 50% compared to untreated controls). All values are an average of at least three independent experiments each done in duplicate.

Fig. 1. Influence of bevacizumab, erlotinib and their combination on tumor growth of CRC xenografts. *Left*, nude mice with SW48, HT-29 or SW620 CRC xenografts were dosed with vehicle (striped squares), bevacizumab at 1 mg/kg *i.p.* (SW48, SW620) or 5 mg/kg *i.p.* every 3 days (HT-29) (black circles), erlotinib at 100 mg/kg *p.o.* once daily (white circles), or bevacizumab and erlotinib together (grey circles). The curves represent the average tumor growth of at least 7 animals per group. Right, box and whisker plots of tumor volumes in mice with SW48, HT-29 or SW620 CRC xenografts after 4 weeks treatment with vehicle, bevacizumab, erlotinib, or their combination. Lines, medians; boxes, 25th to 75th percentile interquartile ranges; whiskers, the highest and lowest value for a given treatment.

Fig. 2. Influence of bevacizumab, erlotinib and their combination on EGFR signaling and angiogenesis in CRC xenografts. Nude mice with SW48 (grey columns), HT-29 (hatched columns) or SW620 (black

columns) human CRC xenografts were dosed with vehicle, bevacizumab at 1 mg/kg *i.p.* (SW48 and SW620) or 5 mg/kg *i.p.* (HT-29) every 3 days (Beva), erlotinib at 100 mg/kg *p.o.* once daily (Erlo) or their combination (Beva + Erlo) for 4 weeks. The expression of pEGFR, total EGFR, pHER3/pErbB3 and CD31 was determined by immunohistochemistry followed by quantitative image analysis. The photos illustrate the typical staining patterns for tumors derived from animals treated with bevacizumab (B) or with bevacizumab + erlotinib (B+E). For the quantitative analysis of the signal intensity of pEGFR, total EGFR and pHER3, the data represent the average fluorescence intensity of treated tumors compared to the treatment intensity of control tumors and are the average of 6 fields/tumor for at least 3 different tumors. For the microvascular density, the data show the CD31-positive area, as % of total, and represent the average of at least 6 fields/tumor for at least 3 different tumors. The statistical analysis of experimental data was performed using a Student's paired *t*-test comparing the treatment group with the vehicle control. Bars, SD; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Fig. 3. Influence of bevacizumab, erlotinib and their combination on pEGFR expression in tumor-associated endothelial cells. Nude mice with SW48 (grey columns), HT-29 (hatched columns) or SW620 (black columns) human CRC xenografts were dosed with vehicle, bevacizumab at 1 mg/kg *i.p.* (SW48 and SW620) or 5 mg/kg *i.p.* (HT-29) every 3 days (Beva), erlotinib at 100 mg/kg *p.o.* once daily (Erlo) or their combination (Beva + Erlo) for 4 weeks. To identify phosphorylated EGFR on the tumor-associated endothelial cells, double labeling was carried out for pEGFR and CD31 and the degree of colocalization was determined by semi-quantitative analysis as illustrated in the upper part of the figure. No colocalization was characterized by a uniform green color, some

colocalization was characterized by a mixture of yellow and green cells and strong colocalization was characterized by predominance of yellow cells. Only blood vessels where the entire rim could be assessed were included in the analysis with at least 12 blood vessels per group. Bars, SD; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Fig 4. Expression of EGFR ligands in CRC cells. Secretion of TGF-alpha (**A**) or amphiregulin (**D**) in SW48, HT-29 and SW620 xenografts after 24 hrs exposure to normoxia (light grey columns) or hypoxia (1% O_2, dark grey columns). Secretion of TGF-alpha (**B**) or amphiregulin (**E**) in SW48, HT-29 and SW620 xenografts after 24 hrs exposure to normoxia in the absence (light grey columns) or presence of 10 µM erlotinib (hatched light grey columns). Secretion of TGF-alpha (**C**) or amphiregulin (**F**) in SW48, HT-29 and SW620 xenografts after 24 hrs exposure to hypoxia (1% O_2) in the absence (dark grey columns) or presence of 10 µM erlotinib (hatched dark grey columns).

DISCUSSION

Les bases de la chimiothérapie ont vu le jour en 1947 [230]. Depuis, de nombreux protocoles ont été mis en place dans le but d'améliorer la survie et la qualité de vie du patient atteint de CRC avec les protocoles FOLFOX (1997) [231] et FOLFIRI (1999) [232]. L'arrivée de chimiothérapies ciblées comme les anticorps monoclonaux tel que le bevacizumab a augmenté la survie de patients dans le cancer du côlon métastatique [175]. Cependant, une sous population de patients ne bénéficient pas du traitement au bevacizumab d'un point de vue thérapeutique pour des raisons encore mal comprises. Nous avons donc cherché à déterminer si cette résistance au bevacizumab était intrinsèque ou si elle reflétait une résistance aux thérapies anti-angiogénique.

Afin de répondre à cette question, l'activité de cet anti-VEGF a été comparée à celle du nintedanib, une petite molécule ciblée inhibitrice d'angiokinases, en phase III de développement, dans des modèles résistants ou sensibles au bevacizumab. Une exposition prolongée au nintedanib (28 jours) a montré une activité anti proliférative dans deux modèles de xénogreffes de CRC sans effet secondaire notable. Ces résultats suggèrent que la résistance au bevacizumab ne veut pas dire résistance à tous traitements anti-angiogéniques.

Afin de comprendre les mécanismes de cette résistance, différentes analyses ont été réalisées notamment sur la signalisation VEGF. Nous avons mis en évidence que la vascularisation des tumeurs résistantes au bevacizumab était beaucoup plus prononcée que celle des tumeurs sensibles lors de l'administration du bevacizumab. En comparaison, aucune différence significative n'a été observée avec un traitement au nintedanib.

L'inhibition de la croissance tumorale peut avoir trois causes principales: L'arrêt du cycle cellulaire, la mort cellulaire ou les deux. Une étude de la synthèse d'ADN a montré la présence d'apoptose et de nécrose dans nos deux modèles tumoraux, indépendamment du traitement utilisé. Cependant, le taux d'apoptose dans la lignée résistante traitée avec le nintedanib était plus élevé que la lignée sensible ce qui suggère une atténuation des réponses de survie face au stress environnemental.

Il a été montré que le VEGF et ses récepteurs avaient une grande influence dans la survie cellulaire en condition de stress. Des analyses immunohistochimiques sur les acteurs de cette voie de signalisation, les protéines HIF, le VEGF, les récepteurs VEGFR-1 et VEGFR-2, ont montrées de fortes différences d'expression entre nos deux modèles. Le traitement par le nintedanib a montré dans le modèle beva-sensible une réduction globale de la voie de signalisation HIF-VEGF-VEGFR (Figure 41) contrairement au modèle beva-resistant.

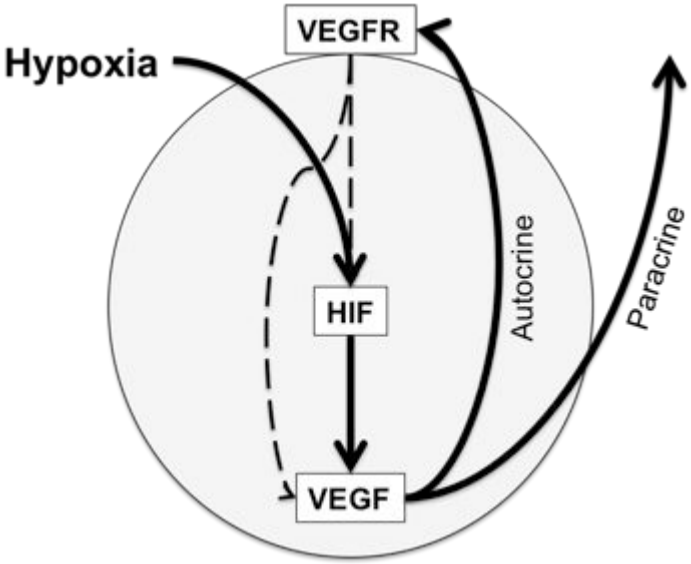


Figure 39: Voie de signalisation HIF/VEGF/VEGFR

Les données obtenues mettent en évidence une forte activation de la signalisation autocrine VEGF lors d'un traitement au bevacizumab comparé au traitement par le nintedanib, ce qui constitue une différence signalétique entre ces deux composés. La protéine mTORC1 est à la croisée de nombreuses voies de signalisation en aval de l'activation de récepteurs tyrosines kinases (VEGFR, EGFR…) et sert de biomarqueur afin de rendre compte de l'activité anti-tumorale d'un composé inhibant les voies de signalisation BRAF et PI3K [233, 234]. Afin de mesurer l'activité kinase de mTORC1, nous nous sommes intéressés au niveau de phosphorylation de la protéine ribosomale S6. Le traitement au bevacizumab et au nintedanib est accompagné d'une diminution de l'activité mTOR dans les modèles beva-sensible. Cependant, chez les beva-résistants, une forte activation de mTOR se produit après traitement au bevacizumab alors qu'une diminution est observée avec le nintedanib. Dans les modèles résistants, l'activation mTOR est cohérente avec les niveaux élevés de phosphorylation des récepteurs VEGFR-1 et VEGFR-2. Le traitement au nintedanib, induisant une baisse d'activité de mTOR, n'est

probablement pas en lien avec la voie de signalisation VEGF mais plus en rapport avec l'inhibition de nombreuses kinases comme le FGFR (ou le PDGFR) [178]. Une corrélation est clairement observée entre la diminution de pS6 et l'effet anti-tumoral. Cependant, les différences de niveaux d'activité pS6 ne sont pourtant pas indicatifs d'une réponse anti tumorale ce qui suggère que ce biomarqueur ne peut pas être utilisé pour étudier la réponse clinique à l'inhibition de l'angiogenèse.

Une des questions principales est de savoir si nos deux modèles sont capables d'activer ou non la voie de signalisation HIF en réponse à l'hypoxie. Nos essais sur HIF-1alpha et HIF-2alpha ont montré une expression de ces deux protéines en normoxie et en hypoxie (HIF-1alpha étant en proportion majoritaire en condition hypoxique à court terme). Ces résultats sont cohérents avec les résultats déjà obtenus par Koh en 2012, démontrant le rôle d'HIF-1alpha conduisant la réponse initiale à l'hypoxie tandis qu'HIF-2alpha est présente dans la réponse chronique [235]. Nous nous sommes ensuite intéressés à l'expression de cibles en aval de HIF-1alpha. Ainsi, nous avons clairement observé une expression de VEGF en condition hypoxique pour les deux modèles. Les différences d'expression (trois fois plus exprimées dans le modèle résistant) sont comparables au niveau d'expression dans les tumeurs xénogreffées. Cette différence *in vivo* dans les niveaux basaux de VEGF semble refléter une plus grande activité intrinsèque de la voie de signalisation HIF-VEGF.

