



HAL
open science

Implication de la neuropiline-2 dans la Transition-Epithélio- Mésenchymateuse

Camille Grandclément

► **To cite this version:**

Camille Grandclément. Implication de la neuropiline-2 dans la Transition-Epithélio- Mésenchymateuse. Médecine humaine et pathologie. Université de Franche-Comté, 2011. Français. NNT : 2011BESA3002 . tel-01227198

HAL Id: tel-01227198

<https://theses.hal.science/tel-01227198>

Submitted on 10 Nov 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.

UNIVERSITE DE FRANCHE-COMTE
UFR SCIENCES MEDICALES ET PHARMACEUTIQUES DE
BESANCON

Année Universitaire 2010-2011

THESE

Pour l'obtention du Diplôme de Doctorat de l'Université de Franche-Comté

Spécialité : Sciences de la Vie et de la Santé

N° de bibliothèque : 25.11.02

Présentée et soutenue publiquement le 22 juin 2011

Par

Camille GRANDCLEMENT

Implication de la neuropiline-2 dans la Transition-Epithélio-
Mésenchymateuse

Sous la direction du Professeur Christophe Borg

Composition du jury :

Directeur de thèse : Pr Christophe BORG

Rapporteurs : Pr Jean-Louis MERLIN

Dr Olivier MICHEAU

Examineurs : Dr Olivier ADOTEVI

Pr Hueseyin FIRAT

RESUME

Le cancer est à l'heure actuelle un important problème de santé publique. Une grande majorité des patients sont diagnostiqués à un stade avancé, nécessitant l'utilisation de thérapies lourdes telles que la radiothérapie et la chimiothérapie. Malheureusement, ces thérapies manquent de spécificité et sont pour cela très toxiques. Le développement de thérapies ciblées, plus efficaces et moins toxiques est depuis longtemps un enjeu majeur de la recherche en cancérologie. La connaissance progressive des mécanismes moléculaires participant à la progression tumorale a permis le développement récent de nouvelles approches thérapeutiques ciblant la transduction du signal, l'angiogénèse tumorale, le cycle cellulaire, les télomérases ou encore visant à induire l'apoptose tumorale.

Les Neuropilines (NRPs) sont des récepteurs transmembranaires non tyrosine-kinase identifiés à l'origine comme des récepteurs pour les sémaphorines de la classe 3. Ces glycoprotéines sont particulièrement impliquées dans la migration de la crête neurale et dans la croissance axonale au cours du développement embryonnaire du système nerveux. En outre, les NRPs sont exprimées par une large variété de tumeurs et de nombreuses molécules solubles semblent interagir avec ces protéines pour moduler la progression tumorale. Parmi elles, les facteurs angiogéniques de la famille du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) semblent être à l'origine d'une angiogénèse médiée par les NRPs.

Tandis que la NRP1 a été largement étudiée et reconnue comme une cible intéressante dans le cadre du développement de thérapies anti-angiogéniques, très peu d'études s'étaient intéressées au rôle de la NRP2 dans la progression tumorale jusqu'à présent. La NRP2 semble réguler la progression tumorale par de nombreux mécanismes, non seulement l'angiogénèse mais aussi la lymphangiogénèse, la Transition-Epithélio-Mésenchymateuse (TEM) et la formation de métastases. A la vue de ces multiples rôles dans la progression tumorale, la NRP2 apparaît donc comme une cible intéressante dans le cadre du développement de thérapies ciblées innovantes en cancérologie. Au cours de notre thèse, nous nous sommes attachés à caractériser le rôle de la NRP2 dans la progression tumorale dans le cadre du cancer colorectal puis nous avons développé un anticorps monoclonal thérapeutique ciblant spécifiquement cette protéine.

ABSTRACT

Cancer incidence is increasing worldwide. The great majority of patients are diagnosed in advanced stage, requiring systemic therapy. Hence radiotherapy and chemotherapy have been the traditional mainstay of treatment for such patients. Unfortunately such therapies act in a non specific manner, resulting in significant toxicity. The development of targeted drug-delivery strategies for safer and more effective therapy in human malignancies has been a long-standing goal for researchers and clinicians. Increasing knowledge in tumor formation and growth at the molecular level has generated a broad array of therapeutic options, including signal transduction inhibition, anti-angiogenic and anti-vascular agents, cell cycle inhibitors, telomerase and telomere interacting agents, apoptosis inducers, and anti-invasive agents.

Neuropilins (NRPs) are transmembrane non tyrosine-kinase glycoproteins first identified as receptors for class-3 semaphorins. They are particularly involved in neural crest migration and axonal growth during development of the nervous system. Since many types of tumor and endothelial cells express NRP receptors, various soluble molecules were also found to interact with these receptors to modulate cancer progression. Among them, angiogenic factors belonging to the Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) family seem to be responsible for NRPs-related angiogenesis.

While NRP1 was intensively studied from many years and identified as an attractive angiogenesis target for cancer therapy, NRP2 signaling pathway has just recently been studied. NRP2 may regulate tumor progression by several concurrent mechanisms, not only angiogenesis but lymphangiogenesis, epithelial-mesenchymal transition and metastasis. In view of their multiples functions in cancer promotion, NRP2 fulfills all the criteria of a therapeutic target for innovative anti-tumor therapies. Our thesis focuses on NRP2-specific roles in tumor progression and subsequent development of a NRP2-neutralizing monoclonal antibody.

REMERCIEMENTS

J'exprime ma profonde gratitude au Pr Jean-Louis Merlin et au Dr Olivier Micheau pour avoir accepté d'être rapporteurs de notre thèse ainsi qu'au Dr Olivier Adotevi et au Pr Hueseyin Firat pour avoir participé au jury et contribué ainsi à l'aboutissement de ce travail.

Je tiens également à exprimer ma profonde reconnaissance au Pr Christophe Borg, qui a été l'initiateur de ce projet au tout début et qui m'a encouragée à poursuivre ma recherche tout au long de ces années. Merci de m'avoir fait bénéficier de toute l'étendue de vos connaissances scientifiques et de votre esprit critique tout au long de ces années, malgré un emploi du temps complètement surchargé !

Je remercie également toutes les personnes de l'EFS et de l'IBCT qui ont contribué à ce travail de près ou de loin.

SOMMAIRE

PREAMBULE.....	21
INTRODUCTION.....	25
CHAPITRE 1 : Les Neuropilines.....	26
1.1 Neuropilines : Histoire de leur découverte, structure et isoformes.....	26
1.1.1 Historique de leur découverte.....	26
1.1.2 Ligands des NRPs.....	26
1.1.3 Structure des NRPs.....	30
1.1.4 Organisation génomique du gène de la NRP2.....	31
1.2 Expression des NRPs.....	33
1.2.1 Embryogénèse	33
1.2.2 Le système immunitaire.....	34
1.2.3 Les NRPs dans le cancer.....	34
1.2.4 Régulation de l'expression des NRPs.....	31
1.3 Fonctions oncogéniques des NRPs.....	37
1.3.1 Interactions NRPs/plexines/sémaphorines.....	39
1.3.2 Interaction des NRPs avec des récepteurs de facteurs de croissance.....	46
1.4 La NRP2 : un biomarqueur diagnostique et pronostique.....	50
1.5 Ciblage thérapeutique des NRPs.....	51
1.5.1 RNA interférence.....	51
1.5.2 Petites molécules.....	51
1.5.3 Anticorps monoclonaux.....	53
CHAPITRE 2 : La Transition-Epithélio-mésenchymateuse.....	55
2.1 Définitions.....	55
2.2 Classification de la TEM	57

2.3 TEM et Cancer.....	58
2.4 Biomarqueurs de la TEM.....	60
2.4.1 Marqueurs membranaires.....	60
2.4.2 Marqueurs du cytosquelette.....	61
2.4.3 Protéines extra-cellulaires.....	63
2.4.4 Facteurs de transcription.....	64
2.4.5 micro-RNA.....	68
2.5 Rôle de la voie de signalisation du TGF β 1 dans la TEM.....	69
2.5.1 Voie de signalisation du TGF β 1.....	69
2.5.2 Rôle des protéines Smads dans la TEM.....	70
2.5.3 TGF β 1 et voies tyrosine kinase.....	71
2.5.4 TGF β 1 et voie de signalisation WNT/GSK3/ β caténine.....	72
2.5.5 TGF β 1 et facteurs de transcription.....	72
2.5.6 TGF β 1 et miRNA.....	73
2.6 Ciblage thérapeutique de la TEM tumorale.....	74
2.6.1 TEM in vitro / in vivo.....	74
2.6.2 Valeur pronostique des marqueurs associés à la TEM.....	74
2.6.3 TEM et résistance aux traitements anti-cancéreux.....	81
2.6.4 Développement de nouveaux traitements ciblant la TEM.....	82
CHAPITRE 3 : Les Anticorps monoclonaux thérapeutiques.....	84
3.1 Historique.....	84
3.2 Structure des anticorps monoclonaux.....	85
3.3 Anticorps monoclonaux murins, chimériques, humanisés et humains.....	87
3.4 Modes d'action de ces anticorps monoclonaux.....	90
3.4.1 ADCC (Cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps).....	91
3.4.2 CDC: Cytotoxicité dépendante du complément.....	93

3.4.3 Voies d'induction d'apoptose	95
3.4.4 Régulation des voies d'apoptose intrinsèque et extrinsèque par p53.....	96
3.5 Utilisation des anticorps monoclonaux en thérapeutique.....	99
3.6 Nouvelles approches : fragments d'anticorps, anticorps bispécifiques.....	103
3.6.1 Nouveaux formats.....	103
3.6.2 Fragments Fab, scFv	104
3.6.3 Anticorps bispécifiques	104
3.6.4 Nanobodies	106
3.6.5 Couplage de ces fragments	107
3.6.6 Intrabodies.....	109
OBJECTIFS DE NOTRE TRAVAIL DE THESE.....	111
RESULTATS.....	113
PUBLICATION N°1.....	114
INTRODUCTION.....	115
1. Etude préliminaire.....	115
2. Expression de la NRP2.....	116
3. NRP2 et progression tumorale.....	116
4. NRP2 et TEM.....	117
PUBLICATION N°1.....	119
RESULTATS DE LA PUBLICATION N°1.....	139
PUBLICATION N°2.....	145
INTRODUCTION.....	146
1. Contexte de l'étude : Plateforme "Innovative Immune Targeting of Cancer".....	146
2. Production d'anticorps monoclonaux murins thérapeutiques anti-NRP2.....	147
3. Détermination de la bioactivité des anticorps monoclonaux anti-NRP2.....	153
PUBLICATION N°2.....	157

RESUME DES RESULTATS.....	203
1. Production et isolement d’anticorps spécifiques de la NRP2.....	203
2. Effets sur la prolifération cellulaire et la formation de colonies.....	204
3. Induction de l’apoptose	205
3.1 Lignées de cancer colorectal.....	205
3.2. Lignées de cancer du pancréas.....	206
3.3 Implication des caspases.....	208
3.4 Voie intrinsèque mitochondriale.....	209
3.5 Voie extrinsèque.....	210
4. NRP2 et p53.....	212
5. Bioactivité in vivo.....	217
DISCUSSION ET PERSPECTIVES DE TRAVAIL.....	245
1. Thérapies ciblées en oncologie.....	219
1.1 A la recherche de nouvelles cibles.....	220
1.2 Intérêt du ciblage des NRPs.....	221
2. NRP2 et TEM.....	224
3. NRP2 et apoptose.....	225
4. NRP2 et p53.....	233
5. NRP2 et miRNA.....	235
6. Développement d’anticorps monoclonaux thérapeutiques anti-NRP2.....	237
CONCLUSION.....	239
REFERENCES.....	242
ANNEXE.....	262

Figures

Figure 1 : Les Neuropilines et leurs ligands

Figure 2: Organisation génomique des gènes NRP1 et NRP2

Figure 3: Les isoformes de la NRP2

Figure 4 : Interactions NRPs/sémaphorines/plexines

Figure 5 : Coopération de la NRP2 avec différents récepteurs aux facteurs de croissance

Figure 6 : Outils biotechnologiques développés pour le ciblage des NRPs

Figure 7 : La Transition Epithélio-Mésenchymateuse

Figure 8 : Les 3 types de TEM

Figure 9 : TEM et progression tumorale

Figure 10 : Voie de signalisation Wnt

Figure 11 : Voie de signalisation SHH

Figure 12 : régulation de l'expression de la E-cadhérine dans des cellules normales et cancéreuses

Figure 13 : Voie de signalisation du TGF β 1.

Figure 14 : Régulation de la TEM par le TGF β 1

Figure 15 : La NRP2 induit une TEM TGF β 1-dépendante dans des cellules tumorales de cancer colorectal, via son interaction avec le TGFRI.

Figure 16 : immunomarquages de marqueurs épithéliaux (A à C) et de marqueurs mésenchymateux (D à I) dans des tissus tumoraux de cancers gastriques

Figure 17 : Survie globale des patients porteurs de cancers gastriques en fonction de l'expression des marqueurs liés à la TEM.

Figure 18 : Immunomarquage IHC de la β -caténine dans des tissus

Figure 19 : Relation entre la localisation cellulaire de la β -caténine et les stades de progression du cancer

Figure 20 : Corrélation entre expression nucléaire de β -caténine et survie globale. Un fort niveau d'expression de beta caténine nucléaire (score >300) est associée à une survie diminuée des patients

Figure 21 : immunomarquages des facteurs de transcription HIF-1 α , Twist1 et Snail dans du tissu sain du poumon (N) et du tissu tumoral de cancer du poumon non à petites cellules

Figure 22 : Corrélation entre l'expression de HIF-1a, Twist1 et Snail et survie globale des patients

Figure 23 : Structure générale des anticorps

Figure 24 : Anticorps chimériques et humanisés

Figure 25 : Les mécanismes effecteurs des anticorps monoclonaux

Figure 26 : Implication de p53 dans la régulation de l'apoptose intrinsèque et extrinsèque

Figure 27 : Fragments d'anticorps monovalents Fab et scFV

Figure 28 : Fragments d'anticorps bispécifiques

Figure 29 : Les nanobodies

Figure 30 : Anticorps conjugués

Figure 31 : La NRP2 induit une TEM TGF β 1-dépendante dans des cellules tumorales de cancer colorectal, via son interaction avec le TGFRI.

Figure 32 : Sélection des hybridomes par culture en milieu sélectif HAT

Figure 33 : Technique de screening par immunofluorescence indirecte

Figure 34 : Les différentes étapes de production d'anticorps monoclonaux murins anti-NRP2.

Figure 35 : Spécificité de l'anticorps ITAC-B1 par IFI

Figure 36: La neutralisation de la NRP2 diminue la prolifération cellulaire.

Figure 37 : L'anticorps ITAC-B1 diminue significativement la formation de colonies de cellules Colo320 dans des tests en milieu semi-gélosé agar.

Figure 38 : L'anticorps ITAC-B1 induit l'apoptose de cellules tumorales exprimant la NRP2 (HT29^{NRP2}) d'une façon dose-dépendante, tandis qu'il n'a aucune action sur les cellules NRP2- (HT29^{ctrl})

Figure 39 : L'anticorps induit l'apoptose de cellules tumorales exprimant la NRP2 (HT29NRP2) d'une façon synergique avec le 5FU ou l'irinotecan.

Figure 40 : Les lignées Bes-PAC03 et Bes-PAC04 permettent la fixation d'ITACB1 à leur membrane cellulaire, contrairement aux lignées Bes-PAC01 et Bes-PAC05.

Figure 41 : ITAC-B1 induit l'apoptose des cellules Bes-PAC03 et Bes-PAC04 tandis qu'il n'a aucun effet sur les cellules Bes-PAC01 et Bes-PAC05.

Figure 42 : L'incubation des cellules HT29NRP2 avec l'anticorps ITACB1 permet le clivage de la caspase 3, par western-blot.

Figure 43 : le prétraitement des cellules HT29^{NRP2} par un inhibiteur des caspases, le zvad-FMK, diminue en partie l'apoptose induite par ITACB1.

Figure 44 : Le traitement des cellules exprimant la NRP2 (HT29^{NRP2} et BesPAC-04) par ITACB1 ou 5FU induit une dépolarisation de la membrane mitochondriale externe.

Figure 45 : Les expressions de NRP2 et des récepteurs de mort DR4, DR5 et Fas sont inversement corrélées.

Figure 46 : Les expressions de NRP2 et de p53 sont inversement corrélées sur des lignées de cancer colorectal

Figure 47 : Le traitement pendant 24h de cellules tumorales HT29^{NRP2} et Colo320^{siRNA-NRP2} par notre anticorps ITAC-B1 entraîne une restauration de l'expression de p53.

Figure 48 : Le pré-traitement des cellules Colo320 par la pifithrine- α (PFT) diminue l'apoptose induite par notre anticorps ITAC-B1.

Figure 49 : L'expression de NRP2 par les cellules HT29 entraîne une diminution de l'expression des protéines p53 et p21 par microscopie confocale.

Figure 50 : Les protéines p53 et NRP2 sont inversement corrélées

Figure 51 : Le traitement des cellules HT29^{NRP2} par le MG132, une molécule inhibitrice du protéasome restaure l'expression de la protéine p53.

Figure 52 : Xénogreffes murines.

Figure 53 : Possible implication des miR-200 dans la régulation des effets oncogéniques de la NRP2.

Tables

Table 1 : Expression des NRPs dans différents cancers.

Table 2 : Fonctions biologiques des sémaphorines de la classe 3.

Table 3 : Fonctions biologiques des NRPs via leur interaction avec des récepteurs de facteur de croissance.

Table 4 : Biomarqueurs de la TEM.

Table 5 : Liste non exhaustive des études évaluant l'impact pronostique de différents marqueurs associés à la TEM dans divers cancers.

Table 6 : Les différents anticorps monoclonaux actuellement sur le marché et leurs principales indications thérapeutiques.

Liste des abréviations

A

ADCC : Cytotoxicité Cellulaire Dépendante des Anticorps

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

Apaf-1 : Apoptotic protease-activating factor-1

ARNm : Acide Ribonucléique messenger

C

CCL21 : Chimiokine ligand-21

CDC : Cytotoxicité Dépendante du Complément

CHU : Centre Hospitalier Universitaire

CTBP : C-terminal Binding Protein

CXCR4 : Récepteur 4 de la chimiokine à motif CC

D

DC : Cellules Dendritiques

DD : Death Domain

DISC : Death Inducing Signalling Complex

E

EGF : Epithelial Growth Factor (Facteur de croissance épidermique)

EGFR : Récepteur au facteur de croissance épidermique

ELISA : Enzyme-linked immunosorbent assay

ERK1/2 : Extracellular signal-regulated kinases 1/2

F

Fab : Fragment d'anticorps

Fc : Fragment cristallisable

FADD : Fas Associated Death Domain

FasL : Fas-Ligand

FGF : Fibroblast Growth Factor (Facteur de croissance fibroblastique)

FITC : Fluorescein Isothiocyanate

FoxC2 : Forkhead box C2

FSP1/S100A4 : Fibroblast-specific protein-1

FT : Facteurs de Transcription

5-FU : 5-Fluorouracile

G

GIPC : GAIP interacting protein, C terminus

GSK-3 β : Glycogen synthase kinase-3

GST : Gènes Suppresseurs de Tumeurs

H

HAT : Hypoxanthine Aminoptérine Thymidine

HBH : Hélice-Boucle-Hélice

HGF : Hepatocyte Growth Factor (Facteur de croissance hépatocytaire)

HIF-1 : Hypoxia Inducible Factor (Facteur inductible par l'hypoxie)

HPRT : Hypoxantine-guanine phosphoribosyl transférase

HT : Hypoxanthine Thymidine

HUVEC : Human Umbilical Vein Endothelial Cells (cellules humaines endothéliales du cordon ombilical)

I

IFI : Immunofluorescence indirecte

IHC : Immunohistochimie

IL-1 β : Interleukine-1 β

IL6 : Interleukine 6

IL8 : Interleukine 8

ILK : Integrin-linked kinase (kinase liée aux intégrines)

K

KLF8 : Kruppel-like factor 8

L

LEF : Lymphoid Enhancer binding Factor

LT : Lymphocytes T

M

MDM2 : Murine Double Minute 2

MEC : Matrice Extra-Cellulaire

MEK1/2 : MAP Kinase Kinase

miRNA : micro-RNA

MMP : Matrix metalloproteases

MUC1 : mucine 1

N

NF-KB : Nuclear Factor Kappa light chain enhancer of activated B-cells

NK : Natural Killer

NRPs : Neuropilines

NRP1 : Neuropiline-1

NRP2 : Neuropiline-2

P

P38-MAPK : P38 Mitogen-Activated Protein Kinases

PARP : Poly-ADP ribose polymerase

PDAC : Adénocarcinome Ductal Pancréatique

PDGF : Platelet-Derived Growth Factor (Facteur de croissance plaquettaire)

PEG : Polyéthylène glycol

PI3K : Phospho-inositide 3 Kinase

PFT- α : Pifithrine- α

PIGF : Placental Growth Factor (Facteur de croissance placentaire)

Ptc1 : Patched-1

R

RT-PCR : Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction

S

Sema : Sémaphorines

SHH : Sonic Hedgehog

shRNA : Short Hairpin RNA (petits ARN en épingle à cheveux)

siRNA : Small Interfering RNA (petits ARN interférents)

SIP1 : survival of motor neuron protein interacting protein 1

sNRP1 and sNRP2 : Formes solubles des NRP1 et NRP2

α -SMA : α -Smooth Muscle Actin

Smo : Smoothened

SVF : Sérum de Veau Fœtal

T

TCF : T cell-specific transcription factor

TEM : Transition Epithélio-Mésenchymateuse

TGF β 1 : Transforming Growth Factor (Facteur de croissance transformant)

TGF β 1-LAP : Facteur de croissance Transformant β 1-peptide associé à la latence

TGFRs : Récepteurs pour le TGF β 1

TGFRI : Récepteurs pour le TGF β 1 de type 1

TGFRII: Récepteurs pour le TGF β 1 de type 2

TGFRIII : Récepteurs pour le TGF β 1 de type 3

TME : Transition Mésenchymateuse-Epithéliale

TNF α : Tumor Necrosis Factor α (facteur de nécrose tumorale α)

Treg : Lymphocytes T régulateurs

TUNEL : Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labelling

V

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor (Facteur de croissance Vasculaire de l'Endothelium)

VEGFR1 : Récepteur de type 1 du VEGF

VEGFR2 : Récepteur de type 2 du VEGF

VEGFR3 : Récepteur de type 3 du VEGF

Z

ZEB1 : Zinc-finger E-box binding homeobox 1

Zo-1 : Zonula-occludens-1

PREAMBULE

Notre unité mixte de recherche "Interaction Hôte-Greffon et Ingénierie Cellulaire et Génique" a pour principal objectif de comprendre les mécanismes du système immunitaire pour mieux les moduler. En particulier, notre équipe « Immunothérapies moléculaires et Cancer » s'attache à décrire de façon plus spécifique les interactions hôte/greffon-tumeur et à développer de nouvelles approches de thérapie génique ex vivo ou de thérapie cellulaire exploitant ces réponses allo-immunes. Nous avons donc tout naturellement commencé à étudier le rôle des Neuropilines (NRPs) dans ce contexte d'interactions entre le système immunitaire et la tumeur. Les NRPs sont en effet des récepteurs membranaires pour les sémaphorines de la classe 3 et les membres de la famille du VEGF (Facteur de croissance vasculaire de l'endothélium) et elles peuvent être exprimées tant au niveau des cellules immunitaires que des cellules tumorales. Tandis que la NRP1 semble impliquée dans les synapses immunologiques ainsi que dans l'organisation du cytosquelette d'actine, d'autres fonctionnalités originales apparaissent rapidement lors de l'étude de la NRP2. Très peu de cellules immunitaires exprimaient la NRP2, contrairement à la NRP1. Par contre, plusieurs lignées cellulaires d'origines diverses semblent l'exprimer. De plus, la transfection du gène de la NRP2 dans des cellules de cancer colorectal humain est à l'origine de changements phénotypiques importants de ces cellules, caractéristiques de changements observés lors d'une Transition-Epithélio-Mésenchymateuse (TEM). Dans un premier temps, nous nous sommes donc attachés à décrire ces changements phénotypiques induits par la NRP2 et notamment son implication dans la progression tumorale et la TEM. Ce travail a fait l'objet d'une première publication scientifique dans le journal *Plos One* en 2011. Dans un second temps, nous avons développé des outils thérapeutiques ciblant spécifiquement la NRP2. Pour cela, des anticorps monoclonaux murins neutralisant spécifiquement la NRP2 humaine ont été développés dans le cadre d'une collaboration entre notre unité de recherche et le laboratoire Diaclone-Genprobe. En particulier, un anticorps monoclonal murin neutralisant la NRP2 humaine

(appelé ITAC-B1), a montré une certaine bioactivité in vitro et in vivo. Cet anticorps ITAC-B1 a fait l'objet d'un dépôt de brevet international en 2008.

Dans une brève introduction, nous décrirons le rôle de la NRP2 dans la progression tumorale puis nous donnerons les bases fondamentales du processus de TEM. Une revue de la littérature décrivant ce rôle de la NRP2 dans la progression tumorale a notamment été publiée en avril 2011 dans le journal *Cancers*. (voir Annexe). Nous présenterons également dans cette introduction quelques notions générales sur le développement et la caractérisation d'anticorps monoclonaux thérapeutiques.

Nous présenterons ensuite nos résultats concernant la capacité de la NRP2 à induire une TEM TGF β 1-dépendante dans des cellules de cancer colorectal dans une première partie. La production, le développement et la caractérisation des anticorps monoclonaux ciblant la NRP2 seront ensuite décrits dans une seconde partie. La discussion de ces résultats et les différentes perspectives de ce travail s'effectueront ensuite.

INTRODUCTION

CHAPITRE 1 : Les Neuropilines

1.1 Neuropilines : Histoire de leur découverte, structure et isoformes

1.1.1 Historique de leur découverte

La famille des neuropilines (NRPs) comprend 2 membres connus à ce jour, la neuropiline-1 (NRP1) et la neuropiline-2 (NRP2). La NRP1 a été isolée pour la première fois en 1987 sur des neurones embryonnaires de Xénope. [1] Les NRPs sont des glycoprotéines de 130-140 kDa à l'origine identifiées au sein du système nerveux d'un grand nombre d'espèces animales, telles que les poules [2,3], les souris [4], les rats [5,6]. Bien qu'elles aient reçu leur nom de leur provenance neuronale, les NRPs sont exprimées par de multiples tissus. Tandis que la NRP1 fut la première neuropiline à être découverte, la NRP2 a été identifiée peu de temps après par Chen et al, en 1997, par RT-PCR (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction) et transfert de gène. [7]

1.1.2 Ligands des NRPs

Sémaphorines de la classe 3

Les premières observations indiquent que les NRPs sont des récepteurs de forte affinité pour des molécules de guidance neuronale, les sémaphorines de la classe-3. [6] Les NRPs sont des récepteurs pour différentes sémaphorines : la NRP1 est un récepteur pour les sémaphorines 3A, 3C, 3F tandis que la NRP2 lie préférentiellement les sémaphorines 3B, 3C, 3D et 3F. (Figure 1) L'utilisation de souris génétiquement modifiées pour l'expression des NRPs a rapidement permis de mettre en évidence le rôle essentiel du couple sémaphorine/neuropiline dans le guidage axonal lors du développement du système nerveux embryonnaire [8-11].

Membres de la famille du VEGF

En outre, l'utilisation de modèles animaux a suggéré d'autres fonctions essentielles à ces NRPs. En effet, des souris génétiquement modifiées pour sur-exprimer la NRP1 possèdent un nombre excessif de vaisseaux sanguins, suggérant un rôle important de ces NRPs dans l'angiogénèse et la vasculogénèse. [12]. A l'inverse, des embryons de souris dont le gène de la NRP1 est muté, présentent un certain nombre de « défauts » au sein de la circulation neuronale, du développement de la crosse de l'aorte [13] et du système cardiovasculaire, aboutissant à la mort in utéro des embryons homozygotes aux jours embryonnaires de E12.5 à E13.5. [13,14] Les souris déficientes en NRP2 sont viables, suggérant que la NRP2 n'est quant à elle pas essentielle pour le développement du système vasculaire, contrairement à la NRP1. [8,10] En effet, des souris présentant une mutation homozygote du gène de la NRP2 sont caractérisées par des capillaires et des vaisseaux lymphatiques anormaux, suggérant que la NRP2 serait plutôt impliquée dans la lymphangiogénèse. [15] En outre, des souris déficientes en NRP1 et NRP2 ne développent pas de vaisseaux sanguins et meurent prématurément au jour embryonnaire E8.5. [14]

Le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) joue un rôle central dans le développement vasculaire et a donc été rapidement considéré comme un partenaire potentiel des NRPs.

La famille du VEGF comprend six membres : VEGF-A (communément appelé VEGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, et PlGF (Facteur de croissance placentaire), qui sont associés chacun à différents aspects d'angiogénèse ou même de lymphangiogénèse. Ces différents membres de la famille du VEGF ont tous été retrouvés au sein de tumeurs de diverses origines.

En 1996, Ferrara et Carmeliet montrent le rôle essentiel du VEGF-A dans les processus de vasculogénèse et d'angiogénèse embryonnaires chez la souris. [16,17] L'inactivation d'un

seul allèle du gène VEGF est source de létalité embryonnaire par malformations cardiovasculaires entre les jours embryonnaires E11 et E12. [16,17] Le VEGF est retrouvé dans de nombreux tissus, comme le cerveau, le rein, le foie, la rate. L'inactivation du gène VEGF après la naissance ou l'expression spécifique d'isoformes du VEGF chez des souris révèlent que ce facteur est indispensable lors de la formation des organes au cours de l'embryogénèse et qu'une déficience en VEGF provoque l'ischémie des tissus, une croissance ralentie et même une nécrose. [18]

L'isoforme VEGF-A augmente la survie, la prolifération et la migration de cellules endothéliales. [19,20] Le gène humain VEGF-A est composé de 8 exons séparés par 7 introns et est localisé sur le chromosome 6p21. L'épissage alternatif du gène VEGF-A entraîne la formation de plusieurs isoformes de VEGF contenant 121, 145, 165, 189 ou 206 acides aminés. VEGF₁₆₅ est l'isoforme majeur. La présence de domaines liant l'héparine dans les exons 6 et 7 joue un rôle dans la localisation des différents isoformes après sécrétion par les cellules.[21] Le VEGF-A peut se lier aux récepteurs VEGFR1 (Récepteur de type 1 du VEGF), VEGFR2 (Récepteur de type 2 du VEGF) et aux NRPs.

La fonction biologique du VEGF-B n'est pas encore claire. 2 isoformes issus d'épissage alternatif ont été identifiés pour le VEGF-B : VEGF-B₁₆₇ et VEGF-B₁₈₆. En effet, des souris déficientes en VEGF-B sont viables, mais présentent un défaut de conduction cardiaque. [22]

Le VEGF-B semble donc quant à lui indispensable pour une fonction cardiaque normale mais en revanche pas pour l'angiogénèse embryonnaire. [21] Deux types de récepteurs ont été décrits pour l'isoforme VEGF-B : VEGFR1 et NRP1.

Le réseau lymphatique est anormal chez des souris déficientes en VEGF-C, suggérant un rôle de l'isoforme VEGF-C dans la lymphangiogénèse embryonnaire et dans la maintenance du réseau lymphatique chez l'adulte.

Contrairement aux souris déficientes en VEGF-C, les souris déficientes en VEGF-D sont viables et possèdent un réseau lymphatique normal. Les isoformes VEGF-C et VEGF-D se fixent sur les mêmes types de récepteurs, c'est-à-dire le VEGFR2, VEGFR3 (Récepteur de type 3 du VEGF) et les NRPs. L'expression du VEGF-D est corrélée à la formation de métastases dans le cancer colorectal, du poumon et des ovaires. [21]

Le PlGF est un facteur de croissance possédant 42% d'homologie au niveau des séquences d'acides aminés avec le VEGF-A. L'épissage alternatif du PlGF donne naissance à quatre isoformes (PlGF-131, -152, -203, -224). Les isoformes du PlGF peuvent se lier au VEGFR1 et aux NRPs. [21]

Le VEGF-E est un facteur de croissance non humain qui stimule la prolifération, le chimiotactisme de cellules endothéliales et l'angiogénèse in vivo. [21]

De nombreuses études ont en effet confirmé depuis que les NRPs sont des récepteurs pour ces différents membres de la famille du VEGF. La NRP1 est un récepteur pour le VEGF₁₆₅, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E et PlGF-2 [23-28], tandis que la NRP2 est un récepteur pour le VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, PlGF-2 [25,29], VEGF-C [27,29], et VEGF-D [27].

Autres facteurs de croissance

Les NRPs sont également des récepteurs pour d'autres facteurs de croissance tels que le facteur de croissance fibroblastique (FGF), le facteur de croissance hépatocytaire (HGF) et le facteur de croissance transformant β 1 (TGF- β 1). [30,31]. (Figure 1)

1.1.3 Structure des NRPs

Chez l'humain, les gènes des la NRP1 et de la NRP2 sont localisés sur 2 chromosomes différents, respectivement sur les chromosomes 10p12 and 2q34. [32] Malgré une homologie d'environ 44% dans leur séquence d'acides aminés, les NRPs présentent des domaines identiques dans leur structure.

Les NRPs sont constituées d'un domaine extracellulaire de 840 acides aminés environ, d'un court domaine transmembranaire d'une longueur d'environ 25 acides aminés et d'une courte queue intracytoplasmique d'environ 40 acides aminés en position C-terminale. Le domaine extracellulaire des NRPs est composé de 2 motifs a1/a2, homologues aux sous unités du complément C1r and C1s, de 2 motifs b1/b2, présentant une homologie de structure avec le domaine N-terminal des facteurs de coagulation V et VIII et d'un domaine meprim, possédant une activité tyrosine-kinase μ . [4,33]. Les domaines a1/a2 permettent la fixation des sémaphorines, tandis que les domaines b1/b2 permettent la fixation des sémaphorines et du VEGF. Le domaine c est impliqué dans la dimérisation du récepteur. [11] (Figure 1). En raison d'un court domaine intracytoplasmique de seulement 40 acides aminés dépourvu de toute activité tyrosine-kinase, les NRPs ont d'abord été décrites comme incapables de transmettre un signal biologique. Cependant, les 3 derniers acides-aminiés SEA (sérine, acide glutamique et alanine) en position C-terminale des NRPs semblent impliqués dans l'interaction avec le domaine PDZ de protéines interagissant avec des petites protéines G.[34]

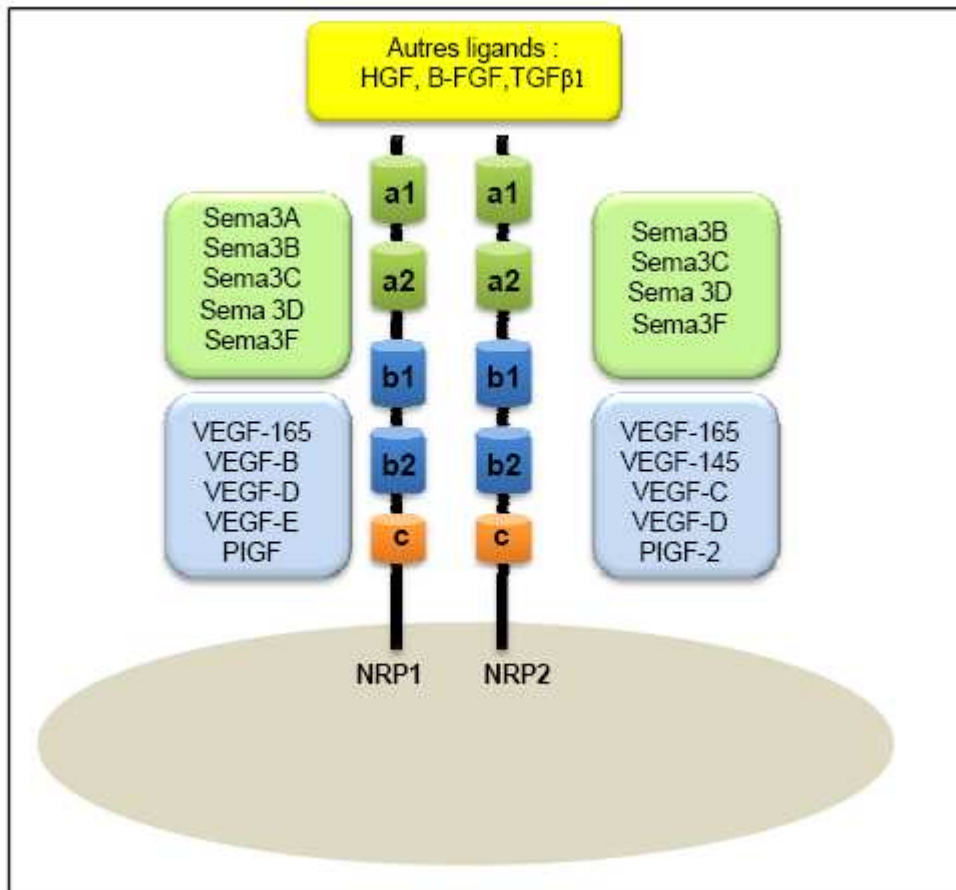


Figure 1 : Les Neuropilines et leurs ligands. Les sémaphorines de la classe-3 (Séma) se lient aux domaines a1/a2 (vert) tandis que les membres de la famille du VEGF se lient préférentiellement sur les domaines b1/b2 (bleu). D'autres facteurs de croissance tels que HGF, B-FGF, TGFβ1 peuvent également se lier aux NRPs. (jaune)

1.1.4 Organisation génomique du gène de la NRP2

Les gènes des NRPs sont composés chacun de 17 exons et 16 introns. (Figure 2) Le produit de traduction de l'ARNm (acide ribonucléique messager) le plus long de NRP2 est une protéine de 926 acides aminés. Cependant, des épissages alternatifs peuvent générer des isoformes plus courts de NRP2 d'une taille allant de 555 à 926 acides aminés. (Figure 3)

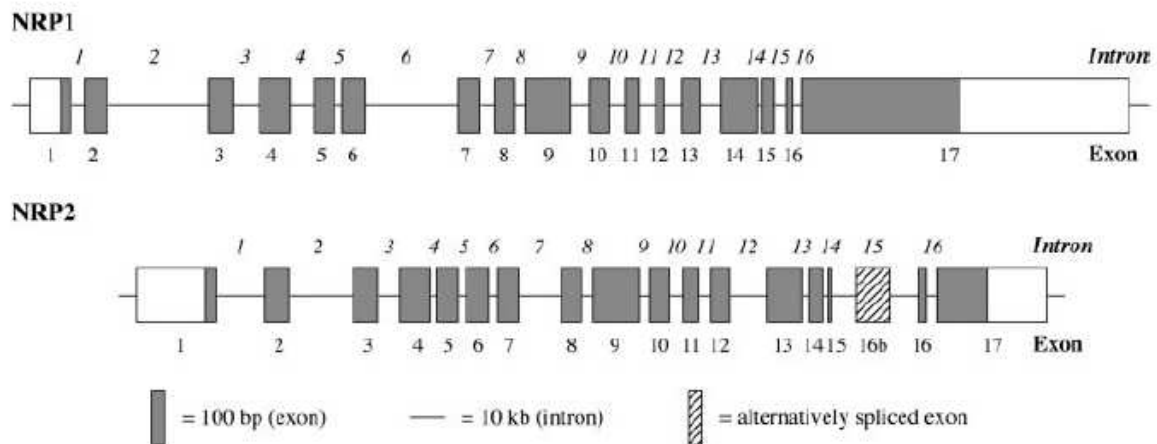


Figure 2: Organisation génomique des gènes NRP1 et NRP2. Les 2 gènes sont composés de 17 exons et 16 introns. Les exons et introns sont représentés par des barres ou des traits proportionnels à leur taille. Les zones non codantes sont en blanc tandis que les zones codantes sont en gris. Le gène de la NRP2 possède un exon supplémentaire, alternativement transcrit, l'exon 16b (rayures). D'après Rossignol et al, 2000 [32]

En particulier, 2 isoformes de la NRP2, NRP2a et NRP2b, issus d'épissage alternatif ont été décrits chez la souris [7] puis chez l'homme. [32] Les différences entre la NRP2a et NRP2b sont principalement observées dans la région « linker » entre les domaines transmembranaires et cytoplasmiques. Des insertions de 17 ou 22 acides aminés après l'acide aminé 809 ont été décrits pour la NRP2a (NRP2a₍₁₇₎, NRP2a₍₂₂₎) tandis que la NRP2b est caractérisée par des insertions de 0 ou 5 acides aminés après l'acide aminé 808. (NRP2b₍₀₎, NRP2b₍₅₎) (Figure 3). La NRP2a semble être plus proche de la NRP1 (44% d'homologie) que la NRP2b (11%). [32] Quatre isoformes solubles de la NRP1 (s_{I1}NRP1, s_{I2}NRP1, s_{III}NRP1 et s_{IV}NRP1) et un de la NRP2 (s₉NRP2) ont été identifiés. [32,35] Tandis que ces isoformes solubles ont conservé leur domaine extracellulaire nécessaire à la liaison des différents ligands, le domaine c, le domaine transmembranaire et intracytoplasmique manquent. Plusieurs études indiquent que ces NRPs solubles peuvent induire l'apoptose de cellules tumorales en bloquant la fixation du VEGF, suggérant ainsi que les NRPs membranaires et solubles auraient des rôles opposés. [36]

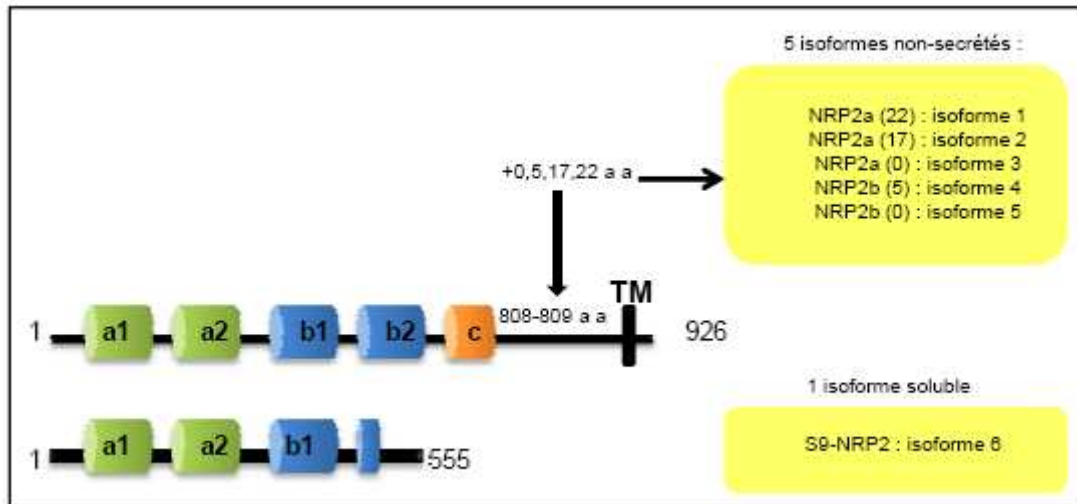


Figure 3: Les isoformes de la NRP2. L'épissage alternatif génère plusieurs isoformes membranaires et solubles de la NRP2.