Une courte exposition au nintedanib et au bevacizumab entraîne une forte régulation de la protéine HIF-1alpha dans les deux modèles, cela est dû à un rétro contrôle positif du VEGF sur son récepteur, suggérant un effet direct des composés sur les cellules tumorales. L'activité du nintedanib est cohérente avec les résultats précédents montrant une modulation du cycle cellulaire et de la viabilité cellulaire chez de nombreuses lignées de CRC [144]. L'influence du bevacizumab est plus inattendue considérant le fait que cet anticorps dirigé contre le VEGF n'est pas à même de pénétrer dans la cellule. Cependant, deux articles récents ont reporté qu'une exposition *in vitro* chronique des cellules de CRC au bevacizumab était accompagnée d'un changement de leur phénotype migratoire et invasif [236, 237] ce qui suggère également un effet direct du bevacizumab sur les cellules tumorales.

L'activation de HIF-1alpha par les composés anti-cancéreux a été accompagnée d'une régulation transcriptionnelle positive dans le modèle beva-

resistant. Sachant qu'HIF-1alpha est sujet à de nombreuses modifications post traductionnelles [238, 239], il est fort probable que les modèles beva-résistants permettent une meilleure activation d'HIF-1alpha.

Le modèle résistant est moins sensible à l'apoptose induite par l'hypoxie que son homologue sensible, en accord avec les résultats de Selvakumaran [168]. Si la survie des beva-résistants à l'hypoxie dépend de l'efficacité de l'activité des récepeteurs tyrosine kinase (incluant la signalisation autocrine VEGF), nous pourrions nous attendre à ce que le nintedanib soit plus toxique en hypoxie qu'en normoxie. Les résultats nous montrent une activité trois fois supérieur du nintedanib en hypoxie dans le modèle résistant contre une très faible différence dans le modèle sensible. Cette augmentation d'activité du nintedanib en hypoxie est différente de ce qui a été reporté pour le gefitinib, un autre inhibiteur tyrosine kinase (EGFR), qui a montré une cytotoxicité moindre sous hypoxie [240].

Chez le patient atteint de CRC, de nombreux éléments montrent une association entre les niveaux plasmatiques et intra-tumoraux de VEGF avec la progression tumorale et un mauvais pronostic [241, 242]. Ce fait est contrasté par les niveaux de VEGF avant traitement qui ne montrent aucune corrélation avec la réponse à un inhibiteur de l'angiogenèse tel que l'inhibiteur pan-VEGFR cediranib [242]. Cependant, l'expression d'autres cibles de la protéine HIF-1alpha comme la lactate déshydrogénase (LDH) [243, 244] et l'anhydrase carbonique IX [245] semble indiquer une sous population de patients ayant de mauvais pronostic qui pourrait bénéficier d'un traitement avec des anti-angiogéniques. Nous suggérons donc que la forte expression de protéines régulées par HIFs est associée avec une forte signalisation autocrine HIF-VEGF-VEGFR. Cette surexpression devrait permettre d'identifier les sous groupes de patients pouvant bénéficier d'un traitement avec le nintedanib.

Nos résultats appuient le rôle de la signalisation autocrine VEGF dans la survie cellulaire due à l'hypoxie et à l'inhibition de l'angiogenèse. Le nintedanib est actif dans les deux modèles proposés indépendamment de leur résistance ou sensibilité au bevacizumab ce qui supporte l'utilisation du nintedanib chez les patients ne répondant pas au bevacizumab dans un essai clinique.

Récemment, deux études cliniques utilisant le nintedanib ont été publiées. La première étude de phase II, nommée INPULSIS-1 et INPULSIS-2, a évalué

l'efficacité et la toxicité de l'administration de 150mg de nintedanib deux fois par jour comparé à un placebo chez des patients atteints de fibrose idiopathique pulmonaire avec succès [246]. L'autre étude de phase III nommée LUME lung a comparé dans le cancer du poumon non à petites cellules (NSCLC) l'activité et la toxicité d'une combinaison docetaxel (un alacaloïde approuvé pour le NSCLC) plus nintedanib contre docetaxel plus placebo en traitement de seconde ligne. Il a été montré que la combinaison docetaxel et nintedanib était une option thérapeutique efficace pour les patients avec un NSCLC avancé traité en première ligne par une chimiothérapie à base de platine, spécialement pour les patients présentant un adénocarcinome. La PFS (survie sans progression) médiane étant de 3,4 mois vs 2,8 mois (Hasard Ratio : 0,79) et l'OS (survie globale) de 10,9 vs 7,9 (Hasard Ratio : 0,75) [247].

Une étude clinique a comparé la combinaison du bevacizumab ou du nintedanib avec le protocole FOLFOX en 2011. La médiane de survie sans progression fut de 10,6 mois pour les deux types de traitement. Bien que le bevacizumab et le nintedanib semble avoir les mêmes efficacités et la même tolérance, il apparaît que la petite molécule ciblée diminue uniquement la fréquence d'apparition d'effets secondaires sévères. L'anticorps monoclonal apparaît supérieur au nintedanib pour le patient, pour le moment, selon l'Institut Gustave Roussy [248]. Nos résultats indiquent par exemple que le nintedanib ne devrait pas être administré avec des chimiothérapies du fait de l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 provoqué, une phase durant laquelle les cellules sont les moins sensibles au 5-FU, oxaliplatine ou irinotécan. D'autres études cliniques, avec des profils d'administration différents, notamment sur les conditions d'administration du nintedanib sont à envisager afin d'obtenir une amélioration de la qualité de vie et de survie du patient dans le cancer du côlon métastatique.

Bien que nous ayons démontré le rationnel quant à l'utilisation du nintedanib chez les patients atteints de CRC, notamment pour les patients ne répondant pas au bevacizumab, ce composé est encore en cours de développement. D'autres petites molécules ciblées ont été testées dans des essais cliniques comme CAIRO2 et PACCE qui ont testé la combinaison de deux anticorps monoclonaux (anti-VEGF et anti-EGFR). Comme vu précédemment, nous savons que ces essais cliniques n'ont montré aucun bénéfice pour le patient et a mis en évidence la mutation KRAS comme déterminante pour le traitement avec un anti-EGFR. Cependant, au vu des résultats obtenus en comparant le nintedanib et le bevacizumab et les résultats

précliniques montrant le bénéfice d'une combinaison de TKIs [144], il a été envisagé de combiner un anti-VEGF, le bevacizumab et l'erlotinib, une petite molécule ciblant l'EGFR.

Notre étude a montré que la combinaison de ces deux agents anti-cancéreux, l'erlotinib (anti EGFR) et le bevacizumab (anti VEGF), dans des modèles de souris xénogreffées avec des cellules de CRC était plus active que l'utilisation du bevacizumab seul, indépendamment de la sensibilité au bevacizumab et du statut KRAS. J'ai montré par l'analyse de biomarqueurs que le bevacizumab activait la protéine EGFR dans les cellules tumorales, tout comme dans les cellules endothéliales associées à la tumeur (TECs), en revanche, l'activation du récepteur est inhibée en présence d'erlotinib. C'est la première fois que nous reportons une activation d'EGFR à la suite d'une exposition au bevacizumab. Cependant, nos résultats restent cohérents avec le rôle d'EGFR dans la signalisation de survie activée par différents types de stress cellulaire dont l'hypoxie. L'activation d'EGFR par le stress peut se produire *via* différentes voies de signalisation :

- la régulation positive des ligands EGFR comme l'amphireguline [249, 250] et de TGF-alpha [240] qui stimulent l'autophosphorylation d'EGFR,
- La régulation positive de Src qui augmente la transphosphorylation d'EGFR [251],
- La modification de la structure membranaire due à l'hypoxie qui augmente la concentration locale d'EGFR [252, 253],
- La diminution de l'endocytose [254] qui contribue à la prolongation de la signalisation du récepteur,
- La régulation traductionnelle positive d'EGFR [213],

Parmi ces possibilités, l'analyse de biomarqueurs ne permet pas de valider l'hypothèse de régulation positive d'EGFR dans les tumeurs xénogreffées traitées au bevacizumab alors que les données *in vitro* suggèrent que le TGF-alpha et l'amphireguline sont régulés positivement en état d'hypoxie dans les lignées KRAS wt.

L'exposition à l'erlotinib a été accompagnée par la diminution de la densité microvasculaire tumorale, en concordance avec les résultats observés après traitement au cetuximab [201, 255, 256]. Les récepteurs à l'EGF actifs sont exprimés sur la surface des TECs (échantillons d'origine chirurgicaux) et des tumeurs

xénogreffées [209, 257, 258] et sont considérés comme une cible directe des thérapies anti-EGFR [256, 257, 259]. La phosphorylation active d'EGFR se produit aussi sur les TECs dans les trois modèles de xénogreffes de CRC étudiés et a été atténuée après traitement à l'erlotinib. De manière intéressante, le bevacizumab augmente les niveaux d'EGFR phosphorylé dans les cellules tumorales (comme dans les TECs), en concordance avec l'activation des voies de survie induites par l'hypoxie.

Il a été reporté que les protéines EGFR wt peuvent entraîner une résistance au gefitinib dans le NSCLC. En état d'hypoxie, la régulation positive de TGF alpha est accompagnée de l'activation de la voie de signalisation de survie EGFR [240]. Cette information est à corréler avec le fait que, dans le CRC, la protéine EGFR est sous forme native ce qui pourrait limiter l'activité de l'erlotinib en hypoxie. Cependant, dans notre étude, l'erlotinib a montré une augmentation et non une diminution de l'activité cytotoxique des trois lignées cellulaires de CRC sous hypoxie (et hypoxie/réoxygénation) comparé à la normoxie. Ces résultats indiquent que le statut sauvage de la protéine EGFR ne limite pas l'activité de l'erlotinib dans le CRC. Le TGF-alpha et l'amphireguline forme un rétrocontrôle positif avec l'EGFR [260, 261]. L'exposition à l'erlotinib a été accompagnée d'une diminution de la sécrétion de TGF-alpha et d'amphireguline sous conditions normoxiques et hypoxiques dans toutes les lignées cellulaires.