1.2 Expression des NRPs

1.2.1 Embryogénèse

Les premières études limitaient l'expression des NRPs aux tissus nerveux embryonnaires. [1,2,4,7,37]. Une forte expression de la NRP2 a en effet été retrouvée dans la plupart des tissus du système nerveux embryonnaire, dans la moelle épinière, les ganglions sympathiques, le système olfactif, le néocortex et l'hippocampe. [7] Les NRPs sont aussi exprimées au cours du développement de nombreux tissus non nerveux tels que les os, de nombreux muscles, l'épithélium intestinal, le rein, les poumons, l'aorte.[7] Par ailleurs, des études de délétion génique des NRPs ont révélé un rôle important de ces NRPs au cours du développement du système vasculaire pendant l'embryogénèse. [12,15] Tandis que la NRP1 est principalement retrouvée dans les artères pendant l'embryogénèse, la NRP2 semble nécessaire à la formation des veines et des vaisseaux lymphatiques. [12,15]

1.2.2 Le système immunitaire

De nombreuses cellules immunes telles que des sous-populations de lymphocytes T (LT), de cellules dendritiques (DC) expriment la NRP1 *in vitro* et *in vivo*. [38] Dans le contexte de la réponse immunitaire, la NRP1 favoriserait les interactions inter-cellulaires, et semblerait même médier la prolifération de LT «resting» induite par des DC. [38] La NRP1 est également retrouvée sur des LT régulateurs (Treg) murins CD4+CD25+ mais pas sur les LT naïfs. [39] Exprimée sur des Treg murins, la NRP1 participerait à l'inhibition de la prolifération des LT. [40] Cependant, les Treg humains n'expriment pas la NRP1 [41] ni la NRP2. (donnée non publiée) Le rôle de la NRP2 dans le système immunitaire n'a été que très récemment étudié. La NRP2 est exprimée sous une forme polysialylée à la surface de cellules dendritiques matures (mDC). [42] La polysialylation de protéines est une modification post-traductionnelle plutôt rare, et son rôle n'a pas été encore bien décrit. Toutefois, la polysialylation de la NRP2 semble être indispensable à la migration des mDC dans les ganglions lymphatiques, migration médiée par la chimiokine ligand-21 (CCL21) dans le contexte de la réponse immunitaire. [43,44]

1.2.3 Les NRPs dans le cancer

Les NRPs sont exprimées au niveau des vaisseaux intra-tumoraux mais aussi au niveau des cellules tumorales, suggérant un rôle propre de ces protéines dans la progression tumorale. En 1998, Soker *et al* montrent en effet que la NRP1 est exprimée au niveau des cellules endothéliales et des tissus tumoraux. [28] Les NRPs sont très souvent les seuls récepteurs du VEGF à être exprimées par les cellules tumorales suggérant un rôle essentiel de ces glycoprotéines dans l'angiogénèse et la vasculogénèse. [45] Bien que la NRP1 soit exprimée par une large variété de tumeurs, l'expression de la NRP2 reste à ce jour assez peu étudiée. La NRP2 a toutefois été identifiée dans des ostéosarcomes [46], des mélanomes [47], des

cancers du poumons [48,49], des tumeurs cérébrales [50,51], des cancers du colon [52], des cancers du pancréas [53-56], des cancers du sein [57], des leucémies myéloïdes [58], des carcinomes cystiques adénoïdes [59], des hémangiomes infantiles [60], des cancers des ovaires [61] et des cancers de la vessie. [62] (Table 1).

	NRP1	NRP2	Références
Tumeurs cérébrales			
Astrocytomes	x	ND	Ding H et al, 2000 [63]
Gliomes	x	ND	Osada H et al, 2004[61]
	x	x	Rieger J et al, 2003[50]
Neuroblastomes	x	x	Fakhari M et al, 2002 [51]
Glioblastomes	x	ND	Broholm H et al, 2004 [64]
Tumeurs hypophysaires	x	ND	Onofri C et al, 2006 [65]
Cancers digestifs			
Tumeurs endocrines pancréatiques	ND	x	Cohen T et al, 2002 [54]
Adénocarcinomes pancréatiques	x	x	Fukahi K et al, 2004 [55]
	x	ND	Parikh AA et al, 2003 [66]
	x	x	Li M et al, 2004 [56]
	x	ND	Feurino LW et al, 2007 [67]
	x	x	Dallas NA et al, 2008 [53]
Cancer gastrique	x	ND	Akagi M et al, 2003[68]
	x	ND	Hansel DE et al, 2004 [69]
Cancer du colon	x	ND	Parikh AA et al, 2004 [70]
	x	ND	Ochiumi T et al, 2006 [71]
	ND	x	Gray MJ et al, 2008 [52]
Leucémies			
Leucémies aiguës myéloïdes (LAM)	x	ND	Kreuter M et al, 2006 [72]
	x	ND	Kreuter M et al, 2007 [73]
	x	x	Vales A et al, 2007 [58]
	x	ND	Lu L et al, 2008 [74]
Leucémies chroniques B	x	ND	Nowakowski GS et al, 2008[75]
Autres tumeurs solides			
Cancer du sein	x	ND	Stephenson JM et al, 2002 [76]
	x	ND	Ghosh M et al, 2008 [77]
Cancer du poumon non à petites cellules	x	x	Kawakami T et al, 2002 [48]
	x	x	Lantuejoul S et al, 2003[78]
Cancer du poumon	x	x	Tomizawa et al, 2001 [49]
Mélanome	x	x	Lacal PM et al, 2000 [47]
	x	ND	Straume O et al, 2003 [79]

Cancer de la prostate	x	ND	Latil A et al, 2000 [80]
	x	ND	Vanveldhuizen PJ et al, 2003 [81]
Carcinome laryngé et papillome	x	ND	Zhang S et al, 2006 [82]
Carcinome cystique adénoïde	ND	x	Cai Y et al, 2010 [59]
Hémangiome infantile	ND	x	Calicchio ML et al, 2009 [60]
Carcinome ovarien	x	ND	Hall GH et al, 2005 [83]
	x	x	Osada R et al, 2006 [61]
	x	ND	Baba T et al, 2007 [84]
Cancer de la vessie	ND	x	Sanchez Carbayo M et al, 2003 [62]
Osteosarcome	ND	x	Handa et al, 2000 [46]

Table 1 : Expression des NRPs dans différents cancers. (ND : non déterminé)

1.2.4 Régulation de l'expression des NRPs

Cytokines et facteurs de croissance

L'expression de la NRP1 est augmentée par l'hypoxie dans de nombreux modèles [85-87] et par l'ischémie chez le rat [88] et la souris [89]. De plus, de nombreux facteurs de croissance et cytokines inflammatoires semblent réguler leur expression. Dans les cancers pancréatiques, l'interleukine 6 (IL6) augmente l'expression de la NRP1 [67] tandis que l'interleukine 8 (IL8) augmente l'expression de la NRP2 via l'activation de la voie ERK1/2 (Extracellular signal-regulated kinases 1/2). [90] Le facteur de nécrose tumorale α (TNF α) augmente l'expression du récepteur de type 2 du VEGF (VEGFR2) et de la NRP1 dans des cellules endothéliales humaines [91]. Tandis que le TGF β 1 et l'interleukine-1 β (IL-1 β) inhibent l'expression de NRP1, elles stimulent l'expression de la NRP2 dans des cellules tubulaires proximales via l'activation de la voie MEK1/2-ERK1/2. L'oncostatine M active quant à elle l'expression des deux NRPs. [92]

Eléments de liaison des facteurs de transcription sur le promoteur du gène NRP2

Des logiciels tels que *Champion ChiP Transcription Factor Search Portal* de SA Biosciences (<http://www.sabiosciences.com/chipqpcrsearch.php?app=TFBS>) ou encore *MatInspector* de Genomix (<http://www.genomatix.de/>) permettent l'identification de sites de liaison de facteurs de transcription (FT) au niveau des promoteurs des gènes. Grâce à ces deux logiciels, il est donc possible de prédire la liaison de facteurs de transcription sur le promoteur du gène de la NRP2. Ainsi, parmi les facteurs de transcription les plus susceptibles de venir se fixer sur le promoteur du gène de la NRP2, citons :

- des facteurs de transcription impliqués dans l'invasion et la TEM (Transition Epithélio-Mésenchymateuse), comme Brachyurie, Gli et Ets-1.

-HIF-1 (Hypoxia Inducible Factor), un facteur de transcription activé par l'hypoxie.

-c-myc, un oncogène impliqué dans les mécanismes de prolifération, de différenciation cellulaire et d'apoptose.

Le promoteur du gène de la NRP2 est donc la cible de nombreux facteurs de transcription impliqués dans la progression tumorale et la TEM, suggérant ainsi que la NRP2 serait une protéine fortement exprimée au cours de l'oncogénèse et de la TEM.

1.3 Fonctions oncogéniques des NRPs

En raison d'un court domaine intracytoplasmique de 40 acides aminés dénué de toute activité tyrosine-kinase, les NRPs ont longtemps paru incapables de transmettre un signal biologique propre. Leur interaction avec d'autres récepteurs membranaires semblait donc indispensable pour la transmission de signaux biologiques. Cependant, dans une étude de 2003, Wang et ses collaborateurs construisent un récepteur chimérique, EGNP-1, composé du domaine

extracellulaire du récepteur du facteur de croissance épidermique fusionné aux domaines transmembranaire et intracellulaire de la NRP1. [93] Les cellules HUVEC (cellules humaines endothéliales du cordon ombilical) transfectées par ce récepteur chimérique pouvaient alors médier la migration induite par le facteur de croissance épidermique (EGF), suggérant ainsi que la portion intra-cytoplasmique de la NRP1 n'était pas dénuée de fonction. [93] En effet, la délétion d'un acide aminé au niveau des 3 derniers acides aminés SEA de la NRP1 empêche la transmission du signal, suggérant ainsi que ces trois derniers acides aminés sont essentiels pour la signalisation de la NRP1. [93] La NRP2 possédant une portion intra-cytoplasmique proche de la NRP1 et les mêmes trois acides aminés SEA en position C-terminale, elle pourrait également posséder les mêmes propriétés.

1.3.1 Interactions NRPs/plexines/sémaphorines

Les sémaphorines (Séma, aussi appelées collapsines) sont réparties en 8 classes, en fonction de leur structure. Les sémaphorines de la classe 1 et 2 sont des sémaphorines retrouvées chez les invertébrés, tandis que les sémaphorines des classes 3 à 7 sont des sémaphorines retrouvées chez les vertébrés. [94] Les sémaphorines sont toutes caractérisées par un domaine « Séma » constitué de 7 hélices alpha, semblable au domaine extra-cellulaire des intégrines [95], par un domaine N-terminal nécessaire à leur fonction et par un domaine basique C-terminal. [96] D'autres domaines peuvent également être présents dans leur structure, comme un domaine plexine/semaphorine/intégrine (PSI), un domaine « Immunoglobine-like » ou encore un domaine thrombospondine. [96] Les sémaphorines de la classe 3 sont des sémaphorines secrétées et sont caractérisées par un domaine fortement basique en C-terminal. Deux types de récepteurs pour les sémaphorines ont été décrits à ce jour: les NRPs et les plexines. Les sémaphorines membranaires peuvent directement se lier aux plexines, tandis

que les sémaphorines secrétées de la classe-3 nécessitent la présence de NRPs pour médier leur signal. [94]

Les plexines ont été les premiers co-récepteurs identifiés des NRPs. Bien que jouant un rôle important dans la guidance axonale en formant des complexes avec les NRPs [97-99], les plexines furent rapidement identifiées au sein de divers tissus tumoraux, suggérant ainsi qu'elles pourraient également jouer un rôle dans la progression tumorale. [50,100] La famille des plexines comprend neuf membres connus à ce jour, répartis en 4 types : 4 plexines de type A, 3 plexines de type B, la plexine C1 et la plexine D1. Le domaine extracellulaire de toutes les plexines se compose d'un domaine Séma, d'un domaine PSI et de motifs riches en glycine et proline. Les NRPs et les plexines de type B possèdent toutes deux dans leur domaine C-terminal un site de liaison pour les domaines PDZ. [34,101,102] La protéine GIPC (GAIP interacting protein, C terminus) peut venir se fixer sur les NRPs ou sur les plexines à ce niveau via son domaine PDZ, activant à son tour des protéines Rho-like GTPases, telles que Rnd1 pour la plexine A1 et Rac1 pour la plexine B1. [34,103-105] (Figure 4)

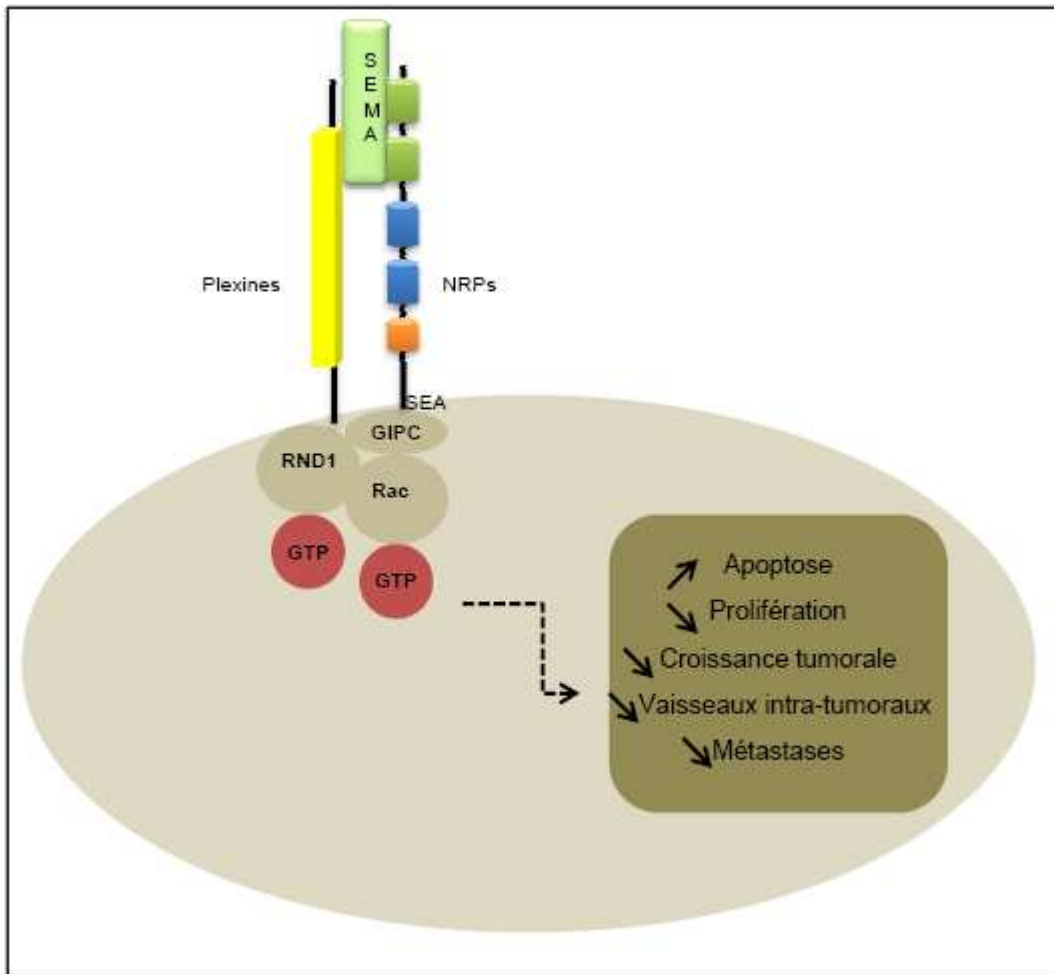


Figure 4 : Interactions NRPs/sémaphorines/plexines. En réponse à la liaison des sémaphorines, les NRPs interagissent avec les plexines permettant ainsi l'activation intracellulaire de petites protéines G, telles que Rnd1 et Rac1 et la médiation de signaux biologiques.

En outre, les sémaphorines sont très souvent peu exprimées ou mutées dans de nombreux cancers, permettant ainsi des interactions massives VEGF/NRPs. Les sémaphorines sont fréquemment inactivées par perte d'allèle ou méthylation de leur promoteur. En effet, dans de nombreux cancers, comme le cancer du poumon et le cancer ovarien, des délétions géniques sont fréquemment observées dans la région 3p21.3, une région codant pour les sémaphorines 3B et 3F (Sema3B et Sema3F). [106-108] Dans les cancers du poumon et du sein, une hyperméthylation du promoteur de ces sémaphorines et de nombreuses mutations peuvent également avoir lieu [49,109-112]. Dans le contexte des cancers, les sémaphorines semblent plutôt induire des signaux biologiques s'opposant à la progression tumorale, et ont été considérées pour cela plutôt comme des gènes suppresseurs de tumeurs (GST). Les sémaphorines semblent en effet capables de ralentir la prolifération cellulaire, l'angiogénèse tumorale, la formation de métastases et même d'induire l'apoptose de cellules cancéreuses. (Table 2)

Sémaphorine 3A

Dans une lignée de progéniteurs neuronaux, la sémaphorine 3A (Sema3A) semble médier la répulsion axonale et même induire la mort cellulaire via son interaction avec la NRP1. [113] Par ailleurs, l'ajout de Sema3A dans le milieu de culture de cellules HUVEC en présence de VEGF₁₆₅ entraîne une apoptose cellulaire in vitro. [114] La NRP1 semble également impliquée dans cette apoptose médiée par la Sema3A. [114] De plus, la Sema3A a été directement impliquée dans l'apoptose médiée par Fas dans une étude plus récente. Dans cette étude, la stimulation de lymphocytes T leucémiques par la Sema3A entraîne la localisation de Fas dans les radeaux lipidiques et rend sensible ces cellules T à l'apoptose médiée par Fas-Ligand (FasL). [115] Kigel *et al* transfectent des cellules de cancer de sein exprimant soit NRP1 ou NRP2 avec différentes sémaphorines pour analyser leur rôle dans la progression tumorale dans des expériences de xéno greffes murines. [116] La surexpression de Sema3A,

sema3D, sema3E et sema3G dans ces cellules de cancer du sein inhibe significativement le développement de tumeurs dans des expériences de xénogreffes murines et diminue le nombre de vaisseaux intra-tumoraux, suggérant un rôle anti-angiogénique de ces molécules. [116] Dans cette étude, l'effet anti-tumoral de chaque sémaphorine corrèle très bien avec l'expression du récepteur correspondant sur les cellules tumorales. [116] De plus, dans une étude assez récente utilisant plusieurs modèles murins, Maione *et al* montrent que l'inhibition de l'expression de la Sema3A dans les derniers stades de la tumorigénèse entraîne une angiogénèse importante et une progression tumorale. Au contraire, la restauration de l'expression de Sema3A dans ces cellules normalise le réseau vasculaire, indiquant ainsi que la Sema3A pourrait être utilisée en tant que traitement anti-angiogénique. [117]

Sémaphorine 3B

Dans des cellules de cancer du poumon et de cancer des ovaires, la sémaphorine 3B (Sema3B) semble diminuer la formation de colonies, la prolifération cellulaire et même induire l'apoptose des cellules cancéreuses *in vitro*. [49,118] De la même façon, la Sema3B induit l'apoptose de cellules de cancer du poumon, en bloquant la liaison du VEGF aux NRPs. [119,120] Une autre étude suggère cependant un rôle opposé de cette Sema3B. Rolny *et al*, montrent au contraire que l'interaction de la Sema3B avec la NRP1 induit une forte sécrétion d'IL8 dans les cellules tumorales, entraînant une forte activation des monocytes et des macrophages, une forte invasion cellulaire et la formation de métastases. [121] Lorsque l'expression de la Sema3B est inhibée par interférence de l'ARN et l'IL8 bloquée par un anticorps neutralisant, une diminution de l'invasion et des métastases est observée dans ces mêmes expériences de xénogreffes murines.[121]

Sémaphorine 3F

La première étude suggérant un rôle potentiel de la sémaphorine 3F (Sema3F) dans la migration et l'invasion cellulaire dans des cellules de cancer du poumon a été réalisée par Brambilla *et al.* [122] Depuis, plusieurs études ont reporté un rôle pro-apoptotique de la Sema3F dans des expériences de xénogreffes murines. En effet, l'expression de Sema3F dans la lignée murine de fibrosarcome A9 et dans la lignée ovarienne HEY inhibe la croissance tumorale dans les souris Nude, tandis qu'aucun effet n'est observé dans la lignée de cancer du poumon GLC45. [123]. De plus, dans des expériences de xénogreffes, l'injection à des rats Nude de cellules de cancer du poumon sur-exprimant la Sema3F, augmente la survie de ces animaux. [124] La Sema3F possède également un rôle anti-angiogénique. Dans des expériences de xénogreffes murines, l'implantation de cellules tumorales sur-exprimant la Sema3F est à l'origine de tumeurs plus petites et moins vascularisées. [125] La Sema3F et le VEGF semblent en effet posséder des activités opposées. Dans des cellules de mélanome hautement métastatiques, la Sema3F inhibe complètement la formation de métastases *in vivo* et diminue le nombre de vaisseaux intra-tumoraux, suggérant que la Sema3F représenterait une molécule extrêmement intéressante dans la recherche de nouveaux traitements anti-angiogéniques et anti-métastatiques. [126,127]

Sémaphorine 3E

Bien que la plupart des sémaphorines de la classe 3 sont actuellement plutôt considérées comme des gènes suppresseurs de tumeurs, certaines possèderaient un rôle totalement opposé. En effet la sémaphorine 3E (Sema3E) semble augmenter la croissance tumorale et la formation de métastases *in vitro* et *in vivo* dans des expériences de xénogreffes murines avec des cellules de cancer du sein. [128]

Sémaphorines	Cellules	Activité	Références
Sema3A	Progéniteurs neuronaux	Répulsion et mort cellulaire	Bagnard D, 2001 [113]
	Cellules endothéliales	Induction de l'apoptose	Guttmann-Raviv N, 2007 [114]
	Cellules T leucémiques	Relocalisation de Fas dans les lipides Rafts	Moretti S, 2008 [115]
	Cellules de cancer du sein	Inhibition de la croissance tumorale et de la vascularisation intra-tumorale	Kigel B, 2008 [116]
	Cellules de cancer du sein	Inhibition de la migration cellulaire et augmentation de l'expression de l'intégrine alpha2beta1	Pan H, 2009 [129]
	Cellules murines de cancer du pancréas	Inhibition de la croissance tumorale et de la vascularisation intra-tumorale	Maione F, 2009 [117]
	Cellules murines de carcinome mammaire	Inhibition de la croissance tumorale, de la vascularisation intra-tumorale et des métastases	Casazza A, 2011 [130]
Sema3B	Cellules de cancer du poumon	Inhibition de la croissance tumorale et induction de l'apoptose	Tomizawa, 2001 [49]
	Cellules d'adénocarcinome ovarien	Diminution de la croissance tumorale dans des xénogreffes, diminution de la formation de colonies et de la prolifération cellulaire	Tse C, 2002 [118]
	Cellules de cancer du poumon et du sein	Induction de l'apoptose	Castro-Rivera E, 2004, 2008 [119,120]
	Cellules de cancer du sein	L'interaction NRP1-sema3B augmente la sécrétion d'IL8 dans les tumeurs, augmentant l'invasion et la formation de métastases.	Rolny C, 2008 [121]
Sema3D	Cellules de cancer du sein	Inhibition de la progression tumorale	Kigel B, 2008 [116]
Sema3E	Cellules de cancer du sein	Augmentation de la progression tumorale	Christensen C, 2005 [128]
Sema3F	Cellules de cancer du poumon	Rôle dans la motilité et l'adhérence cellulaire	Brambilla E, 2000 [122]
	Cellules de cancer du poumon et d'adénocarcinome ovarien	Diminution de la tumorigénécité dans des xénogreffes, induction de l'apoptose	Xiang R, 2002 [123]
	Cellules de cancer du sein	Inhibition de la migration cellulaire	Nasarre P, 2003 [131]
	Cellules endothéliales, cellules de cancer du rein	Inhibition de la prolifération cellulaire, inhibition de l'angiogénèse in vivo	Kessler O, 2004 [125]
	Mélanômes	Inhibition de la formation de métastases, de la vascularisation intra-tumorale et induction d'apoptose in vivo	Bielenberg BR, 2004 [126]
	Cellules de cancer du sein	Induction de la répulsion cellulaire, inhibition des contacts cellulaires et de la prolifération.	Nasarre P, 2005 [132]
	Cellules de cancer du poumon	Augmentation de la survie dans des xénogreffes	Kusy S, 2005 [124]
	Mélanômes	Inhibition de la prolifération cellulaire	Chabbert-de Ponnat I, 2006 [127]
	Cellules de cancer du sein et mélanômes	Inhibition de la progression tumorale in vivo	Kigel B, 2008 [116]

Table 2 : Fonctions biologiques des sémaphorines de la classe 3.

1.3.2 Interaction des NRPs avec des récepteurs de facteurs de croissance (Table 3, Figure 5)

VEGFRs

L'étude des voies de signalisation des NRPs dans le contexte de l'angiogénèse tumorale a rapidement suggéré que les NRPs pouvaient interagir avec les récepteurs du VEGF, VEGFR1 (Récepteur de type 1 du VEGF) et VEGFR2 (Récepteur de type 2 du VEGF). Selon Soker *et al*, la coexpression de NRP1 et de VEGFR2 dans des cellules endothéliales de porc permet d'augmenter au moins 4 fois la liaison du VEGF sur le récepteur VEGFR2. [28] Peu de temps après, des analyses Biacore confirment l'interaction entre la NRP1 et les 2 récepteurs pour le VEGF, VEGFR1 et VEGFR2 [26]. Des résultats similaires ont été obtenus pour la NRP2. [133] La NRP2 augmente la phosphorylation du VEGFR1 et active de multiples voies de signalisation, telles les voies ERK ou PI3K (Phospho-inositide 3 Kinase) dans des cellules de cancer colorectal et d'adénocarcinome pancréatique. [52,53] Tandis que l'implication de la NRP1 dans l'angiogénèse est à présent plutôt évidente, la NRP2 semble quant à elle être plutôt impliquée dans la régulation de la lymphangiogénèse et de la formation de métastases. En effet, les souris possédant un gène muté pour NRP2 possèdent un réseau vasculaire lymphatique anormal, suggérant ainsi un rôle essentiel de la NRP2 dans la formation de ces vaisseaux. [15] Karpänen *et al* confirment ensuite que la NRP2 contribue à la lymphangiogénèse et à la formation des métastases via des interactions avec le VEGF-C, VEGF-D et les récepteurs VEGFR3. [27] De plus, la neutralisation de la NRP2 par un anticorps monoclonal (anti-NRP2^B) diminue la migration de cellules lymphatiques endothéliales induite par le VEGF-C in vitro et diminue la lymphangiogénèse et la formation de métastases in vivo dans des expériences de xéno greffes murines. [134] Enfin, les souris hétérozygotes *nrp2*^{+/-}*vegfr2*^{+/-} possèdent un réseau lymphatique normal contrairement aux

souris hétérozygotes *nrp2*^{+/-}*vegfr3*^{+/-} suggérant ainsi une interaction entre NRP2 et VEGFR3 lors de la lymphangiogenèse embryonnaire. [135]

Intégrines

Les intégrines jouent un rôle important dans l'adhésion cellulaire, la migration, l'invasion et l'angiogenèse. De nombreuses intégrines semblent impliquées dans la progression tumorale. En effet, Fukasawa et ses collègues ont montré que la NRP1 interagissait avec l'intégrine $\beta 1$ dans des cellules de cancer pancréatique et pouvait par ce moyen moduler la croissance tumorale, la survie et l'invasion cellulaire. [136] La NRP1 semble pouvoir également coopérer avec l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dans des cellules endothéliales et réguler ainsi l'angiogenèse. [137]. Dans des cellules tumorales pulmonaires, l'effet anti-tumoral de la Sema3F s'accompagne de la perte de l'intégrine $\alpha 5\beta 3$. Les intégrines peuvent cependant posséder une fonction opposée. Le traitement par Sema3A de cellules de cancer du sein augmente l'expression de l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ et ralentit la migration cellulaire de ces cellules. [129] Par ailleurs dans des cellules endothéliales, l'intégrine $\beta 3$ peut inhiber l'angiogenèse médiée par le VEGF en séquestrant NRP1 et en prévenant son interaction avec le VEGFR2.[138]

c-met

Les facteurs de croissance FGF and HGF sont également des ligands pour les NRPs et peuvent aussi contribuer à l'angiogenèse médiée par les NRPs. En effet, la NRP1 potentialise la prolifération dépendante du FGF2 et de l'HGF, respectivement dans des cellules HUVEC, des cellules de gliomes, et des cellules de cancer du pancréas. [30,139,140]. Les NRPs sont un récepteur pour le HGF mais peuvent aussi augmenter la phosphorylation du récepteur c-met. [140] Sulpice et al confirment en 2008 que les deux NRPs sont impliquées dans l'angiogenèse médiée par le VEGF et l'HGF dans des cellules endothéliales via l'activation autocrine de la voie HGF/SF/c-Met. [31] Les NRPs via leur coopération avec le récepteur c-

met génèrent l'activation de nombreuses voies impliquées dans la prolifération cellulaire, telles que p38-MAPK (P38 mitogen-activated protein kinases), ERK, src, PI3K. [31,139,140]

TGFRs (Récepteurs pour le TGF β 1)

La NRP1 est un récepteur pour la forme active du TGF β 1 et pour le TGF β 1-LAP (Facteur Transformant β 1-peptide associé à la latence). [141] Depuis, d'autres études ont confirmé que la NRP1 pouvait participer activement à la voie de signalisation du TGF β 1. En effet, Glinka et *al* ont montré très récemment que la NRP1 pouvait s'associer avec les récepteurs de type 1 et de type 2 du TGF β 1 (TGFRI et TGFRII) et augmentait ainsi l'activation de la voie de signalisation du TGF β 1 dans des cellules tumorales. [142] La NRP1 peut également induire une cirrhose en augmentant les voies PDGF (Facteur de croissance plaquettaire) /TGF β 1 dans des hépatocytes humains et peut donner un phénotype myofibroblastique à ces cellules. [143] D'une façon similaire Cao Y et *al* confirment que la NRP1 suractive la voie du TGF β 1 en augmentant la phosphorylation des smad2/3 et induit un phénotype myofibroblastique dans des fibroblastes. [144]. Il a été montré récemment que la NRP1 induisait une relocalisation de Snail dans le noyau et induisait alors une TEM dans des cellules de cancer de la prostate. [145] La TEM est décrite comme un des mécanismes primordiaux de l'oncogénèse, permettant la progression tumorale et la formation de métastases. Cette TEM se caractérise par une perte d'expression des marqueurs épithéliaux au profit de l'acquisition de marqueurs mésenchymateux. La TEM participe notamment à la migration cellulaire, l'invasion cellulaire et la formation des métastases. [146]

Complexes	Cellules	Activité	Références
NRP/VEGFR1	Analyses Biacore	NRP1 coopère avec VEGFR1 et VEGFR2	Fuh et al, 2000[26]
	Cellules endothéliales d'aorte de pors (PAE)	NRP2 co-immunoprecipite avec VEGFR1	Gluzman-Poltorak et al, 2001 [133]
	Cellules de cancer colorectal	NRP2 augmente la phosphorylation du VEGFR1, la migration, l'invasion de cellules tumorales via l'activation des voies PI3K et ERK. La diminution de l'expression de NRP2 par sh-RNA diminue la croissance tumorale, la formation de métastases dans des expériences de xénogreffes murines.	Gray et al, 2008 [52]
	Cellules d'adénocarcinôme pancréatique	NRP2 augmente la phosphorylation du VEGFR1, la migration, l'invasion de cellules tumorales via l'activation des voies PI3K et ERK. La diminution de l'expression de NRP2 par sh-RNA diminue la croissance tumorale, la formation de métastases dans des expériences de xénogreffes murines.	Dallas et al, 2008 [53]
NRP/VEGFR2	Cellules endothéliales d'aorte de pors (PAE)	NRP1 augmente la fixation du VEGF sur VEGFR2	Soker et al, 1998 [28]
	Analyse Biacore	NRP1 interagit avec VEGFR1 et VEGFR2	Fuh et al, 2000 [26]
	293T, PAE, cellules endothéliales microvasculaires	NRP2 interagit avec VEGFR2 and VEGFR3 et augmente leur activation. La surexpression de NRP2 augmente la survie et la migration dépendante du VEGF-A et du VEGF-C, de cellules endothéliales humaines.	Favier et al, 2006 [147]
	Cellules endothéliales lymphatiques	NRP2 interagit avec VEGFR2 and VEGFR3 et augmente leur activation	Caunt et al, 2008 [134]
NRP/VEGFR3	Cellules endothéliales lymphatiques et 293T transfectées	NRP2 co-immunoprécipite avec VEGFR3	Karpänen et al, 2006 [27]
	293T, PAE, cellules endothéliales microvasculaires	NRP2 interagit avec VEGFR2 and VEGFR3 et augmente leur activation. La surexpression de NRP2 augmente la survie et la migration dépendante du VEGF-A et du VEGF-C, de cellules endothéliales humaines.	Favier et al, 2006 [147]
	Cellules endothéliales lymphatiques	NRP2 interagit avec VEGFR2 and VEGFR3 et augmente leur activation	Caunt et al, 2008 [134]
NRP/c-met	HUVEC	HGF se fixe sur NRP1 et NRP2 et augmente la phosphorylation du récepteur c-met et la migration cellulaire via l'activation de la voie ERK.	Sulpice et al, 2008 [31]
	Cellules de gliome	La NRP1 augmente la progression des gliomes via son interaction avec les voies de signalisation HGF/SF et ERK.	Hu B et al, 2007 [139]
	Cellules de cancer du pancréas	NRP1 interagit avec c-met, augmente l'invasion via l'activation des voies p38-MAPK et ERK.	Matsushita et al, 2007 [140]
NRP/TGFR	Fibroblastes	NRP1 augmente la phosphorylation des Smads 2/3 et induit un phénotype myofibroblastique	Cao et al, 2010 [144]
	Cellules de cancer du sein	La NRP1 et NRP2 coopèrent avec TGFRI et TGFRII et augmentent la phosphorylation des Smad2/3.	Glinka et al, 2010 [148]
	Cellules de cancer colorectal, Analyses biacore	La NRP2 interagit avec TGFRI et augmente la phosphorylation de Smad2/3. La NRP2 induit une Transition épithélio-mésenchymateuse dépendante du TGFβ1. La NRP2 est un récepteur pour ce facteur de croissance.	Grandclement et al, 2010 [149]

Table 3 : Fonctions biologiques des NRPs via leur interaction avec des récepteurs de facteur de croissance.