L'activité de l'erlotinib envers les xénogreffes au statut KRAS muté est d'un intérêt particulier considérant le fait que KRAS est muté activement dans plus de 43% des patients atteints de CRC [14], est reconnu comme un mauvais facteur pronostic et contre indiqué pour les thérapies à base d'anticorps dirigés contre l'EGFR [219, 262]. Etrangement, les mutations KRAS ne semblent pas d'égales importances, suggérant que la réponse aux anticorps anti-EGFR peut être liée à la conformation précise de la mutation de la protéine KRAS et la façon dont cette conformation affecte la signalisation en aval. Dans le cancer du poumon, l'association entre le statut KRAS et la réponse au TKI ciblant EGFR est faible comparé à l'impact des mutations EGFR tandis que le statut KRAS n'est pas prédictif de la réponse au cetuximab [263].

Dans les études précédentes, le statut KRAS n'était pas prédictif pour la réponse à l'erlotinib en concordance avec les précédents résultats pour l'afatinib.

C'est aussi en accord avec les résultats d'une étude clinique où l'erlotinib a été administré à des patients atteints d'un cancer du côlon métastatique en combinaison avec une chimiothérapie [264]. Ces résultats suggèrent que l'activité des TKI dirigés contre les récepteurs à l'EGF n'est pas nécessairement limité par le statut KRAS muté comme ça l'est pour les anticorps anti-EGFR.

Mes résultats *in vitro* sur les modèles de cellules de cancer colorectales et mes analyses immunohistochimique sur tissu de xénogreffes suggèrent dans leur ensemble que la combinaison du bevacizumab et de l'erlotinib puisse être plus active que le bevacizumab seul en thérapie de maintenance, même pour les patients KRAS muté, ce qui fournit un rationnel pour l'étude clinique GERCOR DREAM de phase III.

Depuis l'obtention de ces résultats, l'étude clinique DREAM a été achevée et les conclusions ont été sélectionné pour une présentation orale au congrès annuel European Society of Medical Oncology (ESMO), le plus grand rendez vous annuel de l'oncologie clinique en Europe avec environ 1800 participants. Cet essai a été réalisé pour des patients atteints de cancer colorectal métastatique non résécable sans progression après une thérapie FOLFOX/FOLFIRI + bevacizumab. Il a été comparé à un traitement de maintenance au bevacizumab seul ou accompagné d'erlotinib. La survie globale a été améliorée de trois mois (HR : 0,80). La combinaison d'erlotinib et de bevacizumab en thérapie de maintenance a augmenté significativement la PFS et l'OS de ces patients. La combinaison d'un anticorps monoclonal anti-VEGF et d'un inhibiteur tyrosine kinase anti-EGFR est donc active, y compris chez les patients KRAS mutés.

Bien que des nombreux patients décèdent encore du CRC, beaucoup d'avancés ont été faites dans le domaine thérapeutique comme on peut le voir avec la découverte notamment des thérapies ciblées. La coopération entre la recherche clinique et la recherche pré-clinique a montré dans l'étude DREAM l'étendue de ce qui peut être fait. En continuant à identifier de nouvelles cibles thérapeutiques, comprendre les mécanismes cancéreux/anti-cancéreux, comprendre les mécanismes de résistance, il reste à espérer une amélioration nette de la survie et qualité de vie du patient.

BIBLIOGRAPHIE

1. Marisa, L., et al., *Gene expression classification of colon cancer into molecular subtypes: characterization, validation, and prognostic value.* PLoS Med, 2013. **10**(5): p. e1001453.

2. Sancho, E., E. Batlle, and H. Clevers, *Signaling pathways in intestinal development and cancer.* Annu Rev Cell Dev Biol, 2004. **20**: p. 695-723.

3. Willett, W., *The search for the causes of breast and colon cancer.* Nature, 1989. **338**(6214): p. 389-94.

4. Zavoral, M., et al., *Colorectal cancer screening: 20 years of development and recent progress.* World J Gastroenterol, 2014. **20**(14): p. 3825-3834.

5. Hewitson, P., et al., *Screening for colorectal cancer using the faecal occult blood test, Hemoccult.* Cochrane Database Syst Rev, 2007(1): p. CD001216.

6. Atkin, W.S., et al., *Improving colorectal cancer screening outcomes: proceedings of the second meeting of the International Colorectal Cancer Screening Network, a global quality initiative.* J Med Screen, 2010. **17**(3): p. 152-7.

7. Barrows, G.H., et al., *Immunochemical detection of human blood in feces.* Am J Clin Pathol, 1978. **69**(3): p. 342-6.

8. Day, L.W., T. Bhuket, and J. Allison, *FIT testing: an overview.* Curr Gastroenterol Rep, 2013. **15**(11): p. 357.

9. Weitz, J., et al., *Colorectal cancer.* Lancet, 2005. **365**(9454): p. 153-65.

10. Lynch, H.T., et al., *Hereditary colorectal cancer.* Semin Oncol, 1991. **18**(4): p. 337-66.

11. Aaltonen, L.A., et al., *Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer.* Science, 1993. **260**(5109): p. 812-6.

12. Strand, M., et al., *Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair.* Nature, 1993. **365**(6443): p. 274-6.

13. Groden, J., et al., *Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene.* Cell, 1991. **66**(3): p. 589-600.

14. Cancer Genome Atlas, N., *Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer.* Nature, 2012. **487**(7407): p. 330-7.

15. Sinicrope, F.A., et al., *Prognostic impact of microsatellite instability and DNA ploidy in human colon carcinoma patients.* Gastroenterology, 2006. **131**(3): p. 729-37.

16. Kane, M.F., et al., *Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines.* Cancer Res, 1997. **57**(5): p. 808-11.

17. Fearon, E.R. and B. Vogelstein, *A genetic model for colorectal tumorigenesis.* Cell, 1990. **61**(5): p. 759-67.

18. Korinek, V., et al., *Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC-/- colon carcinoma.* Science, 1997. **275**(5307): p. 1784-7.

19. Vogelstein, B., et al., *Genetic alterations during colorectal-tumor development.* N Engl J Med, 1988. **319**(9): p. 525-32.

20. Malumbres, M. and M. Barbacid, *RAS oncogenes: the first 30 years.* Nat Rev Cancer, 2003. **3**(6): p. 459-65.

21. Repasky, G.A., E.J. Chenette, and C.J. Der, *Renewing the conspiracy theory debate: does Raf function alone to mediate Ras oncogenesis?* Trends Cell Biol, 2004. **14**(11): p. 639-47.

22. Ji, H., et al., *Mutations in BRAF and KRAS converge on activation of the mitogen-activated protein kinase pathway in lung cancer mouse models.* Cancer Res, 2007. **67**(10): p. 4933-9.

23. Bernet, A. and P. Mehlen, *Dependence receptors: when apoptosis controls tumor progression.* Bull Cancer, 2007. **94**(4): p. E12-7.

24. Lane, D.P., *Cancer. p53, guardian of the genome.* Nature, 1992. **358**(6381): p. 15-6.

25. Chehab, N.H., et al., *Phosphorylation of Ser-20 mediates stabilization of human p53 in response to DNA damage.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(24): p. 13777-82.

26. Kandoth, C., et al., *Mutational landscape and significance across 12 major cancer types.* Nature, 2013. **502**(7471): p. 333-9.

27. Heldin, C.H., K. Miyazono, and P. ten Dijke, *TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins.* Nature, 1997. **390**(6659): p. 465-71.

28. Kalluri, R. and E.G. Neilson, *Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis.* J Clin Invest, 2003. **112**(12): p. 1776-84.

29. Puisieux, A., T. Brabletz, and J. Caramel, *Oncogenic roles of EMT-inducing transcription factors.* Nat Cell Biol, 2014. **16**(6): p. 488-94.

30. Jechlinger, M., S. Grunert, and H. Beug, *Mechanisms in epithelial plasticity and metastasis: insights from 3D cultures and expression profiling.* J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2002. **7**(4): p. 415-32.

31. Kokudo, T., et al., *Snail is required for TGFbeta-induced endothelial-mesenchymal transition of embryonic stem cell-derived endothelial cells.* J Cell Sci, 2008. **121**(Pt 20): p. 3317-24.

32. Medici, D., E.D. Hay, and B.R. Olsen, *Snail and Slug promote epithelial-mesenchymal transition through beta-catenin-T-cell factor-4-dependent expression of transforming growth factor-beta3.* Mol Biol Cell, 2008. **19**(11): p. 4875-87.

33. Niessen, K., et al., *Slug is a direct Notch target required for initiation of cardiac cushion cellularization.* J Cell Biol, 2008. **182**(2): p. 315-25.

34. Peinado, H., D. Olmeda, and A. Cano, *Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype?* Nat Rev Cancer, 2007. **7**(6): p. 415-28.

35. Thiery, J.P., *Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression.* Nat Rev Cancer, 2002. **2**(6): p. 442-54.

36. Lim, S.H., et al., *Circulating tumour cells and the epithelial mesenchymal transition in colorectal cancer.* J Clin Pathol, 2014.

37. Bhangu, A., et al., *Epithelial mesenchymal transition in colorectal cancer: Seminal role in promoting disease progression and resistance to neoadjuvant therapy.* Surg Oncol, 2012. **21**(4): p. 316-23.

38. Loboda, A., et al., *EMT is the dominant program in human colon cancer.* BMC Med Genomics, 2011. **4**: p. 9.

39. Hugo, H., et al., *Epithelial--mesenchymal and mesenchymal--epithelial transitions in carcinoma progression.* J Cell Physiol, 2007. **213**(2): p. 374-83.

40. Coussens, L.M. and Z. Werb, *Inflammation and cancer.* Nature, 2002. **420**(6917): p. 860-7.

41. Demaria, S., et al., *Cancer and inflammation: promise for biologic therapy.* J Immunother, 2010. **33**(4): p. 335-51.

42. Sarma, D.P., *The Dukes classification of colorectal cancer.* JAMA, 1986. **256**(11): p. 1447.

43. Sobin, L.H. and I.D. Fleming, *TNM Classification of Malignant Tumors, fifth edition (1997). Union Internationale Contre le Cancer and the American Joint Committee on Cancer.* Cancer, 1997. **80**(9): p. 1803-4.

44. Connolly, M.K., et al., *Distinct populations of metastases-enabling myeloid cells expand in the liver of mice harboring invasive and preinvasive intra-abdominal tumor.* J Leukoc Biol, 2010. **87**(4): p. 713-25.

45. Radinsky, R. and I.J. Fidler, *Regulation of tumor cell growth at organ-specific metastases.* In Vivo, 1992. **6**(4): p. 325-31.

46. Rutman, R.J., A. Cantarow, and K.E. Paschkis, *Studies in 2-acetylaminofluorene carcinogenesis. III. The utilization of uracil-2-C14 by preneoplastic rat liver and rat hepatoma.* Cancer Res, 1954. **14**(2): p. 119-23.

47. Heidelberger, C., et al., *The comparative utilization of uracil-2-C14 by liver, intestinal mucosa, and Flexner-Jobling carcinoma in the rat.* Cancer Res, 1957. **17**(5): p. 399-404.

48. Cassidy, J., et al., *XELOX (capecitabine plus oxaliplatin): active first-line therapy for patients with metastatic colorectal cancer.* J Clin Oncol, 2004. **22**(11): p. 2084-91.

49. Matuo, R., et al., *5-Fluorouracil and its active metabolite FdUMP cause DNA damage in human SW620 colon adenocarcinoma cell line.* J Appl Toxicol, 2009. **29**(4): p. 308-16.

50. Longley, D.B., D.P. Harkin, and P.G. Johnston, *5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies.* Nat Rev Cancer, 2003. **3**(5): p. 330-8.

51. Bertrand, M., et al., *High-dose continuous infusion folinic acid and bolus 5-fluorouracil in patients with advanced colorectal cancer: a phase II study.* J Clin Oncol, 1986. **4**(7): p. 1058-61.

52. Capitain, O., et al., *The influence of fluorouracil outcome parameters on tolerance and efficacy in patients with advanced colorectal cancer.* Pharmacogenomics J, 2008. **8**(4): p. 256-67.

53. de Gramont, A., et al., *Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer.* J Clin Oncol, 2000. **18**(16): p. 2938-47.

54. Raymond, E., et al., *Oxaliplatin: a review of preclinical and clinical studies.* Ann Oncol, 1998. **9**(10): p. 1053-71.

55. Graham, M.A., et al., *Clinical pharmacokinetics of oxaliplatin: a critical review.* Clin Cancer Res, 2000. **6**(4): p. 1205-18.

56. Kweekel, D.M., H. Gelderblom, and H.J. Guchelaar, *Pharmacology of oxaliplatin and the use of pharmacogenomics to individualize therapy.* Cancer Treat Rev, 2005. **31**(2): p. 90-105.

57. Pendyala, L., et al., *Cytotoxicity, cellular accumulation and DNA binding of oxaliplatin isomers.* Cancer Lett, 1995. **97**(2): p. 177-84.

58. Cvitkovic, E., *Ongoing and unsaid on oxaliplatin: the hope.* Br J Cancer, 1998. **77 Suppl 4**: p. 8-11.

59. Tournigand, C., et al., *Adjuvant therapy with fluorouracil and oxaliplatin in stage II and elderly patients (between ages 70 and 75 years) with colon cancer: subgroup analyses of the Multicenter International Study of Oxaliplatin, Fluorouracil, and Leucovorin in the Adjuvant Treatment of Colon Cancer trial.* J Clin Oncol, 2012. **30**(27): p. 3353-60.

60. Wall, M.E., M.C. Wani, and H. Taylor, *Isolation and chemical characterization of antitumor agents from plants.* Cancer Treat Rep, 1976. **60**(8): p. 1011-30.

61. Saltz, L., *Irinotecan-based combinations for the adjuvant treatment of stage III colon cancer.* Oncology (Williston Park), 2000. **14**(12 Suppl 14): p. 47-50.

62. Guerin, E., et al., *In vivo topoisomerase I inhibition attenuates the expression of hypoxia-inducible factor 1alpha target genes and decreases tumor angiogenesis.* Mol Med, 2012. **18**: p. 83-94.

63. Douillard, J.Y. and V.S. Group, *Irinotecan and high-dose fluorouracil/leucovorin for metastatic colorectal cancer.* Oncology (Williston Park), 2000. **14**(12 Suppl 14): p. 51-5.

64. Douillard, J.Y., et al., *Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicentre randomised trial.* Lancet, 2000. **355**(9209): p. 1041-7.

65. de Gramont, A., et al., *Adjuvant therapy for stage II and III colorectal cancer.* Semin Oncol, 2007. **34**(2 Suppl 1): p. S37-40.

66. Folkman, J., *Tumor angiogenesis: therapeutic implications.* N Engl J Med, 1971. **285**(21): p. 1182-6.

67. Folkman, J., *Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis.* Semin Oncol, 2002. **29**(6 Suppl 16): p. 15-8.

68. Sholley, M.M., et al., *Mechanisms of neovascularization. Vascular sprouting can occur without proliferation of endothelial cells.* Lab Invest, 1984. **51**(6): p. 624-34.

69. Clapp, C., et al., *Peptide hormone regulation of angiogenesis.* Physiol Rev, 2009. **89**(4): p. 1177-215.

70. Folkman, J., *What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent?* J Natl Cancer Inst, 1990. **82**(1): p. 4-6.

71. McDonald, D.M. and P. Baluk, *Significance of blood vessel leakiness in cancer.* Cancer Res, 2002. **62**(18): p. 5381-5.

72. McDonald, D.M. and P.L. Choyke, *Imaging of angiogenesis: from microscope to clinic.* Nat Med, 2003. **9**(6): p. 713-25.

73. McDonald, D.M. and A.J. Foss, *Endothelial cells of tumor vessels: abnormal but not absent.* Cancer Metastasis Rev, 2000. **19**(1-2): p. 109-20.

74. Morikawa, S., et al., *Abnormalities in pericytes on blood vessels and endothelial sprouts in tumors.* Am J Pathol, 2002. **160**(3): p. 985-1000.

75. Hashizume, H., et al., *Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness.* Am J Pathol, 2000. **156**(4): p. 1363-80.

76. Huang, Y., et al., *Vascular normalization as an emerging strategy to enhance cancer immunotherapy.* Cancer Res, 2013. **73**(10): p. 2943-8.

77. Folkman, J., *New perspectives in clinical oncology from angiogenesis research.* Eur J Cancer, 1996. **32A**(14): p. 2534-9.

78. Folkman, J., et al., *Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia.* Nature, 1989. **339**(6219): p. 58-61.

79. Torres Filho, I.P., et al., *Noninvasive measurement of microvascular and interstitial oxygen profiles in a human tumor in SCID mice.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(6): p. 2081-5.

80. North, S., M. Moenner, and A. Bikfalvi, *Recent developments in the regulation of the angiogenic switch by cellular stress factors in tumors.* Cancer Lett, 2005. **218**(1): p. 1-14.

81. Demicheli, R., et al., *Local recurrences following mastectomy: support for the concept of tumor dormancy.* J Natl Cancer Inst, 1994. **86**(1): p. 45-8.

82. Uhr, J.W., et al., *Cancer dormancy: opportunities for new therapeutic approaches.* Nat Med, 1997. **3**(5): p. 505-9.

83. Black, W.C. and H.G. Welch, *Advances in diagnostic imaging and overestimations of disease prevalence and the benefits of therapy.* N Engl J Med, 1993. **328**(17): p. 1237-43.

84. Folkman, J. and R. Kalluri, *Cancer without disease.* Nature, 2004. **427**(6977): p. 787.

85. Ferrara, N., H.P. Gerber, and J. LeCouter, *The biology of VEGF and its receptors.* Nat Med, 2003. **9**(6): p. 669-76.

86. Houck, K.A., et al., *The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA.* Mol Endocrinol, 1991. **5**(12): p. 1806-14.

87. Suto, K., et al., *Crystal structures of novel vascular endothelial growth factors (VEGF) from snake venoms: insight into selective VEGF binding to kinase insert domain-containing receptor but not to fms-like tyrosine kinase-1.* J Biol Chem, 2005. **280**(3): p. 2126-31.

88. Senger, D.R., et al., *Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid.* Science, 1983. **219**(4587): p. 983-5.

89. Rini, B.I. and E.J. Small, *Biology and clinical development of vascular endothelial growth factor-targeted therapy in renal cell carcinoma.* J Clin Oncol, 2005. **23**(5): p. 1028-43.

90. Uthoff, S.M., et al., *VEGF isoforms and mutations in human colorectal cancer.* Int J Cancer, 2002. **101**(1): p. 32-6.

91. Poltorak, Z., et al., *VEGF145, a secreted vascular endothelial growth factor isoform that binds to extracellular matrix.* J Biol Chem, 1997. **272**(11): p. 7151-8.

92. Woolard, J., et al., *VEGF165b, an inhibitory vascular endothelial growth factor splice variant: mechanism of action, in vivo effect on angiogenesis and endogenous protein expression.* Cancer Res, 2004. **64**(21): p. 7822-35.

93. Olofsson, B., et al., *Vascular endothelial growth factor B, a novel growth factor for endothelial cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(6): p. 2576-81.

94. Olofsson, B., et al., *Genomic organization of the mouse and human genes for vascular endothelial growth factor B (VEGF-B) and characterization of a second splice isoform.* J Biol Chem, 1996. **271**(32): p. 19310-7.

95. Ristimaki, A., et al., *Proinflammatory cytokines regulate expression of the lymphatic endothelial mitogen vascular endothelial growth factor-C.* J Biol Chem, 1998. **273**(14): p. 8413-8.

96. Bry, M., et al., *Vascular Endothelial Growth Factor-B in Physiology and Disease.* Physiol Rev, 2014. **94**(3): p. 779-794.

97. Joukov, V., et al., *Proteolytic processing regulates receptor specificity and activity of VEGF-C.* EMBO J, 1997. **16**(13): p. 3898-911.

98. Tammela, T. and K. Alitalo, *Lymphangiogenesis: Molecular mechanisms and future promise.* Cell, 2010. **140**(4): p. 460-76.

99. Fujimoto, J., et al., *Clinical implication of expression of vascular endothelial growth factor-C in metastatic lymph nodes of uterine cervical cancers.* Br J Cancer, 2004. **91**(3): p. 466-9.

100. Farnebo, F., F. Piehl, and J. Lagercrantz, *Restricted expression pattern of vegf-d in the adult and fetal mouse: high expression in the embryonic lung.* Biochem Biophys Res Commun, 1999. **257**(3): p. 891-4.

101. Takahashi, S., *Vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF receptors and their inhibitors for antiangiogenic tumor therapy.* Biol Pharm Bull, 2011. **34**(12): p. 1785-8.

102. Park, J.E., et al., *Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR.* J Biol Chem, 1994. **269**(41): p. 25646-54.

103. Xu, L. and R.K. Jain, *Down-regulation of placenta growth factor by promoter hypermethylation in human lung and colon carcinoma.* Mol Cancer Res, 2007. **5**(9): p. 873-80.

104. Escudero-Esparza, A., et al., *PGF isoforms, PLGF-1 and PGF-2, in colorectal cancer and the prognostic significance.* Cancer Genomics Proteomics, 2009. **6**(4): p. 239-46.

105. Lyttle, D.J., et al., *Homologs of vascular endothelial growth factor are encoded by the poxvirus orf virus.* J Virol, 1994. **68**(1): p. 84-92.