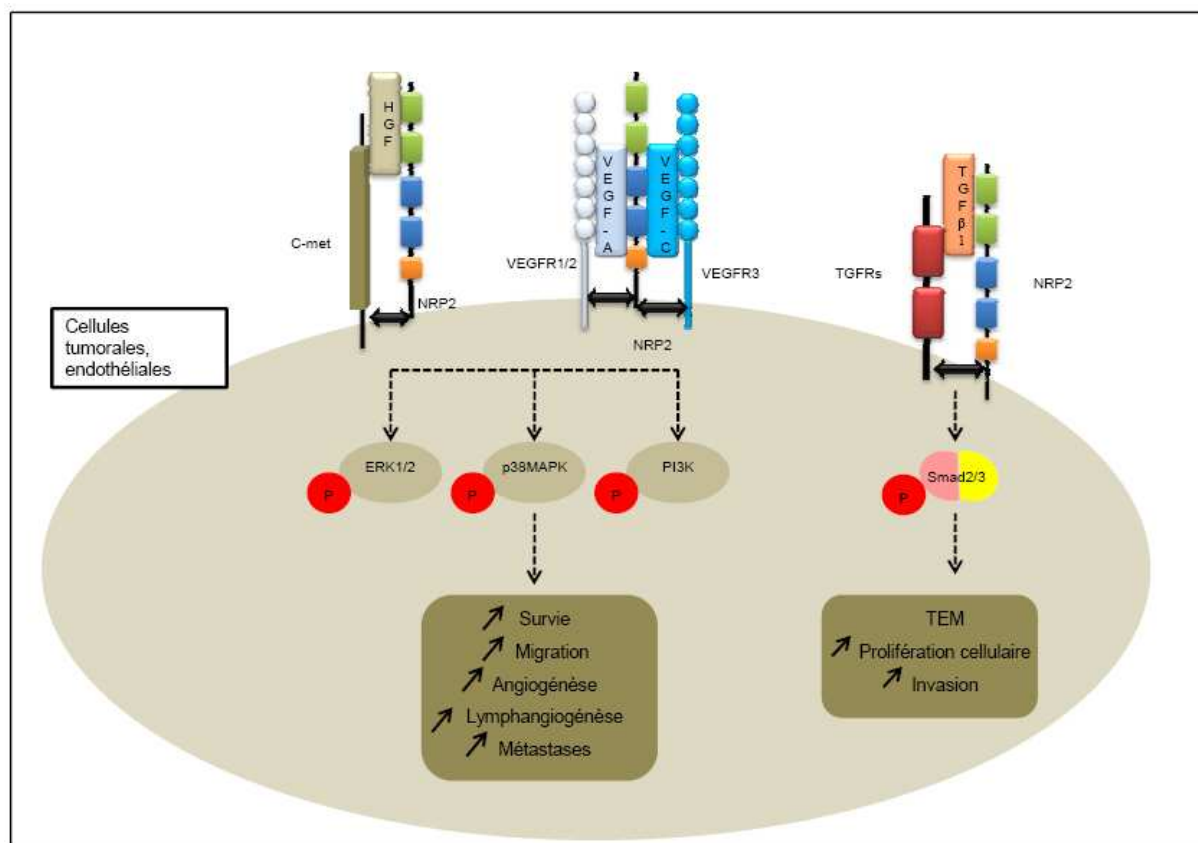


Figure 5 : Coopération de la NRP2 avec différents récepteurs aux facteurs de croissance.

1.4 La NRP2 : un biomarqueur diagnostique et pronostique

La NRP2 étant activement impliquée dans les processus d'angiogénèse, de lymphangiogénèse et de formation de métastases, il est rapidement apparu que la détection de la NRP2 pouvait constituer un nouvel outil diagnostique et pronostique.

L'expression de la NRP2 est en effet corrélée à une augmentation de la vascularisation et à un mauvais pronostic dans l'ostéosarcome [46], dans le cancer du poumon non à petites cellules, [48] et dans les carcinomes kystiques adénoïdes. [61] Dans le cancer du sein, l'expression de la NRP2 est corrélée significativement aux métastases ganglionnaires, à l'expression du VEGF-C et à l'expression cytoplasmique du récepteur CXCR4 (Récepteur 4 de la chimiokine à motif CC). [57] Une forte expression de la NRP2 est également détectée dans les stades précoces et tardifs du neuroblastome. [51] De plus, la NRP2 est exprimée par

une large variété de tumeurs endocrines pancréatiques, suggérant que la NRP2 pourrait être un nouveau marqueur diagnostique pour ces tumeurs. [54] La NRP2 pourrait être également un biomarqueur pour suivre la progression du cancer de la vessie.[62]

1.5 Ciblage thérapeutique des NRPs

1.5.1 RNA interférence

L'utilisation de siRNA (petits ARN interférents) ciblant la NRP1 réduit significativement la croissance tumorale, l'angiogénèse, la formation de métastases dans de nombreux cancers humains, comme le carcinome hépatocellulaire [150,151] la leucémie aigue myéloïde [74] le cancer du poumon [152]. De même, des cellules de cancer colorectal transfectées par un shRNA (petits ARN en épingle à cheveux) ciblant spécifiquement la NRP2 induisent des tumeurs plus petites, diminuent les métastases et entraînent une apoptose dans des expériences de xéno greffes murines. [52] Le traitement par voie intrapéritonéale de souris porteuses de tumeurs avec des liposomes contenant des siRNA-NRP2 ralentit la croissance tumorale et le nombre de métastases. [52] (Figure 6)

1.5.2 Petites molécules

Comme vu précédemment, l'épissage alternatif donne lieu à de nombreux isoformes des NRPs et en particulier à des formes solubles sNRP1 and sNRP2. Ces isoformes solubles ont été tout d'abord décrits plutôt comme des molécules inhibitrices, fonctionnant comme un piège à ligands, bloquant ainsi leur interaction avec les récepteurs membranaires. Les sNRP ne possèdent pas de segment transmembranaire ni intracellulaire. Gagnon et *al* remarquent que la surexpression de sNRP1 dans des cellules de carcinomes prostatiques de rat AT2.1 et AT3.1 diminue leur prolifération et induit une apoptose précoce dans ces tumeurs. [36]

Schuch et *al* confirment ces données dans un modèle de sarcome murin avec des cellules NMuMG/VEGF et NMuMG/sNRP-1 capables de produire de grosses quantités de VEGF recombinant et sNRP1. Le traitement par le VEGF augmente la croissance tumorale et la vascularisation, tandis que le traitement par la sNRP1 semble inhiber la croissance et l'angiogénèse tumorales. De plus, dans un modèle de leucémie, la survie de souris traitées par un adénovirus codant pour un dimère de sNRP1 (Fc-sNRP-1) est augmentée par rapport à la survie de souris traitées par un adénovirus contrôle. [153] (Figure 6)

Tout comme les formes naturelles solubles des NRPs, des petits peptides solubles pourraient bloquer la fixation du VEGF sur les NRPs. Geretti et *al* ont décrit récemment un mutant du domaine B de la NRP2 (MutB-NRP2), possédant une affinité 8 fois supérieure pour le VEGF que celle du domaine B wild-type. Le traitement de souris xénotreffées avec des cellules de mélanome par ce mutant MutB-NRP2 inhibe la croissance tumorale, lorsqu'il est utilisé seul et en association avec le bevacizumab. [154] (Figure 6)

De même, le screening de bibliothèques de peptides capables de reconnaître spécifiquement certaines cellules cancéreuses a permis l'identification de séquences d'acides-aminés liant spécifiquement les NRPs. En effet, Ruoslahti et *al* reportent 2 peptides capables de pénétrer dans la tumeur et de lier spécifiquement les intégrines humaines et la NRP1. La conjugaison de ces peptides à des molécules de chimiothérapie ou à des agents de contraste pourrait améliorer l'imagerie médicale mais aussi l'activité des chimiothérapies. [155-157] Depuis, d'autres peptides liant spécifiquement la NRP1 ont été décrits dans différents modèles de cellules cancéreuses *in vitro*. [158-160]

1.5.3 Anticorps monoclonaux

Genentech a développé des anticorps monoclonaux ciblant spécifiquement la NRP1 et la NRP2. En particulier, des anticorps monoclonaux ciblant spécifiquement le domaine a1/a2 (anti-NRP1^A) ou b1/b2 (anti-NRP1^B) de NRP1 ont d'abord été générés. Ces anticorps diminuent la migration induite par le VEGF de cellules HUVEC et inhibent la formation de tumeur dans des modèles animaux. [161] Parallèlement à ces travaux, Pan et *al* montrent que l'utilisation d'anticorps monoclonaux ciblant spécifiquement la NRP1 utilisés en association avec des thérapies ciblant le VEGF ralentissait significativement la croissance tumorale dans des modèles animaux. [162] (Figure 6)

Un anticorps totalement humain anti-NRP1, le MNRP1685A est actuellement en phase-1 de développement, utilisé seul ou en association avec le bevacizumab avec ou sans paclitaxel pour le traitement de tumeurs solides avancées. [163] (Figure 6)

Des anticorps monoclonaux ciblant les domaines b1/b2 de la NRP2 ont récemment été développés. En bloquant la liaison du VEGF et/ou du VEGF-C à la NRP2, ces anticorps anti-NRP2^B diminuent le nombre de vaisseaux intra-tumoraux et de métastases dans les ganglions lymphatiques sentinelles et dans les organes distants dans des expériences de xénogreffes murines. [134]

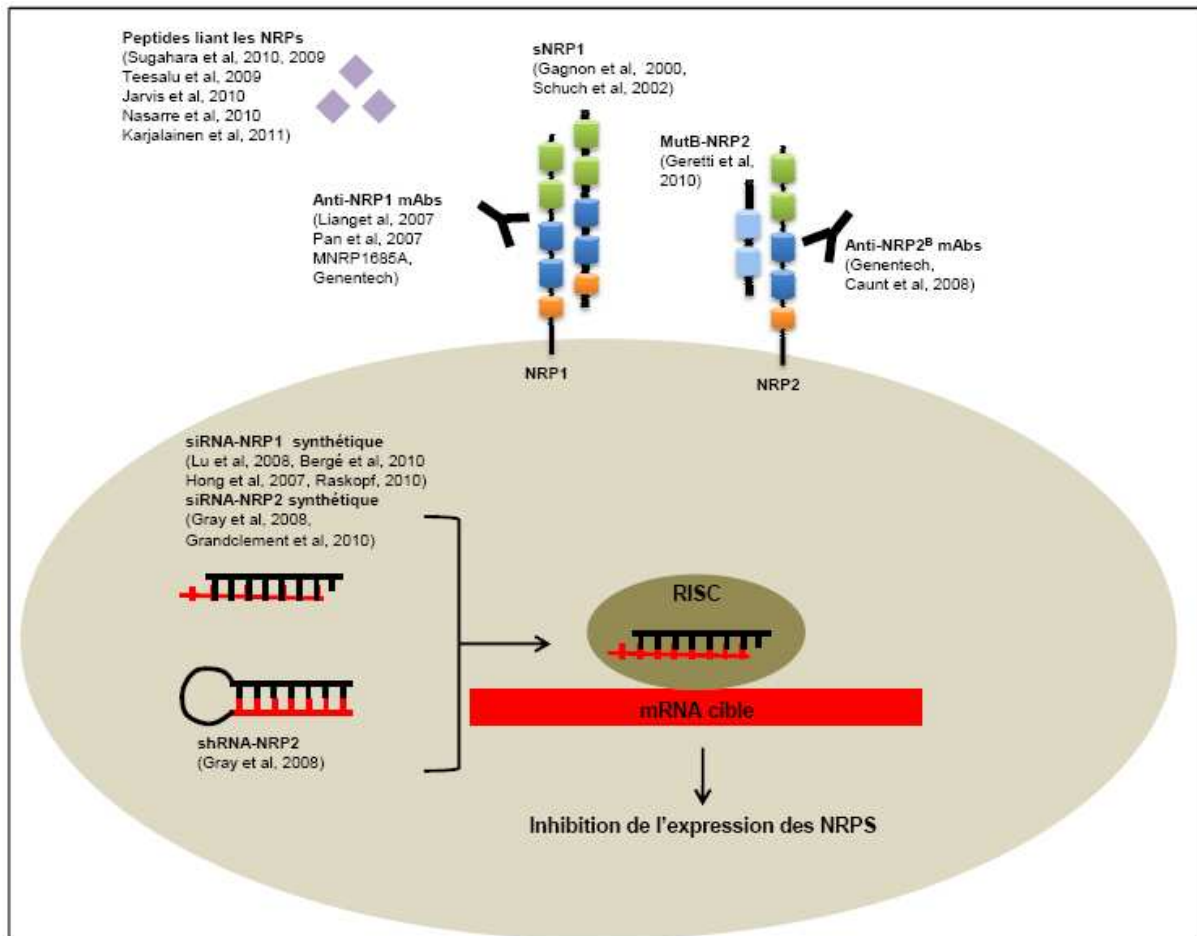


Figure 6 : Outils biotechnologiques développés pour le ciblage des NRPs. Plusieurs stratégies ont été développées pour neutraliser spécifiquement les fonctions oncogéniques des NRPs tels que: des siRNA, des peptides, des NRP solubles antagonistes, des anticorps monoclonaux.

CHAPITRE 2 : La Transition-Epithélio-Mésenchymateuse

2.1 Définitions

La TEM caractérise un processus dynamique au cours duquel les cellules perdent un nombre important de leurs caractéristiques épithéliales pour gagner des propriétés de cellules mésenchymateuses, ce qui nécessite des modifications architecturales et fonctionnelles complexes. [164] Les cellules épithéliales transformées acquièrent alors des propriétés invasives et migratoires typiques de cellules mésenchymateuses. [164]

La principale fonction de l'épithélium est de servir de barrière protectrice contre l'extérieur (la peau) et l'intérieur (les voies aériennes, le tractus gastro-intestinal). La structure et la fonction de cet épithélium sont assurées par les cellules épithéliales, intimement jointes entre elles par des structures membranaires hautement spécialisées, jonctions serrées, jonctions adhérentes ou desmosomes. L'épithélium est par ailleurs d'une grande plasticité : il est en constant renouvellement et réparation, ce qui pourrait en partie expliquer que la majorité des cancers dérive de cellules épithéliales.

Les cellules épithéliales sont caractérisées par une polarisation baso-apicale, une répartition localisée des molécules d'adhésion, une polarisation des filaments d'actine et reposent sur une lame basale. Elles sont mobiles au sein de la couche cellulaire à laquelle elles appartiennent, mais ne peuvent pas en temps normal sortir de cette couche.

Les cellules mésenchymateuses, quant à elles, ne sont pas organisées en couches, ne sont pas polarisées, ont très peu de contacts inter-cellulaires et ne reposent pas sur une lame basale. Ces cellules très mobiles ont une forme fibroblastique en culture, en forme d'aiguille « spindle-shape », tandis que les cellules épithéliales poussent en amas cellulaires et sont plutôt arrondies. Les cellules mésenchymateuses sont caractérisées par une grande plasticité

cellulaire, qui leur permet de migrer. La migration requiert en outre la sécrétion d'enzymes protéolytiques détruisant la matrice extracellulaire afin d'envahir l'interstitium.

La transition d'un phénotype cellulaire à un autre recouvre un large spectre de modifications inter- et intracellulaires rarement observées en totalité impliquant que la TEM n'est pas nécessairement un changement complet de lignage cellulaire. Dans les années 1980, Greenburg et Hey cultivent des cellules épithéliales de tissus adulte et embryonnaire in vitro sur une couche de collagène et observent des changements phénotypiques importants dans ces cellules. [165] Les cellules épithéliales cultivées sur gel de collagène s'allongent, et acquièrent des propriétés migratrices et invasives. [165]

La TEM se déroule en plusieurs étapes successives : la première étape se caractérise par une disparition des contacts inter-cellulaires entraînant la perte de marqueurs épithéliaux (E-cadherine, cytokératines) et le gain de marqueurs mésenchymateux (vimentine, N-cadhérine). Les cellules perdent leur polarisation baso-apicale, connaissent une réorganisation de leur cytosquelette d'actine médiée par des protéines Rho GTPases, se détachent de la matrice et peuvent ensuite migrer dans les tissus adjacents grâce à l'activation d'enzymes protéolytiques comme les MMP (Matrix metalloproteases). Une surexpression ou une translocation nucléaire de facteurs de transcription comme la β -caténine ou des molécules de la famille de Snail, de ZEB ou de la famille hélice-boucle-hélice (HBH) intervient également durant les différentes étapes du processus de TEM. (Figure 7)

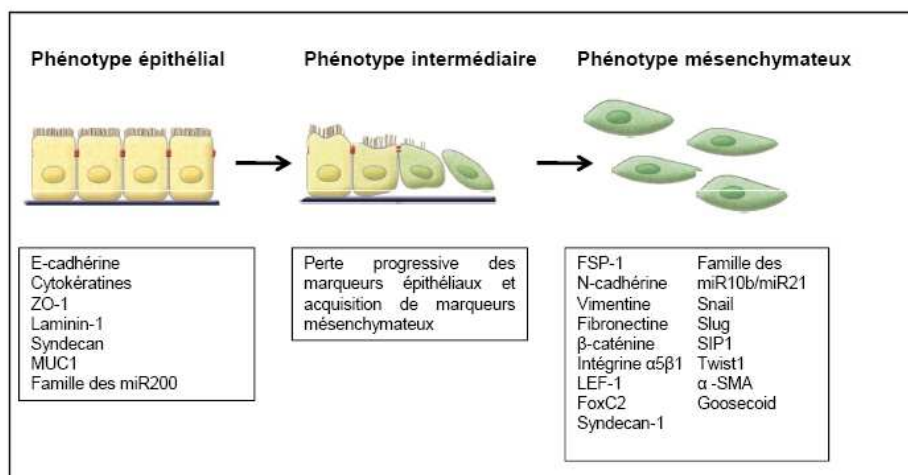


Figure 7 : La Transition Epithélio-Mésenchymateuse. La TEM consiste en la transition de cellules épithéliales polarisées en cellules mésenchymateuses mobiles, et sécrétrices de composants de la matrice extra-cellulaire (MEC) Les marqueurs épithéliaux et mésenchymateux impliqués dans cette TEM et couramment étudiés sont listés. ; Zo-1 : zonula-occludens-1, MUC1 : mucine 1, miR200 : microRNA-200, SIP1 : survival of motor neuron protein interacting protein 1, FoxC2 : forkhead box C2. D'après Kalluri et al, 2009 [164]

2.2 Classification de la TEM

Kalluri et Weinberg distinguent en 2009 dans une revue de la littérature, trois différents types de TEM, à l'origine de différentes conséquences fonctionnelles. [164] (Figure 8) Cette classification prend en compte les contextes biologiques dans lesquels se déroulent ces TEM : la TEM de « type 1 » a lieu lors de l'embryogénèse et du développement des organes et génère différents types cellulaires partageant des propriétés mésenchymateuses communes. Cette TEM de type 1 peut générer des cellules mésenchymateuses pouvant subir le processus inverse, la TME (Transition Mésenchymateuse Epithéliale) pour générer des épithéliums secondaires. La TEM associée à la cicatrisation, à la régénération tissulaire et à la fibrose des organes est quant à elle dite « du second type ». Dans cette TEM de type 2, la première étape consiste à la génération de fibroblastes et d'autres cellules associées pour reconstruire les tissus traumatisés et inflammés. Contrairement à la TEM de type 1, la TEM de type 2 est associée à l'inflammation et cesse dès que l'inflammation prend fin. Enfin, la TEM de « type 3 » se déroule dans des cellules cancéreuses qui ont subi auparavant des modifications

généétiques et épigénétiques pour certains gènes suppresseurs de tumeur et oncogènes. (Figure 8). Des cellules de carcinome ayant subi cette TEM de type 3 sont fortement invasives et métastatiques. Bien que ces 3 types de TEM représentent des processus biologiques bien différents, les mêmes changements génétiques et biochimiques sont cependant observés.

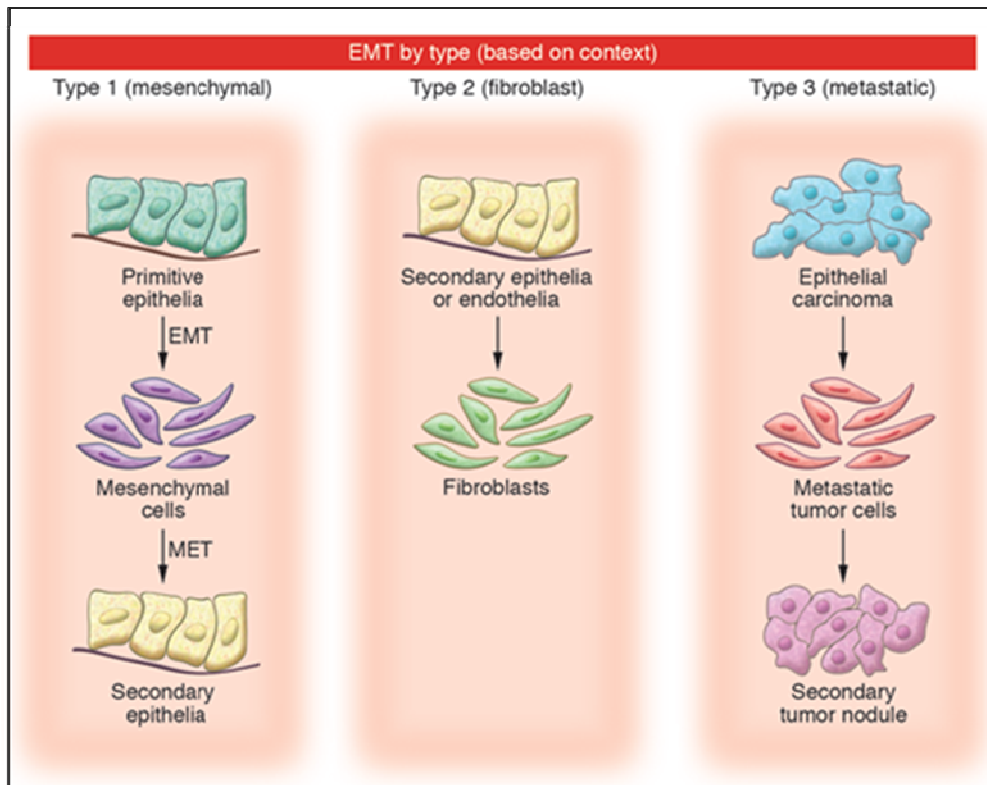


Figure 8 : Les 3 types de TEM. La TEM de type 1 a lieu lors de l'implantation de l'embryon et de la gastrulation, la TEM de type 2 lors de fibroses tissulaires et la TEM de type 3 lors de la progression tumorale et de la formation de métastases tumorales. D'après Zeisberg et al, 2009 [166]

2.3 TEM et Cancer

Les cellules cancéreuses en TEM sont retrouvées sur le front invasif des tumeurs primaires et sont considérées comme des cellules invasives pouvant former des métastases. Paradoxalement, ces cellules invasives qui forment des colonies de cellules tumorales à distance du site primaire tumoral semblent perdre assez rapidement leur phénotype mésenchymateux et retrouver leur phénotype initial épithélial, par le phénomène inverse, appelé TME (Transition Mésenchymateuse-Epithéliale). (Figure 9)

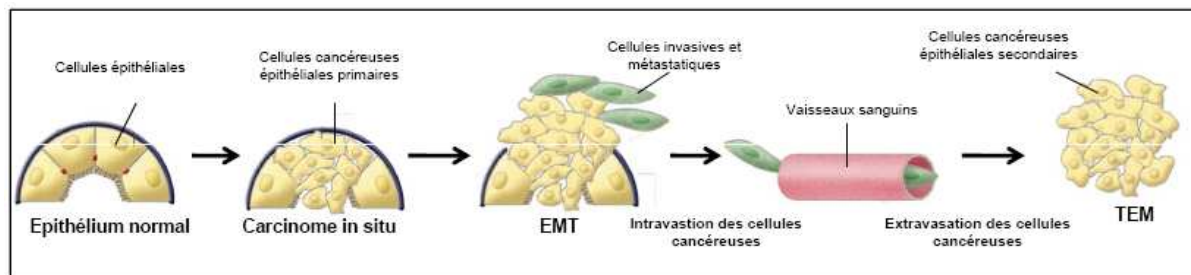


Figure 9 : TEM et progression tumorale. Le passage d'un épithélium normal à un carcinome invasif suit plusieurs étapes successives. Les cellules épithéliales perdent petit à petit leur polarisation et se détachent de la membrane basale. La composition de la membrane basale change également, tout comme les interactions cellules-membrane extra-cellulaire et les réseaux de signalisation. La TEM a ensuite lieu, de même qu'un switch angiogénique, facilitant la croissance tumorale. Les cellules cancéreuses vont ensuite entrer dans la circulation, former des micro- et macro- métastases, puis retrouver un phénotype épithélial primaire grâce à le processus de TME. (Transition Mésenchymateuse-Epithéliale). D'après Kalluri et al, 2009[164]

Le déclenchement du processus de TEM dans les cellules cancéreuses est encore assez discuté. Lors de la formation du site primaire tumoral, les cellules tumorales subissent des altérations génétiques et épigénétiques qui pourraient les rendre sensibles à des signaux issus du stroma tumoral. Dans de nombreux cas, ce sont les facteurs de croissance provenant du stroma tumoral tels que HGF, EGF, PDGF et TGF β 1 qui semblent responsables du déclenchement de la TEM en activant certains facteurs de transcription associés à la TEM, comme Snail, Slug, ZEB1 (zinc-finger E-box binding homeobox1), Twist, Goosecoïd et Forkhead box C2 (FoxC2). Une fois exprimés et activés, ces facteurs de transcription agissent de façon pléiotropique et orchestrent le processus de TEM, souvent collectivement, grâce à l'aide d'autres facteurs de transcription. Les voies de signalisation intra-cellulaires impliquées dans ce processus de TEM sont les voies ERK, MAPK, PI3K, Akt, Smads, LEF (Lymphoid Enhancer binding Factor), RhoB, β -caténine et c-Fos ainsi que les intégrines β 4, α 5 β 1 et α 5 β 6.[164]

2.4 Biomarqueurs de la TEM

Toute une variété de biomarqueurs est utilisée pour caractériser les 3 types de TEM. (Table 4)

2.4.1 Marqueurs membranaires

E-cadhérine

La perte d'expression de la E-cadhérine constitue un des événements majeurs de la TEM. La E-cadhérine est probablement la cadhérine la mieux connue. Elle consiste en 5 séquences de cadhérines dans le domaine extracellulaire, un domaine transmembranaire, et un domaine intracellulaire qui lie la β -caténine. La β -caténine se lie à l' α -caténine qui à son tour se lie aux microfilaments d'actine, ce qui relie la E-cadhérine au cytosquelette. La E-cadhérine est exprimée dans les cellules épithéliales, et son expression diminue au cours de la TEM lors du développement embryonnaire, de la fibrose et de la progression tumorale. Un changement d'expression des différentes cadhérines est souvent observé lors de la TEM : en effet, au cours de la TEM l'expression de la E-cadhérine diminue au profit de l'expression de la N-cadhérine qui est un marqueur des cellules mésenchymateuses, des fibroblastes, des cellules cancéreuses et du tissu nerveux.

Intégrines

Un changement dans l'expression de certaines intégrines est également observé lors de la TEM : dans le cancer du colon, les cellules qui ont subi la TEM de type 3 expriment de grandes quantités d'intégrine $\beta 6$. [167] Une expression augmentée de l'intégrine $\alpha 5$ corrèle avec le potentiel métastatique de la lignée B16F10 de mélanome murin et avec la TEM. [168]

2.4.2 Marqueurs du cytosquelette

FSP1/S100A4 (Fibroblast-specific protein-1)

Il s'agit d'un membre de la famille des protéines S100 dépendantes du calcium. Il est détecté lors de la TEM associée à une fibrose ou une progression tumorale.

Vimentine

La vimentine est également un marqueur de la TEM tumorale. La vimentine est un membre de la famille des filaments intermédiaires qui constitue le cytosquelette avec les microtubules et les microfilaments d'actine. Bien que la plupart des filaments intermédiaires soient des structures stables, la vimentine est une structure dynamique. Elle est responsable du maintien de la forme cellulaire, de l'intégrité du cytoplasme, et stabilise les interactions cytosquelettiques. L'expression de la vimentine est souvent corrélée à une invasion augmentée et au développement de métastases. [169]

α -SMA

α -SMA (α -Smooth Muscle Actin) est l'un des membres des 6 familles d'actine. Chez l'adulte, de grandes quantités de α -SMA sont retrouvées dans le muscle lisse vasculaire et dans les cellules myoépithéliales. Dans le contexte du cancer, l'expression d' α -SMA est corrélée avec la TEM de type 3 dans le cancer du sein principalement.[170]

β -caténine

La β -caténine est un composant des jonctions adhérentes qui lie la E-cadhérine au cytosquelette d'actine. En absence de signal Wnt, GSK-3 β (Glycogen synthase kinase-3) phosphoryle la β -caténine entraînant ainsi son ubiquitinylation puis sa dégradation, maintenant ainsi un niveau faible de cette protéine dans le cytoplasme. L'activation de la voie Wnt inhibe GSK-3 β , permettant ainsi une accumulation de β -caténine dans le cytoplasme. La

β -caténine peut alors interagir avec 2 facteurs de transcription, TCF (T cell-specific transcription factor) ou LEF1 (Lymphoid Enhancer Factor-1), entraînant alors une translocation de ce complexe au niveau du noyau et la régulation de gènes en réponse aux ligands Wnt. (Figure 10) [171,172]

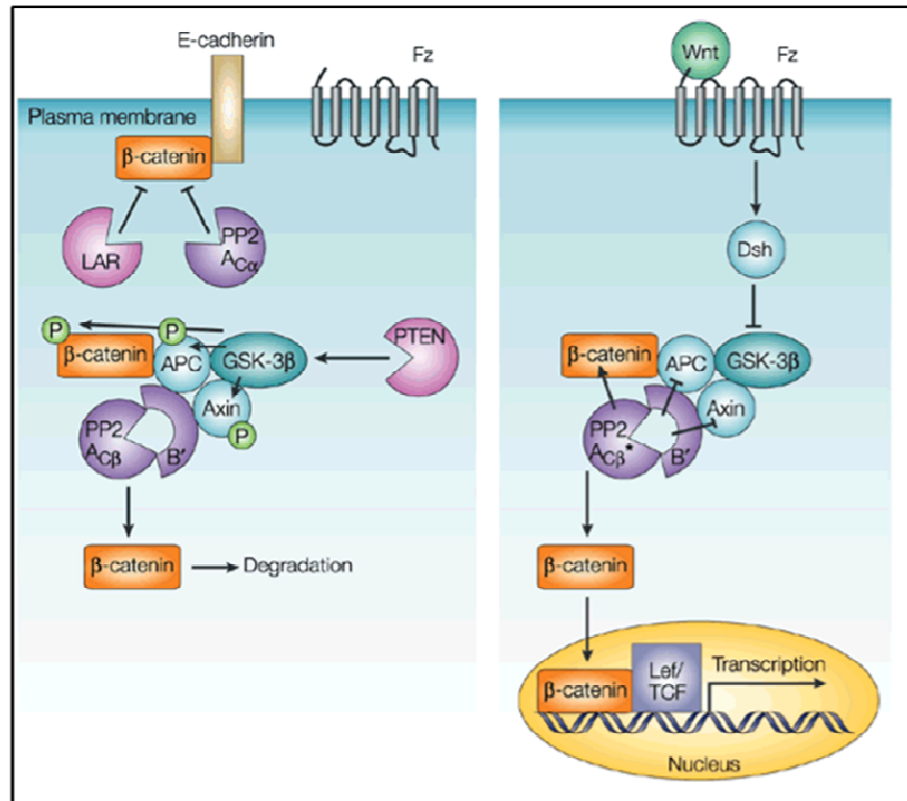


Figure 10 : Voie de signalisation Wnt. En absence de ligand Wnt (à gauche), GSK-3 β phosphoryle la β -caténine entraînant alors son ubiquitinylation puis sa dégradation. L'activation de la voie Wnt (à droite) inhibe GSK-3 β , permettant ainsi une accumulation de β -caténine dans le cytoplasme et sa translocation au niveau du noyau pour réguler l'expression de gènes. D'après Larsen et al, 2003 [173]

La β -caténine agit également comme un facteur de transcription lors de la TEM. Elle est d'ailleurs considérée comme un biomarqueur de la TEM, à la fois lors du développement embryonnaire, de la fibrose mais aussi du cancer. Lors de la TEM, plusieurs molécules peuvent en effet inhiber l'activité de GSK-3 β comme pAKT, la sérine/thréonine kinase ILK (kinase liée aux intégrines) et permettre ainsi une accumulation de β -caténine dans le

cytoplasme. [174] Associée aux facteurs de transcription TCF/LEF1, la β -caténine se transloque ensuite au niveau du noyau et active la transcription de plusieurs gènes cibles, comme c-Myc, la cycline D1, TCF-1, CD44, MMP-7. [175]

2.4.3 Protéines extra-cellulaires

Laminines

De tous les constituants principaux de la membrane basale dont l'expression est diminuée durant la TEM (collagène de type 4, laminine, proteoglycanes...), la laminine-1 est l'un des meilleurs marqueurs de la TEM. Les laminines sont des glycoprotéines hétérotrimériques composées d'une chaîne α , d'une chaîne β et d'une chaîne γ . L'expression de la laminine 5 ($\alpha3\beta3\gamma2$) est augmentée durant la TEM oncogénique de type 3 et durant la TEM de type 2 associée à une fibrose tissulaire. L'expression de la laminine 5 est corrélée à un phénotype invasif des cancers, et son expression est retrouvée dans les cancers du sein [176], les carcinomes hépatocellulaires [177], et les carcinomes oraux squameux [178].

	Marqueurs acquis	Marqueurs perdus
Protéines membranaires	N-cadhérine	E-cadhérine
	OB-cadhérine	ZO-1
	intégrine $\alpha5\beta1$	
	intégrine $\alpha5\beta6$	
	Syndecan-1	
Marqueurs du cytosquelette	FSP1	Cytokératine
	α -SMA	
	Vimentine	
	β -caténine	
Protéines de la Matrice Extra-Cellulaire	$\alpha1$ (I) collagène	$\alpha1$ (IV) collagène
	$\alpha1$ (III) collagène	Laminine 1
	Fibronectine	
	Laminine 5	
Facteurs de transcription	Snail 1 (Snail)	
	Snail 2 (Slug)	
	ZEB1	
	Complexe β -caténine/LEF1/TCF	
	Twist	
	LEF-1	
	Ets-1	
	FOXC2	
	Goosecoid	
MicroRNAs	miR10b	Famille du miR-200
	miR-21	

Table 4 : Biomarqueurs de la TEM. Adapté de Zeisberg et al, 2009 [166]

2.4.4 Facteurs de transcription

La perte d'expression de la E-cadhérine constitue l'un des événements majeurs de la TEM. De nombreuses études se sont donc intéressées à la régulation de l'expression de la E-cadhérine dans le cancer. Plusieurs répresseurs de la E-cadhérine ont été identifiés et groupés en 2 familles, en fonction de leur effet sur le promoteur de la E-cadhérine. Snail, ZEB, E47 et KLF8 (Kruppel-like factor 8) se lient et répriment l'activation du promoteur de la E-cadhérine

[179,180], tandis que les facteurs tels que Twist, Goosecoid, E2.2 et FoxC2 répriment indirectement la transcription de la E-cadhérine. [181,182] (Table 4)

Snail

Les facteurs de transcription Snail partagent une structure assez similaire, contenant un domaine C assez caractéristique en 4 à 6 doigts de zinc permettant la liaison à l'ADN. 3 protéines de cette famille ont été identifiées chez les vertébrés : Snail1 (ou Snail), Snail2 (aussi appelée Slug) et Snail3 récemment identifiée. Les facteurs de transcription Snail agissent comme des répresseurs de transcription. Snail1 est le plus important répresseur de la E-cadhérine. Cependant, il régule également d'autres aspects de la TEM, induit l'expression de marqueurs mésenchymateux (tels que la fibronectine), et la diminution de divers marqueurs épithéliaux comme les claudines, occludines et cytokératines. Snail exerce sa fonction de facteur de transcription lorsqu'il est situé dans le noyau. La phosphorylation de Snail entraîne sa migration du noyau au cytoplasme, aboutissant à son inactivation. Snail1 est induit dans tous les types de TEM et des niveaux élevés de Snail1 ont été observés dans des tumeurs très invasives.[183] Snail2 est plus largement exprimé que Snail1, et son expression est quelquefois non liée à la TEM. [184]

Facteurs de transcription hélice-boucle-hélice (HBH)

La famille des facteurs de transcription HBH est une large famille de protéines surexprimées durant l'embryogénèse [185], la fibrose tissulaire [186] et la formation de métastases cancéreuses. [187] La structure de base de ces facteurs est constituée de deux hélices α parallèles liées entre elles par une boucle pour leur dimérisation. Les facteurs HBH sont divisés en 7 catégories en fonction de leur distribution dans les tissus, de leur capacité de dimérisation et leur spécificité de liaison à l'ADN. Parmi elles, les protéines de la classe 1 E12 et E47, les protéines Twist de la classe 2 et les protéines Ids de la classe 5 sont

impliquées dans l'élaboration de la TEM. Les protéines de la classe 2 (Twist1 et Twist2) s'hétérodimérisent toujours avec les protéines de la classe 1. Une expression ectopique de Twist1 ou Twist2 diminue la E-cadhérine, l'expression d'occludine et de claudin-7, et augmente le niveau de vimentine et de N-cadhérine, favorisant ainsi la migration et l'invasion. [188]. Les protéines E12 et E47 répriment la E-cadhérine directement par leur liaison au niveau de l'E-box du promoteur. Une expression ectopique de E12 ou E47 réprime la E-cadhérine, induit l'expression de vimentine et de fibronectine et augmente la migration et l'invasion. [189] A l'inverse, les facteurs de transcription Id peuvent inhiber la répression de la E-cadhérine. [190]

FoxC2

Le facteur de transcription FoxC2 agit d'une façon pléiotropique pour réguler la TEM. FoxC2 est exprimé dans des cancers du sein. [191] La surexpression d'un seul de ces inducteurs de TEM (TGF- β , Snail, Twist ou Goosecoid) augmente l'expression de FoxC2, et la surexpression seule de FoxC2 peut induire la TEM, suggérant ainsi un rôle important de ce facteur de transcription dans la TEM de type 3. [191]

ZEB

2 facteurs de transcription ZEB ont été identifiés chez les vertébrés : ZEB1 aussi appelé δ EF1 et ZEB2, aussi appelé SIP1. Les protéines ZEB sont exprimées durant le développement dans de nombreux tissus, comme le système nerveux central, le cœur, les muscles et les cellules hématopoïétiques. Les protéines ZEB répriment l'expression d'E-cadhérine et augmentent la migration des cellules, indépendamment du facteur de transcription Snail dans les cellules épithéliales mammaires murines. [192,193] De plus, elles peuvent entraîner une relocalisation de la β -caténine.[194]

Notch

Notch semble jouer un rôle dans la TEM physiologique, lors du développement et lors de la TEM tumorale. L'activation du récepteur transmembranaire Notch par son ligand Jagged entraîne la translocation de Notch dans le noyau et l'activation de gènes cibles comme Hey1, responsable notamment de l'inhibition de la E-cadhérine et de la TEM.