106. Andre, T., et al., *Vegf, Vegf-B, Vegf-C and their receptors KDR, FLT-1 and FLT-4 during the neoplastic progression of human colonic mucosa.* Int J Cancer, 2000. **86**(2): p. 174-81.

107. Cunningham, S.A., et al., *Characterization of vascular endothelial cell growth factor interactions with the kinase insert domain-containing receptor tyrosine kinase. A real time kinetic study.* J Biol Chem, 1999. **274**(26): p. 18421-7.

108. Neagoe, P.E., C. Lemieux, and M.G. Sirois, *Vascular endothelial growth factor (VEGF)-A165-induced prostacyclin synthesis requires the activation of VEGF receptor-1 and -2 heterodimer.* J Biol Chem, 2005. **280**(11): p. 9904-12.

109. Fan, F., et al., *Expression and function of vascular endothelial growth factor receptor-1 on human colorectal cancer cells.* Oncogene, 2005. **24**(16): p. 2647-53.

110. Zachary, I. and G. Gliki, *Signaling transduction mechanisms mediating biological actions of the vascular endothelial growth factor family.* Cardiovasc Res, 2001. **49**(3): p. 568-81.

111. Barleon, B., et al., *Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1.* Blood, 1996. **87**(8): p. 3336-43.

112. Clauss, M., et al., *The vascular endothelial growth factor receptor Flt-1 mediates biological activities. Implications for a functional role of placenta growth factor in monocyte activation and chemotaxis.* J Biol Chem, 1996. **271**(30): p. 17629-34.

113. LeCouter, J., et al., *Angiogenesis-independent endothelial protection of liver: role of VEGFR-1.* Science, 2003. **299**(5608): p. 890-3.

114. Kendall, R.L. and K.A. Thomas, *Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(22): p. 10705-9.

115. Terman, B.I., et al., *Identification of a new endothelial cell growth factor receptor tyrosine kinase.* Oncogene, 1991. **6**(9): p. 1677-83.

116. Martins, S.F., et al., *Clinicopathological correlation and prognostic significance of VEGF-A, VEGF-C, VEGFR-2 and VEGFR-3 expression in colorectal cancer.* Cancer Genomics Proteomics, 2013. **10**(2): p. 55-67.

117. Takahashi, T., et al., *A single autophosphorylation site on KDR/Flk-1 is essential for VEGF-A-dependent activation of PLC-gamma and DNA synthesis in vascular endothelial cells.* EMBO J, 2001. **20**(11): p. 2768-78.

118. Kumanogoh, A. and H. Kikutani, *Immunological functions of the neuropilins and plexins as receptors for semaphorins.* Nat Rev Immunol, 2013. **13**(11): p. 802-14.

119. Fantin, A., et al., *Neuropilin 1 (NRP1) hypomorphism combined with defective VEGF-A binding reveals novel roles for NRP1 in developmental and pathological angiogenesis.* Development, 2014. **141**(3): p. 556-62.

120. Cimato, T., et al., *Neuropilin-1 identifies endothelial precursors in human and murine embryonic stem cells before CD34 expression.* Circulation, 2009. **119**(16): p. 2170-8.

121. Frankel, P., et al., *Chondroitin sulphate-modified neuropilin 1 is expressed in human tumour cells and modulates 3D invasion in the U87MG human glioblastoma cell line through a p130Cas-mediated pathway.* EMBO Rep, 2008. **9**(10): p. 983-9.

122. Nakamura, F. and Y. Goshima, *Structural and functional relation of neuropilins.* Adv Exp Med Biol, 2002. **515**: p. 55-69.

123. Djordjevic, S. and P.C. Driscoll, *Targeting VEGF signalling via the neuropilin co-receptor.* Drug Discov Today, 2013. **18**(9-10): p. 447-55.

124. Herzog, Y., et al., *Differential expression of neuropilin-1 and neuropilin-2 in arteries and veins.* Mech Dev, 2001. **109**(1): p. 115-9.

125. Battaglia, A., et al., *Neuropilin-1 expression identifies a subset of regulatory T cells in human lymph nodes that is modulated by preoperative chemoradiation therapy in cervical cancer.* Immunology, 2008. **123**(1): p. 129-38.

126. Soker, S., et al., *VEGF165 mediates formation of complexes containing VEGFR-2 and neuropilin-1 that enhance VEGF165-receptor binding.* J Cell Biochem, 2002. **85**(2): p. 357-68.

127. Fuh, G., K.C. Garcia, and A.M. de Vos, *The interaction of neuropilin-1 with vascular endothelial growth factor and its receptor flt-1.* J Biol Chem, 2000. **275**(35): p. 26690-5.

128. Pan, Q., et al., *Blocking neuropilin-1 function has an additive effect with anti-VEGF to inhibit tumor growth.* Cancer Cell, 2007. **11**(1): p. 53-67.

129. Jarvis, A., et al., *Small molecule inhibitors of the neuropilin-1 vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) interaction.* J Med Chem, 2010. **53**(5): p. 2215-26.

130. Xin, Y., et al., *Pharmacokinetic and pharmacodynamic analysis of circulating biomarkers of anti-NRP1, a novel antiangiogenesis agent, in two phase I trials in patients with advanced solid tumors.* Clin Cancer Res, 2012. **18**(21): p. 6040-8.

131. Weekes, C.D., et al., *A phase I study of the human monoclonal anti-NRP1 antibody MNRP1685A in patients with advanced solid tumors.* Invest New Drugs, 2014.

132. Ross, R., et al., *A platelet-dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1974. **71**(4): p. 1207-10.

133. Westermark, B. and A. Wasteson, *A platelet factor stimulating human normal glial cells.* Exp Cell Res, 1976. **98**(1): p. 170-4.

134. Kohler, N. and A. Lipton, *Platelets as a source of fibroblast growth-promoting activity.* Exp Cell Res, 1974. **87**(2): p. 297-301.

135. Ball, S.G., C.A. Shuttleworth, and C.M. Kielty, *Vascular endothelial growth factor can signal through platelet-derived growth factor receptors.* J Cell Biol, 2007. **177**(3): p. 489-500.

136. Pennock, S. and A. Kazlauskas, *Vascular endothelial growth factor A competitively inhibits platelet-derived growth factor (PDGF)-dependent activation of PDGF receptor and subsequent signaling events and cellular responses.* Mol Cell Biol, 2012. **32**(10): p. 1955-66.

137. Andrae, J., R. Gallini, and C. Betsholtz, *Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine.* Genes Dev, 2008. **22**(10): p. 1276-312.

138. Demoulin, J.B. and A. Essaghir, *PDGF receptor signaling networks in normal and cancer cells.* Cytokine Growth Factor Rev, 2014.

139. Papadopoulos, N., et al., *Binding and neutralization of vascular endothelial growth factor (VEGF) and related ligands by VEGF Trap, ranibizumab and bevacizumab.* Angiogenesis, 2012. **15**(2): p. 171-85.

140. Bates, R.C., et al., *Flt-1-dependent survival characterizes the epithelial-mesenchymal transition of colonic organoids.* Curr Biol, 2003. **13**(19): p. 1721-7.

141. Giatromanolaki, A., et al., *Activated VEGFR2/KDR pathway in tumour cells and tumour associated vessels of colorectal cancer.* Eur J Clin Invest, 2007. **37**(11): p. 878-86.

142. Calvani, M., et al., *Differential involvement of vascular endothelial growth factor in the survival of hypoxic colon cancer cells.* Cancer Res, 2008. **68**(1): p. 285-91.

143. Morelli, M.P., et al., *Targeting vascular endothelial growth factor receptor-1 and -3 with cediranib (AZD2171): effects on migration and invasion of gastrointestinal cancer cell lines.* Mol Cancer Ther, 2009. **8**(9): p. 2546-58.

144. Poindessous, V., et al., *EGFR- and VEGF(R)-targeted small molecules show synergistic activity in colorectal cancer models refractory to combinations of monoclonal antibodies.* Clin Cancer Res, 2011. **17**(20): p. 6522-30.

145. Yin, Y., et al., *Blocking effects of siRNA on VEGF expression in human colorectal cancer cells.* World J Gastroenterol, 2010. **16**(9): p. 1086-92.

146. Eppenberger, M., et al., *Role of the VEGF ligand to receptor ratio in the progression of mismatch repair-proficient colorectal cancer.* BMC Cancer, 2010. **10**: p. 93.

147. Okita, N.T., et al., *Vascular endothelial growth factor receptor expression as a prognostic marker for survival in colorectal cancer.* Jpn J Clin Oncol, 2009. **39**(9): p. 595-600.

148. Munaut, C., et al., *Hypoxia is responsible for soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1) but not for soluble endoglin induction in villous trophoblast.* Hum Reprod, 2008. **23**(6): p. 1407-15.

149. Bais, C., et al., *PlGF blockade does not inhibit angiogenesis during primary tumor growth.* Cell, 2010. **141**(1): p. 166-77.

150. Masuda, K., et al., *A novel tumor-promoting function residing in the 5' non-coding region of vascular endothelial growth factor mRNA.* PLoS Med, 2008. **5**(5): p. e94.

151. Lesslie, D.P., et al., *Vascular endothelial growth factor receptor-1 mediates migration of human colorectal carcinoma cells by activation of Src family kinases.* Br J Cancer, 2006. **94**(11): p. 1710-7.

152. Samuel, S., et al., *Intracrine vascular endothelial growth factor signaling in survival and chemoresistance of human colorectal cancer cells.* Oncogene, 2011. **30**(10): p. 1205-12.

153. Shweiki, D., et al., *Induction of vascular endothelial growth factor expression by hypoxia and by glucose deficiency in multicell spheroids: implications for tumor angiogenesis.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(3): p. 768-72.

154. Maxwell, P.H., et al., *Hypoxia-inducible factor-1 modulates gene expression in solid tumors and influences both angiogenesis and tumor growth.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(15): p. 8104-9.

155. Carmeliet, P., et al., *Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis.* Nature, 1998. **394**(6692): p. 485-90.

156. Hu, C.J., et al., *The N-terminal transactivation domain confers target gene specificity of hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha.* Mol Biol Cell, 2007. **18**(11): p. 4528-42.

157. Semenza, G.L., *Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine.* Cell, 2012. **148**(3): p. 399-408.

158. Stein, I., et al., *Stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by hypoxia and hypoglycemia and coregulation with other ischemia-induced genes.* Mol Cell Biol, 1995. **15**(10): p. 5363-8.

159. Shen, K., et al., *c-Jun N-terminal kinase mediated VEGFR2 sustained phosphorylation is critical for VEGFA-induced angiogenesis in vitro and in vivo.* Cell Biochem Biophys, 2012. **64**(1): p. 17-27.