Voie Sonic Hedgehog-Patched-Gli

En plus de son rôle important durant le développement, la voie de signalisation Sonic Hedgehog (SHH) contribue également à la TEM de cellules cancéreuses. Les ligands SHH se lient au récepteur membranaire Patched et l'inactivent ainsi. Le récepteur Patched a quant à lui un rôle inhibiteur sur la protéine transmembranaire Smoothened, protéine qui permet la transmission du signal intracellulaire par l'activation du facteur de transcription Gli-1. Le facteur de transcription Gli-1 régule l'expression de nombreux gènes, dont Snail. (Figure 11)

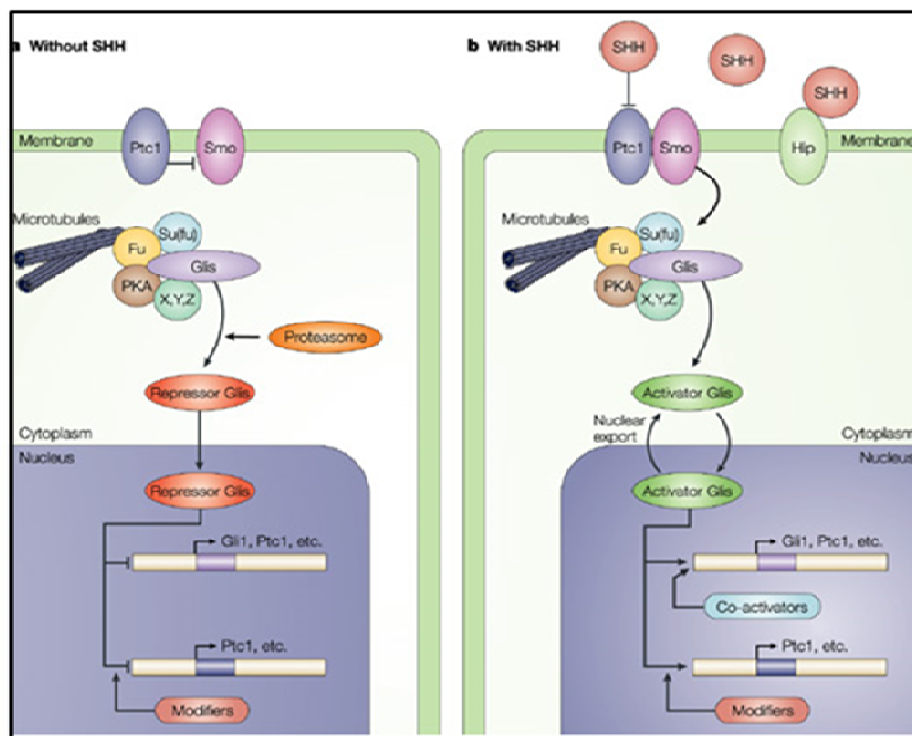


Figure 11 : La voie de signalisation SHH. En absence de ligand sonic Hedgehog (SHH), le récepteur Patched (Ptc1) inhibe la protéine Smoothened (Smo) et la transmission du signal intracellulaire. (gauche) En présence du ligand SHH, Le récepteur Patched inhibé, la protéine Smoothened peut transmettre le signal intracellulaire et donc l'activation du facteur de transcription Gli-1. (droite) D'après Altaba et al, 2002 [195]

2.4.5 micro-RNA

De récentes études ont montré un rôle des microRNA dans la régulation des facteurs de transcription associés à la TEM. En effet, la surexpression du miR-10b est associée à l'invasion et à la formation de métastases. [196] Le miR-10b est surexprimé dans les cancers du sein métastatiques et est induit par le facteur de transcription Twist. De récentes études montrent également que la famille du miR-200 (miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-141 et miR-429) et que le miR-205 jouent un rôle critique dans la régulation de la TEM, en inhibant spécifiquement les répresseurs de la E-cadhérine, ZEB1 et ZEB2. [197-199] (Figure 12) De nombreux facteurs de transcription impliqués dans la TEM comme Snail ou Slug ont été associés à une rechute de la maladie, à une survie diminuée et à un phénotype invasif dans divers cancers, comme le cancer du sein [200], les cancers digestifs [201,202], l'adénocarcinome de l'œsophage [203], l'adénocarcinome adrenocortical [204], dans les tumeurs de la vessie. [205]

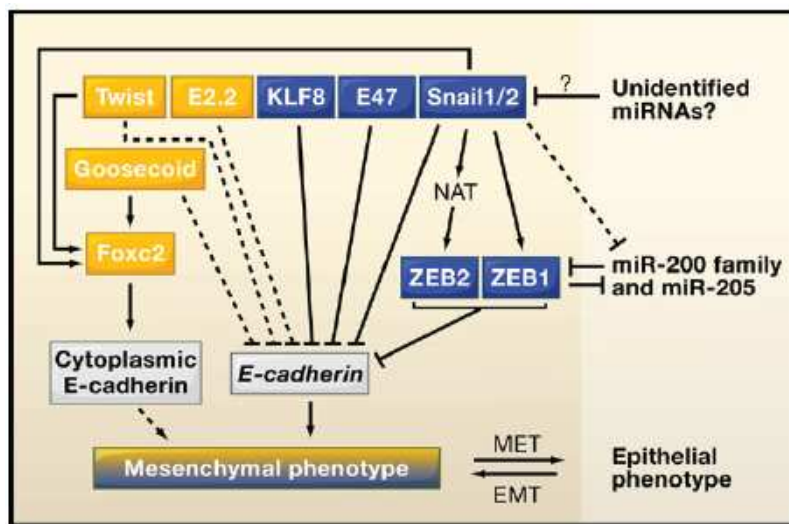


Figure 12 : régulation de l'expression de la E-cadhérine dans des cellules normales et cancéreuses. D'après Thierry JP et al, 2009 [206])

2.5 Rôle de la voie de signalisation du TGFβ1 dans la TEM

Le TGFβ1 est une cytokine multifonctionnelle pouvant inhiber la prolifération de nombreux types cellulaires, dont les cellules épithéliales, les cellules hématopoïétiques et les lymphocytes. Le TGFβ1 peut également induire une fibrose tissulaire et une TEM dans certaines cellules épithéliales et participer de cette façon à la progression tumorale.

2.5.1 Voie de signalisation du TGFβ1

La voie de signalisation du TGFβ1 commence par sa liaison à 3 récepteurs de forte affinité, appelés récepteur de type 1 (TGFR1), de type 2 (TGFR2) et de type 3 (TGFR3). La liaison du TGFβ1 sur le TGFR2 entraîne le recrutement et l'activation du récepteur de type 1 (TGFR1) puis l'activation de protéines intracellulaires, les protéines Smads. (Figure 13) Le TGFR1 phosphoryle Smad2 et Smad3, tandis que les récepteurs de type 1 du BMP induisent la phosphorylation des Smads 1, 5 et 8. Les protéines Smad2/3 phosphorylées (pSmad2/3) complexent ensuite avec Smad4. Les complexes pSmad2/3-Smad4 migrent alors vers le noyau et peuvent alors interagir avec de nombreux facteurs de transcription régulant ainsi l'expression de gènes cibles. (Figure 13) Smad7 est une protéine Smad inhibitrice, capable d'inactiver la signalisation du TGFβ1 via de nombreux mécanismes. Smad7 peut notamment se lier au TGFR1 et empêcher la liaison des Smad2/3 au même récepteur, bloquant ainsi la signalisation par le TGFβ1. En plus de l'activation des protéines Smads, le TGFβ1 peut activer d'autres voies de signalisation comme les voies Erk, c-Jun N-terminal kinase, p38-MAPK, PI3K dans certains types de cellules.

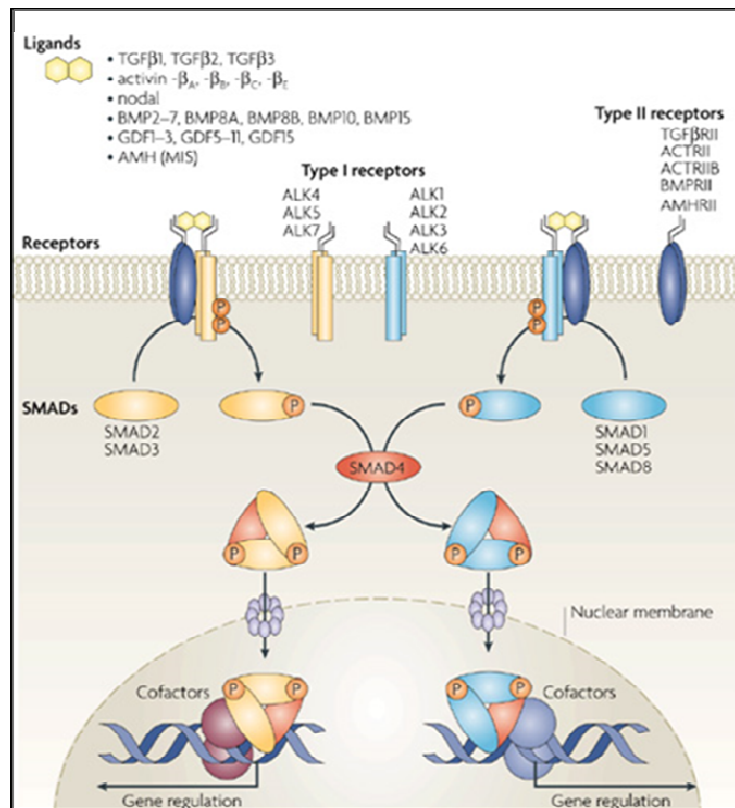


Figure 13 : Voie de signalisation du TGFβ1. D'après Miettinen et al, 1994 [207]

2.5.2 Rôle des protéines Smads dans la TEM

L'induction de la TEM par le TGFβ1 a tout d'abord été mise en évidence in vitro. Après traitement par du TGFβ1, des cellules épithéliales peuvent changer de phénotype. Elles passent ainsi d'une forme cuboïdale à une forme fibroblastique, allongée et perdent leur marqueurs épithéliaux au profit de marqueurs mésenchymateux.[208] Ces changements sont accompagnés d'une augmentation de la motilité. De nombreuses études ont montré l'importance du TGFβ1 et des protéines Smads dans la TEM à la fois physiologique et pathologique. Des expressions fortes de Smad2, Smad3 et Smad4 sont capables d'induire la TEM dans les cellules NmuMG, tandis que l'expression du dominant négatif de Smad2 ou Smad3 bloque la TEM dans ces cellules. [209] De plus, le TGFβ1 n'induit pas la TEM dans des cellules épithéliales rénales déficientes en Smad3, confirmant le rôle essentiel de Smad3 dans ce processus de TEM. [210] Comme Smad3, Smad4 paraît essentiel pour l'induction de TEM. En effet, la diminution de l'expression de Smad4 par siRNA ou l'expression d'un

dominant négatif pour cette protéine préserve l'expression de E-cadhérine [211], diminue la production de collagène de type 1 in vitro [212] et diminue les métastases osseuses in vivo. [213] A l'inverse les Smads inhibitrices (Smad6 et Smad7) fonctionnent comme des régulateurs négatifs de la TEM et répriment la TEM induite par le TGF β 1. En effet, une expression augmentée de Smad7 bloque la TEM dans de nombreux tissus. [209,214].

2.5.3 TGF β 1 et voies tyrosine kinase

De nombreuses études montrent une coopération entre les voies du TGF β 1 et les voies tyrosine-kinase telles que ERK, MAPK, p38-MAPK ou encore PI3K. En effet, l'induction de TEM dans des kératinocytes humains par le TGF β 1 entraîne l'activation de la voie ERK, la dissociation des jonctions adhérentes et une plus grande mobilité dans ces cellules. [215] De plus, l'inhibition de la voie ERK par des inhibiteurs pharmacologiques semble bloquer les changements morphologiques induits par la TEM, tels que la dissociation des jonctions adhérentes, confirmant un rôle majeur de cette voie d'activation dans ce processus de TEM. [215] Par ailleurs, l'induction de TEM par le TGF β 1 dans des cellules mammaires épithéliales de souris NMuMG entraîne également l'activation de la voie de signalisation p38-MAPK. [216] La voie PI3K est également activée lors de l'induction de TEM par le TGF β 1 dans des cellules épithéliales mammaires humaines permettant ainsi la migration de ces cellules, la diminution d'expression des protéines ZO-1 et la dissociation des jonctions intercellulaires. [217] Cependant, dans d'autres modèles d'induction de TEM par le TGF β 1, la voie PI3K ne semble pas essentielle à l'induction de TEM, suggérant ainsi que la voie PI3K a sans doute un rôle assez limité dans la TEM induite par le TGF β 1.

2.5.4 TGFβ1 et voie de signalisation WNT/GSK3/βcaténine

En réponse à une activation de la voie du TGFβ1, les protéines Smads peuvent interagir avec TCF ou LEF1, ou directement avec la β-caténine. Dans le contexte de la TEM, Smad2 et Smad4 peuvent former un complexe avec LEF1 au niveau du promoteur de la E-cadhérine, entraînant alors une répression de ce marqueur épithélial. Smad4 et LEF1 sont également responsables de la surexpression de marqueurs mésenchymateux comme la vimentine et la fibronectine, et également de l'augmentation de la migration et d'invasion des cellules caractéristique des cellules qui subissent une TEM. [218]

2.5.5 TGFβ1 et facteurs de transcription

Snail1 et Snail2 sont induits dans des cellules subissant une TEM induite par le TGFβ1. (Figure 14) L'induction de l'expression de Snail1 en réponse au TGFβ1 est médiée par Smad3. En effet, Smad3 se lie au promoteur de Snail1 et active sa transcription. [219] La voie de signalisation TGFβ1/Smads coopère également avec les voies de signalisation Ras, Notch et Wnt et augmente ainsi l'expression de Snail au cours du développement et de la formation de métastases tumorales. [220]

Le TGFβ1 peut induire l'expression des protéines ZEB pendant la TEM par un mécanisme indirect médié en partie par Ets-1. [221] Les protéines ZEB peuvent interagir avec Smad3 et directement réprimer l'expression de marqueurs épithéliaux, notamment en interagissant avec le co-répresseur CTBP (C-terminal Binding Protein). [222,223] (Figure 14)

Le TGFβ1 réprime l'expression de Id1, Id2 et Id3, qui sont eux-mêmes des antagonistes de la répression de la E-cadhérine. Il en résulte alors une diminution de l'expression de la E-cadhérine. [224]

Par ailleurs, le TGF β 1 est impliqué dans la voie de signalisation de Notch, en induisant l'expression de Hey1 et du ligand Jagged.

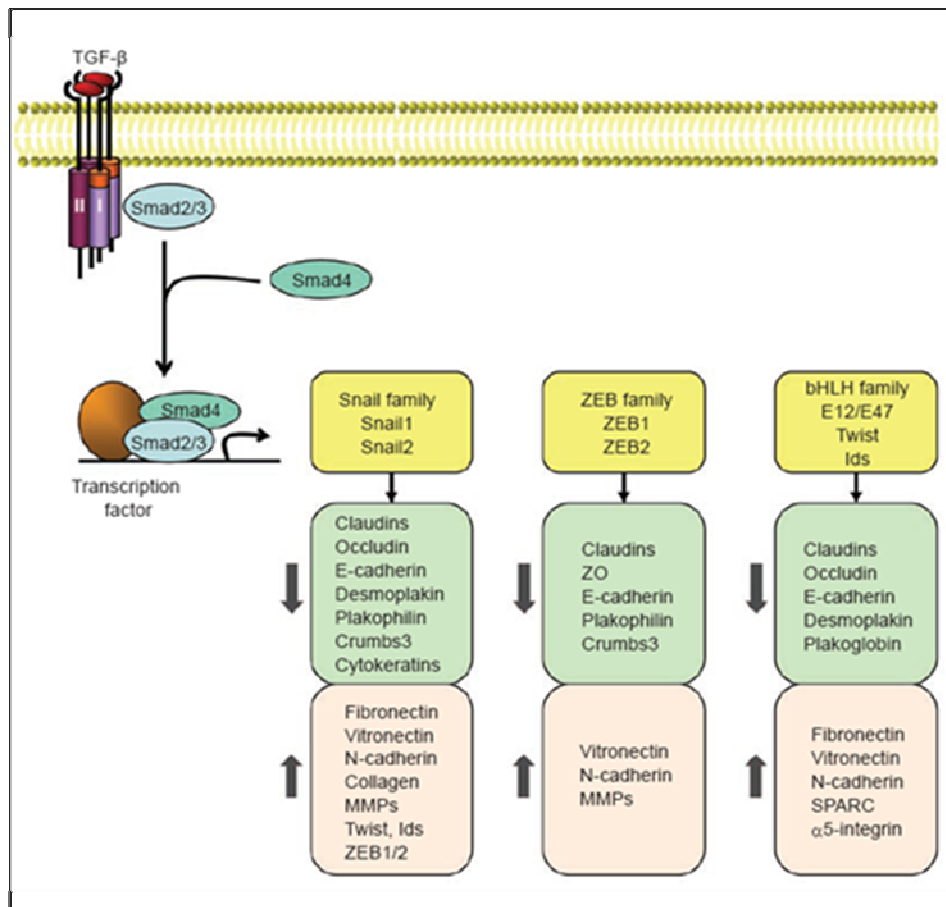


Figure 14 : Régulation de la TEM par le TGF β 1. Après liaison du TGF β 1, les Smad2/3 sont activés, forment un complexe avec Smad4, et vont réguler la transcription de gènes cibles. Les Smads activés médient leur action transcriptionnelle grâce à trois familles de facteurs de transcription, aboutissant à la répression de marqueurs épithéliaux et l'expression de marqueurs mésenchymateux. D'après Xu et al, 2008 [225].

2.5.6 TGF β 1 et miRNA

Le TGF β 1 diminue l'expression de miRNA impliqués la maintenance d'un phénotype épithélial comme le miR-141, miR-200a, miR-200b, miR-205 et le miR-429. En inhibant ces miRNAs, le TGF β 1 entraîne alors l'expression des facteurs de transcriptions ZEB1 et ZEB2 et régule ainsi la TEM.[197]

2.6 Ciblage thérapeutique de la TEM tumorale

2.6.1 TEM in vitro / in vivo

De nombreuses études in vitro et des modèles animaux montrent un rôle important de la TEM dans la progression tumorale et dans la formation de métastases. Bien que le processus de TEM tumorale soit bien caractérisé in vitro, le concept de TEM in vivo durant la progression tumorale et son importance en clinique furent très controversés jusqu'à très récemment. Ceci était principalement dû au manque d'identification de molécules impliquées dans cette TEM dans des échantillons biologiques. De plus, les cellules tumorales subissant une TEM ne représentent bien souvent qu'une très faible quantité des cellules tumorales. Enfin, ces cellules sont souvent très difficiles à distinguer des cellules stromales ou des fibroblastes associés aux tumeurs. La caractérisation de marqueurs associés à la TEM dans des tissus tumoraux de diverses origines et leur valeur pronostique en clinique renforce ce concept de TEM in vivo.

2.6.2 Valeur pronostique des marqueurs associés à la TEM

De nombreuses études ont à présent établi une corrélation entre l'expression de marqueurs associés à la TEM au sein de prélèvements biologiques de patients cancéreux et le pronostic de la maladie. En effet, une expression élevée des marqueurs mésenchymateux (vimentine, fibronectine, snail, slug) et une absence ou une expression réduite des marqueurs épithéliaux (cytokératine et E-cadhérine) sont corrélées à un mauvais pronostic de la maladie et à une survie globale réduite dans de nombreux cas. (Table 5)

Marqueurs	Cancers	Observations	Références
E-cadhérine, Snail, SIP1, Slug	Cancers du sein et des ovaires	La diminution d'expression d'E-cadhérine et l'expression de SIP1, Snail et Slug sont corrélées à un mauvais pronostic	Elloul S, 2005 [226]
E-cadhérine	Cancer colorectal	Une faible expression d'E-cadhérine est associée à une survie diminuée	Dorudi S, 1995 [227]
E-cadhérine	Cancer colorectal	La perte d'expression d'E-cadhérine est corrélée un stade avancé de la maladie, à la présence de métastases, à la rechute de la maladie et à une survie diminuée	Mohri et al, 1997 [228]
E-cadhérine	Cancer gastrique	Une faible expression d'E-cadhérine et une forte expression de Slug sont associées à un mauvais pronostic	Uchikado et al, 2011 [229]
E-cadhérine	Cancers du sein triple négatifs	Une faible expression d'E-cadhérine est associée à une survie diminuée	Tang et al, 2011 [230]
β -caténine nucléaire	Cancers colorectaux	L'expression de β -caténine nucléaire est significativement corrélée à un stade avancé de la maladie	Wong et al, 2004 [231]
β -caténine nucléaire	Cancers colorectaux	L'expression de β -caténine nucléaire est significativement corrélée à la présence de métastases ganglionnaires et à une survie globale diminuée.	Wong et al, 2003 [232]
Vimentine	Cancers du sein	Une forte expression de Vimentine est associée à un mauvais pronostic de la maladie	Thomas et al, 1999 [233]
Vimentine	Cancers gastriques	L'expression de vimentine est significativement corrélée aux rechutes de la maladie, à la présence de métastases éloignées et à un mauvais pronostic	Otsuki et al, 2011 [234]
N-cadhérine	Cancer de l'œsophage	Une forte expression de N-cadhérine est associée à un mauvais pronostic de la maladie	Yoshinaga et al, 2004 [235]
N-cadhérine	Cancers de la vessie	Une forte expression de N-cadhérine est associée à un mauvais pronostic de la maladie	Lascombe et al, 2006 [236]
Fibronectine	Cancers des ovaires	Une forte expression de fibronectine est associée à un mauvais pronostic de la maladie et à une survie globale diminuée	Franke et al, 2003 [237]
Snail	Carcinome adrénocortical	Une forte expression de snail est associée à une survie globale diminuée	Waldmann et al, 2008 [238]
Snail	Cancer hépatocellulaire	Une forte expression de snail est associée à un mauvais pronostic de la maladie	Miyoshi et al, 2005 [239]
Slug	Cancer du poumon	Une forte expression de slug est associée à une survie diminuée	Shih et al, 2005 [240]
Slug	Cancer colorectal	Une forte expression de slug est associée à la présence de métastases éloignées, à un mauvais pronostic et à une survie diminuée	Shiori et al, 2006 [202]
Twist1	Cancer cervical	Une forte expression de twist1 est associée à un mauvais pronostic et à une survie diminuée	Shibata et al, 2008 [241]
Twist1	Cancer des ovaires	L'expression de twist1 est associée à un fort risque de rechute et à une survie diminuée	Hosono et al, 2007 [242]
Twist1	Cancers gastriques	L'expression de Twist1 dans les cancers gastriques est corrélée à la présence de métastases ganglionnaires et à un mauvais pronostic de la maladie	Ru et al, 2010 [243]
HIF-1a, Twist1, Snail	Cancers du poumon non à petites cellules	L'expression de HIF-1a, Twist1 et Snail est significativement corrélée à un mauvais pronostic	Hung et al, 2009 [244]

Table 5 : Liste non exhaustive des études évaluant l'impact pronostic de différents marqueurs associés à la TEM dans divers cancers.

En particulier, l'équipe de Kim a étudié l'expression par IHC (Immunohistochimie) de plusieurs marqueurs associés à la TEM, comme des marqueurs épithéliaux (E-cadhérine, cytokératines, γ -caténine), des marqueurs mésenchymateux (vimentine, N-cadhérine, Snail, β -caténine nucléaire et FSP-1/S100A4) dans des tissus tumoraux de cancers gastriques. Très peu de marqueurs épithéliaux étaient retrouvés au sein de ces tumeurs contrairement aux marqueurs mésenchymateux qui étaient eux fortement exprimés. [245] (Figure 16)

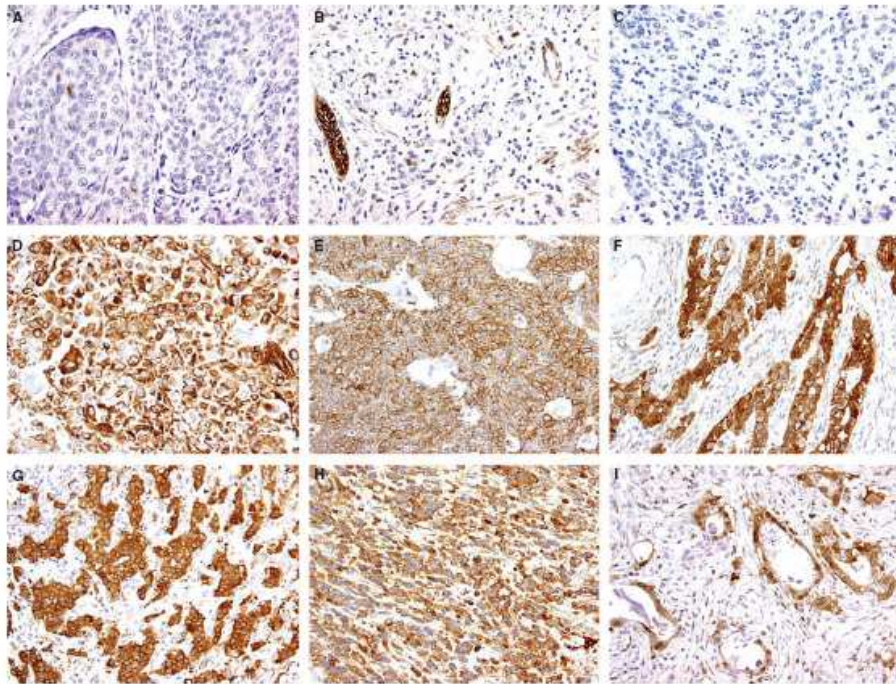


Figure 16 : immunomarquages de marqueurs épithéliaux (A à C) et de marqueurs mésenchymateux (D à I) dans des tissus tumoraux de cancers gastriques. A : cytokératines, B : E-cadhérine, C : γ -caténine, D : vimentine, E : N-cadhérine, F : β -caténine nucléaire, G : MMP2, H : Snail, I : FSP-1/S100A4) D'après Kim et al, 2009 [245]

De plus, dans cette étude, les marqueurs mésenchymateux comme la vimentine, la N-cadhérine, Snail1 et FSP1/S100A4 nucléaire sont corrélés à un mauvais pronostic et à une survie diminuée, tout comme la perte d'E-cadhérine et de γ -caténine. [245] Cependant aucune différence significative en terme de survie globale n'est reportée sur la base de l'expression de la β -caténine, des cytokératines ou de MMP2, contrairement à d'autres études.

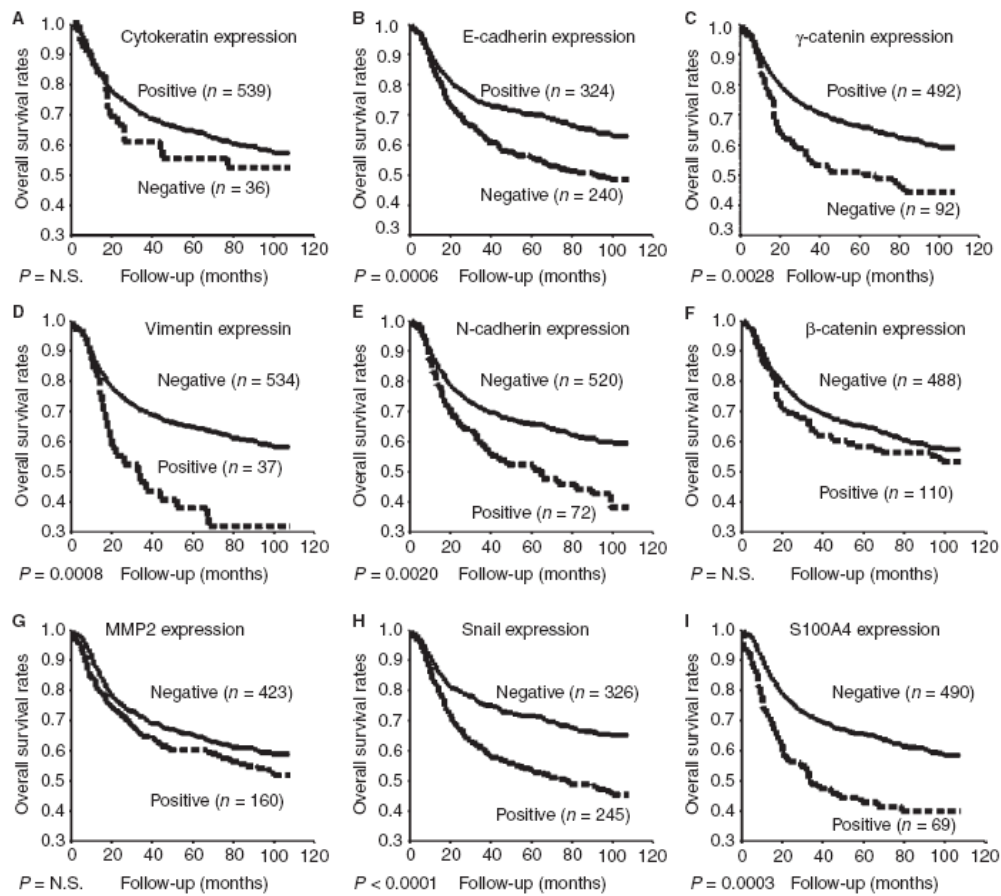


Figure 17 : Survie globale des patients porteurs de cancers gastriques en fonction de l'expression des marqueurs liés à la TEM. D'après Kim et al, 2009 [245]

En outre, d'autres études montrent que l'expression de β -caténine nucléaire est significativement corrélée à un stade avancé du cancer et à mauvais pronostic de la maladie. En effet, dans une étude de 2004, un fort niveau d'expression de β -caténine nucléaire en IHC est retrouvé dans des cancers colorectaux de stade avancé. [231]

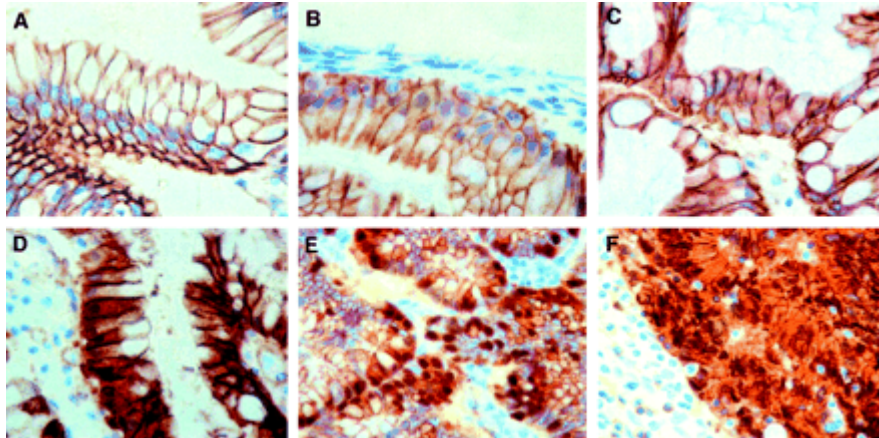


Figure 18 : Immunomarquage IHC de la β -caténine dans des tissus : A : épithélium sain de colon, B : épithélium glandulaire de polype hyperplasique, C : épithélium glandulaire de polype non adénomateux, D : épithélium glandulaire de polype Peutz-Jeghers, E : épithélium glandulaire dysplasique adénomateux, F : adénocarcinôme moyennement différencié. D'après Wong et al, 2004 [231]

Dans cette étude, un « score » de β -caténine rendant compte du niveau d'expression de β -caténine nucléaire en IHC est attribué pour chaque analyse. Le graphique suivant rend compte de l'expression et la localisation de la β -caténine en fonction du stade de progression des cancers colorectaux. De forts taux de β -caténine nucléaire sont retrouvés dans les cancers gastriques de stade avancé. (Figure 19)

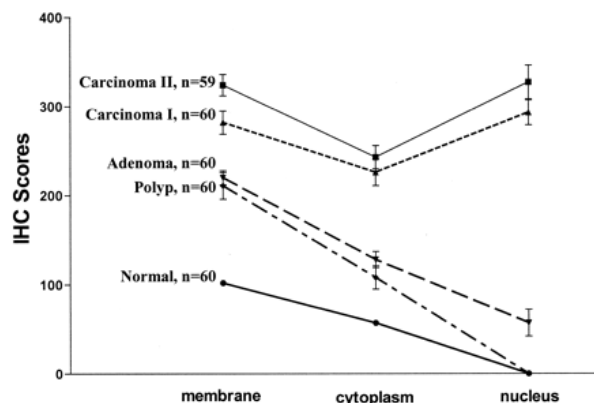


Figure 19 : Relation entre la localisation cellulaire de la β -caténine et les stades de progression du cancer. D'après Wong et al, 2004 [231]

Dans une autre étude, la localisation nucléaire de la β -caténine dans des tissus tumoraux de cancer colorectal est associée à un fort risque de développement de métastases ganglionnaires et à une survie diminuée. [232] Le graphique suivant présente la courbe de survie de patients

atteints de cancer colorectal en fonction de l'expression de β -caténine nucléaire (un « score » de β -caténine rendant compte du niveau d'expression de β -caténine nucléaire en IHC est attribuée pour chaque analyse). (Figure 20)

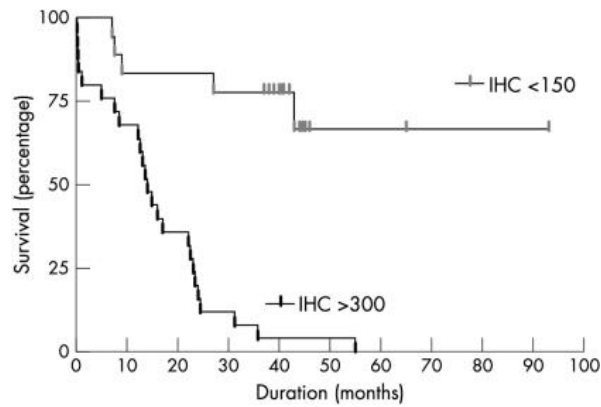


Figure 20 : Corrélation entre expression nucléaire de β -caténine et survie globale. Un fort niveau d'expression de β -caténine nucléaire (score >300) est associée à une survie diminuée des patients. D'après Wong et al, 2003 [232]

Par ailleurs d'autres facteurs de transcriptions associés à la TEM semblent également corrélés à de mauvais pronostiques comme les facteurs de transcriptions HIF-1 α , Twist et Snail qui sont retrouvés dans des stades avancés de cancer du poumon non à petites cellules. [244] (Figure 21)

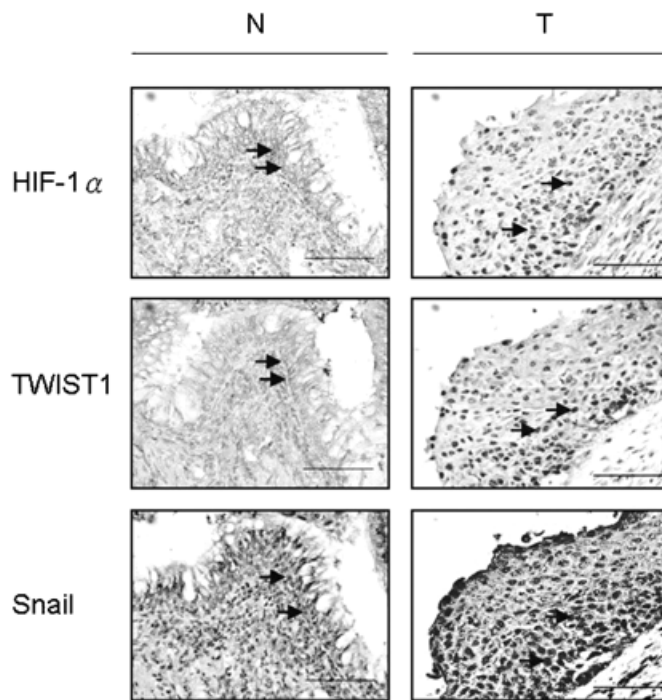


Figure 21 : immunomarquages des facteurs de transcription HIF-1 α , Twist1 et Snail dans du tissu sain du poumon (N) et du tissu tumoral (T) de cancer du poumon non à petites cellules. D'après Hung et al, 2009. [244]

Ces 3 mêmes facteurs de transcriptions apparaissent même comme des facteurs de mauvais pronostic dans cette maladie, puisque leur expression est directement corrélée à une survie diminuée des patients. [244] (Figure 22)

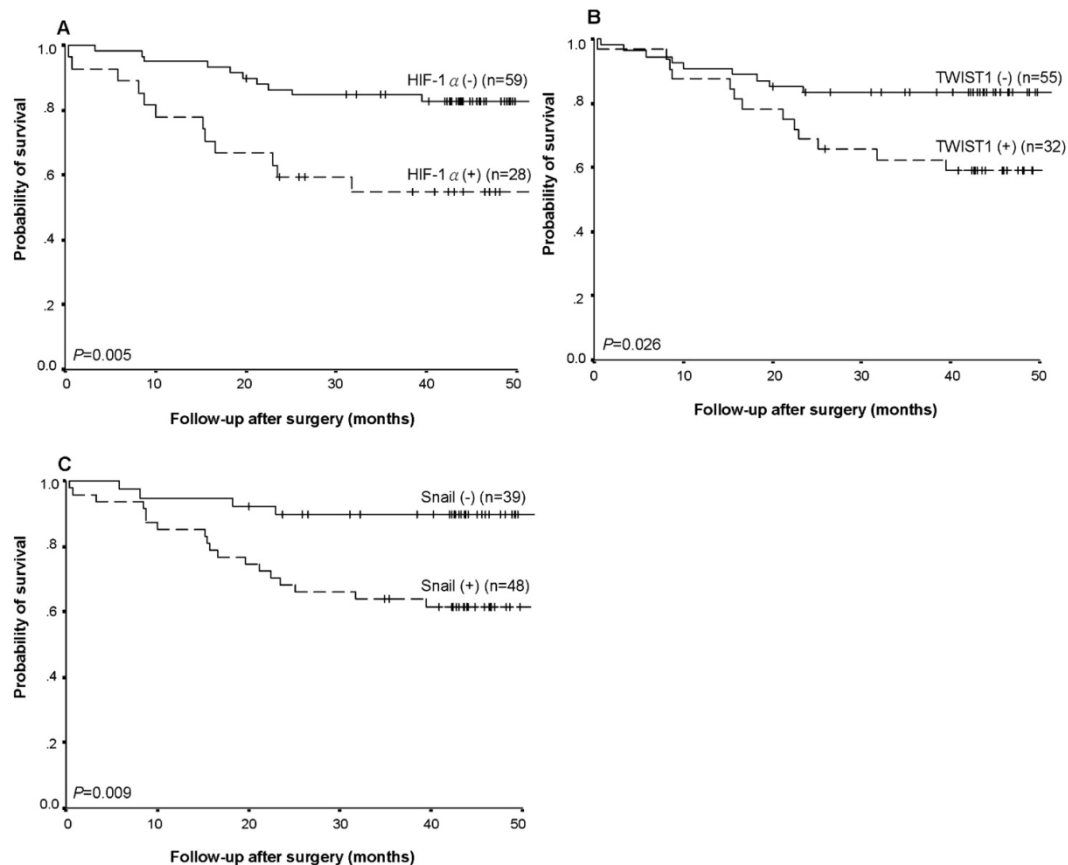


Figure 22 : Corrélation entre l'expression de HIF-1a, Twist1 et Snail et survie globale des patients. L'expression de chacun des facteurs de transcription HIF-1a (A), Twist1 (B) et Snail (C) est corrélée à une survie totale diminuée. D'après Hung et al, 2009 [244]

2.6.3 TEM et résistance aux traitements anti-cancéreux

Par ailleurs, les cellules subissant une TEM semblent développer une certaine résistance vis-à-vis de certains traitements chimiothérapeutiques. Notamment l'erlotinib, un inhibiteur de l'EGFR (récepteur au facteur de croissance épidermique), semble efficace contre les cellules tumorales épithéliales mais inefficace contre des cellules tumorales à phénotype mésenchymateux. Des essais cliniques montrent également un bénéfice de l'utilisation de l'erlotinib chez des patients atteints de cancer du poumon présentant une forte expression d'E-cadhérine par rapport à ce même traitement chez des patients possédant une moindre expression intra-tumorale d'E-cadhérine. [246] Ces résultats ont été confirmés dans d'autres types de cancer et avec d'autres inhibiteurs de l'EGFR comme le gefinitib [247] ou le

cetuximab [248]. Parallèlement à ces résultats, des cellules de cancer du pancréas résistantes à la gemcitabine [249] et des cellules de cancer colorectal résistantes à l'oxaliplatine [250] présentent un phénotype caractéristique de cellules subissant une TEM. La surexpression de Twist a également été associée à la résistance au paclitaxel dans des tumeurs de la vessie, des ovaires, de la prostate. [251] La caractérisation du processus de TEM in vivo pourrait en somme permettre de prédire l'efficacité d'un traitement, d'administrer des traitements appropriés à des patients sélectionnés en fonction de leur « empreinte » tumorale. Par exemple, l'Erlotinib est actuellement utilisé dans le traitement de tumeurs du pancréas métastatiques alors que les cellules tumorales ne semblent sensibles à cette chimiothérapie que lorsqu'elles sont de phénotype épithélial. Pour cela, de nombreuses études s'intéressent à présent au développement de traitements combinant des chimiothérapies à des substances ciblant spécifiquement des molécules impliquées dans la TEM. Ceci permettrait alors de restaurer une certaine sensibilité des tumeurs à des molécules classiques de chimiothérapie et de traiter ainsi des tumeurs à des stades plus avancés.