160. Gerber, H.P., et al., *Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes. Flt-1, but not Flk-1/KDR, is up-regulated by hypoxia.* J Biol Chem, 1997. **272**(38): p. 23659-67.

161. Han, Y., et al., *Hypoxia influences the vascular expansion and differentiation of embryonic stem cell cultures through the temporal expression of vascular endothelial growth factor receptors in an ARNT-dependent manner.* Stem Cells, 2010. **28**(4): p. 799-809.

162. Suzuma, K., et al., *Increased expression of KDR/Flk-1 (VEGFR-2) in murine model of ischemia-induced retinal neovascularization.* Microvasc Res, 1998. **56**(3): p. 183-91.

163. Kanellis, J., et al., *Renal ischemia-reperfusion increases endothelial VEGFR-2 without increasing VEGF or VEGFR-1 expression.* Kidney Int, 2002. **61**(5): p. 1696-706.

164. Graeber, T.G., et al., *Hypoxia induces accumulation of p53 protein, but activation of a G1-phase checkpoint by low-oxygen conditions is independent of p53 status.* Mol Cell Biol, 1994. **14**(9): p. 6264-77.

165. Menendez, D., et al., *A SNP in the flt-1 promoter integrates the VEGF system into the p53 transcriptional network.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(5): p. 1406-11.

166. Hwang, I., J. Kim, and S. Jeong, *beta-Catenin and peroxisome proliferator-activated receptor-delta coordinate dynamic chromatin loops for the transcription of vascular endothelial growth factor A gene in colon cancer cells.* J Biol Chem, 2012. **287**(49): p. 41364-73.

167. Naik, S., et al., *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 Is Synthetic Lethal to Aberrant {beta}-Catenin Activation in Colon Cancer.* Clin Cancer Res, 2009. **15**(24): p. 7529-7537.

168. Selvakumaran, M., et al., *Antitumor effect of the angiogenesis inhibitor bevacizumab is dependent on susceptibility of tumors to hypoxia-induced apoptosis.* Biochem Pharmacol, 2008. **75**(3): p. 627-38.

169. Barr, M.P., D.J. Bouchier-Hayes, and J.J. Harmey, *Vascular endothelial growth factor is an autocrine survival factor for breast tumour cells under hypoxia.* Int J Oncol, 2008. **32**(1): p. 41-8.

170. Nardo, G., et al., *Glycolytic phenotype and AMP kinase modify the pathologic response of tumor xenografts to VEGF neutralization.* Cancer Res, 2011. **71**(12): p. 4214-25.

171. Presta, L.G., et al., *Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders.* Cancer Res, 1997. **57**(20): p. 4593-9.

172. Wildiers, H., et al., *Effect of antivascular endothelial growth factor treatment on the intratumoral uptake of CPT-11.* Br J Cancer, 2003. **88**(12): p. 1979-86.

173. Lee, T.H., et al., *Vascular endothelial growth factor modulates the transendothelial migration of MDA-MB-231 breast cancer cells through regulation of brain microvascular endothelial cell permeability.* J Biol Chem, 2003. **278**(7): p. 5277-84.

174. Willett, C.G., et al., *Direct evidence that the VEGF-specific antibody bevacizumab has antivascular effects in human rectal cancer.* Nat Med, 2004. **10**(2): p. 145-7.

175. de Gramont, A., et al., *Bevacizumab plus oxaliplatin-based chemotherapy as adjuvant treatment for colon cancer (AVANT): a phase 3 randomised controlled trial.* Lancet Oncol, 2012. **13**(12): p. 1225-33.

176. Aghajanian, C., et al., *OCEANS: a randomized, double-blind, placebo-controlled phase III trial of chemotherapy with or without bevacizumab in patients with platinum-sensitive recurrent epithelial ovarian, primary peritoneal, or fallopian tube cancer.* J Clin Oncol, 2012. **30**(17): p. 2039-45.

177. Stark, D., et al., *Standard chemotherapy with or without bevacizumab in advanced ovarian cancer: quality-of-life outcomes from the International Collaboration on Ovarian Neoplasms (ICON7) phase 3 randomised trial.* Lancet Oncol, 2013. **14**(3): p. 236-43.

178. Hilberg, F., et al., *BIBF 1120: triple angiokinase inhibitor with sustained receptor blockade and good antitumor efficacy.* Cancer Res, 2008. **68**(12): p. 4774-82.

179. Gaya, A. and V. Tse, *A preclinical and clinical review of aflibercept for the management of cancer.* Cancer Treat Rev, 2012. **38**(5): p. 484-93.

180. Holash, J., et al., *VEGF-Trap: a VEGF blocker with potent antitumor effects.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(17): p. 11393-8.

181. Fukasawa, M. and M. Korc, *Vascular endothelial growth factor-trap suppresses tumorigenicity of multiple pancreatic cancer cell lines.* Clin Cancer Res, 2004. **10**(10): p. 3327-32.

182. Van Cutsem, E., et al., *Addition of aflibercept to fluorouracil, leucovorin, and irinotecan improves survival in a phase III randomized trial in patients with metastatic colorectal cancer previously treated with an oxaliplatin-based regimen.* J Clin Oncol, 2012. **30**(28): p. 3499-506.

183. Carpenter, G. and S. Cohen, *Epidermal growth factor.* Annu Rev Biochem, 1979. **48**: p. 193-216.

184. Casalini, P., et al., *Role of HER receptors family in development and differentiation.* J Cell Physiol, 2004. **200**(3): p. 343-50.

185. Tzahar, E., et al., *ErbB-3 and ErbB-4 function as the respective low and high affinity receptors of all Neu differentiation factor/heregulin isoforms.* J Biol Chem, 1994. **269**(40): p. 25226-33.

186. Graus-Porta, D., et al., *ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling.* EMBO J, 1997. **16**(7): p. 1647-55.

187. Xie, H., et al., *EGF receptor regulation of cell motility: EGF induces disassembly of focal adhesions independently of the motility-associated PLCgamma signaling pathway.* J Cell Sci, 1998. **111 (Pt 5)**: p. 615-24.

188. de Larco, J.E. and G.J. Todaro, *Epithelioid and fibroblastic rat kidney cell clones: epidermal growth factor (EGF) receptors and the effect of mouse sarcoma virus transformation.* J Cell Physiol, 1978. **94**(3): p. 335-42.

189. Peschon, J.J., et al., *An essential role for ectodomain shedding in mammalian development.* Science, 1998. **282**(5392): p. 1281-4.

190. Kasina, S., et al., *ADAM-mediated amphiregulin shedding and EGFR transactivation.* Cell Prolif, 2009. **42**(6): p. 799-812.

191. Bles, N., et al., *ATP confers tumorigenic properties to dendritic cells by inducing amphiregulin secretion.* Blood, 2010. **116**(17): p. 3219-26.

192. Johnson, G.R., et al., *Amphiregulin induces tyrosine phosphorylation of the epidermal growth factor receptor and p185erbB2. Evidence that amphiregulin acts exclusively through the epidermal growth factor receptor at the surface of human epithelial cells.* J Biol Chem, 1993. **268**(4): p. 2924-31.

193. Hsu, Y.L., et al., *Lung tumor-associated dendritic cell-derived amphiregulin increased cancer progression.* J Immunol, 2011. **187**(4): p. 1733-44.

194. Eckstein, N., et al., *Epidermal growth factor receptor pathway analysis identifies amphiregulin as a key factor for cisplatin resistance of human breast cancer cells.* J Biol Chem, 2008. **283**(2): p. 739-50.

195. Fiske, W.H., D. Threadgill, and R.J. Coffey, *ERBBs in the gastrointestinal tract: recent progress and new perspectives.* Exp Cell Res, 2009. **315**(4): p. 583-601.

196. Miettinen, P.J., et al., *Epithelial immaturity and multiorgan failure in mice lacking epidermal growth factor receptor.* Nature, 1995. **376**(6538): p. 337-41.

197. Nair, R.R., B.B. Warner, and B.W. Warner, *Role of epidermal growth factor and other growth factors in the prevention of necrotizing enterocolitis.* Semin Perinatol, 2008. **32**(2): p. 107-13.

198. Larsen, A.K., et al., *Targeting EGFR and VEGF(R) pathway cross-talk in tumor survival and angiogenesis.* Pharmacol Ther, 2011. **131**(1): p. 80-90.

199. Goldman, C.K., et al., *Epidermal growth factor stimulates vascular endothelial growth factor production by human malignant glioma cells: a model of glioblastoma multiforme pathophysiology.* Mol Biol Cell, 1993. **4**(1): p. 121-33.

200. Detmar, M., et al., *Overexpression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and its receptors in psoriasis.* J Exp Med, 1994. **180**(3): p. 1141-6.

201. Ciardiello, F., et al., *Antiangiogenic and antitumor activity of anti-epidermal growth factor receptor C225 monoclonal antibody in combination with vascular endothelial growth factor antisense oligonucleotide in human GEO colon cancer cells.* Clin Cancer Res, 2000. **6**(9): p. 3739-47.

202. Pore, N., et al., *EGFR tyrosine kinase inhibitors decrease VEGF expression by both hypoxia-inducible factor (HIF)-1-independent and HIF-1-dependent mechanisms.* Cancer Res, 2006. **66**(6): p. 3197-204.

203. Petit, A.M., et al., *Neutralizing antibodies against epidermal growth factor and ErbB-2/neu receptor tyrosine kinases down-regulate vascular endothelial growth factor production by tumor cells in vitro and in vivo: angiogenic implications for signal transduction therapy of solid tumors.* Am J Pathol, 1997. **151**(6): p. 1523-30.

204. Li, X., et al., *Requirement of hypoxia-inducible factor-1alpha down-regulation in mediating the antitumor activity of the anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody cetuximab.* Mol Cancer Ther, 2008. **7**(5): p. 1207-17.

205. Naumov, G.N., et al., *Combined vascular endothelial growth factor receptor and epidermal growth factor receptor (EGFR) blockade inhibits tumor growth in xenograft models of EGFR inhibitor resistance.* Clin Cancer Res, 2009. **15**(10): p. 3484-94.

206. Shaheen, R.M., et al., *Tyrosine kinase inhibition of multiple angiogenic growth factor receptors improves survival in mice bearing colon cancer liver metastases by inhibition of endothelial cell survival mechanisms.* Cancer Res, 2001. **61**(4): p. 1464-8.

207. Sini, P., et al., *The antitumor and antiangiogenic activity of vascular endothelial growth factor receptor inhibition is potentiated by ErbB1 blockade.* Clin Cancer Res, 2005. **11**(12): p. 4521-32.

208. Tonra, J.R., et al., *Synergistic antitumor effects of combined epidermal growth factor receptor and vascular endothelial growth factor receptor-2 targeted therapy.* Clin Cancer Res, 2006. **12**(7 Pt 1): p. 2197-207.

209. Yokoi, K., et al., *Dual inhibition of epidermal growth factor receptor and vascular endothelial growth factor receptor phosphorylation by AEE788 reduces growth and metastasis of human colon carcinoma in an orthotopic nude mouse model.* Cancer Res, 2005. **65**(9): p. 3716-25.

210. Punt, C.J. and J. Tol, *More is less -- combining targeted therapies in metastatic colorectal cancer.* Nat Rev Clin Oncol, 2009. **6**(12): p. 731-3.

211. Tol, J., et al., *Chemotherapy, bevacizumab, and cetuximab in metastatic colorectal cancer.* N Engl J Med, 2009. **360**(6): p. 563-72.

212. Hecht, J.R., et al., *A randomized phase IIIB trial of chemotherapy, bevacizumab, and panitumumab compared with chemotherapy and bevacizumab alone for metastatic colorectal cancer.* J Clin Oncol, 2009. **27**(5): p. 672-80.

213. Franovic, A., et al., *Translational up-regulation of the EGFR by tumor hypoxia provides a nonmutational explanation for its overexpression in human cancer.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(32): p. 13092-7.

214. Chung, K.Y., et al., *Cetuximab shows activity in colorectal cancer patients with tumors that do not express the epidermal growth factor receptor by immunohistochemistry.* J Clin Oncol, 2005. **23**(9): p. 1803-10.

215. Lenz, H.J., et al., *Multicenter phase II and translational study of cetuximab in metastatic colorectal carcinoma refractory to irinotecan, oxaliplatin, and fluoropyrimidines.* J Clin Oncol, 2006. **24**(30): p. 4914-21.

216. Moroni, M., et al., *Gene copy number for epidermal growth factor receptor (EGFR) and clinical response to antiEGFR treatment in colorectal cancer: a cohort study.* Lancet Oncol, 2005. **6**(5): p. 279-86.

217. Roth, A.D., et al., *Prognostic role of KRAS and BRAF in stage II and III resected colon cancer: results of the translational study on the PETACC-3, EORTC 40993, SAKK 60-00 trial.* J Clin Oncol, 2010. **28**(3): p. 466-74.

218. Smith, G., et al., *Activating K-Ras mutations outwith 'hotspot' codons in sporadic colorectal tumours - implications for personalised cancer medicine.* Br J Cancer, 2010. **102**(4): p. 693-703.

219. Allegra, C.J., et al., *American Society of Clinical Oncology provisional clinical opinion: testing for KRAS gene mutations in patients with metastatic colorectal carcinoma to predict response to anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody therapy.* J Clin Oncol, 2009. **27**(12): p. 2091-6.

220. Safaee Ardekani, G., et al., *The prognostic value of BRAF mutation in colorectal cancer and melanoma: a systematic review and meta-analysis.* PLoS One, 2012. **7**(10): p. e47054.

221. De Roock, W., et al., *Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis.* Lancet Oncol, 2010. **11**(8): p. 753-62.

222. Di Nicolantonio, F., et al., *Wild-type BRAF is required for response to panitumumab or cetuximab in metastatic colorectal cancer.* J Clin Oncol, 2008. **26**(35): p. 5705-12.

223. Laurent-Puig, P., et al., *Analysis of PTEN, BRAF, and EGFR status in determining benefit from cetuximab therapy in wild-type KRAS metastatic colon cancer.* J Clin Oncol, 2009. **27**(35): p. 5924-30.

224. Dasari, A. and W.A. Messersmith, *New strategies in colorectal cancer: biomarkers of response to epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies and potential therapeutic targets in phosphoinositide 3-kinase and mitogen-activated protein kinase pathways.* Clin Cancer Res, 2010. **16**(15): p. 3811-8.

225. Goldstein, N.I., et al., *Biological efficacy of a chimeric antibody to the epidermal growth factor receptor in a human tumor xenograft model.* Clin Cancer Res, 1995. **1**(11): p. 1311-8.

226. Sunada, H., et al., *Monoclonal antibody against epidermal growth factor receptor is internalized without stimulating receptor phosphorylation.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(11): p. 3825-9.

227. Li, D., et al., *BIBW2992, an irreversible EGFR/HER2 inhibitor highly effective in preclinical lung cancer models.* Oncogene, 2008. **27**(34): p. 4702-11.

228. Perera, S.A., et al., *HER2YVMA drives rapid development of adenosquamous lung tumors in mice that are sensitive to BIBW2992 and rapamycin combination therapy.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(2): p. 474-9.

229. Sequist, L.V., et al., *Phase III study of afatinib or cisplatin plus pemetrexed in patients with metastatic lung adenocarcinoma with EGFR mutations.* J Clin Oncol, 2013. **31**(27): p. 3327-34.

230. Karnofsky, D.A., *The bases for cancer chemotherapy.* Stanford Med Bull, 1948. **6**(1): p. 257-69.

231. de Gramont, A., et al., *[Oxaliplatin, folinic acid and 5-fluorouracil (folfox) in pretreated patients with metastatic advanced cancer. The GERCOD].* Rev Med Interne, 1997. **18**(10): p. 769-75.

232. Andre, T., et al., *CPT-11 (irinotecan) addition to bimonthly, high-dose leucovorin and bolus and continuous-infusion 5-fluorouracil (FOLFIRI) for pretreated metastatic colorectal cancer. GERCOR.* Eur J Cancer, 1999. **35**(9): p. 1343-7.

233. Corcoran, R.B., et al., *TORC1 suppression predicts responsiveness to RAF and MEK inhibition in BRAF-mutant melanoma.* Sci Transl Med, 2013. **5**(196): p. 196ra98.

234. Elkabets, M., et al., *mTORC1 inhibition is required for sensitivity to PI3K p110alpha inhibitors in PIK3CA-mutant breast cancer.* Sci Transl Med, 2013. **5**(196): p. 196ra99.

235. Koh, M.Y. and G. Powis, *Passing the baton: the HIF switch.* Trends Biochem Sci, 2012. **37**(9): p. 364-72.

236. Fan, F., et al., *Chronic exposure of colorectal cancer cells to bevacizumab promotes compensatory pathways that mediate tumour cell migration.* Br J Cancer, 2011. **104**(8): p. 1270-7.

237. Yamagishi, N., et al., *Chronic inhibition of tumor cell-derived VEGF enhances the malignant phenotype of colorectal cancer cells.* BMC Cancer, 2013. **13**: p. 229.

238. Das, B., et al., *A hypoxia-driven vascular endothelial growth factor/Flt1 autocrine loop interacts with hypoxia-inducible factor-1alpha through mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway in neuroblastoma.* Cancer Res, 2005. **65**(16): p. 7267-75.

239. Harada, H., et al., *The Akt/mTOR pathway assures the synthesis of HIF-1alpha protein in a glucose- and reoxygenation-dependent manner in irradiated tumors.* J Biol Chem, 2009. **284**(8): p. 5332-42.

240. Minakata, K., et al., *Hypoxia induces gefitinib resistance in non-small-cell lung cancer with both mutant and wild-type epidermal growth factor receptors.* Cancer Sci, 2012. **103**(11): p. 1946-54.

241. Longo, R. and G. Gasparini, *Challenges for patient selection with VEGF inhibitors.* Cancer Chemother Pharmacol, 2007. **60**(2): p. 151-70.

242. Jurgensmeier, J.M., et al., *Prognostic and predictive value of VEGF, sVEGFR-2 and CEA in mCRC studies comparing cediranib, bevacizumab and chemotherapy.* Br J Cancer, 2013. **108**(6): p. 1316-23.

243. Koukourakis, M.I., et al., *Prognostic and predictive role of lactate dehydrogenase 5 expression in colorectal cancer patients treated with PTK787/ZK 222584 (vatalanib) antiangiogenic therapy.* Clin Cancer Res, 2011. **17**(14): p. 4892-900.

244. Scartozzi, M., et al., *Pre-treatment lactate dehydrogenase levels as predictor of efficacy of first-line bevacizumab-based therapy in metastatic colorectal cancer patients.* Br J Cancer, 2012. **106**(5): p. 799-804.

245. McIntyre, A., et al., *Carbonic anhydrase IX promotes tumor growth and necrosis in vivo and inhibition enhances anti-VEGF therapy.* Clin Cancer Res, 2012. **18**(11): p. 3100-11.

246. Richeldi, L., et al., *Efficacy and safety of nintedanib in idiopathic pulmonary fibrosis.* N Engl J Med, 2014. **370**(22): p. 2071-82.

247. Reck, M., et al., *Docetaxel plus nintedanib versus docetaxel plus placebo in patients with previously treated non-small-cell lung cancer (LUME-Lung 1): a phase 3, double-blind, randomised controlled trial.* Lancet Oncol, 2014. **15**(2): p. 143-55.

248. *Oral anti-angiogenesis treatment plus chemotherapy is not more efficacious than bevacizumab plus chemotherapy in metastatic colorectal cancer.* Oncology (Williston Park), 2011. **25**(12): p. 1232.

249. O'Reilly, S.M., et al., *Hypoxia induces epithelial amphiregulin gene expression in a CREB-dependent manner.* Am J Physiol Cell Physiol, 2006. **290**(2): p. C592-600.

250. Bordoli, M.R., et al., *Prolyl-4-hydroxylase PHD2- and hypoxia-inducible factor 2-dependent regulation of amphiregulin contributes to breast tumorigenesis.* Oncogene, 2011. **30**(5): p. 548-60.

251. Petitprez, A. and A.K. Larsen, *Irinotecan resistance is accompanied by upregulation of EGFR and Src signaling in human cancer models.* Curr Pharm Des, 2013. **19**(5): p. 958-64.

252. Lee, S.H., et al., *HIF-1 is induced via EGFR activation and mediates resistance to anoikis-like cell death under lipid rafts/caveolae-disrupting stress.* Carcinogenesis, 2009. **30**(12): p. 1997-2004.

253. Wang, Y., et al., *Hypoxia promotes ligand-independent EGF receptor signaling via hypoxia-inducible factor-mediated upregulation of caveolin-1.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(13): p. 4892-7.

254. Wang, Y., et al., *Regulation of endocytosis via the oxygen-sensing pathway.* Nat Med, 2009. **15**(3): p. 319-24.

255. Perrotte, P., et al., *Anti-epidermal growth factor receptor antibody C225 inhibits angiogenesis in human transitional cell carcinoma growing orthotopically in nude mice.* Clin Cancer Res, 1999. **5**(2): p. 257-65.