2.6.4 Développement de nouveaux traitements ciblant la TEM

En outre, le ciblage des voies de signalisation impliquées dans cette TEM semble particulièrement intéressant pour prévenir la progression tumorale, l'apparition de métastases mais aussi la résistance aux agents anti-cancéreux.

En raison de son rôle central dans le processus de TEM, Snail peut être considéré comme le principal candidat pour le ciblage moléculaire de la TEM. En 2007, Olmeda et al montrent que l'inhibition de l'expression de Snail par ARN interférence dans des cellules MDCK est capable de réverser la TEM et ainsi de restaurer complètement un phénotype épithélial dans ces cellules. [252] Dans des xénogreffes murines, l'inhibition stable de Snail par siRNA diminue de façon importante la croissance tumorale. [252]

Le traitement de cellules de cancer du pancréas par la cyclopamine, un inhibiteur de la voie Hedgehog, entraîne une diminution du facteur de transcription snail et une sur-expression de la E-cadhérine. [253] De plus, dans des expériences de xénogreffes murines, le traitement par la cyclopamine inhibe même toute formation de métastases chez ces souris. [253] Krutzfeld et al reportent même qu'il serait possible d'antagoniser des miRNA in vivo par des molécules appelées « antagomirs ». [254] Le ciblage des miR-10b et miR-21 associés au phénotype mésenchymateux par des antagomirs représenterait alors une stratégie d'inhibition in vivo de la TEM. Le microenvironnement tumoral contribuant à la TEM peut aussi être ciblé spécifiquement. Notamment, la voie de signalisation du TGF β 1 peut être également une cible intéressante pour interférer avec la TEM. Roberts et al montrent que l'utilisation de molécules inhibant Smad3 peut réverser la TEM et atténuer les effets pro-métastatiques du TGF β 1 lors de la progression tumorale. [255] L'utilisation d'un siRNA ciblant le TGF β 1 semble également diminuer la migration et l'invasion de cellules de cancer du sein in vitro et l'apparition de métastases pulmonaires in vivo. [256] Un inhibiteur chimique du TGFRI, le SB-431542 est capable également de réverser la TEM induite par le TGF β 1 et ainsi de diminuer la motilité, la migration et l'invasion cellulaire.[257]

CHAPITRE 3 : Les anticorps monoclonaux thérapeutiques

3.1 Historique

Dès le 19^{ème} siècle, Emil von Behring observe qu'une dose non létale de toxine diphtérique ou tétanique protège des lapins de l'administration ultérieure d'une dose létale, et que l'état d'immunité qui en résulte peut être transféré par le sérum à des animaux naïfs. [258] Behring suppose alors que le sérum des lapins contient des substances « anti-toxines » possédant une activité spécifique contre la toxine tétanique. En 1894, le docteur Émile Roux, ancien disciple de Louis Pasteur, constate que, si l'on vaccine un cheval en lui injectant des doses croissantes de toxine diphtérique, on provoque chez lui l'apparition de grandes quantités d'anticorps antidiphtériques. Roux a donc l'idée de transférer le sérum de ce cheval ainsi "hyperimmunisé" à des malades atteints de la diphtérie. Un grand nombre de malades guérissent.[259] C'est ainsi qu'est née la « Serum-Thérapie », ou sérothérapie en français. Le concept de neutralisation de toxines par la sérothérapie fut rapidement transposé par Césaire Phisalix et Albert Calmette au traitement des envenimations. On commença à préparer des sérums contre les venins de différentes espèces de serpent puis de scorpion, et à les employer avec succès.

Dès le début du XXe siècle, on parle alors d'anticorps à la place du concept initial d'« anti-toxines » mais ce n'est qu'à la veille de la Seconde Guerre mondiale qu'on montra que les anticorps se trouvaient parmi les gammaglobulines du sérum. Cependant, ce n'est qu'en 1968 que la véritable structure en Y des immunoglobulines est décrite par Porter et Edelman. [260,261]

En 1975, César Milstein et Georges Köhler arrivent à fusionner pour la première fois des lymphocytes B normaux provenant d'une souris immunisée avec des globules rouges de

mouton avec des cellules de myélome. Cette fusion leur permet d'obtenir des cellules « hybrides » produisant des anticorps monoclonaux dirigés contre les globules rouges de mouton. [262] Ces cellules « hybrides » appelées ensuite « hybridômes » possèdent 2 propriétés principales : elles se multiplient indéfiniment comme des cellules de myélome, en donnant des « cellules filles » identiques, et produisent des anticorps monoclonaux spécifiques de l'antigène ayant servi à l'immunisation. Grâce à des techniques de sélection des cellules hybrides puis par leur clonage, cette technique permet d'obtenir des clones de cellules hybrides produisant un seul type d'anticorps, dits alors « anticorps monoclonaux ». Les hybridômes peuvent être cultivés indéfiniment in vitro sans modification de l'anticorps qu'ils produisent, et peuvent même être congelés. Cette technique permet donc la génération d'une source illimitée de cellules produisant en théorie toujours le même type d'anticorps.

3.2 Structure des anticorps monoclonaux

Les anticorps sont des glycoprotéines d'environ 150kDa de la superfamille des immunoglobulines, formées de deux sortes de chaînes polypeptidiques : les chaînes légères (**L** pour *light*) κ ou λ et les chaînes lourdes (**H** pour *heavy*) μ , δ , γ_1 , γ_2 , γ_3 , γ_4 , α_1 , α_2 et ϵ . Le type de chaîne lourde définit la classe et la sous-classe de l'immunoglobuline (Ig) par exemple μ , une IgM etc...Chaque molécule d'anticorps est composée de 2 chaînes légères et de 2 chaînes lourdes reliées entre elles par un nombre variable de ponts disulfures assurant la flexibilité de la molécule. Ces chaînes forment une structure en Y et sont constituées de domaines de 110 acides aminés environ. Chaque chaîne légère est constituée d'un domaine constant ($C\kappa$ et $C\lambda$) et d'un domaine variable ($V\kappa$ et $V\lambda$). Les chaînes lourdes comportent un domaine N-terminal variable (VH), 3 (δ , γ , α) ou 4 (μ , ϵ) domaines constants CH (CH_1 , CH_2 ,

CH3, CH4) et une région charnière (« Hinge »). (Figure 23) Les domaines variables des chaînes lourdes et légères (VH et VL) sont à l'origine de la spécificité de l'anticorps pour un antigène. Chacun de ces domaines variables VL et VH possède 3 zones hypervariables (CDR).

Le clivage des anticorps par la papaine donne naissance à 2 fragments appelés fragment Fc (pour Fragment cristallisable) et Fab (pour Fragment de liaison à l'antigène). (Figure 23) Les fragments Fab contiennent les domaines variables des chaînes lourdes et légères responsables de la spécificité de l'anticorps. Le fragment Fc contient seulement les portions constantes des 2 chaînes lourdes de l'anticorps. Ce fragment Fc est responsable de la plupart des effets biologiques des anticorps. En effet, le fragment Fc sert de site de liaison pour la molécule C1q du complément et pour diverses cellules immunitaires via leurs récepteurs aux fragments Fc.

Les chaînes lourdes d'immunoglobuline sont glycosylées sur différents sites. Il s'agit en général de chaînes d'oligosaccharides branchés comportant un ou plusieurs résidus d'acide sialique. (Figure 23) En particulier, pour les IgG1 humaines, il s'agit de 2 chaînes d'oligosaccharides attachées d'une façon covalente sur l'asparagine 297 (Asn297) au niveau du domaine CH2, composés de mannose, fucose, de N-acetylglucosamine (GlcNAc), de galactose et d'une molécule terminale d'acide sialique. (Figure 23) Le type de glycosylation peut varier pour une même chaîne lourde, ce qui crée un niveau supérieur d'hétérogénéité pour ces molécules. De plus, la présence des oligosaccharides est critique pour leurs fonctions effectrices. L'analyse de la structure cristalline montre que les oligosaccharides liés au domaine Fc influencent la conformation du domaine Fc. [263]

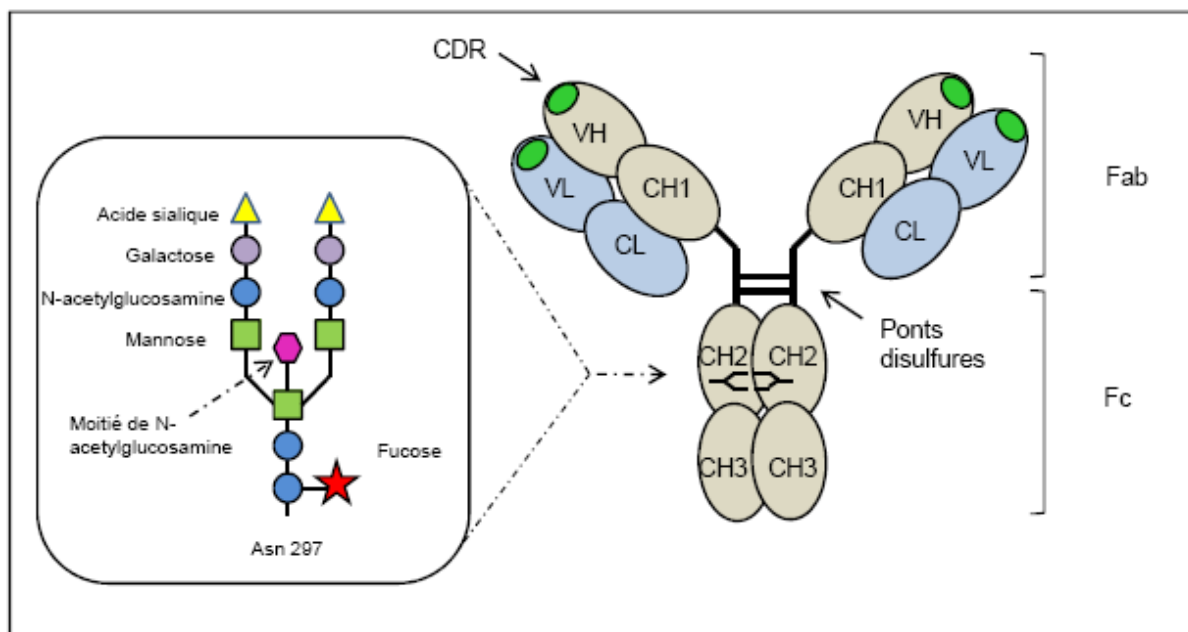


Figure 23: Structure générale des anticorps. VH : région variable des chaînes lourdes. VL : région variable des chaînes légères. CH : région constante des chaînes lourdes. CL : région constante des chaînes légères. CDR : Complementary determining region. Fab : Fragment d'anticorps. Fc : fragment cristallisable.

3.3 Anticorps monoclonaux murins, chimériques, humanisés et humains.

Les premiers anticorps monoclonaux à avoir été produits étaient entièrement murins. Dès les années 1970, Köhler et Milstein mettent au point une technique de production in vitro d'anticorps monoclonaux, technique qui va être ensuite utilisée pendant de nombreuses années. [262] Cette technique consiste en l'administration répétée d'un antigène à un animal de laboratoire suivie de la fusion des lymphocytes B de cet animal immunisé avec des cellules de myélome de la même espèce animale. Les cellules résultant de la fusion des deux types cellulaires sont alors appelées « hybridômes ». Elles possèdent alors la capacité de se multiplier indéfiniment et de produire des anticorps monoclonaux spécifiques de l'antigène administré. Les anticorps monoclonaux murins ont tous un nom qui se termine en *-momab*. L'excitation suscitée par la découverte de Köhler et Milstein a rapidement laissé place à une grande déception car l'utilisation de ces anticorps monoclonaux murins en thérapeutique a tout d'abord généré de nombreux problèmes en thérapeutique. Les premiers anticorps

monoclonaux murins développés en thérapeutique ont entraîné 2 types de problèmes : ces anticorps issus de rongeurs entraînent une réponse immunitaire et le développement d'anticorps humains anti-souris (HAMA : human anti-mouse antibodies) une fois administrés à l'homme. Suite à des administrations répétées, ces anticorps HAMA inactivent et éliminent les anticorps murins mais peuvent aussi générer des complexes anticorps-HAMA responsables de réactions allergiques et même de chocs anaphylactiques, limitant ainsi la possibilité d'administrations répétées. De plus, de par leur nature murine, la portion Fc de ces anticorps murins est dans l'impossibilité d'induire une cytotoxicité dépendante du complément ou même d'une cytotoxicité cellulaire dépendante de l'anticorps.

Le développement de la biologie moléculaire dans les années 1990 a rendu possible le clonage des gènes de ces anticorps monoclonaux d'intérêt dans des vecteurs d'expression eucaryote. [264] Ainsi, des versions recombinantes de tout anticorps monoclonal d'intérêt peuvent être obtenues dans diverses lignées d'une façon reproductible, améliorant ainsi la production de ces anticorps, la culture de lignées d'hybridomes étant très instable.

L'obtention d'anticorps monoclonaux « plus humains » ou totalement humains est donc devenue un objectif central au cours des années 1980-1995. Pour cela, quatre approches d'ingénierie moléculaire ont été utilisées :

- la construction d'**anticorps chimériques**, constitués des domaines variables (VH et VL) de souris, le reste de la molécule étant d'origine humaine. (Figure 24) (le plus souvent il s'agit d'un fragment Fc d'une IgG1 et la région C κ humaine) [265]. Les IgG1 sont en effet très efficaces pour activer le complément et les réponses cellulaires. Ces anticorps chimériques sont à 70% humains et possèdent un fragment Fc totalement humain, ce qui les rend beaucoup moins immunogènes et ce qui leur

permet d'interagir avec des cellules immunitaires et avec les protéines de la famille du complément. Leur nom se termine en *-ximab*.

- La construction d'**anticorps humanisés**, produits par clonage des portions hypervariables CDR de l'anticorps murin d'intérêt dans des anticorps humains. [266] (Figure 24) Ces anticorps humanisés sont des molécules à 85-90% humaines et sont encore moins immunogènes que les anticorps chimériques. La plupart des anticorps monoclonaux utilisés à l'heure actuelle en thérapeutique sont des anticorps chimériques ou humanisés. Leur nom se termine en *-zumab*.

- Enfin, des **anticorps totalement humains** peuvent être à présent produits. (Figure 24) La technique de phage-display est de loin la technique la plus utilisée. Il s'agit d'une méthode qui permet la reconnaissance d'un peptide grâce à sa présentation sur la surface de phages. Le phage display constitue une catégorie de phage permettant la construction de banques d'ADN ou d'ADN complémentaire. Les 2 principaux phages utilisés dans cette technique sont les phages M13 (phage filamenteux) et lambda qui infectent tous les 2 E.Coli. Cette technique permet d'obtenir des banques d'ADN que l'on peut facilement conserver et les clones sélectionnés sont multipliés à faible coût. Cette technique permet ainsi de produire des anticorps sans passer par l'immunisation d'un animal. Leur nom se termine en *-mumab*.

- L'utilisation de « souris humanisées » (HuMab Mouse) dont le génome contient une grande partie des gènes codant les chaînes lourdes et légères humaines. Après leur immunisation, ces souris humanisées produisent donc directement des IgGs humaines.

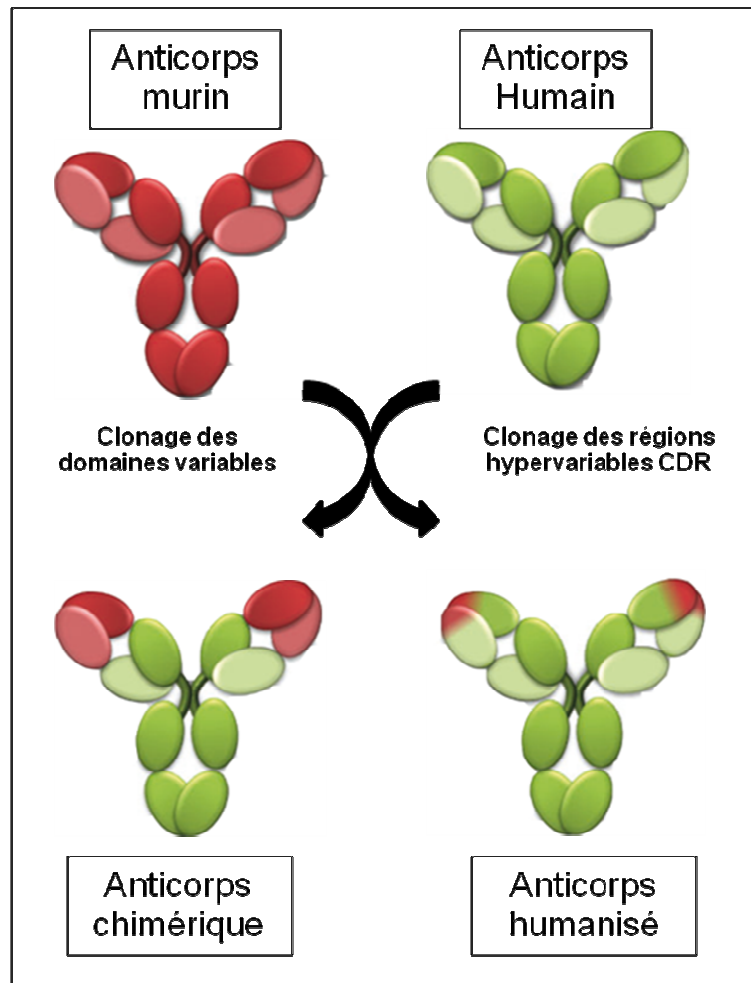


Figure 24 : Anticorps chimériques et humanisés. Les séquences murines sont représentées en rouge et les séquences humaines en vert. D'après [267]

3.4 Modes d'action de ces anticorps monoclonaux

Les anticorps monoclonaux peuvent agir selon 2 voies principales :

-en liant et en neutralisant directement les antigènes; la liaison des anticorps à leurs antigènes empêche alors leur activité et leur interaction avec des autres molécules. C'est sans doute un des modes d'action des anticorps infliximab, adalimumab et certolizumab (anti-TNF α) ou bevacizumab (anti-VEGF). L'anticorps peut aussi cibler un récepteur présent à la surface cellulaire, et bloquer son interaction avec son ligand principal. C'est le cas des anticorps cetuximab et panitumumab (anti-EGFR) et trastuzumab (anti-HER2).

-en activant la réponse immunitaire, selon 2 mécanismes principaux :

1) la liaison et l'activation du complément C1q sur la région Fc résulte en la formation d'un complexe d'attaque membranaire aboutissant à la lyse de cellules cibles (CDC : cytotoxicité dépendante du complément) (Figure 25)

2) le fragment Fc peut également se lier sur des récepteurs à fragments Fc tels que CD16, CD32 et CD64 présents sur les cellules NK, les monocytes et les macrophages et initier ainsi une réponse cellulaire. (ADCC : cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps) (Figure 25)

Les différents isotypes et sous-classes d'anticorps n'ont pas tous le même mode d'action. Tandis que les IgM humains activent presque essentiellement la voie du complément, les isotypes IgG (et surtout IgG1 et IgG3) entraînent plutôt une réponse cellulaire.

3.4.1 ADCC (Cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps)

L'ADCC est certainement l'un des mécanismes effecteurs les plus importants des anticorps monoclonaux. Les récepteurs aux fragments Fc (FcγRs) présents sur les cellules immunitaires effectrices permettent la fixation des fragments Fc des anticorps sur ces cellules. La famille des récepteurs aux fragments Fc contient 6 membres répartis en 3 groupes : FcγRI (CD64), FcγRIIa, b, c (CD32a, b, c) et FcγRIIIa, b (CD16a, b). Ces récepteurs sont exprimés par différentes cellules immunitaires, comme les macrophages, les neutrophiles, les cellules dendritiques et les cellules NK (Natural Killer). Les cellules NK sont les principales cellules impliquées dans l'ADCC humaine. Grâce à l'interaction de leurs récepteurs FcγRIIIa avec la portion Fc des anticorps, les cellules NK sont alors recrutées et activées, conduisant alors à la formation d'une synapse immunologique, à l'exocytose de granules de perforines/granzyme, à l'établissement d'une interaction Fas/FasL et enfin à l'apoptose des cellules tumorales cibles. Les autres types cellulaires agissent plutôt par phagocytose des cellules cibles cancéreuses. L'ADCC semble jouer un rôle essentiel dans l'efficacité in vivo des anticorps. En effet, de

nombreuses études ont établi un lien entre les polymorphismes des récepteurs FcγR et les réponses cliniques aux anticorps monoclonaux thérapeutiques. [268] Par exemple, les taux de réponse au rituximab chez les patients porteurs d'un lymphome non-Hodgkinien sont supérieurs chez les patients portant un variant FcγRIIIa de forte affinité (Val158-homozygote) que chez les patients porteurs d'un variant FcγRIIIa de faible affinité (Phe158). [269,270] Cependant, l'ADCC est assez souvent limitée. En effet, l'affinité entre le fragment Fc des anticorps et les récepteurs FcγR joue un rôle crucial dans cette réponse. Or 80% de la population exprime un variant de faible affinité de FcγRIIIa. De plus, les IgG1 sont très souvent glycosylées dans leur domaine CH2 (Asn 297). Cette glycosylation permet la modulation de l'affinité des Fc pour leurs récepteurs FcγRIIIa et leur bioactivité in vivo. Notamment, la présence de résidus fucose sur la chaîne d'oligosaccharides des anticorps diminue l'efficacité de l'ADCC.[271] La nature de la chaîne d'oligosaccharides dépend des enzymes exprimées par la lignée cellulaire utilisée pour la production de l'anticorps. [272] Par exemple, les IgG1 anti-CD20 chimériques produits par la lignée cellulaire de rat YB2/0 ont une ADCC 50 fois supérieure que les mêmes anticorps produits dans la lignée de hamster CHO, la lignée cellulaire traditionnellement utilisée pour la production de protéines thérapeutiques. Cette différence semble attribuée à la présence du gène FUT8, le gène codant pour l'α1,6-fucosyltransferase, dans la lignée CHO. [271] Les anticorps monoclonaux défucosylés sont actuellement en plein développement. Pour cela des lignées cellulaires CHO déficientes en gène FUT8 ont été générées. En outre, l'affinité entre les récepteurs FcγR et les fragments Fc n'est pas le seul obstacle à l'ADCC. En effet, les anticorps thérapeutiques sont en compétition permanente avec des concentrations élevées d'IgG des patients pour leur liaison sur les FcγRIIIa. La concentration sérique des patients en IgG est de 8 à 17mg/mL et environ 66% de ces molécules peuvent également interagir avec les FcγRIIIa. La plupart des anticorps thérapeutiques doivent donc être injectés à des doses très importantes (entre 10 et

100µg/mL) pour avoir un effet thérapeutique in vivo. [273] Enfin, la présence de récepteurs inhibiteurs FcγRIIb sur les cellules B, macrophages, les cellules dendritiques et les neutrophiles limite également l'ADCC. [274] Ces FcγRIIb possèdent un motif inhibiteur dans leur portion intra-cytoplasmique, régulant ainsi négativement les fonctions effectrices des anticorps. Différentes approches sont en cours de développement pour la génération d'anticorps monoclonaux thérapeutiques plus puissants, telles que la modification des acides aminés ou des oligosaccharides du domaine Fc.

3.4.2 CDC: Cytotoxicité dépendante du complément

La CDC met en jeu toute une série de protéines du complément (C1-C9) présentes en grandes quantité dans le sérum. L'activation de cette cascade cytolitique est appelée couramment « voie classique » du complément. La CDC commence par la fixation de la fraction C1q sur la portion Fc des anticorps monoclonaux entraînant ensuite la formation d'un complexe d'attaque membranaire aboutissant à la lyse des cellules tumorales cibles. Un certain nombre d'anticorps semblent agir de cette façon in vivo comme les anticorps anti-CD20, anti-CD52, anti-CEA (antigène carcinoembryonnaire). Cependant les cellules tumorales peuvent échapper à cette CDC par différents mécanismes de résistance. En effet, l'expression de protéines régulatrices du complément (CD35, CD46, CD55, CD59) peut inhiber la cascade d'activation des protéines du complément à la surface cellulaire, diminuant ainsi considérablement la bioactivité du rituximab lors du traitement de lymphomes folliculaires non-Hodgkiniens ou de lignées cellulaires de lymphome de Burkitt.[275] De plus, ces protéines régulatrices du complément ont été directement mises en cause lors de mécanismes de résistance aux thérapies par des anticorps. En effet, après traitement par le rituximab, une sur-expression de CD59 dans les cellules tumorales a été reportée [276], de même qu'une forte expression de

CD55 dans les tumeurs ganglionnaires de personnes souffrant de lymphomes non-Hodgkiniens.[277]

Dans l'objectif d'améliorer l'activité CDC des anticorps monoclonaux, de nombreux anticorps mutants ont été générés avec succès, en particulier en augmentant l'affinité des protéines C1q pour les fractions Fc des anticorps. La modification d'acides aminés dans la portion CH2 ou dans la région charnière permet une meilleure affinité pour la liaison de C1q et ainsi d'améliorer cette CDC.

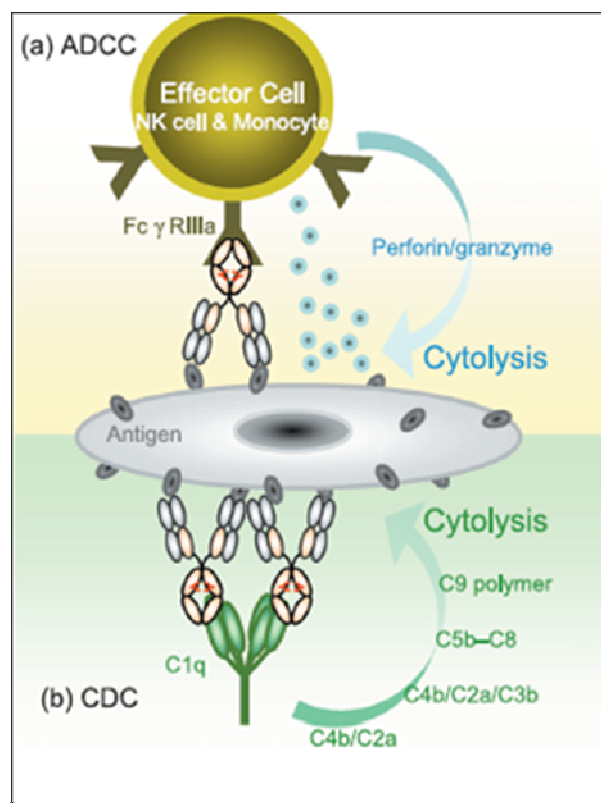


Figure 25: Les mécanismes effecteurs des anticorps monoclonaux : la cytotoxicité cellulaire dépendante de l'anticorps (ADCC) et la cytotoxicité dépendante du complément. De [263]

3.4.3 Voies d'induction d'apoptose

En outre, la liaison des anticorps monoclonaux sur les cellules tumorales peut aboutir à la lyse des cellules tumorales. Deux voies principales d'induction d'apoptose sont rapportées dans la littérature :

- une voie dite extrinsèque, impliquant des récepteurs appartenant à la superfamille des récepteurs au TNF,
- une voie dite intrinsèque impliquant la mitochondrie ; cette voie est gouvernée par des protéines appartenant à la superfamille de Bcl-2.

Ces deux voies conduisent à l'activation de protéases à cystéine appelées caspases, responsables des phénomènes morphologiques et biochimiques observés : externalisation de phosphatidylsérines à la surface de la membrane cellulaire, arrêt de la réplication, fragmentation du noyau et du cytosquelette entraînant la formation de corps apoptotiques phagocytés par les cellules environnantes.

La voie extrinsèque d'apoptose met en jeu les récepteurs spécifiques appelés « Death Receptors » (récepteurs de mort) tels que Fas, DR4 et DR5. (Figure 26) Ces récepteurs sont situés dans la membrane plasmique et contiennent des domaines particuliers appelés Death Effector Domain (DD) au niveau de leur domaine intracellulaire. L'activation de ces récepteurs suite à la liaison de leurs ligands respectifs (FasL ou TNF α) permet la formation d'un complexe DISC (Death Inducing Signaling Complex) composé d'une molécule adaptatrice FADD (Fas Associated Death Domain) et des procaspases-8 et/ou 10. La formation de ce complexe entraîne le clivage des procaspases puis la cascade d'activation séquentielle des différentes caspases parmi lesquelles la caspase-3. L'activation de la caspase 3 entraîne à la fois le clivage d'enzymes critiques pour la réparation de l'ADN tel que PARP

(poly-ADP ribose polymerase) et l'activation d'endonucléases spécifiques. La fragmentation de la chromatine cellulaire en oligonucléosomes est le stade ultime de l'apoptose. Il existe 2 voies de transduction du signal de la voie Fas, dépendant du type cellulaire. Dans les cellules de type 1 comme les thymocytes, la caspase 8 peut activer directement la caspase 3. Dans les cellules de type 2 comme les hépatocytes, la caspase 8 active Bid, provoquant la libération du cytochrome c.

La voie intrinsèque ou voie mitochondriale (Figure 26) est mise en jeu lorsque les cellules sont lésées ou soumises à un stress. Le signal inducteur est essentiellement d'origine intracellulaire (virus, stress cellulaire, dommages de l'ADN). La voie intrinsèque d'apoptose se caractérise par une dépolarisation de la membrane mitochondriale externe et par une libération de cytochrome-c dans le cytosol. Une fois libéré dans le cytosol, le cytochrome-c va se fixer à une protéine adaptatrice, la protéine Apaf-1 (Apoptotic protease-activating factor-1), et va l'activer. Une fois activée Apaf-1 se lie à la procaspase-9. Il se forme alors un complexe trimoléculaire encore appelé « apoptosome » constitué par le cytochrome-c/Apaf-1/procaspase-9 permettant l'activation et la protéolyse de la procaspase-9. La caspase-9 active pourra à son tour activer d'autres caspases et notamment la caspase-3. La phase de libération du cytochrome c est sous le contrôle de petites protéines de la famille Bcl-2. Ainsi, Bcl-2 et Bcl-XL sont capables de bloquer la sortie du cytochrome c alors que Bax peut l'induire. En empêchant la libération du cytochrome c par la mitochondrie, Bcl-2 et Bcl-XL inhibent la formation du complexe APAF1/cytochrome c/procaspase 9 nécessaire à l'apoptose.

3.4.4 Régulation des voies d'apoptose intrinsèque et extrinsèque par p53

L'apoptose et la sénescence sont deux des mécanismes de surveillance « clés » de l'organisme pour limiter la prolifération de cellules potentiellement délétère pour l'organisme. La protéine suppresseur de tumeur p53 joue un rôle fondamental dans ces processus de surveillance.

p53 est une phosphoprotéine nucléaire de 393 acides aminés, qui agit comme un facteur de transcription en se liant directement à l'ADN. p53 contient de nombreux sites de phosphorylation, cibles de kinases impliquées dans les voies de signalisation qui contrôlent la prolifération cellulaire et des sites d'acétylation. Dans les cellules normales, la protéine p53 est assez instable du fait de sa rapide ubiquitinylation par la protéine ubiquitine ligase MDM2 (Murine Double Minute 2) et de sa dégradation consécutive par le protéasome.

Depuis sa découverte en 1979, le rôle de la protéine p53 dans le cancer a été intensivement étudiée. p53 est un suppresseur de tumeur bien connu pour sa capacité à bloquer le cycle cellulaire ou à induire une apoptose en réponse à des signaux de stress.

Plus de la moitié des cancers présente des mutations pour p53. La conséquence fonctionnelle de la mutation de p53 est la perte de la liaison spécifique à l'ADN et de l'activité transcriptionnelle de la protéine dans les tumeurs. En effet, la perte des fonctions oncosuppressives de p53 est un des événements majeurs au cours de l'oncogénèse, et de nombreuses approches thérapeutiques visent à restaurer la fonction de p53 dans les tumeurs.

De nombreuses publications ont montré un rôle de p53 dans la régulation des voies d'apoptose extrinsèque ou intrinsèque. Dans la voie d'apoptose extrinsèque, p53 peut augmenter l'expression des récepteurs membranaires Fas et DR5. En particulier, p53 peut se lier à des éléments se trouvant dans le promoteur et dans le premier intron du gène Fas et ainsi induire son expression. (Figure 26) [278] Cette induction semble être spécifique de certains tissus et intervenir en réponse à des radiations γ . En plus de son action sur la transcription de Fas, p53 peut également augmenter son expression membranaire en accélérant son transport intracellulaire depuis l'appareil de Golgi. [279] Les mécanismes impliqués dans ce phénomène restent à ce jour inconnus. p53 induit également l'expression du récepteur DR5 en réponse à des dommages de l'ADN ou à une irradiation- γ . (Figure 26) [280] La voie

d'apoptose intrinsèque est gouvernée par les protéines de la famille Bcl2, qui contrôlent la libération de cytochrome-c de la mitochondrie. Cette famille de protéines comprend à la fois des protéines anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-XL) et pro-apoptotiques (Bax, Bak). Un certain nombre de membres de cette famille de protéines (telles que Bax, Noxa, PUMA) sont des cibles de p53. Bax est le premier membre de cette famille à avoir été identifié comme une cible de p53. Des éléments de réponse à p53 ont été récemment identifiés dans les gènes Bax, PUMA et Noxa. [281,282]

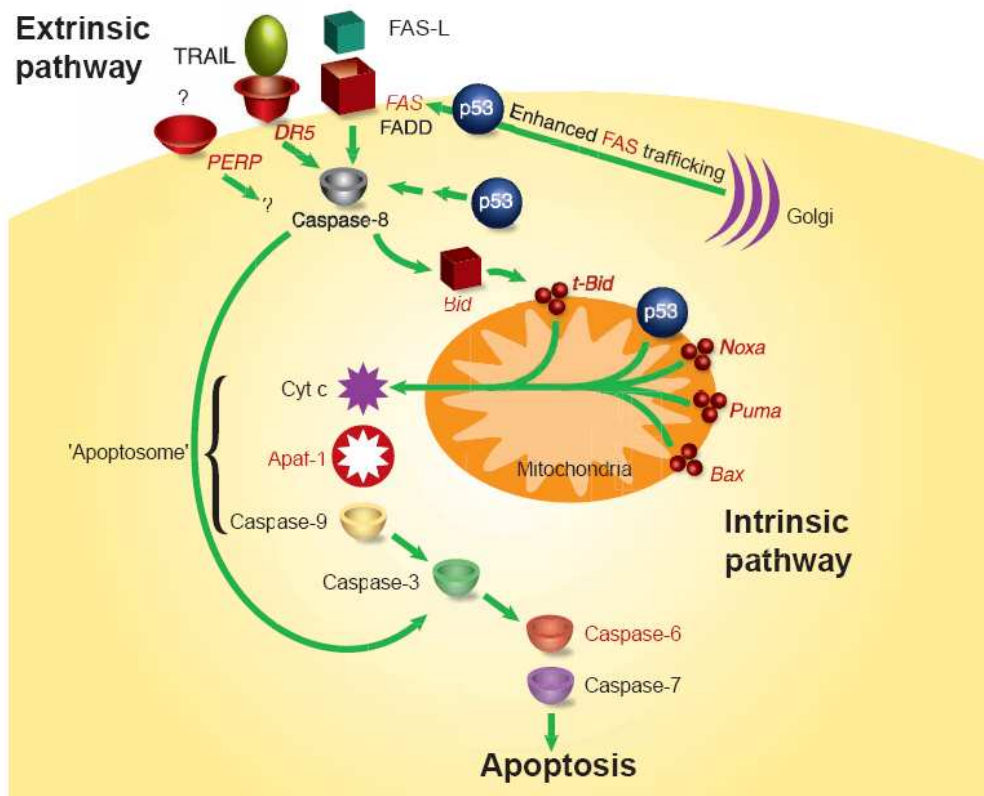


Figure 26 : Implication de p53 dans la régulation de l'apoptose intrinsèque et extrinsèque. D'après Haupt et al, 2003.

3.5 Utilisation des anticorps monoclonaux en thérapeutique

Très rapidement après la publication de Köhler et Milstein en 1975, de nombreux anticorps monoclonaux murins ont été générés à des fins thérapeutiques. Ces anticorps murins possèdent tous un nom se terminant en –momab. Cependant leur utilisation thérapeutique s'est trouvée ralentie du fait des nombreux problèmes liés à leur utilisation (manque de spécificité, courte demi-vie, pénétration limitée dans les tumeurs, production d'anticorps humains anti-souris neutralisants,...). Ce n'est que depuis les quinze dernières années que l'introduction de la nouvelle génération d'anticorps recombinants a permis l'élargissement du panel d'utilisation de ces anticorps monoclonaux. Depuis les années 1990, plus d'une vingtaine d'anticorps monoclonaux ont été approuvés en thérapeutique. Ces nouveaux anticorps thérapeutiques sont à présent couramment utilisés en clinique et apparaissent comme des outils particulièrement efficaces pour le traitement de nombreuses pathologies : en oncologie, mais aussi en cardiologie, en transplantation, dans les pathologies inflammatoires, en dermatologie... (voir Table 6).

L'anticorps OKT3 (anti-CD3) a été le premier anticorps à avoir reçu une autorisation d'utilisation clinique, dans la prévention du rejet aigu de greffes rénales. Il a été pendant longtemps le seul anticorps à montrer un effet clinique. Il a été rapidement rejoint par d'autres anticorps monoclonaux comme l'anticorps monoclonal Abciximab (Reopro®) dirigé contre les récepteurs d'intégrines exprimés à la surface des plaquettes et des cellules vasculaires endothéliales et utilisé pour le traitement des complications thrombotiques lors d'interventions chirurgicales coronariennes; le trastuzumab (Herceptin®) dirigé contre la protéine p185^{HER2} souvent surexprimée dans les cancers du sein, est proposé dans le traitement du cancer du sein métastatique en association avec une chimiothérapie; le rituximab (Mabthera®), anticorps monoclonal chimérisé dirigé contre la protéine CD20,

utilisé dans le traitement du lymphome non hodgkiniens folliculaires ; l'infliximab (Remicade®) et l'adalimumab (Humira®), deux anticorps monoclonaux chimériques anti-TNF α utilisés dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde, notamment en association avec du méthotrexate ; l'omalizumab (Xolair®), un autre anticorps monoclonal humanisé qui cible la région Fc des IgE dans la prévention de la réponse asthmatique aux allergènes. (Table 6)

Anticorps monoclonal	Nom commercial	Type de molécule	Cible	Indications	Statut FDA/EMEA
Muromomab	Orthoclone	Anticorps murin IgG2a	CD3	Prévention du rejet aigu lors de greffe d'organe	FDA : 1986 EMEA : 1987
Abciximab	ReoPro	Fragment d'anticorps chimérique Fab, IgG1	Glycoprotéine IIb/IIIa	Inhibition de l'agrégation plaquettaire après angioplastie	FDA : 1994
Rituximab	Mabthera	Anticorps chimérique IgG1k	CD20	Lymphome folliculaire non-Hodgkinien à cellules B , Polyarthrite rhumatoïde, Leucémie lymphoïde chronique	FDA : 1997 EMEA : 1998
Daclizumab	Zenapax	Anticorps humanisé, IgG1	CD25	Prévention du rejet de greffe	FDA : 1997 EMEA : 1999
Basiliximab	Simulect	Anticorps chimérique IgG1	CD25	Prévention du rejet lors d'une greffe de rein	FDA : 1998 EMEA : 1998
Palivizumab	Synagis	Anticorps humanisé IgG1k	Protéine F du virus respiratoire syncytial	Prévention des infections respiratoires basses (pulmonaires) graves dues au virus respiratoire syncytial (VRS)	FDA : 1998 EMEA : 1999
Infliximab	Remicade	Anticorps chimérique, IgG1	TNF α	Polyarthrite rhumatoïde active, maladie de Crohn, spondylarthrite ankylosante active, psoriasis, rectocolite hémorragique, rhumatisme psoriasique actif	FDA : 1998 EMEA : 1999
Trastuzumab	Herceptin	Anticorps humanisé IgG1k	HER2	Cancer métastatique du sein surexprimant HER2	FDA : 1998 EMEA : 2000
Etanercept	Enbrel	Fragment d'anticorps humain Fc γ 1/TNFR	TNF α et β	Maladies auto-immunes comme la spondylarthrite ankylosante	FDA : 1998 EMEA : 2001
Gemtuzumab ozogamicin	Mylotarg	Anticorps humanisé IgG4k couplé à une immunotoxine (calicheamicine)	CD33	Leucémie aigüe myéloïde	FDA : 2000 retrait 2010
Alemtuzumab	Mabcampath	Anticorps humanisé IgG1k	CD52	Leucémie lymphoïde chronique	FDA : 2001 EMEA : 2001
Ibritumomab tiuxetan	Zevalin 90Y	Anticorps murin IgG1k marqué à l'yttrium 90	CD20	Lymphome non-Hodgkinien à lymphocytes B folliculaire chez des patients réfractaires au rituximab	FDA : 2002 EMEA : 2004
Adalimumab	Humira	Anticorps humain IgG1	TNF α	Maladie de Crohn, Polyarthrite rhumatoïde,	FDA : 2002 EMEA :

				spondylarthrite ankylosante	2003
Alefacept	Amevive	Fragment d'anticorps humain Fcγ1/LFA-3	CD2	Psoriasis chronique	FDA : 2003
Omalizumab	Xolair	Anticorps humanisé IgG1	IgE Fc	Allergies	FDA : 2003 EMEA : 2005
I-131 tositumomab	Bexxar 131I	Anticorps murin IgG2aλ marqué à l'iode 131	CD20	Lymphome non-Hodgkinien à lymphocytes B folliculaire chez des patients réfractaires au rituximab	FDA : 2003
Efalizumab	Raptiva	Anticorps humanisé IgG1	CD11a	Psoriasis modéré et sévère	FDA : 2003 EMEA : 2004
Cetuximab	Erbix	Anticorps chimérique IgG1k	EGFR	Cancer colorectal métastatique exprimant l'EGFR et wt-Kras, cancers squameux de la tête et du cou	FDA : 2004 EMEA : 2004
Bevacizumab	Avastin	Anticorps humanisé IgG1	VEGFA	Cancer colorectal métastatique, cancer du sein métastatique, cancer bronchique non à petites cellules, cancer du rein avancé et/ou métastatique	FDA : 2004 EMEA : 2005
Natalizumab	Tysabri	Anticorps humanisé IgG4k	intégrine α4	Maladie de Crohn sévère active, sclérose multiple	FDA : 2004 EMEA : 2006
Ranibizumab	Lucentis	Fragment d'anticorps humanisé monoclonal IgG1k recombinant Fab	VEGFA	forme «humide» de la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) ou œdème maculaire du au diabète	FDA : 2006 EMEA : 2007
Panitumumab	Vectibis	Anticorps humain, IgG2k	EGFR	Cancer colorectal métastatique exprimant l'EGFR et wt-Kras	FDA : 2006 EMEA : 2007
Eculizumab	Soliris	anticorps humanisé monoclonal recombinant IgG2/4k	protéine C5 du complément	Hémoglobinurie paroxystique nocturne (HPN)	FDA : 2007 EMEA : 2007
Certolizumab	Cimzia	Fragment humain Fab pegylé IgG1	TNFα	Maladie de Crohn , Polyarthrite rhumatoïde active	FDA : 2009 EMEA : 2009
Golimumab	Simponi	Anticorps humain	TNFα	Polyarthrite rhumatoïde active, spondylarthrite ankylosante active, rhumatisme psoriasique actif	FDA : 2009 EMEA : 2009
Canakinumab	Ilaris	Anticorps humain	IL-1β	Traitement du syndrome périodique associé à la cryopyrine	FDA : 2009 EMEA : 2009
Ustekinumab	Stelara	Anticorps monoclonal IgG1k	IL-12/IL-23	Psoriasis en plaques modéré à sévère chez	FDA : 2009 EMEA :

		entièrement humain		l'adulte	2010
Ofatumumab	Arzerra	Anticorps humain	CD20	leucémie lymphoïde chronique résistante à la fludarabine et à l'alemtuzumab	FDA : 2009 EMEA : 2010
Denosumab	Prolia, Xgeva	Anticorps humain	RANK Ligand	prévention d'ostéoporose post-ménopausée, le traitement et la prévention de perte osseuse, traitement préventif des évènements osseux chez les patients souffrant de cancer avec métastases osseuses	FDA : 2010 EMEA : 2010
Tocilizumab	Roactemra	anticorps monoclonal IgG1 humanisé	IL6R	Polyarthrite rhumatoïde (PR) active, modérée à sévère	FDA : 2008 EMEA : 2010
Catumaxomab	Removab	Anticorps hybride rat/souris	CD3/Epcam	ascites malignes positives pour Epcam	EMEA : 2009
Ipilimumab	Yervoy	Anticorps humain	CTLA4	Mélanome métastasé	FDA : 2011
Belimumab	Benlysta	Anticorps humain	BAFF	Lupus érythémateux systémique	FDA : 2011

Table 6 : Les différents anticorps monoclonaux actuellement sur le marché et leurs principales indications.

3.6 Nouvelles approches : fragments d'anticorps, anticorps bispécifiques...

3.6.1 Nouveaux formats

Grâce à l'essor de la biologie moléculaire dans les années 1990, des nouveaux « formats » d'anticorps monoclonaux sont alors produits. En effet, la taille importante des anticorps monoclonaux (de 150kDa à 180kDa en moyenne) ne permet pas une bonne pénétration intratumorale et leur assez longue demi-vie limite leur utilisation pour diverses applications, comme la radio-immunothérapie ou l'imagerie, par exemple. Des fragments d'anticorps tels que les fractions Fab, Fc sont alors assez rapidement générés et réarrangés pour former de nouveaux « formats » possédant de nouvelles propriétés, ou couplés avec des molécules telles que des toxines, des isotopes radioactifs ou des cytokines.

3.6.2 Fragments Fab, scFv (Figure 27)

Les anticorps contiennent 2 fragments différents : le fragment Fab, responsable de la liaison à l'antigène et le fragment Fc, responsable des fonctions effectrices. Ces fragments peuvent être manipulés pour l'obtention de nouveaux formats d'anticorps. Bien qu'ils ne possèdent pas de fonction effectrice propre, les fragments Fab peuvent être des molécules assez intéressantes par leur monovalence et leur élimination rapide par clairance rénale. Un nouveau format d'anticorps a assez rapidement intéressé les chercheurs, les fragments scFv (single-chain fragment variable), d'environ 30kDa. Ces fragments sont composés des domaines variables des chaînes lourdes et légères reliés entre eux par un polypeptide flexible (linker). Ces scFv sont en effet des petites molécules possédant une capacité de liaison aux antigènes comparable à celle des immunoglobulines entières. [283] Cependant, à cause de leur très courte demi-vie (2 heures), ces fragments ne peuvent pas être utilisés seuls, mais plutôt associés à d'autres molécules.

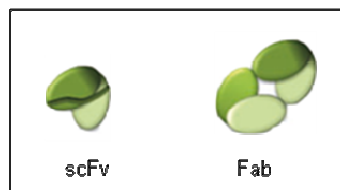


Figure 27 : Fragments d'anticorps monovalents Fab et scFv. D'après [267]

3.6.3 Anticorps bispécifiques (Figure 28)

La génération d'anticorps monoclonaux spécifiques de 2 antigènes a été rendue possible grâce aux techniques de biologie moléculaire. De nombreux fragments d'anticorps monoclonaux dits « bispécifiques » ont donc été développés depuis. La petite taille de ces fragments (60kDa pour les diabodies) permet une bonne pénétration intra-tumorale, et de nombreux fragments

d'anticorps bispécifiques sont actuellement en essai clinique. [284] Les fragments bispécifiques les plus utilisés sont les scFv en tandem, les minibodies et les diabodies. (Figure 28)

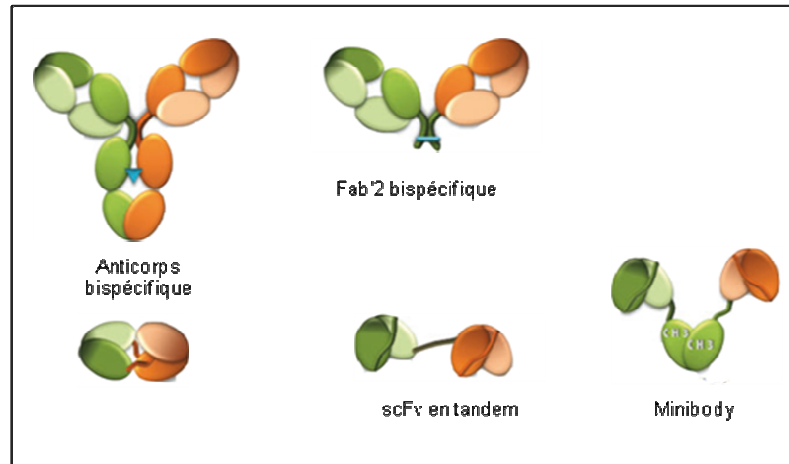


Figure 28: Fragments d'anticorps bispécifiques. D'après [267]

La diminution de longueur de la chaîne polypeptidique entre les chaînes lourdes et légères, permet la formation de dimères, appelé diabodies, mais également de trimères (triabodies) et tétramères (tetrabodies). [285] Grâce à une structure compacte et une taille moyenne (60kDa), les diabodies pénètrent bien les tumeurs, possèdent une bonne solubilité et une bonne stabilité. Les anticorps bispécifiques peuvent lier 2 antigènes différents ce qui est à l'origine de nouvelles fonctions effectrices. L'un des principaux avantages de ces fragments d'anticorps est leur capacité à recruter et à activer des cellules immunitaires effectrices (cellules NK, lymphocytes T cytotoxiques et macrophages), afin que ces cellules lysent ensuite efficacement les cellules tumorales. Les lymphocytes T présentent de nombreux avantages pour cette application puisqu'ils sont les plus nombreux, assez mobiles et qu'ils sont connus pour bien pénétrer dans les tumeurs. Un anticorps bispécifique, le catumaxomab (un anti-CD3 conjugué à un anti-Epcam) a reçu une AMM en 2009 pour le traitement par voie intra-

péritonéale d'ascites malignes chez des malades atteints de carcinomes EpCAM positifs. [286] Il est par ailleurs en phases cliniques de développement pour le traitement de tumeurs ovariennes, de cancers coliques, gastriques et pancréatiques. [287] De nombreux essais pré-cliniques et même cliniques suggèrent que ces anticorps bispécifiques sont des molécules très efficaces pour le traitement des cancers.

3.6.4 Nanobodies (Figure 29)

Les chameaux et les requins produisent des anticorps dépourvus de chaîne légère, appelés HcAbs (« Heavy Chain Antibodies »). [288,289] Ces anticorps sont composés de 2 chaînes lourdes composées d'un simple domaine variable (appelé VHH pour les chameaux et V-NAR pour les requins) de très forte affinité pour un large spectre d'antigènes. Ces petits fragments de 13kDa VHH ou V-NAR peuvent être produits dans des bactéries, dans des levures et peuvent aussi être appelés « domain antibodies » (dAbs), « single-domain antibodies » (sdAbs) ou encore nanobodies. Grâce à une bonne stabilité, une forte affinité, une grande spécificité et une production assez simple, ces nanobodies représentent des molécules particulièrement intéressantes. Plusieurs sdAbs sont actuellement en phases cliniques de développement, dans le traitement de la maladie de Crohn et de la poly-arthrite rhumatoïde.

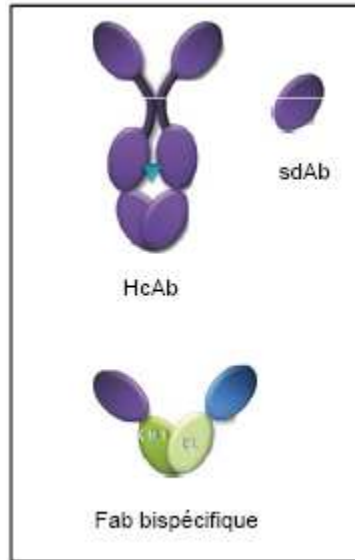


Figure 29 : Les Nanobodies. Les anticorps de chameaux ou de requins (HcAb) sont en bleu. D'après [267]

3.6.5 Couplage de ces fragments (Figure 30)

Grâce à leur bonne pénétration intra-tumorale, les fragments d'anticorps ont rapidement été couplés à de nombreuses molécules, telles que des toxines, des radioisotopes, des pro-drogues, des cytokines.

Pegylation

Un des inconvénients majeur de ces fragments d'anticorps est leur courte demi-vie sérique. De nombreuses équipes ont donc cherché à augmenter la demi-vie de ces molécules grâce à plusieurs approches. L'une consiste à coupler les fragments avec des molécules de polyéthylène glycol (PEG), ce qui augmente considérablement la taille des fragments. Le certolizumab pegol, un fragment Fab anti- $\text{TNF}\alpha$ PEGylés possédant une demi-vie sérique de 14 jours a récemment été approuvé par la FDA pour le traitement de la maladie de Crohn. [290] Cependant ces modifications chimiques conduisent parfois à l'inactivation partielle ou à une moindre affinité de la molécule et de nombreuses autres alternatives sont actuellement à l'étude. Par exemple, la fusion de fragments d'anticorps à de l'albumine humaine peut

augmenter la demi-vie sérique sans affecter leur bioactivité, contrairement à la PEGylation. Des fragments scFv couplés à l'albumine semblent en effet avoir une meilleure biodisponibilité. [291] L'ajout de motifs de N-glycosylation à des diabodies permet également d'augmenter la demi-vie de ces molécules par un facteur 2 ou 3. [292]

Radioisotopes

Pour des applications en imagerie et radioimmunothérapie, les fragments d'anticorps tels que les scFv ou les diabodies peuvent être couplés à un radio-isotope. Conjugués à l'iode ^{123}I ou à l'indium ^{111}In , les diabodies permettent une bonne visualisation des tumeurs in vivo ou de xénogreffes par PET (Positron Emission Tomographie) lorsqu'ils sont conjugués à des isotopes radioactifs. [293] De plus, en radioimmunothérapie une seule injection de diabodies conjugués au ^{90}Y diminue la taille de tumeurs HER2 dans des modèles de xénogreffes murines. [294]. D'autres résultats encore plus prometteurs ont été rapportés avec des diabodies anti-HER2 couplés à l'isotope ^{211}At , avec 60% des animaux sans tumeur un an après une simple injection du conjugué à des souris immunodéficientes Nude portant des tumeurs HER2/Neu-positives établies. [293]

Toxines

Des toxines peuvent être couplées aux fragments d'anticorps. Des résultats intéressants ont été obtenus avec des immunotoxines, comme un fragment de l'exotoxine PE38 de *Pseudomonas*, la toxine diphtérique ou encore la chaîne A de la ricine, fusionnée à un fragment scFv. [295] Cependant ces molécules sont souvent très immunogènes et sont rapidement neutralisées par le système immunitaire. De nombreuses immunotoxines sont actuellement testées en essais cliniques.

Autres : enzymes, cytokines, protéines membranaires

Des fragments d'anticorps peuvent être également conjugués à une enzyme capable de convertir une pro-drogue en une drogue active sur le site tumoral, évitant ainsi les effets

cytotoxiques des drogues sur les cellules saines. Les fragments d'anticorps peuvent être également couplés à des cytokines, capables d'activer le système immunitaire des patients sur le site tumoral. Le couplage des scFvs avec l'IL2, l'IL-15, le GM-CSF, ou encore l'IFN- γ donne des résultats assez impressionnants et de nombreuses constructions sont actuellement en évaluation clinique. [296,297] Enfin, des fragments scFv peuvent être fusionnés à des protéines membranaires, donnant ainsi des récepteurs chimériques. Entre autres, les « T-bodies » sont des lymphocytes T génétiquement modifiés possédant des récepteurs T chimériques dont la portion extra-cellulaire est constituée d'un fragment d'anticorps comme un scFV et dont la portion intra-cellulaire est dérivée de molécules d'activation des lymphocytes comme le CD3 ζ et Fc ϵ RI- γ . [298] Ces récepteurs chimériques sont introduits ex-vivo dans des lymphocytes T périphériques d'un patient grâce à des vecteurs rétro-viraux. Les cellules-T génétiquement modifiées sont ensuite réinjectées au patient. Cette approche a été utilisée avec succès contre de nombreuses cibles, comme des tumeurs, des cellules infectées par le HIV et des cellules effectrices auto-immunes.[299]



Figure 30 : Anticorps conjugués. La molécule rouge représente une toxine ou une cytokine. D'après [267]

3.6.6 Intrabodies

Les intrabodies sont des anticorps spécialement conçus pour être exprimés au niveau-intracellulaire. Ils peuvent reconnaître des composants intracellulaires, et certains ont été ainsi développés pour cibler spécifiquement le noyau, le reticulum endoplasmique, les

mitochondries, les peroxisomes...Ils interagissent spécifiquement avec leurs cibles antigéniques, et peuvent alors bloquer ou modifier spécifiquement l'activité biologique de la protéine cible. [300]

OBJECTIFS DE NOTRE TRAVAIL DE THESE

Notre travail de thèse s'est organisé en 2 grands axes d'étude.

1. La NRP2 induit une TEM TGFβ1-dépendante dans des cellules de cancer colorectal.

Nous avons tout d'abord souhaité confirmer l'intérêt du ciblage thérapeutique de la NRP2, dans le cadre du développement de thérapeutiques ciblées en cancérologie. Pour cela, nous avons montré l'importance de la NRP2 dans la progression tumorale notamment par son implication dans la voie de signalisation du TGFβ1 et dans le processus de TEM. Ce travail a fait l'objet d'un article scientifique dans le journal *Plos One* en 2011. (Grandclement C et al, « *Neuropilin-2 expression promotes TGFβ1-epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer cells* », Plos One 2011, accepted)

2. Développement d'anticorps monoclonaux thérapeutiques anti-NRP2

La NRP2 n'étant pas ou très peu exprimée au niveau de tissus sains de diverses origines, elle semble donc spécifique des tissus tumoraux. De plus, cette glycoprotéine semble impliquée dans différents mécanismes participant à la progression tumorale, comme l'angiogénèse, l'invasion, et la TEM. Dans ce contexte, la NRP2 apparaît comme une cible extrêmement intéressante dans le cadre du développement de nouvelles thérapies ciblées anti-cancéreuses. Parallèlement à ce premier axe d'étude, nous avons donc développé des outils thérapeutiques ciblant spécifiquement cette NRP2 humaine. Des anticorps monoclonaux murins anti-NRP2 ont ainsi été produits dans le cadre d'une collaboration entre notre unité de recherche et le laboratoire Diaclone-GenProbe. A l'issue de cette production d'anticorps monoclonaux murins anti-NRP2, nous avons sélectionné des anticorps spécifiques de la NRP2 et bioactifs. Plusieurs tests de bioactivité tels que des tests de prolifération cellulaire, de formation de

colonies en milieu agar et d'induction d'apoptose ont notamment été réalisés dans cet objectif. Un de ces anticorps anti-NRP2, l'anticorps ITAC-B1 semble pouvoir induire une apoptose des cellules tumorales exprimant la NRP2 et également restaurer l'expression de p53 dans ces cellules. Cet anticorps monoclonal ITAC-B1 montrant une certaine bioactivité a notamment fait l'objet d'un dépôt de brevet en 2010. (Grandclement C, Borg C, Wijdenes J « *Induction of p53 expression by neutralization of neuropilin-2 for the treatment of cancers* » WO2010/023382A1, 04/03/2010.)

Cette phase de production et de développement d'anticorps monoclonaux neutralisant spécifiquement la NRP2 humaine a été prioritaire dans notre travail de thèse, ce qui explique une soumission tardive de notre travail sur la participation de la NRP2 à la TEM au journal *Plos One*, en 2011.

RESULTATS

PUBLICATION N°1

Grandclement C, Pallandre J.R, Valmary Degano S, Viel E, Bouard A, Balland J, Rémy-Martin JP, Simon B, Rouleau A, Boireau W, Klagsbrun M, Ferrand C, Borg C. « Neuropilin-2 expression promotes TGF β 1-epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer cells », *Plos One* 2011, *in press*.

INTRODUCTION A LA PUBLICATION N°1

1. Etude préliminaire

Notre équipe s'intéressant particulièrement aux relations entre le système immunitaire et les tumeurs, nous avons commencé l'étude de la NRP2 dans ce contexte. Une étude suggérait en effet que la NRP1 pouvait médier la prolifération de lymphocytes T induite par des cellules dendritiques et qu'elle jouait ainsi un rôle important dans les interactions cellulaires. [38] Dans ce contexte, nous nous étions demandé au début de notre travail de thèse si la NRP2 ne jouait pas un rôle dans le système immunitaire et plus particulièrement dans l'immunité anti-tumorale. Tandis que la NRP1 et ses ligands étaient retrouvés sur bon nombre de cellules tumorales et de cellules immunitaires, la NRP2 n'était que très peu retrouvée sur les cellules immunitaires. En effet, nous n'avons remarqué aucune expression de NRP2 sur les lymphocytes CD4+, CD8+, ni sur les lymphocytes régulateurs ni sur les cellules dendritiques immatures. Seules les cellules dendritiques matures semblent exprimer NRP2. Par contre, des quantités non négligeables de NRP2 étaient retrouvées sur des lignées de cancer colorectal. En parcourant la littérature relative à l'expression de cette protéine membranaire, nous nous sommes aperçus que très peu d'études s'étaient intéressées à l'expression de la NRP2 par les cellules tumorales humaines jusque là, tandis que l'expression de la NRP1 avait été largement plus étudiée.

La seconde étape de notre travail a consisté en la génération de lignées transgéniques humaines de cancer colorectal exprimant ou non la NRP2, afin d'étudier l'influence de l'expression de cette protéine dans le contexte des réponses immunitaires anti-tumorales. Grâce à l'utilisation d'un siRNA ciblant spécifiquement la NRP2, nous avons pu diminuer l'expression de NRP2 dans la lignée d'adénocarcinôme colorectal Colo320. A l'inverse, nous

avons induit l'expression de NRP2 grâce à une technique de transfert de gène dans la lignée cellulaire HT29. Tandis que l'expression de NRP2 ne semble pas moduler les réponses lymphocytaires anti-tumorales, elle semble cependant à l'origine de modifications structurales et fonctionnelles importantes dans les cellules tumorales. Nous avons à partir de ce moment réorienté notre travail vers l'étude des conséquences sur le plan fonctionnel de l'expression de la NRP2 dans des cellules tumorales d'adénocarcinôme colorectal.

2. Expression de la NRP2

L'expression de la NRP2 a été caractérisée plus largement par immunohistochimie au niveau de tissus sains et tumoraux de diverses origines, dans le cadre d'une collaboration avec le laboratoire d'Anatomie-Pathologie du Centre Hospitalier Universitaire de Besançon. Des tissus tumoraux de cancer colorectal, de cancer du pancréas, du rein et du sein expriment spécifiquement la NRP2, tandis qu'aucune expression de NRP2 n'est retrouvée dans les tissus sains des mêmes origines. Tandis que nous commençons à étudier l'expression de la NRP2 au sein des tumeurs humaines, plusieurs études s'intéressant à l'expression de la NRP2 dans les cancers du colon, du pancréas et du sein sont parues en 2008 et 2009, nous confirmant alors tout l'intérêt du ciblage de la NRP2 dans le cadre du développement de stratégies thérapeutiques ciblées anti-tumorales.

3. NRP2 et progression tumorale

Plusieurs études montraient déjà une implication de la NRP2 dans la formation des vaisseaux sanguins au début de notre travail de thèse en 2008. Les NRPs ayant été identifiées au niveau des cellules endothéliales humaines, les premières études se sont donc naturellement penchées sur l'implication de ces glycoprotéines dans le mécanisme général de vasculogénèse. Tandis que la NRP1 semble particulièrement impliquée dans l'angiogénèse, la NRP2 jouerait plutôt

un rôle dans la lymphangiogénèse. Cependant aucune étude ne mentionnait un rôle propre de la NRP2 dans les cellules tumorales au début de notre travail de thèse en 2008. La modulation de l'expression de NRP2 dans les lignées cellulaires de cancer colorectal HT29 et Colo320 par transfert de gène ou siRNA nous a permis l'étude précise du rôle de la NRP2 dans la prolifération, l'invasion cellulaire in vitro et dans la pousse de tumeurs xénotransplantées in vivo.

4. NRP2 et TEM

En outre, dans notre étude, la transfection du gène de la NRP2 humaine dans les cellules HT29 est à l'origine de modifications structurales et phénotypiques importantes en culture. En effet, 72h après transfection par le vecteur d'expression pcDNA3.1-NRP2+, les cellules HT29 prennent une forme allongée, fibroblastique, forme caractéristique des cellules subissant un processus de TEM. Nous avons donc tout naturellement émis l'hypothèse d'une implication de la NRP2 dans la TEM. Les marqueurs phénotypiques caractéristiques de la TEM ont pour cela été évalués par western-blot et RT-PCR dans nos lignées cellulaires. L'implication de la NRP2 dans diverses voies de signalisation participant à la TEM comme dans la voie du TGF β 1 et de la β -caténine a également été évaluée par différentes techniques expérimentales telles que du western-blotting, des expériences de co-immunoprécipitations, de la microscopie confocale, de Biacore et d'analyse de promoteur par un test en luciférase. Ces différentes analyses suggèrent que la NRP2 est à l'origine d'une TEM TGF β 1-dépendante dans des cellules d'adénocarcinôme colorectal. Aucune autre étude ne suggèrait un lien entre NRP2 et TEM jusqu'à présent.

PUBLICATION N°1

Ce travail a fait l'objet d'un article scientifique dans le journal *Plos One* en 2011.

(Grandclement C et al, « *Neuropilin-2 expression promotes TGF β 1-epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer cells* », Plos One 2011, accepted)

Neuropilin-2 Expression Promotes TGF- β 1-Mediated Epithelial to Mesenchymal Transition in Colorectal Cancer Cells

Camille Grandclement^{1,2,3}, Jean René Pallandre^{1,2,3}, Séverine Valmary Degano⁴, Erika Viel⁵, Adeline Bouard^{1,2,3}, Jérémy Balland^{1,2,3}, Jean-Paul Rémy-Martin^{1,2,3}, Benoit Simon⁶, Alain Rouleau⁶, Wilfrid Boireau⁶, Michael Klagsbrun⁷, Christophe Ferrand^{1,2,3}, Christophe Borg^{1,2,3,5*}

1 INSERM UMR 645, Besançon, France, **2** University of Franche-Comté, Besançon, France, **3** EFS Bourgogne Franche-Comté, Besançon, France, **4** Department of Pathology, CHU Besançon, Besançon, France, **5** Department of Medical Oncology, CHU Besançon, Besançon, France, **6** FEMTO-ST Institute, University of Franche Comté, Besançon, France, **7** Department of Surgery and Pathology, Children's Hospital, Boston, Massachusetts, United States of America

Abstract

Neuropilins, initially characterized as neuronal receptors, act as co-receptors for cancer related growth factors and were recently involved in several signaling pathways leading to cytoskeletal organization, angiogenesis and cancer progression. Then, we sought to investigate the ability of neuropilin-2 to orchestrate epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer cells. Using specific siRNA to target neuropilin-2 expression, or gene transfer, we first observed that neuropilin-2 expression endows HT29 and Colo320 for xenograft formation. Moreover, neuropilin-2 conferred a fibroblastic-like shape to cancer cells, suggesting an involvement of neuropilin-2 in epithelial-mesenchymal transition. Indeed, the presence of neuropilin-2 in colorectal carcinoma cell lines was correlated with loss of epithelial markers such as cytokeratin-20 and E-cadherin and with acquisition of mesenchymal molecules such as vimentin. Furthermore, we showed by surface plasmon resonance experiments that neuropilin-2 is a receptor for transforming-growth factor- β 1. The expression of neuropilin-2 on colon cancer cell lines was indeed shown to promote transforming-growth factor- β 1 signaling, leading to a constitutive phosphorylation of the Smad2/3 complex. Treatment with specific TGF β -type1 receptor kinase inhibitors restored E-cadherin levels and inhibited in part neuropilin-2-induced vimentin expression, suggesting that neuropilin-2 cooperates with TGF β -type1 receptor to promote epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer cells. Our results suggest a direct role of NRP2 in epithelial-mesenchymal transition and highlight a cross-talk between neuropilin-2 and TGF- β 1 signaling to promote cancer progression. These results suggest that neuropilin-2 fulfills all the criteria of a therapeutic target to disrupt multiple oncogenic functions in solid tumors.

Citation: Grandclement C, Pallandre JR, Valmary Degano S, Viel E, Bouard A, et al. (2011) Neuropilin-2 Expression Promotes TGF- β 1-Mediated Epithelial to Mesenchymal Transition in Colorectal Cancer Cells. PLoS ONE 6(7): e20444. doi:10.1371/journal.pone.0020444

Editor: Hang Thi Thu Nguyen, Emory University, United States of America

Received: November 17, 2010; **Accepted:** May 3, 2011; **Published:** July 1, 2011

Copyright: © 2011 Grandclement et al. 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.

Funding: Grant API-CHU 2008 of the University Hospital of Besançon; CG received a fellowship from the French "agence nationale pour la recherche technologique"; JRP received a fellowship from the regional council of Franche Comté; a grant from the "ligue contre le cancer du doubs" supported this work. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: christophe.borg@efs.sante.fr

Introduction

Neuropilins (NRPs) are transmembrane non-tyrosine kinase glycoproteins originally described in the nervous system. Neuropilin (NRP) family consists of two genes, neuropilin-1 (NRP1) and neuropilin-2 (NRP2). During nervous system development, NRP1 and NRP2 play a critical role in axon retraction and guidance by binding class III semaphorins [1]. Initially characterized as neuronal receptors, NRPs were also found to be expressed in endothelial cells and subsequently were shown to play a role in the development of the vascular system [2].

NRPs display a short intracytoplasmic tail which does not contain a kinase domain. Initial investigations of neuropilin-dependent molecular pathways suggested that neuropilins can not directly transmit intracellular signals. This led to the proposal that heterodimerization with other receptors are required to mediate neuropilin-downstream signaling. One of these co-receptor complexes

described so far involves vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR) [3,4,5]. Besides the amplification of VEGFR signaling, NRPs might interact with plexins to mediate class 3 semaphorin signal transduction via Rho-related G proteins, modulating cytoskeleton organization [6].

Nevertheless, a highly conserved amino-acid sequence promoting NRPs intracellular tail binding to the PDZ domain of GAI-C terminus interacting protein-1 (GIPC-1) was recently reported suggesting the possibility that NRPs might regulate alternative biological functions [7].

The multiple functions of NRPs were recently highlighted by the identification of NRP role in oncogenesis. Besides the presence of NRPs on tumor-associated vessels, NRPs were expressed by a large variety of tumors, suggesting a potential role of this glycoprotein in cancer progression. Indeed, NRP2 expression was found in osteosarcoma [8], melanoma [9], lung cancers [10,11], brain tumors [12,13] colon cancers [14], pancreatic cancers [15,16,17],

breast cancers [18], myeloid leukemia [19], salivary adenoid cystic carcinoma [20], infantile hemangioma [21], ovarian neoplasms [22] and bladder cancers [23]. In colon carcinoma, NRP2 directly promotes tumor progression in a cell autonomous manner (see review of NRP2 expression on cancer cells in Table S1). It was suggested that NRP2 oncogenic properties rely on an increased VEGFR1 phosphorylation and an activation of the VEGFR1/Pi3K/Akt signaling. [14] However, the precise molecular pathways driven by NRP2 and involved in oncogenesis remain largely unknown.

Epithelial-mesenchymal transition (EMT) is one of the major molecular mechanisms carried out during oncogenesis to promote cancer progression. EMT is characterized by a breakdown of cell junctions, the loss of epithelial characteristics and cell polarity, contributing to carcinoma progression. Besides the gain of mesenchymal markers, EMT endows cancer cell for migration, invasiveness and subsequent metastasis formation [24]. Despite several studies pertaining to the role of NRP2 in cancer progression, no substantial evidence established an involvement of this molecular pathway in EMT.

Here, we used colon cancer cell lines transfected with NRP2 transgene or siRNA to investigate NRP2 involvement in EMT. These experiments provided evidence that NRP2 endows colon cancer cell lines for colony and xenograft formation. Moreover, a conversion from epithelial to fibroblast-like shape was triggered by NRP2 expression, as well as the acquisition of vimentin and EMT specific transcription factors. Then, we examined the influence of NRP2 on transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) signaling that is believed to contribute to the late-stage carcinoma by inducing EMT. We showed that NRP2 promotes a constitutive Smad2/3 phosphorylation in colon cancer cell lines. Moreover, specific siRNA targeting NRP2 or treatment with pharmacological inhibitors of TGF- β 1 type 1 receptor (TGF β RI) prevented Smad2/3 phosphorylation and the NRP2-mediated EMT of colorectal cancer cells. Collectively, these results suggest that NRP2 cooperates with TGF β RI to promote EMT in colorectal carcinoma.

Materials and Methods

Cell culture

Human cell lines HT29, Colo320, SW620, MCF7, Caki, A498, HEK293 were purchased from the American Type Cell Culture Collection and were cultured in RPMI1640 or DMEM (Lonza, Paris, France) supplemented with 10% heat inactivated endotoxin

free fetal calf serum (FCS), (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). Bes-PAC01, Bes-PAC03, Bes-PAC04 and Bes-PAC05 (Pancreatic Adeno-Carcinoma) cell lines were originally isolated from ascitic fluids derived from four patients with pancreatic adenocarcinomas, in our university hospital. R3III cell line was kindly provided by Nathalie Labarriere, Inserm (Nantes, France). Jijoye and Raji cell lines (Human Burkitt Lymphoma) were provided by Dialclone (Besançon, France). Cell lines used in this study were authenticated using DNA profiling (short tandem repeats analysis), in line with ATCC's recommendations (see Table 1). Short tandem repeat (STR) analysis is a molecular biology method recommended for cell line identification. Cell lines used in this study were genotyped before freezing and every two months. STR analysis was performed with the AmpFISTR Identifier PCR Amplification Kit (Applied Biosystems). Height specific loci including tandem repeats on DNA from cancer cell lines were analyzed. STR analysis measures the exact number of repeating units for each allele (D7S820 8,20 means that 8 and 20 repeats are identified on each allele of the D7S820 locus for the cell line Jijoye). If a variant appears that contains a partial repeat, that partial repeat unit is designated by a decimal followed by the number of bases in the partial repeat.

pcDNA Expression plasmids

The influence of NRP2 on colon cancer cell progression was assessed by transferring NRP2 gene in the HT29 cell line. We generated HT29^{NRP2} cell lines using two expression plasmids encoding hNRP2 (pcDNA3.1-NRP2, kindly provided by M. Klagsbrun) and pCMV6-XL5-NRP2 (purchased from Origene (Rockville, MD, USA). Control HT29 cells were generated using pcDNA3.1 or pCMV6-XL5 vectors. 1.5×10^6 HT29 cells were seeded in a 60 mm³ flask in 4 mL medium and incubated for 24 h. Then, cells were stably transfected with 1 μ g of pcDNA3.1-NRP2 or pCMV6-XL5-NRP2 expression vectors or control vectors using the Effectene kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's instruction. Cells transfected with pcDNA3.1 vectors were selected with 0.8 mg/mL of geneticin (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France), 48 h following the transfection.

Small Interfering RNA

Using the Ambion siRNA web design tool, we identified one potential NRP2-specific target sequence. Specific NRP2 siRNA (sense 5'-AAA GGC TGG AAG TCA GCA CTA ATT T-3' and anti-sense 5'-AAA AAT TAG TGC TGA CTT CCA GCT T-3')

Table 1. DNA STR (Short Tandem Repeats) profiling of tumor cell lines.