256. Bruns, C.J., et al., *Epidermal growth factor receptor blockade with C225 plus gemcitabine results in regression of human pancreatic carcinoma growing orthotopically in nude mice by antiangiogenic mechanisms.* Clin Cancer Res, 2000. **6**(5): p. 1936-48.

257. Amin, D.N., et al., *Tumor endothelial cells express epidermal growth factor receptor (EGFR) but not ErbB3 and are responsive to EGF and to EGFR kinase inhibitors.* Cancer Res, 2006. **66**(4): p. 2173-80.

258. Sasaki, T., et al., *Modification of the primary tumor microenvironment by transforming growth factor alpha-epidermal growth factor receptor signaling promotes metastasis in an orthotopic colon cancer model.* Am J Pathol, 2008. **173**(1): p. 205-16.

259. Kuwai, T., et al., *Phosphorylated epidermal growth factor receptor on tumor-associated endothelial cells is a primary target for therapy with tyrosine kinase inhibitors.* Neoplasia, 2008. **10**(5): p. 489-500.

260. Coffey, R.J., Jr., et al., *Production and auto-induction of transforming growth factor-alpha in human keratinocytes.* Nature, 1987. **328**(6133): p. 817-20.

261. Panupinthu, N., et al., *Self-reinforcing loop of amphiregulin and Y-box binding protein-1 contributes to poor outcomes in ovarian cancer.* Oncogene, 2014. **33**(22): p. 2846-56.

262. Normanno, N., et al., *Implications for KRAS status and EGFR-targeted therapies in metastatic CRC.* Nat Rev Clin Oncol, 2009. **6**(9): p. 519-27.

263. Roberts, P.J. and T.E. Stinchcombe, *KRAS mutation: should we test for it, and does it matter?* J Clin Oncol, 2013. **31**(8): p. 1112-21.

264. Ma, B.B., et al., *Intermittent versus continuous erlotinib with concomitant modified "XELOX" (q3W) in first-line treatment of metastatic colorectal cancer: correlation with serum amphiregulin and transforming growth factor alpha.* Cancer, 2013. **119**(23): p. 4145-53.

ANNEXE

Publications dans des congrès scientifiques :

Annette K. Larsen, Virginie Poindessous, Alexandre E. Escargueil and Paul Mésange
Angiogenesis inhibitors: accomplishments and challenges.
Annual Meeting of the Pharmacology and Molecular Mechanisms (PAMM) group of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC). Cardiff, Wales, January 2013.

P Mésange, V Poindessous, A Battistella, S Dumont, F Merabtene and AK Larsen ❖
Angiogenesis inhibition triggers a survival response in colorectal tumor models.
Annual Meeting of the Pharmacology and Molecular Mechanisms (PAMM) group of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC). Cardiff, Wales, January 2013.
Awarded first price for "***best oral presentation by a young investigator***"

P Mésange, V Poindessous, A Battistella, S Dumont, F Merabtene, A de Gramont, AK Larsen.

Colorectal cancer models with intrinsic bevacizumab resistance show strong autocrine HIF-VEGF-pVEGFR signaling and are sensitive to nintedanib.

ESMO 15th World Congress on Gastrointestinal Cancer, Barcelona, Spain, July 2013.

V Poindessous, P Mésange, A Batistella, A Afchain, M-E Forgue-Lafitte, A de Gramont, AK Larsen

Exposure to nintedanib, a triple angiokinase inhibitor, is accompanied by activation of EGFR and other ErbB/HER-family members in colorectal cancer (CRC) models, providing a rational for combinations of nintedanib with the ErbB family blocker afatinib.

ESMO, Amsterdam, the Netherlands, Sep-Oct 2013

P Mésange, V Poindessous, A Batistella, A Savina, C Tournigand, T André, A de Gramont, AK. Larsen

Bevacizumab exposure is accompanied by EGFR activation in colorectal cancer (CRC) models providing a rational for combinations of bevacizumab and erlotinib in the GERCOR DREAM phase III trial.

ESMO, Amsterdam, the Netherlands, Sep-Oct 2013

AK Larsen, V Poindessous, D Ouaret, M Ayadi, P Mésange

Combination therapy: is more better ?

ESMO, Amsterdam, the Netherlands, Sep-Oct 2013

P Mésange, V Poindessous, A Batistella, A Savina, C Tournigand, T André, A de Gramont, AK Larsen

Prolonged bevacizumab exposure is accompanied by EGFR activation in colorectal cancer (CRC) models providing a rational for combinations of bevacizumab and erlotinib in the GERCOR DREAM phase III trial.

ASCO GI (Gastrointestinal Cancers Symposium organized by the American Society for Clinical oncology). San Francisco, US, January 2014.

V Poindessous, P Mésange, A Batistella, A Afchain, A de Gramont, AK Larsen

Nintedanib, a triple angiokinase inhibitor activates EGFR and HER2 in colorectal cancer (CRC) models, providing a rational for combinations of nintedanib with the ErbB family blocker afatinib.

ASCO GI (Gastrointestinal Cancers Symposium organized by the American Society for Clinical oncology). San Francisco, US, January 2014.

P Mésange, V Poindessous, A Savina, T André, A de Gramont, AK Larsen ❖

VEGF inhibition is accompanied by EGFR activation in CRC models providing a rational for combinations of bevacizumab and erlotinib in the GERCOR phase III DREAM study.

Annual Meeting of the Pharmacology and Molecular Mechanisms (PAMM) group of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC). Münster, Germany, February 2014.

AK Larsen, V Poindessous, A Bouygues, D Muller, A Savina, B Chibaudel, C Tournigand, T André, A de Gramont, P Mésange

Mouse-DREAM: VEGF inhibition is accompanied by EGFR activation in colorectal cancer models independent of KRAS status providing a rational for combinations of bevacizumab and erlotinib in the positive GERCOR phase III DREAM trial

Annual congress of the European Society for Medical Oncology (ESMO). Madrid, Spain, Septeber 2014.

P Mésange, V Poindessous, M Sabbah, AE Escargueil, A de Gramont, AK Larsen

Natural bevacizumab resistance is associated with hypoxia tolerance and prolonged activation of autocrine VEGF signaling in colorectal cancer cells and can be overcome by nintedanib, a triple angiokinase inhibitor.

AK Larsen, V Poindessous, M Sabbah, A de Gramont and P Mésange ❖❖

Autocrine signaling plays a major role in the response of colorectal cancer cells to VEGF blockage

19th World Congress on Advances in Oncology and 17th International Symposium on Molecular Medicine. Athens, Greece, October 2014.

P Mésange, V Poindessous, A Bouygues, D Muller, A Savina, B Chibaudel, C Tournigand, T André, A de Gramont and AK Larsen

Mouse-DREAM: VEGF inhibition is accompanied by EGFR activation in colorectal cancer models whatever the KRAS status providing a rational for combinations of bevacizumab and erlotinib in the positive GERCOR phase III DREAM trial

AACR-NCI-EORTC conference on Molecular Targets and Cancer Therapeutics. Barcelona, Spain, November 2014.

A Bouygues, P Mésange, M Ayadi, V Poindessous, M Chiron, E Dochy, T André, A de Gramont, AK Larsen

Aflibercept (Zaltrap) directly attenuates the migration and invasion of colorectal cancer cells

AACR-NCI-EORTC conference on Molecular Targets and Cancer Therapeutics. Barcelona, Spain, November 2014.

B. Chibaudel[1], C. Tournigand[1], B. Samson[2], W. Scheithauer[3], P. Mesange[1], G. Lledo[4], F. Viret[5], J.F. Ramée[6], N. Tubiana-Mathieu[7], J. Dauba[8], O. Dupuis[9], Y. Rinaldi[5], M. Mabro[10], N. Aucoin[11], J. Latreille[2], F. Bonnetain[12], C. Louvet[1], A.K. Larsen[1], T. André[1], A. De Gramont[13]; [1]Paris/FR, [2]Greenfield Park/CA, [3]Wien/AT, [4]Lyon/FR, [5]Marseille/FR, [6]Nantes/FR, [7]Limoges/FR, [8]Mont-de-Marsan/FR, [9]Le Mans/FR, [10]Suresnes/FR, [11]Laval, QC/CA, [12]Besançon/FR, [13]Paris Cedex/FR

Bevacizumab-Erlotinib as maintenance therapy in metastatic colorectal cancer. Final results of the GERCOR DREAM study

Annual congress of the European Society for Medical Oncology (ESMO). Madrid, Spain, September 2014.

RESUME

Le but des travaux est de caractériser l'influence de la signalisation VEGF, en particulier la signalisation autocrine VEGF, sur la biologie et la sensibilité/résistance aux médicaments de cellules de cancer colorectal. Nous avons premièrement souhaité caractériser l'impact de la signalisation autocrine VEGF dans des modèles de CRC avec une résistance naturelle au bevacizumab, un anticorps anti-VEGF. Bien que ce composé soit actif dans le CRC, une sous population de patients ne répondent pas au traitement. Nos résultats montrent une sur régulation de la voie autocrine HIF-VEGF-VEGFR en réponse à une exposition prolongée au bevacizumab dans les cellules bevacizumab résistantes. Si la résistance à cet anticorps est bien établie, d'autres inhibiteur de la voie VEGF restent actifs (comme la petite molécule ciblée nintedanib) et peuvent inhiber la voie mTOR. La signalisation VEGF autocrine joue un rôle dans la survie de cellules de CRC. Chez les sujets résistants au bevacizumab, il serait intéressant d'introduire le nintedanib seul ou en combinaison pour accentuer l'inhibition angiogénique. Une autre combinaison d'agents (anti VEGF(R) et anti EGFR) a montré une efficacité dans des modèles de CRC en préclinique. Plus récemment, la combinaison du bevacizumab et d'une petite molécule ciblant EGFR (erlotinib) a montré une plus grande efficacité que le bevacizumab seul dans des modèles de CRC indépendamment du statut *Kras*. Le bevacizumab induit une activation de la voie de survie EGFR dans les cellules tumorales et dans les cellules endothéliales associées à la tumeur. Cette activation se trouve diminuée avec l'introduction de l'erlotinib. Les résultats indiquent que la combinaison du bevacizumab et de l'erlotinib sont plus actif en thérapie de maintenance que le bevacizumab seul, même pour les patients mutés *Kras*. Ces résultats ont mené à l'étude clinique positive GERCOR phase III DREAM dans le cancer du côlon métastatique où la combinaison du bevacizumab et de l'erlotinib a augmenté la survie de trois mois comparé au traitement au bevacizumab seul.