	D7S820	CSF1PO	TH01	D13S317	D16S539	vWA	TPOX	D5S818
Jijoye	8,10	10,11	7,9	12	10,11	15,19	6,8	12
SW620	8,9	13,14	8	12	9,13	16	11	13
Caki-1	8,12	10,11	6,8	11,12	12	15,17	8,11	11,12
MCF-7	8,9	10	6	11	11,12	14,15	9,12	11,12
A498	10,11	11,12	6, 9,3	12	12	18	8,11	11,13
Colo320	9,12	11	8,9	11	11,12	15,18	8,9	12
HT29	10	11,12	6,9	11,12	11,12	17,19	8,9	11,12
5637	10,11	11	7,9	11	9	16,18	8,9	11,12
HEK293	11,12	11,12	7,9,3	12,14	9,13	16,19	11	8,9
MDAMB231	8,9	12,13	7,9,4	13	12	15,18	8,9	12
Raji	10	10,12	6,7	13	8,11	16,19	8,13	10,13

doi:10.1371/journal.pone.0020444.t001

and scramble siRNA (sense 5'-AAAGGAGGGGCATGCCACG-TTGG-3' and anti-sense 5'-AAAACCAACGTTGGCATGCCCC-TC-3') sequences were annealed and cloned into the BbsI site of the 3' LTR of pFIV-H1/U6 vector according to manufacturer's instructions (System Biosciences, Mountain View, CA). Sequences were confirmed by NIH BLAST analysis to have no substantial homology to sequences in other vertebrate genes. Lentiviral supernatant production and subsequent infection of cells were performed according to manufacturer's instructions (System Biosciences, Mountain View, CA). Colo320 stably transfected were selected with 3 µg/mL of puromycin (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France), 48 h following the transfection.

Flow cytometry

Anti-NRP2, anti-NRP1, anti-pSmad2/3, anti-TGFβ1, anti-TGFβR1 were from Santa-Cruz Biotechnology (Heidelberg, Germany). Anti-smad2/3 and anti-TGFR11, were from RD system (Lille, France). Alexafluor488-labelled secondary antibodies were purchased from Fluoroprobes (Interchim, Montluçon, France). Ten thousands cells from each sample were evaluated for fluorescence detection using BD FACSCanto cytometer. (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France) For intracellular staining, cells were fixed for 20 min at 4°C in 2% paraformaldehyde. Staining was then realized at room temperature for 30 min in a buffer containing 0.4% saponin and 5% FCS. Wash buffer contained 0.1% saponin, 5% FCS. For flow cytometry analysis, Relative Fluorescence Intensity (RFI) was calculated.

Cell Proliferation Assay

Cell proliferation in vitro was analyzed with the tetrazolium salt 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazolium bromide (MTT). Briefly, 4000 cells per well were seeded in 96-well microplates containing 100 µL of medium per well. For analysis, 10 µL of MTT substrate (of a 5 mg/mL stock solution in phosphate-buffered saline) was added to each well, and the plates were let to standard tissue incubator conditions for an additional 2 hours. Cells were solubilized in 200 µL of dimethyl sulfoxide, and colorimetric analyses were performed (wavelength, 570 nm). The plates were assayed every 24 hours for next 3 consecutive days.

ELISA assay

Cells were incubated in RPMI or DMEM-1% FCS for 24 h. Then cells were counted and 10000 cells per well were seeded in 96-microplate in 200 µL DMEM-0.1% FCS for 24 h. VEGF production was assessed on supernatants using human VEGF ELISA kit (Strathmann Biotec, Hamburg, Germany).

Flow Cytometry Analysis of DNA Content

Cells were harvested by trypsinization, washed with ice-cold PBS, fixed in 70% ethanol. Prior to DNA analysis, cells were stained with 50 µg/mL propidium iodide (Sigma-Aldrich, Lyon, France) and 2 µg/mL DNase-free RNase (Sigma-Aldrich, Lyon, France) for 15 min at 37°C in the dark. DNA content was measured using a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France) and analyzed with the CellQuest program.

Xenograft experiments

Nude mice were obtained from Janvier (Le Genest St Isle, France), and maintained in our animal facility according to the Animal Experimental Ethics Committee Guidelines. 1×10^6 cells of HT29^{ctrl}, HT29^{NRP2}, Colo320^{si-RNA-NRP2} and Colo320^{siRNA-ctrl} cell lines resuspended in 100 µL of PBS were inoculated

subcutaneously in nude mice and tumor growth was monitored biweekly in each group. Tumor volume was calculated by the formula $V = 1/2 a \times b^2$, where a is the longest tumor axis, and b is the shortest tumor axis. When tumors reached 1 cm in diameter, mice were sacrificed and tumors were fixed in formal for subsequent immunohistochemical analysis.

Colony formation assay

Effect of NRP2 expression on colony formation in vitro was evaluated by soft agar colony-formation assay. 5000 cells per well were seeded in 500 µL of 2% agarose medium in a 24-well plate. Cells were incubated at 37°C, 5% CO₂ and photos were taken after 10 days of culture.

Invasion assay

Invasion was evaluated using 96W QCM Invasion Assay (Millipore, USA). Briefly, equal number (10000) of control cells (HT29^{ctrl}) or NRP2 expressing cells (HT29^{NRP2}) resuspended in serum-free medium were placed in the top compartment of a standard 8 µm pore Boyden chamber. Feeder tray wells contained serum free medium or medium 10% FCS. Following 16 hours invasion (37°C, 5% CO₂), invasive cells were incubated with cell detachment buffer, lysed and marked with CyQuant GR dye. (QCM 96W Assay, Millipore, International). Fluorescence was then evaluated with a fluorescence plate reader (Cell Lab Quanta, Beckman-Coulter) using a 480–520 nm filter set.

Cell Treatments

TGF-β1 signaling was inhibited using SD-208 or SB-431542 (TGFR1 kinase inhibitor) diluted in DMSO (Sigma-Aldrich, Lyon, France). DMSO served as control medium in all experiments. In some experiments Avastin (Pharmacy of CHU Jean Minjoz, Besançon, France) was used to inhibit VEGF-A. TGF-β1 was purchased from RD System (Lille, France).

Western Blot analysis

Briefly, after two washing steps, cells were harvested and solubilized in lysis buffer containing 1 mM EDTA, 1 mM NaF, 1 mM Vanadate and one complete Mini protease Inhibitor Cocktail Tablet (Complete Mini EDTA Free, per 10 mL of lysis buffer, Roche, France). 30 µg of whole-cell lysates were separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to polyvinylidene difluoride membranes by electroblotting. The blots were then blocked for 1 h in 5% milk before incubation with specific antibodies as follows: anti-NRP2 and anti-twist1 (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany), anti-Smad2/3 (R&D System, Lille, France), anti-vimentin, anti-Ecadherin, anti-TGFβ1, anti-smad2/3, anti-pSmad2, anti-sna1 (all from Cell Signaling Technology, Danvers, USA). All antibodies were diluted in Trisbuffered saline and 0.1% (v/v) Tween-20 containing dried milk. Blotted proteins were detected and quantified on a bioluminescence imager and BIO-ID advanced software (Wilber-Lourmat, Marne-la-Vallée, France), after incubating blots with a horseradish peroxidaseconjugated appropriate secondary antibody (Beckman Coulter, Paris). For some experiments, cytoplasm and nuclear subcellular fractions were harvested after differential centrifugation in adapted buffers; the presence or absence of subcellular specific proteins (such as β-actin or histone H1) attested to subcellular separation.

Co-immunoprecipitation analysis

Cells were lysed in PBS containing 200 mM of TRIS-Hcl pH 7.4, 100 mM NaCl, 1% v/v tritonX100, 1 mM DTT, 15 mM

EGTA, 1 mM NaF, 1 mM vanadate and one complete Mini protease Inhibitor Cocktail Tablet (Complete Mini EDTA Free, per 10 mL of lysis buffer, Roche, France). Rabbit anti-TGFRI polyclonal antibodies (Santa-Cruz Biotechnology) and Rabbit IgG polyclonal antibodies were added to the lysates at a final dilution of 1/100 and incubated overnight at 4°C. Protein-G magnetic beads (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) were added to the mix and incubated for additional two hours at 4°C. Proteins were then eluted by magnetic separation and denatured. Western-Blot was then performed using anti-NRP2 antibody (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany).

Histopathologic Analysis and Immunohistochemical Staining of Tissues

Tissue samples, obtained from xenografts were fixed in 4% formalin and paraffin embedded. Then, blocks were cut serially at 4- μ m thickness. HES (Hematoxyline Eosine Safran) staining was used to assess morphology. A standard immunohistochemical technique was performed using a Ventana BenchMark XT (Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, Arizona) immunostainer with the following primary antibodies: anti E-cadherin (Zymed, San-Francisco, USA), anti-cytokeratin-20 (Zymed, San-Francisco, USA).

Surface Plasmon Resonance analysis

Design and fabrication of homemade chips compatible with SPR (Surface Plasmon Resonance) have been performed as previously published with the help of the MIMENTO technological platform, Besançon, France [25]. The NRP2 chips fabricated in this study consist in the covalent grafting of Fc-NRP2 entities on chemically activated self assembled monolayer following the procedure of protein chip building recently published [26]. Fc-NRP2 were from RD System (Lille, France). This procedure leads to a coverage of 7.4 \pm 0.1 femtomole/mm² of NRP2. Injections of BSA (Control -), VEGF (Control+) and TGF β 1 are performed at 250 nM in PBS-Tween 0.05%, pH 7.4. Biacore experiments were performed with the Biacore 2000 apparatus at 25°C with a flow rate comprise between 2 and 30 μ l/min.

Real Time-quantitative PCR (RT-qPCR)

Total RNA were extracted using Kit RNeasy mini (Qiagen, Courtaboeuf, France) and reverse transcribed using random hexamers and Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Life Technologies, Rockville, MD, USA). Duplicate samples were subjected to RT-qPCR. mRNA were quantified using primers listed below: NRP2 (Hs00187290_m1), Sna11 (Hs001955991_m1), TGF- β 1 (Hs00171257_m1), Gli1 (Hs00171790_m1), Twist1 (Hs00361186_m1) (Applied Biosystems).

ABL mRNA from each sample was quantified as an endogenous control of internal RNA. Relative mRNA expression was calculated using the Delta-Delta-Ct method and untreated cells were used as calibrator.

Slide preparation and confocal microscopy

Cells were spread onto Labteck chamber slides (Sigma-Aldrich, Lyon, France) and subsequently treated with the appropriate reagents. Cells were fixed in 4% paraformaldehyde and permeabilized with 0.1% Triton X100. After 20 minutes of blocking in 20% fetal bovine serum and washing, cells were stained with appropriate antibodies. Stacks of confocal images were collected with an Olympus FV1000 laser scanning confocal microscope. Cell nuclei were counterstained with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole). For fluorescence quantification, ratio of fluorescence

intensity was calculated in each condition. Ratio of fluorescence intensity was calculated in dividing the nuclear fluorescence by the cytoplasm-membrane fluorescence. Fluorescence intensity of 50 cells has been analyzed in each condition.

Smad reporter assay

We have used the TGF- β reporter assay from SABiosciences (Qiagen, Courtaboeuf, France) for the quantification of TGF- β -induced SMAD2/3 signaling. Quantification of the firefly luciferase was realized using a Dual-Luciferase Reporter assay system (Promega Co, Madison, USA) according to the manufacturer's protocol. All transfections were performed in triplicate using Lipofectamine kit (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). After 24 h of transfection, medium was changed and cells were treated by 50 ng/mL of TGF- β 1 for additional 24 hours. Results are presented as the ratio between the *firefly luciferase* activity and the *renilla luciferase* activity (Ren/Luc) for each conditions. Then, values were reported to the values of the negative control.

Statistical analysis

Results are expressed as the mean plus or minus the standard error of the mean (SEM). Group comparisons were performed using Student *t* test. Differences were considered significant at $p < 0.05$.

Results

NRP2 expression in human cancer cell lines

We first sought to examine the expression of NRP2 glycoprotein in various cancer cell lines. Immunofluorescence analysis confirmed that NRP2 is expressed at the membrane of several human cancer cell lines (Figure 1A). Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC), isolated from normal human umbilical vein, were used as a positive control for NRP2 expression. We observed NRP2 expression at the membrane of 2 out of 3 colon cancer cell lines (SW620, Colo320 but not HT29). NRP2 was also expressed in all renal cancer cell lines tested (HEK 293, Caki, R3III and A498), in two of four pancreatic cancer cell lines (Bes-PAC03 and Bes-PAC04, derived from patient's ascitic fluid in our institute), in NCIH441 lung cancer cell line and in 5637 bladder cancer cell line (Figure 1A). MDAMB231 breast cancer-cell line expressed NRP2 whereas no NRP2 staining was found on Burkitt lymphoma cells lines (Raji, Jijoye) (Figure 1A).

Immunohistochemistry studies were then undertaken to determine if NRP2 is expressed at the membrane of various paraffin embedded-human cancer specimen. NRP2 was expressed on 3 out of 10 colon carcinoma, 5 out of 15 breast carcinoma and 4 out of 12 pancreatic carcinoma. Of note, NRP2 was not detected on prostate cancers (n = 10) and B cell lymphoma (n = 10) (data not shown). Moreover, immunohistochemical staining showed that NRP2 is expressed at the membrane of human colon carcinoma and breast carcinoma while it is not expressed in non malignant tissues (Figure 1B). Our results are concordant with previous published reports. Indeed, in a recent study, Gray et al observed that NRP2 was not detectable in nonmalignant colonic mucosa but was evident in 10 (83%) of 12 adjacent colon adenocarcinoma and in five (71%) of seven liver metastases by IHC staining. Moreover, in another study, NRP2 expression was found in 5 out of 6 (83%) commonly used pancreatic cell lines [15] and in 7 out of 11 (64%) surgical specimens of pancreatic adenocarcinoma by IHC staining [14]. Finally, in breast cancer, Yasuoka et al reported Nrp2 expression in 60 out of 113 invasive breast carcinoma (53.1%) [18]. From these various studies, it appears that NRP2 seems to be specific of several tumor tissues, while no expression of

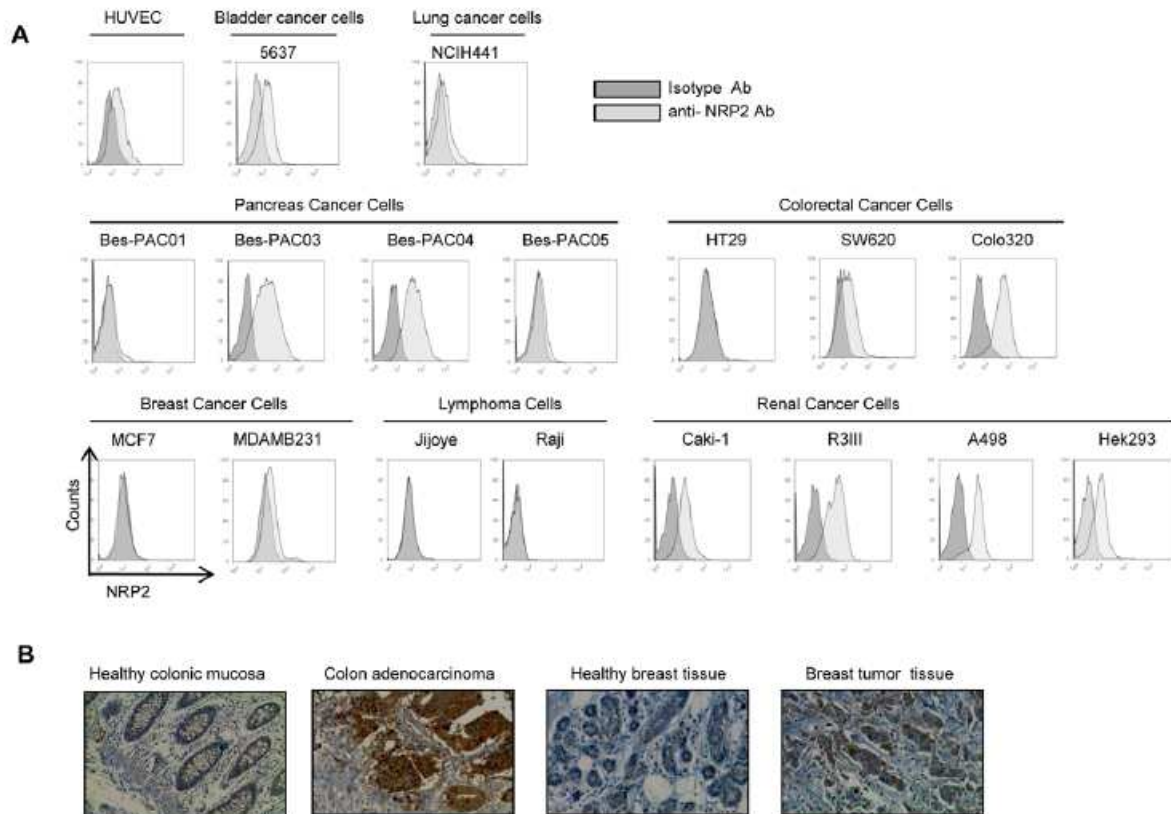


Figure 1. Neuropilin-2 expression on human cancer cells. *A*, Flow cytometry analysis of NRP2 expression in human cancer cell lines. *B*, Immunohistochemical staining of NRP2 in human colon tissues and breast tissues (brown). Formalin-fixed paraffin-embedded tissues were incubated overnight at room temperature with anti-human NRP2 antibody. Representative micrographs were taken at an original magnification x1000; NRP2 is expressed at the membrane of human colon and breast carcinomas while it is not expressed in healthy tissues. doi:10.1371/journal.pone.0020444.g001

this glycoprotein is commonly observed in healthy tissues, confirming that NRP2 is an attractive target for innovative anti-tumor therapies (see Table S1 for review of NRP2 expression in cancers).

To study the precise role of NRP2 in cancer progression, we decided to generate colon cancer cell lines expressing or not NRP2, using NRP2 gene transfer or NRP2 specific siRNA. Hence, NRP2 was transfected into HT29 and a specific siRNA was used to knockdown NRP2 expression in Colo320. Flow cytometry experiments were performed to confirm the modulation of NRP2 expression in HT29 and Colo320 (Figure 2A). No modulation of NRP1 expression was observed in HT29 or Colo320 transfected cells. Caki-1 renal cancer cells were used as positive control for NRP1 staining. NRP2 presence in HT29^{ctrl}, HT29^{NRP2}, Colo320^{siRNA-ctrl}, Colo320^{siRNA-NRP2} was controlled by western blotting (Figure 2B).

NRP2 promotes tumor proliferation

We took advantage of the previous cell lines to study the role of NRP2 on cancer proliferation in vitro and tumor growth in vivo. Proliferation was monitored using MTT assays. HT29^{NRP2} cells showed a superior proliferation rate at 24, 48 and 72 h compared to HT29^{ctrl} (Figure 2C). Conversely, NRP2 knockdown using specific siRNA, negatively modulated the proliferation of Colo320 tumor cell line (Figure 2C). These experiments showed that NRP2

expression enhances colon cancer cell line proliferation in vitro (the significance at each time point of these MTT assays is indicated in Table S2). To confirm the influence of NRP2 on cell proliferation, we have evaluated in two additional experiments the doubling-times of HT29^{ctrl}, HT29^{NRP2}, Colo320^{siRNA-ctrl} and Colo320^{siRNA-NRP2} cancer cells. NRP2 expressing cells HT29^{NRP2} and Colo320^{siRNA-ctrl} had a doubling time of 8 and 11 hours respectively, whereas doubling times of NRP2 lacking cells HT29^{ctrl} and Colo320^{siRNA-NRP2} were 13 and 14 hours. Since NRPs are VEGF co-receptors, we monitored VEGF-A production in HT29 and Colo320 cultures by Elisa test. These cells produced low levels of VEGF-A. NRP2 expression did not influence VEGF production (Figure S1). Moreover, the neutralizing mAb bevacizumab, known to inhibit the proliferation of microvascular endothelial cell line HMEC-1 [27], was used to address the potential role of VEGFA in NRP2-mediated tumor cell growth. These experiments showed that VEGFA neutralization did not influence NRP2-mediated HT29 or Colo320 proliferation. (Figure 2D)

Moreover, NRP2 is a functional receptor for semaphorin 3F, which was described as an inhibitor of angiogenesis, tumor progression and metastasis [28]. Western blotting experiments showed that HT29^{ctrl} and HT29^{NRP2} express the same level of semaphorin 3F, whereas no semaphorin 3F was found in Colo320 cells, suggesting that NRP2-mediated tumor proliferation does not involve semaphorin 3F (Figure S2). Then, the distribution of the

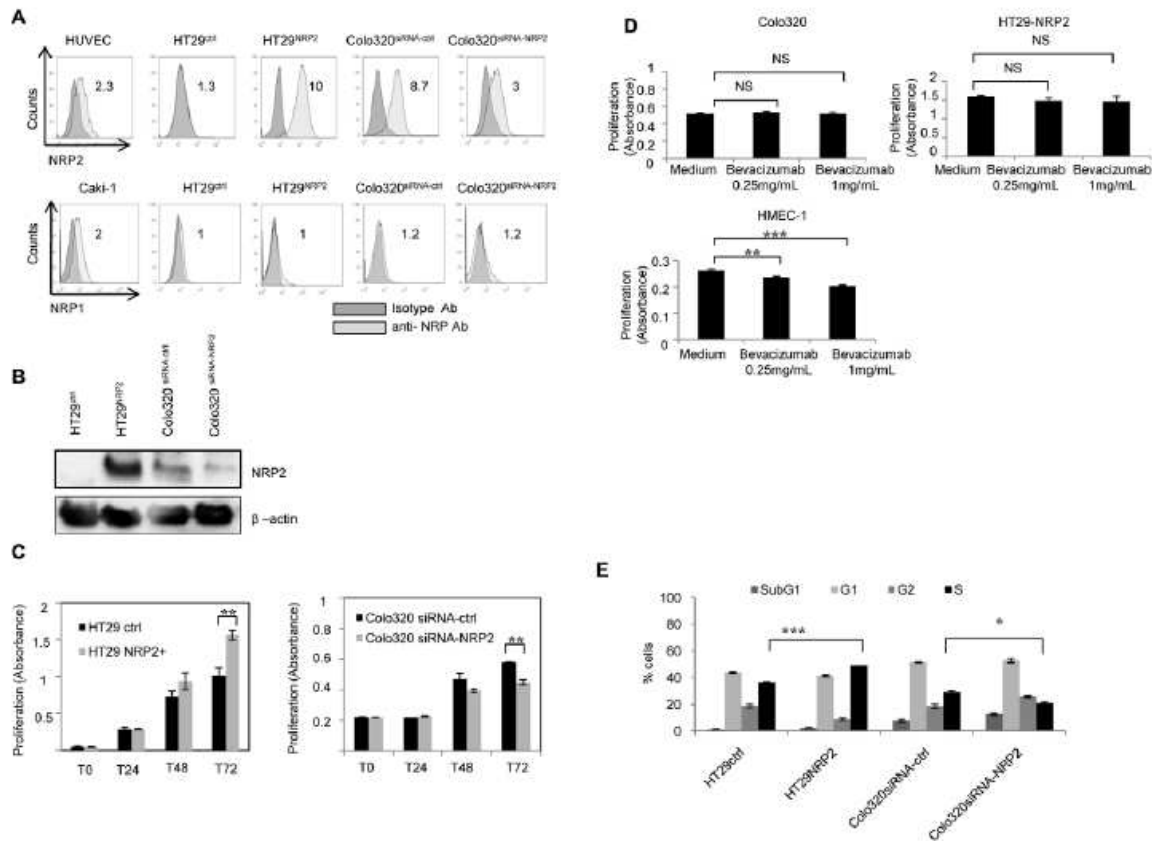


Figure 2. Neuropilin-2 promotes cell proliferation in colon carcinoma cell lines. Transfected cells were analyzed for NRP1 and NRP2 expression by flow cytometry analysis (A) or by western blotting (B). For flow cytometry analysis, Relative Fluorescence Intensity (RFI) was calculated. Caki1 and HUVEC cells were used as positive control for NRP1 and NRP2 staining respectively. C, Proliferation of HT29 and Colo320 cells, according to NRP2 expression was assessed using MTT assays. 4000 cells were let in culture during 24, 48 or 72h before analysis. NRP2 expression is associated with an enhanced proliferation in colon cancer cells. Data represent means of triplicates plus or minus the standard error (SE) of a representative experiment out of three performed. (**, $P < 0.01$). D, Similar MTT experiments were reproduced in the presence of bevacizumab (0.25 and 1 mg/mL, 72 h). HMEC-1 microvascular endothelial cells were used as a positive control for the bioactivity of bevacizumab. Indeed, bevacizumab significantly decreases HMEC-1 proliferation whereas no decrease of cell proliferation is observed with HT29^{NRP2} and Colo320 cancer cells. Experience was made 3 times, and for each time in triplicates. E, Flow cytometric analysis of DNA content of transfected colon cancer cells. NRP2 expression is associated with an enhanced number of cells in phase S. Data represent results of a representative experiment out of 3 expressed as the mean of duplicate assays (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$, *** $P < 0.001$). doi:10.1371/journal.pone.0020444.g002

nuclear DNA content was studied by flow cytometry in HT29^{ctrl}, HT29^{NRP2}, Colo320^{siRNA-ctrl} and Colo320^{siRNA-NRP2} cancer cells. NRP2 expression was associated with an enhanced number of cells in phase S (Figure 2E). Serum deprivation in culture medium induced an increase in the subG1 fraction only in NRP2 negative conditions (data not shown). Collectively, these results showed that NRP2 expression in colorectal cell carcinoma promotes cancer cell proliferation and survival.

NRP2 ablation using siRNA inhibits xenograft formation

The precise role of NRP2 on cancer progression was first characterized *in vivo*. To examine the effect of NRP2 expression on *in vivo* tumor growth, we inoculated equal numbers (1.10⁶ cells per mouse) of HT29^{NRP2} or HT29^{ctrl} subcutaneously into nude mice. Tumor incidence and volume were assessed biweekly. Tumors appeared in all mice inoculated with HT29^{ctrl} and HT29^{NRP2}. NRP2 significantly enhanced tumor growth *in vivo* (Figure 3A). To confirm these results, we decided to investigate if NRP2

targeting using specific siRNA could inhibit tumor formation. While 1.10⁶ Colo320^{siRNA-ctrl} cells injected subcutaneously into nude mice induced tumor engraftment in all mice, NRP2 inhibition using specific siRNA prevented Colo320 engraftment in all animals suggesting a critical role of NRP2 in the early events contributing to tumor formation (Figure 3B). The influence of NRP2 inhibition using specific siRNA on Colo320 tumorigenicity was confirmed *in vitro*. For this purpose, Colo320 cells were treated with NRP2 siRNA or ctrl siRNA and cultured in a soft agar assay. NRP2 knockdown in Colo320 decreased the number of colonies observed in soft agar experiments (Figure 3C). Since HT29 did not form colonies in soft agar cultures, we decided to investigate the influence of NRP2 on HT29 invasion and migration. For this purpose, a Boyden chamber assay was performed to quantify HT29 invasiveness according to NRP2 expression. The capacity of HT29 cells to migrate through the matrigel-coated filter was significantly enhanced in the presence of NRP2 (Figure 3D). Similar results were observed with Colo320 (data not shown). Of

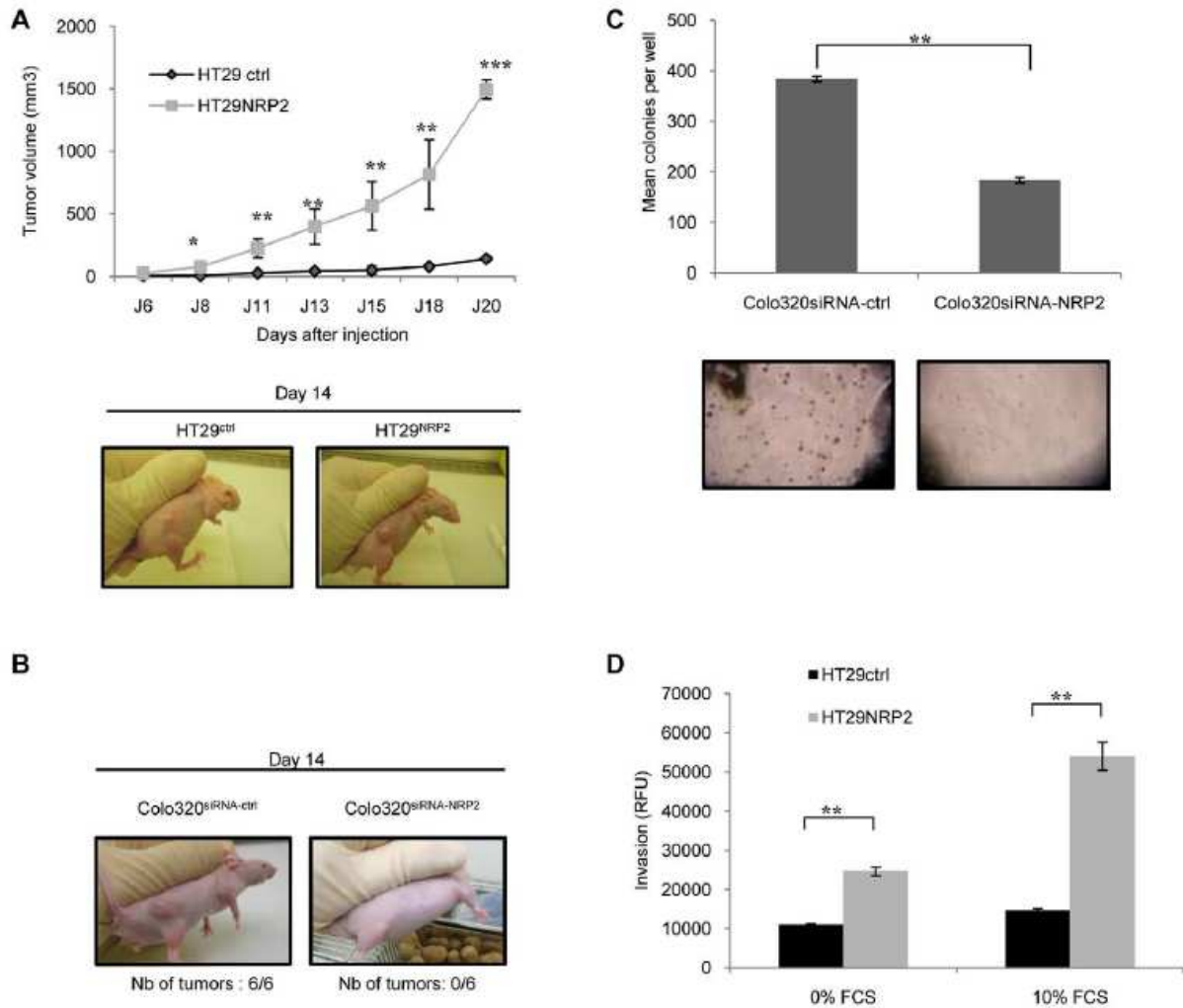


Figure 3. NRP2 enhances colorectal cancer xenograft formation. A, 1.10^6 HT29^{ctrl} and HT29^{NRP2} cells were injected subcutaneously in nude mice (15 mice in each group included in four independent experiments). NRP2 significantly enhanced tumor growth of colon cancer cells in xenograft experiments. Tumor volume was calculated by the formula $V = 1/2 a \times b^2$, where a is the longest tumor axis, and b is the shortest tumor axis. Data reported are the mean average tumor diameter \pm SEM. A representative experiment out of 3 is shown. (**, $P < 0.01$). B, 1.10^6 Colo320^{siRNA-NRP2} or Colo320^{siRNA-ctrl} were injected s.c. in nude mice (15 mice in each group included in four independent experiments). Mice receiving Colo320^{siRNA-NRP2} did not develop tumor, even after 2 months. Data represent results of a representative experiment out of 3. C, 5000 Colo320 cells treated with control siRNA or NRP2 siRNA were cultured in soft Agar containing medium during 10 days. Colonies were then photographed (magnitude \times 10) and counted. siRNA-NRP2 prevents colony formation in soft agar assays, in comparison to siRNA-ctrl in Colo320 cancer cells. (**, $P < 0.01$). D, Invasion assays were performed using HT29^{ctrl} and HT29^{NRP2}. HT29^{NRP2} were resuspended in serum-free medium and placed in the top compartment of a standard 8 μ m pore Boyden chamber. Following 16 hours of culture (37°C, 5% CO₂), invasive cells were incubated with cell detachment buffer, lysed and marked with CyQuant GR dye. Fluorescence was then evaluated with a fluorescence plate reader using a 480-520 nm filter set. doi:10.1371/journal.pone.0020444.g003

note, these results were also reproduced in the absence of serum suggesting an autonomous effect of NRP2 on the invasive properties of HT29 cells.

NRP2 induces epithelial-mesenchymal transition

The cell autonomous effect of NRP2 on HT29 invasiveness led us to explore the direct impact of NRP2 on EMT. The phenomenon of EMT is defined by the transition of epithelial cells to fibroblastoid- or mesenchymal-like cells. EMT is an important mechanism associated with cancer invasiveness and metastasis formation. In a recent paper, NRPI was found to drive EMT

process by promoting Snail nuclear localization in prostate cancer cells [29]. In culture, NRP2 transfection conferred to HT29 a fibroblastic-like shape reminiscent of mesenchymal cells, whereas HT29 and HT29^{ctrl} cell lines displayed a cuboidal appearance, formed clusters which progressively increased in number, and closely apposed cell-to-cell junctions typical of epithelial cells (Figure S3A). This observation prompted us to investigate the ability of NRP2 to orchestrate the EMT.

EMT is characterized by the loss of epithelial markers and acquisition of mesenchymal components. E-cadherin, occludin and cytokeratin are downregulated during EMT, while N-

cadherin, vimentin, fibronectin are upregulated [30]. E-Cadherin is a universal epithelial marker that plays a key role in epithelial integrity maintenance. Loss of its expression is a hallmark of EMT. Vimentin is a canonical marker for detecting fully transitioned epithelial cells and their acquisition of fibroblastoid-like phenotype. Accordingly, we assessed the pattern of E-Cadherin and vimentin expression in colorectal cancer cell lines by western-blotting. The presence of NRP2 in HT29 completely abrogated the expression of E-Cadherin and induced the production of vimentin. (Figure 4A). This observation was confirmed in Colo320 where specific disruption of NRP2 using siRNA down-regulated vimentin (Figure 4A). Then we analyzed the expression of EMT-associated markers in HT29^{ctrl} and HT29^{NRP2} xenografts. Immunohistochemical analysis revealed that the presence of NRP2 on HT29 was associated with an invasive phenotype. While HT29^{ctrl} xenografts reconstituted the morphology of moderate differenti-

ated colon adenocarcinoma, HT29^{NRP2} induced less differentiated xenografts displaying an invasive phenotype (Figure 4B). HT29^{NRP2} xenografts lacked epithelial markers such as cytokeratin-20 and E-cadherin compared to HT29^{ctrl} xenografts (Figure 4B). In order to confirm that NRP2 expression is associated with a mesenchymal phenotype, we have determined NRP2, E-cadherin and vimentin levels in four renal and pancreatic cell lines by western-blotting. We observed that NRP2 expression is correlated with vimentin expression and with a lack of E-cadherin expression in these cancer cell lines. (Figure 4C)

Of note, NRP2 transfection in HT29 also led to the decrease of EpcAM (epithelial cell adhesion molecule) in HT29 cells (Figure S3B). We could also observe an inverse correlation between NRP2 and Epcam in several pancreatic cancer cell lines (Figure S3C), confirming that NRP2 is quite associated with a mesenchymal phenotype of cancer cells. Several zinc-finger transcriptional

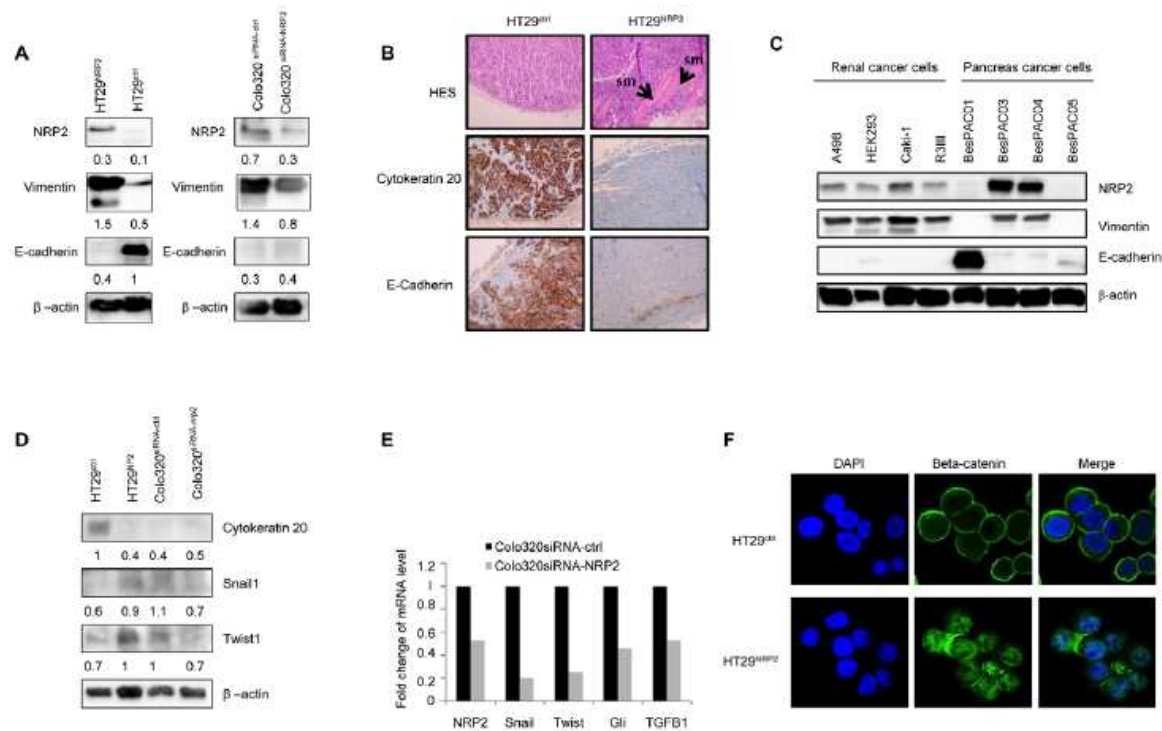


Figure 4. NRP2 drives EMT in colon cancer cells. A, HT29^{ctrl}, HT29^{NRP2}, Colo320^{siRNA-NRP2} and Colo320^{siRNA-ctrl} were analyzed for expression of epithelial and mesenchymal markers (respectively E-Cadherin and vimentin) by western-blotting (whole cell lysate). β-actin was used as a control of protein loading. The presence of NRP2 decreases E-cadherin expression and induces vimentin in HT29 colorectal cancer cells. Specific disruption of NRP2 using siRNA down-regulated vimentin in Colo320 cancer cells. Blotted proteins have been quantified with the BIO-1D advanced software and reported to the β-actin level. B, Frozen sections of the isolated tumors from HT29^{ctrl} and HT29^{NRP2} xenografts were subjected to immunohistochemical staining with anti-cytokeratin-20, anti-Ecadherin antibodies and HES staining (magnification x100). HES (Hematoxyline Eosine Safran) staining was used to assess morphology. HT29^{NRP2} invade smooth muscle (sm = smooth muscle) as indicated by arrows unlike HT29^{ctrl} which showed a local invasion. HT29^{NRP2} xenografts lacked epithelial markers such as cytokeratin-20 and E-cadherin. C, Pancreatic and renal cancer cell lines were analyzed for NRP2, E-cadherin and vimentin expression by western-blotting. β-actin was used as a control of protein loading. The presence of NRP2 is positively correlated with mesenchymal marker vimentin and inversely correlated with epithelial marker E-cadherin. D, Transcriptional factors Snail1 and Twist1 were analyzed in HT29^{ctrl}, HT29^{NRP2}, Colo320^{siRNA-NRP2} and Colo320^{siRNA-ctrl} whole cell lysates by western-blotting. NRP2 expressing cells (Colo320^{siRNA-ctrl} and HT29^{NRP2}) have increased levels of Snail1 and Twist1 compared to NRP2 lacking cells (HT29^{ctrl} and Colo320^{siRNA-NRP2}). β-actin was used as a control of protein loading. Blotted proteins have been quantified with the BIO-1D advanced software and reported to the β-actin level. E, Evaluation of NRP2, Snail, Twist1, Gli1 and TGFβ1 expression by QRT-PCR analysis in Colo320^{siRNA-ctrl} and Colo320^{siRNA-NRP2}. Decreased NRP2 expression is indeed associated with a down-regulation of transcriptional regulators Snail, Gli1 and twist1 and with a decreased TGF-β1 production. F, Confocal microscopy analysis of localization of β-catenin. Cells (HT29^{ctrl} and HT29^{NRP2}) were stained with DAPI (blue) for nuclear staining and also with anti-β-catenin antibody (green). Whereas β-catenin (green) is localized at the membrane in HT29^{ctrl} cells, HT29^{NRP2} cells show a nuclear localization of this transcriptional activator. doi:10.1371/journal.pone.0020444.g004

regulators of EMT can act as E-Cadherin repressors such as Snail, which is the master repressor of E-cadherin [31], but also Twist [32]. Gli family members are zinc-finger transcription factors, which are involved in embryogenesis and carcinogenesis. Hedgehog-Gli signaling axis has been recently proposed as a regulator of EMT process through interactions with TGF- β 1 pathway [33]. Then, the next set of experiments was performed to analyze EMT-related transcription factors in HT29 and Colo320 cell lines, according to NRP2 expression. Western-Blot experiments showed an increase of Twist and Snail in HT29^{NRP2} in comparison to HT29^{ctrl}. (Figure 4D) Conversely, NRP2 targeting using specific siRNA in Colo320 led to a decreased expression of these transcription factors, as shown in western blotting experiments (Figure 4D). Of note, the influence of NRP2 on EMT-related transcription factors was confirmed at the RNA level. Indeed, expression of these transcriptional regulators of EMT was analyzed by real-time quantitative PCR in Colo320^{siRNA-ctrl} and Colo320^{siRNA-NRP2}. Decreased NRP2 expression was associated with a down-regulation of Snail1, Twist1 and Gli1 transcription (Figure 4E). Moreover, since nuclear accumulation of the transcriptional activator β -catenin is a hallmark of EMT in cancer cells [34], we decided to evaluate localization of this protein in HT29^{ctrl} and HT29^{NRP2} by confocal microscopy. Whereas β -catenin is localized at the membrane in HT29^{ctrl} cells, HT29^{NRP2} cells show a nuclear localization of this transcriptional activator. (Figure 4F) Furthermore, TGF- β 1 is a Janus-like cytokine and has been demonstrated to play a pivotal role in EMT [35,36]. The expression of TGF- β 1 was then monitored in our various colorectal cancer cell lines. We observed that NRP2 knock-down in Colo320 decreased TGF- β 1 production (Figure S4) while NRP2 expression in HT29 was associated to a constitutive production of TGF- β 1. (Figure S4) Altogether, these results identified a direct role for NRP2 on EMT promotion in colorectal cancer cells.

Regulation of TGF- β 1 pathway by NRP2

Next, we investigated the influence of NRP2 on TGF- β 1 signaling. In response to ligand binding, type I and II TGF- β receptors (TGFRI, TGFRII) form tight complexes leading to phosphorylation of Smad2 and Smad3. Phosphorylated Smads interact with cytoplasmic Smad4 and translocate into the nucleus where Smad complex control transcription of target genes. A recent study suggested that NRP1 can be a co-receptor for both active TGF β 1 and TGF β 1-LAP [37]. Moreover, NRP1 associates with TGFRI and TGFRII to enhance TGF β 1 signaling in cancer cells, augmenting canonical Smad2/3 signaling [38]. A peptide of the b2 domain of NRP1 (RKFK, similar to a thrombospondin-1 peptide, (also present in NRP2) activates the latent form of TGF- β 1 [37]. Moreover, in fibroblastic cells, NRP1 upregulates TGF β 1 pathway by enhancing smad2/3 phosphorylation and promotes a myofibroblast phenotype [39]. Then, considering the potent promoter effect of NRP1 on TGF β -1 pathway and on EMT, we hypothesized that NRP2 might have similar properties.

Hence, we first assessed Smad2/3 activation status according NRP2 expression in HT29 and Colo320. Using flow cytometry and western blot experiments, we observed that NRP2 expression is associated to a constitutive smad2/3 phosphorylation (Figure 5A and B). While exogenous TGF- β 1 was mandatory for smad2 phosphorylation detection in HT29 using western blotting experiments, we could observe that Smad2 was constitutively phosphorylated in HT29^{NRP2} cells without any previous exposition to exogenous TGF- β 1 (Figure 5B). Moreover, NRP2 expression was associated with an increase of TGF- β 1 on HT29 cytoplasmic membrane, while treatment of Colo320 with NRP2-siRNA decreased membrane-bound TGF- β 1 (Figure S5). To confirm

our hypothesis that NRP2 induces a constitutive activation of the TGF β 1 pathway, we used a TGF- β 1 signaling reporter assay for the quantification of TGF- β 1-induced smad2/3 signaling in HT29^{ctrl}, HT29^{NRP2}, Colo320^{siRNA-ctrl} and Colo320^{siRNA-NRP2} colorectal cancer cells. Compared to HT29^{ctrl}, HT29^{NRP2} exhibited an enhanced smad2/3 activity, as reported in the Figure 5C. At the opposite, smad responsive luciferase expression is significantly decreased in Colo320 cells treated by siRNA targeting NRP2 compared to Colo320 cells treated by siRNA-control after TGF- β 1 stimulation. (Figure 5C) NRP2 exerts a co-stimulatory effect of the TGF- β 1 pathway in colorectal cancer cells.

Then, we characterized TGFRI and TGFRII expression on HT29 and Colo320. Interestingly, while the kinase containing receptor, TGFRI, was expressed both on HT29 and Colo320, TGFRII, known to bind TGF- β 1, was not present on Colo320 (Figure 5D). Combined with the inhibition of membrane-bound TGF- β 1 by NRP2 targeting siRNA (Figure S5), these results supported the hypothesis of a direct binding activity of TGF- β 1 by NRP2 leading to smad2/3 phosphorylation in colorectal cancer cells.

To examine if NRP2 could directly bind active TGF- β 1, we studied the binding of TGF- β 1 to NRP2-Fc by Surface Plasmon Resonance (SPR). We showed that TGF- β 1 can directly bind to NRP2-Fc chips as well as VEGF₁₆₅ (Figure 5E). BSA was used as a negative control. Specific Interactions were highlighted by checking the interactions on Fc-control chips (bevacizumab coated chips) (data not shown). These results were confirmed in co-immunoprecipitation experiments, where TGFRI could be detected in NRP2-targeted immunoprecipitation. (Figure 5F) Therefore, these results provide evidences of a direct binding activity of NRP2 for TGF- β 1, leading to cooperation with TGFRI and subsequent smad2/3 phosphorylation.

NRP2-induced EMT is TGF- β 1 dependent

Since NRPs are non-tyrosine kinase receptor, NRP2 and TGFRI are thought to cooperate in order to mediate smad phosphorylation and subsequent induction of EMT. Then, the next set of experiments was performed to examine if TGF- β 1 pathway neutralization in NRP2 positive cells can reverse NRP2-mediated EMT. For TGF- β 1 pathway neutralization, we used two pharmacological inhibitors of TGFRI, SD-208 and SB-431542. SD-208 and SB-431542 are specific inhibitors of TGF- β superfamily type I receptors [40,41,42]. Treatment of NRP2 expressing cells with variable doses of SB-431542 has been performed to determine the concentrations of this inhibitor required to decrease nuclear smad phosphorylation in HT29^{NRP2}. After sub-cellular separation, levels of nuclear phosphorylated smad2 and nuclear total smad2/3 proteins were evaluated by western blotting. Whereas only 10 μ M of SB-431542 decreases the nuclear level of phosphorylated Smad2 in Colo320 cancer cells, 50 μ M of TGFRI inhibitor decreased the nuclear level of phosphorylated Smad2 in HT29^{NRP2} cancer cells. (Figure 6A)

Then, we assessed the influence of TGFRI pharmacological inhibition on vimentin and E-cadherin levels in NRP2 expressing colorectal cancer cell lines. SB-431542 treatment decreased dose-dependently vimentin expression in Colo320 and HT29^{NRP2} cancer cells and even restored E-Cadherin levels in HT29^{NRP2} underlying that TGFRI plays an essential role in the maintenance of the EMT phenotype conferred by NRP2 (Figure 6B). However, TGFRI inhibition had no influence on E-Cadherin expression in Colo320 which constitutively not express this molecule. Moreover, we could observe a decrease of Snail and Twist transcription factor levels following exposition of HT29^{NRP2} and Colo320 to the TGFRI pharmacological inhibitor SB-431542 (Figure 6C). Then, since nuclear localization of beta-catenin is frequently observed in

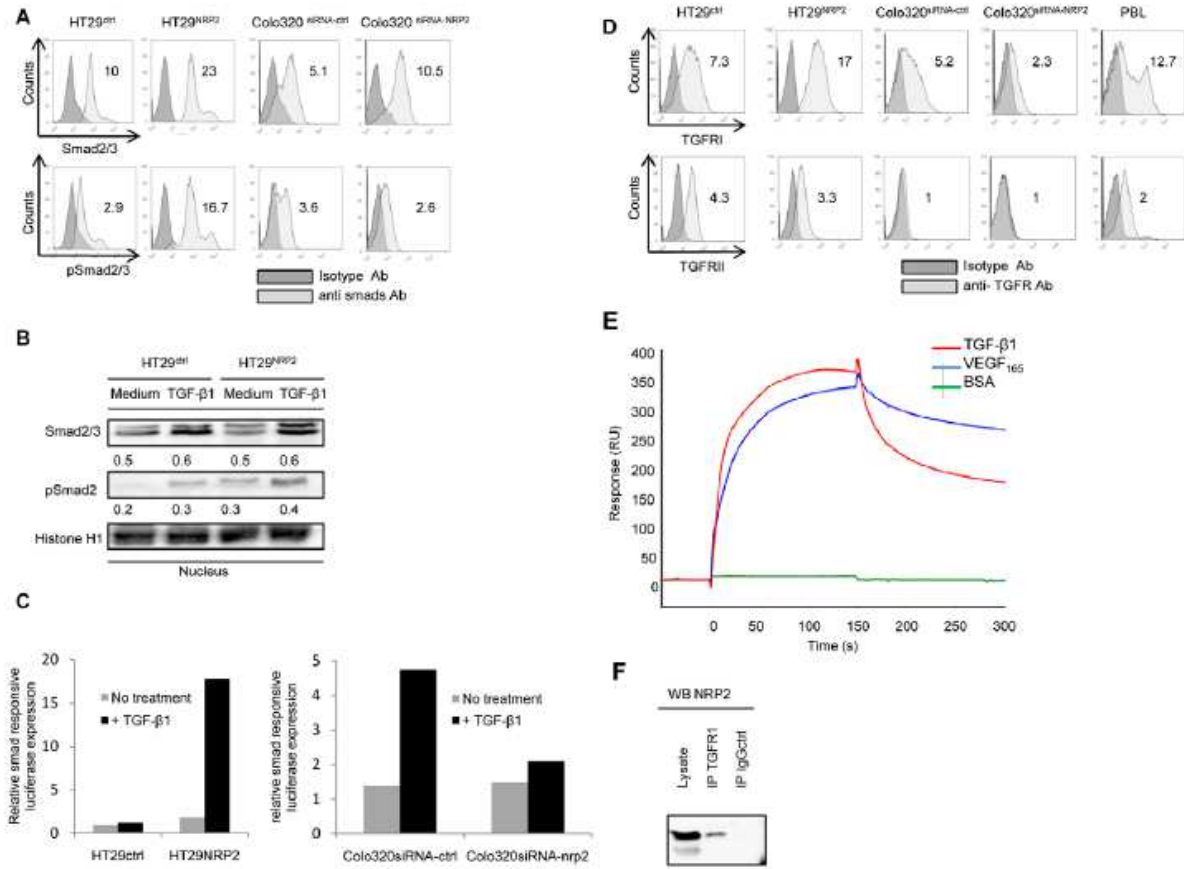


Figure 5. NRP2 acts as a TGF-β1 co-receptor. A, smad2/3 and phospho-smad2/3 expression was assessed in HT29^{ctrl}, HT29^{NRP2}, Colo320^{siRNA-ctrl}, Colo320^{siRNA-NRP2} by intra-cellular flow-cytometry. Relative Fluorescence Intensity (RFI) was calculated. B, Western-blotting experiments were performed on nuclear extracts of HT29^{ctrl} and HT29^{NRP2} cultured in serum free conditions or with 10 ng/mL of TGF-β1 for 16 hours. Histone-H1 was used as a control of protein loading. Blotted proteins have been quantified with the BIO-1D advanced software and reported to the Histone-H1 level. While exogenous TGF-β1 is mandatory for smad2 phosphorylation detection in HT29, Smad2 is constitutively phosphorylated in HT29^{NRP2} cells without any previous exposition to exogenous TGF-β1. C, TGF-β1 Signal reporter assay kit was used for the quantification of TGF-β1-induced smad2/3 signaling in HT29^{ctrl}, HT29^{NRP2}, Colo320^{siRNA-ctrl} and Colo320^{siRNA-NRP2} cells. An up-regulation of approximately 17 times of the smad response is observed in HT29^{NRP2} cells compared to HT29^{ctrl} after TGF-β1 stimulation. At the opposite, smad dependent response is significantly decreased in Colo320 cells treated by siRNA targeting NRP2 compared to Colo320 cells treated by siRNA-control after TGF-β1 stimulation. Results are presented as the ratios between the *firefly luciferase* activity and the *renilla luciferase* activity (Ren/Luc) for each conditions. This experiment was realized 3 times, each time in triplicates. D, Expression of TGFRI and TGFRII in HT29^{ctrl}, HT29^{NRP2}, Colo320^{siRNA-ctrl}, Colo320^{siRNA-NRP2} colon cancer cells. Relative Fluorescence Intensity (RFI) was calculated. Colo320 cells don't express TGFRI. E, Surface plasmon resonance studies were performed to explore TGF-β1 interactions with NRP2. Fc-NRP2 proteins were covalently grafted on a chemically activated self assembled protein chip. Injections of TGF-β1, BSA (Control -), VEGF (Control +) were performed at 250 nM in PBS-Tween 0.05%, before biacore analysis. These experiments were reproduced two times and showed a specific binding of TGFβ1 to Fc-NRP2 protein. F, NRP2 interacts with TGFRI in co-immunoprecipitation experiments using HT29^{NRP2} cells.
doi:10.1371/journal.pone.0020444.g005

tumor cells undergoing EMT [43], we analyzed localization of this transcriptional activator in HT29^{NRP2} cells, after treatment by increased doses of SB-431542, by confocal microscopy analysis. A treatment with 50 μM of SB-431542 during 16 hours induced the relocalization of beta-catenin at the membrane of tumor cells, indicating that TGFRI activity neutralization can reverse EMT in NRP2 expressing colorectal cancer cells. (Figure 6D) Mitotracker staining was realized in order to assess potential cytotoxicity of the SB-431542 treatment. No cytotoxicity was observed at any dose of SB-431542 used. For fluorescence quantification, ratio of fluorescence intensity was calculated in each condition. We observed a decrease of the ratio of nuclear fluorescence/cytoplasm-membrane fluorescence intensity after treatments with 50 μM of SB-431542 in HT29^{NRP2} cells, confirming the relocalization of beta-catenin at the membrane of the cells. (Figure 6D).

Moreover, we analyzed the effect of TGFRI kinase inhibition on colony formation in soft agar experiments. For this purpose, Colo320 expressing NRP2 (Colo320^{siRNA-ctrl}) or treated by siRNA targeting NRP2 (Colo320^{siRNA-NRP2}) were cultured in soft agar with or without SD208, another pharmacological inhibitor of TGFRI and in the presence or not of TGF-β1. The ability of NRP2 to promote the formation of Colo320 colonies in soft agar cultures was not observed in the presence of TGFRI pharmacological inhibition, in presence or not of TGF-β1 (Figure S6). Similar results were obtained with SB-431542 (data not shown). Moreover, exposition to 10 ng/mL of TGF-β1 increased the number of colonies of Colo320^{siRNA-ctrl}, whereas this treatment had no impact on Colo320^{siRNA-NRP2} cells. (Figure S6) These experiments suggest that the EMT program mediated by NRP2 depends on TGF-β1.

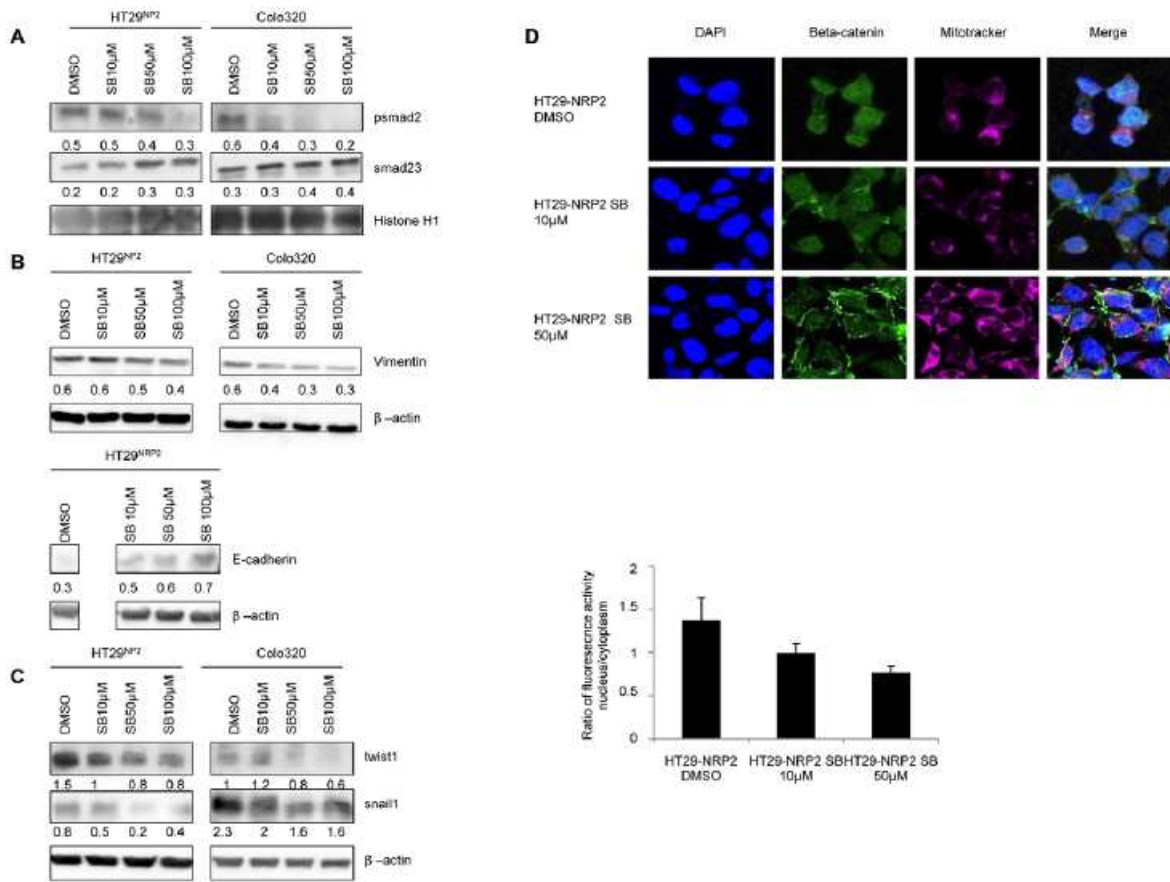


Figure 6. TGF-β1 is required for NRP2-mediated EMT. *A*, Western-blotting experiments were performed on nuclear extracts of HT29^{NRP2} and Colo320 for the detection of nuclear smad proteins after treatment with increased doses of TGFRI kinase-inhibitor SB-431542 (10 μM, 50 μM, 100 μM). DMSO is the control medium. Histone-H1 was used as a control of protein loading. Whereas only 10 μM of SB-431542 decreases the nuclear level of phosphorylated Smad2 in Colo320 cancer cells, doses of 50 μM should be used to decrease the nuclear level of phosphorylated Smad2 in HT29^{NRP2} cancer cells. Smad proteins have been quantified with the BIO-1D advanced software and reported to the Histone H1 level. *B*, Overnight treatment with increased doses of TGFRI kinase-inhibitor SB431542 (10 μM, 50 μM, 100 μM) inhibited dose-dependently vimentin expression in Colo320 and in HT29^{NRP2} cells. TGF-β1 signaling inhibition restored in part E-cadherin in HT29^{NRP2} cells. Proteins have been quantified with the BIO-1D advanced software and reported to the β-actin level. Data represent results of a representative experiment out of 3. *C*, Western-blotting experiment realized with Colo320 and HT29^{NRP2} whole cell lysates overnight treated with increased doses of TGFRI kinase-inhibitor SB431542 (10 μM, 50 μM, 100 μM). SB431542 treatment inhibited dose-dependently snail1 and twist1 expression in Colo320 and in HT29^{NRP2} cells. Proteins have been quantified with the BIO-1D advanced software and reported to the β-actin level. *D*, Confocal microscopy analysis of localization of β-catenin in HT29^{NRP2} cells after overnight treatment with increased doses of TGFRI kinase-inhibitor SB431542 (10 μM, 50 μM). Cells (HT29^{NRP2}) were stained with DAPI (blue) for nuclear staining, with mitotracker (purple) for cytotoxicity detection and also with an anti-β-catenin antibody (green). Mitotracker staining (purple) was realized in order to assess potential cytotoxicity of the SB-431542 treatment. Loss of staining of this marker correlates with increased cytotoxicity. 16 hours treatment with 50 μM of SB-431542 induces relocalization of beta-catenin at the membrane of the cells, indicating that TGFRI activity neutralization by SB-431542 can reverse EMT in HT29^{NRP2} colorectal cancer cells. No cytotoxicity was observed at any dose of SB-431542 used. For fluorescence quantification, ratio of fluorescence intensity was calculated in each condition. A decreased ratio of nuclear fluorescence/cytoplasm-membrane fluorescence intensity after treatment with 50 μM of SB-431542 in HT29^{NRP2} cells was observed indicating that beta-catenin relocalizes at the membrane of the cells. doi:10.1371/journal.pone.0020444.g006

Altogether, these results suggest that NRP2 expression leads to TGF-β1 constitutive signaling activation and sustains a possible role of NRP2 and TGF-β1 in EMT. The oncogenic properties of NRP2 and its direct involvement in EMT open new perspectives to design specific targeted therapeutics.

Discussion

There is increasing evidence that epithelial-mesenchymal transition (EMT) is involved in cancer progression. For most carcinomas, cancer progression is correlated with a loss of epithelial differentiation and a shift towards a mesenchymal phenotype.

This process, referred to as EMT, enhances motility and invasiveness of many cell types and is often considered as a prerequisite for tumor infiltration and metastasis. The targeting of specific molecules involved in EMT is of particular interest to prevent cancer progression. However, such specific therapies interfering with the EMT process are still missing. Neuropilins were initially described as kinase-deficient neuronal patterning receptors recognizing class-3 semaphorin ligands. Indeed, neuropilins have emerged as regulators of neuronal growth cone collapse and cell motility mediated by semaphorins during embryogenesis [1] leading us to explore the hypothesis of their involvement in EMT.

Their ability to function as VEGFR co-receptors resulted in the identification of their implication in vascular and lymphatic sprouting controlled by VEGF. The role of NRPs in vascular development regulation supported their potential involvement in cancer neo-angiogenesis. Blocking NRP1 in mice exposed to cancer cells, resulted in a vascular-specific anti-tumor activity [44]. Based on the ability of NRP2 to bind VEGF-A, C and D, studies were conducted to investigate the role of NRP2 in cancer neo-vascularization. Neutralization of NRP2 in different tumor models led to tumor lymphangiogenesis inhibition [5].

In addition to their expression on neovessels, NRPs have been detected on several human tumors. The wide expression of NRPs among different human tumors suggested a potential role of this molecular network in cancer progression. Although the role of NRP1 in cancer was largely demonstrated [45], the precise contribution of NRP2 in oncogenesis was only recently considered. A role for NRP2 in cancer cells has been initially suggested in colon cancer. The first investigations showed that NRP2 is expressed on human colon cancer cells while undetectable in uninvolved adjacent mucosa [14]. NRP2 expression was shown to promote the malignant phenotype of colon cancers [14], pancreatic cancers [15], and breast cancers [18]. Particularly, NRP2 knock-down hampered anchorage-independent growth in several tumor models [14,15].

Our results first confirmed the role of NRP2 in cancer proliferation *in vitro* and xenograft formation *in vivo* (Figures 2 and 3). We also extended the understanding of NRP2 oncogenic functions. We have shown that NRP2 is a critical component of epithelial to mesenchymal transition. Analysis of NRP2 transfected cell lines and NRP2 expressing xenografts established that NRP2-expressing tumor cells displayed an immunohistochemical phenotype of EMT characterized by the loss of E-Cadherin and an increase of vimentin expression (Figure 4).

EMT is a pivotal component of cancer invasiveness associated with loss of epithelial differentiation and gain of mesenchyme-like capabilities. Loss of homophilic cell adhesions and polarity is widely associated with loss of functional E-cadherin and acquisition of proteins regulating cytoskeletal functions such as vimentin. A direct role of vimentin in cancer invasiveness, when co-expressed with keratins, was suggested in breast carcinoma cell lines [46]. The expression of vimentin in invasive colorectal carcinoma was not thoroughly investigated. Brabletz T *et al* observed an expression of vimentin in colorectal cancer cell lines and dedifferentiated human colorectal carcinoma [47]. The association between vimentin and EMT in colorectal cancer cell was confirmed in a recent study [48]. Of note, these authors demonstrated that TGF β -1-mediated EMT directly drives vimentin production in colon cancer cells [48].

However, in our study, treatment with recombinant TGF- β 1 failed to induce vimentin expression or to decrease E-cadherin level in HT29 cells (data not shown). In contrast, NRP2 transgenic expression induced vimentin and repressed E-Cadherin in HT29. Moreover, TGFRI pharmacological inhibition restored E-Cadherin expression, suggesting cooperation between TGFRI and NRP2 signaling for EMT promotion. Co-immunoprecipitation experiment confirmed that NRP2 interacts with TGFRI in colon cancer cells. Furthermore, from these results it is postulated that NRP2 expression might be an early component of EMT promoting cadherin switch and acquisition of vimentin expression.

From our results it also appears that NRP2 induction is correlated to the transcription of the E-Cadherin repressors snail and twist1, suggesting a direct role of NRP2 in EMT program acquisition (Figure 4).

Moreover, a peptide (RKFK) of the b2 domain of NRP1, was recently shown to be implicated in TGF- β 1 binding [37].

Comparison of the amino acid sequences of NRP1 and NRP2 revealed that RKFK peptide is a conserved sequence of the extracellular part of these receptors.

These observations prompted us to investigate the role of NRP2 on TGF- β 1 signaling. Our work highlights a cross-talk between NRP2 and TGF- β 1 signaling to promote cancer progression. We could observe that NRP2 gene transfer induces a constitutive expression of activated Smad2/3 and a nuclear localization of phospho-Smad2/3 complexes in HT29 (Figure 5A and 5B). Moreover, NRP2 expression on colon cancer cell lines promoted their capacities to respond to TGF- β 1 (Figure 5).

Treatment of Colo320 cell lines with SD208 or SB431542, two TGFRI kinase inhibitors, abrogated the effect of NRP2 on proliferation in colony formation in soft agar assays (Fig S6). Moreover, TGFRI-kinase inhibitors treatment decreases dose-dependently NRP2-induced vimentin and restores in part E-Cadherin in HT29^{NRP2} cells, suggesting the requirement of TGFRI in NRP2-induced EMT (Figure 6).

The precise role of the TGF- β 1-activated Smads in EMT is complex. While activated Smad2/3 complexes promote EMT, the inhibitory Smad7 prevents the transition of cancer cells towards a mesenchymal phenotype [49]. Interestingly, we observed a reduced level of Smad7 in colon cancer cells following NRP2 gene transfer (data not shown). This molecular feature might account for the enhanced colony and xenograft-formation capacities associated with NRP2 expression.

A critical function in cancer cell survival was previously attributed to NRP2 in colon cancer cells [14]. In this model, NRP2 sustains VEGFR1 activity leading to constitutive phosphorylation of Akt and VEGF-mediated survival. Our results suggest the presence of an alternative signaling pathway governed by NRP2 and triggering the Smad-dependent TGF- β 1 signaling to initiate the EMT process.

Since EMT is a critical step towards invasion and cancer progression, these results suggest that NRP2 fulfills all the criteria of a therapeutic target to disrupt multiple oncogenic functions in solid tumors.

Supporting Information

Figure S1 VEGF-A production was monitored by ELISA assay in HT29^{ctrl}, HT29^{NRP2}, Colo320^{siRNA-NRP2} and Colo320^{siRNA-ctrl} cells. Low level of VEGF-A was detected and no significative difference in secretion of VEGF-A was noticed in all cell lines analyzed. NRP2 expression did not influence VEGF production. (TIF)

Figure S2 Western blotting experiments showed that HT29^{ctrl} and HT29^{NRP2} express the same level of semaphorin 3F, whereas no semaphorin 3F was found in Colo320 cells. β -actin was used as a control of protein loading. (TIF)

Figure S3 A, HT29^{ctrl} and HT29^{NRP2} were cultured and observed using a light microscope. Cells were photographed at magnification *40. HT29^{NRP2} displayed a fibroblastic-like shape whereas HT29^{ctrl} exhibited a cuboidal phenotype. **B, FACS analysis reveals that NRP2 expression induces decrease of Epcam protein in HT29^{NRP2} cells.** **C, FACS analysis of NRP2 and Epcam proteins in pancreatic cancer cell lines.** NRP2 and Epcam are inversely correlated. (red: isotype, green: anti-NRP2 or anti-Epcam antibodies). (TIF)

Figure S4 Western-blotting experiments shows that NRP2 positive cells (Colo320^{siRNA-ctrl} and HT29^{NRP2})

secreted higher level of TGF β 1 precursors than NRP2 negative cells (HT29^{ctrl} and Colo320^{siRNA-NRP2}). β -actin was used as a control of protein loading.

(TIIF)

Figure S5 The level of membrane associated-TGF- β 1 was assessed by FACS analysis in HT29^{ctrl}, HT29^{NRP2}, Colo320^{siRNA-NRP2} and Colo320^{siRNA-ctrl}. Relative Fluorescence Intensity (RFI) was calculated. NRP2 expression is associated with an increase of TGF- β 1 on HT29 cytoplasmic membrane, while treatment of Colo320 with NRP2-siRNA decreased membrane-bound TGF- β 1.

(TIIF)

Figure S6 Colo320^{siRNA-ctrl} or Colo320^{siRNA-NRP2} were cultured in soft-agar containing medium for 10 days with or without TGFRI pharmacological inhibitor (SD208, 10 μ Mol). DMSO is the diluent of the TGFRI pharmacological inhibitor SD208 and serves as control medium. The ability of NRP2 to promote the formation of Colo320 colonies in soft agar cultures was not observed in the presence of TGFRI pharmacological inhibition, in presence or not of TGF- β 1. 10ng/mL TGF- β 1 treatment increased the number of colonies of

Colo320^{siRNA-ctrl} whereas this same treatment has no impact on Colo320^{siRNA-NRP2} cells. Data represent means of triplicates plus or minus the standard error (SE). The presence of TGFRI pharmacological inhibitor decreased the ability of Colo320 to form colony in soft agar cultures.

(TIIF)

Table S1 Review of the publications mentioning the expression of NRP2 in cancer samples (x indicates the identification of NRP expression, while ND (note done) indicates the absence of investigation related to NRP1 or 2 expression in tumor cell lines.

(DOCX)

Table S2 NRP2 expression in tumor cell lines.

(DOCX)

Author Contributions

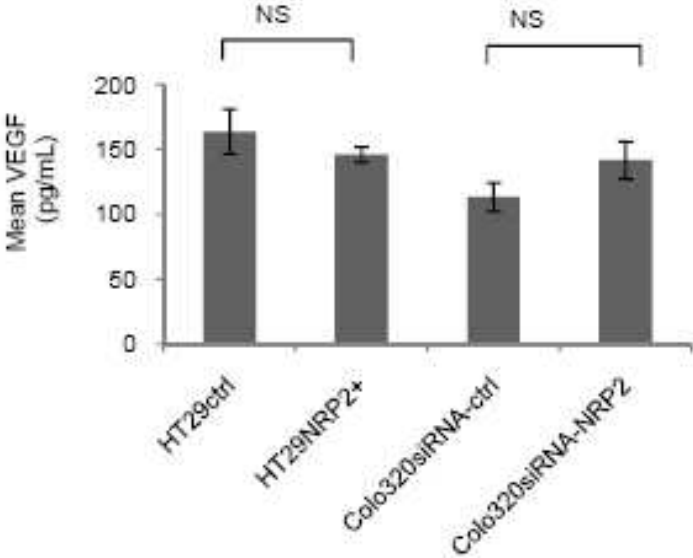
Designed the research: GB. Performed research: CG JRP SVD EV AB JB J-PR-M AR BS WB. Analyzed experiments: CB CG JRP SVD EV AB JB J-PR-M AR BS WB. Provided critical materials: MK. Wrote the paper: CB. Contributed to the design and writing: CG CF.

References

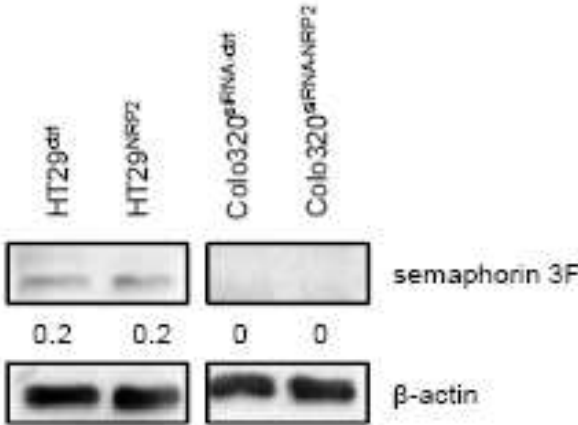
- He Z, Tesier-Lavigne M (1997) Neuropilin is a receptor for the axonal chemorepellent Semaphorin III. *Cell* 90: 739–751.
- Takahashi S, Kitakaze M, Asakura M, Asanuma H, Sanada S, et al. (2002) Targeting of both mouse neuropilin-1 and neuropilin-2 genes severely impairs developmental yolk sac and embryonic angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 3657–3662.
- Favier B, Alam A, Barron P, Bonnin J, Labouf P, et al. (2006) Neuropilin-2 interacts with VEGFR-2 and VEGFR-3 and promotes human endothelial cell survival and migration. *Blood* 108: 1243–1250.
- Soker S, Miao HQ, Nomi M, Takahashi S, Klagsbrun M (2002) VEGF165 mediates formation of complexes containing VEGFR-2 and neuropilin-1 that enhance VEGF165-receptor binding. *J Cell Biochem* 85: 357–368.
- Caunt M, Mak J, Liang WC, Stawicki S, Pan Q, et al. (2008) Blocking Neuropilin-2 function inhibits tumor cell metastasis. *Cancer Cell* 13: 331–342.
- Liu BP, Strittmatter SM (2001) Semaphorin-mediated axonal guidance via Rho-related G proteins. *Curr Opin Cell Biol* 13: 619–626.
- Cai HB, Reed RR (1999) Cloning and characterization of neuropilin-1 interacting protein: A PSD-95/Dlg/ZO-1 domain-containing protein that interacts with the cytoplasmic domain of neuropilin-1. *J Neurosci* 19: 6519–6527.
- Handa A, Tokunaga T, Tsuchida T, Lee YH, Kijima H, et al. (2000) Neuropilin-2 expression affects the increased vascularization and is a prognostic factor in osteosarcoma. *Int J Oncol* 17: 291–295.
- Lacal PM, Falck CM, Pagani E, Odehio T, Schietroma C, et al. (2000) Human melanoma cells secrete and respond to placenta growth factor and vascular endothelial growth factor. *J Invest Dermatol* 115: 1000–1007.
- Kawakami T, Tokunaga T, Hatanaka H, Kijima H, Yamazaki H, et al. (2002) Neuropilin 1 and neuropilin 2 co-expression is significantly correlated with increased vascularity and poor prognosis in nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer* 95: 2196–2201.
- Tomizawa Y, Sekido Y, Kondo M, Gao B, Yokota J, et al. (2001) Inhibition of lung cancer cell growth and induction of apoptosis after reexpression of β 21.3 candidate tumor suppressor gene SEMA3B. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 13954–13959.
- Rieger J, Wick W, Weller M (2003) Human malignant glioma cells express semaphorins and their receptors, neuropilins and plexins. *Glia* 42: 379–389.
- Fakhari M, Pullirsch D, Abraham D, Paya K, Hofbauer R, et al. (2002) Selective upregulation of vascular endothelial growth factor receptors neuropilin-1 and -2 in human neuroblastoma. *Cancer* 94: 258–263.
- Gray MJ, Van Buren G, Dallas NA, Xia L, Wang X, et al. (2008) Therapeutic targeting of neuropilin-2 on colorectal carcinoma cells implanted in the murine liver. *J Natl Cancer Inst* 100: 109–120.
- Dallas NA, Gray MJ, Xia L, Fan F, van Buren G, 2nd, et al. (2008) Neuropilin-2-mediated tumor growth and angiogenesis in pancreatic adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 14: 8052–8060.
- Cohen T, Herzog Y, Brodsky A, Greenson JK, Eldar S, et al. (2002) Neuropilin-2 is a novel marker expressed in pancreatic islet cells and endocrine pancreatic tumours. *J Pathol* 198: 77–82.
- Fukahi K, Fukasawa M, Neufeld G, Itakura J, Kore M (2004) Aberrant expression of neuropilin-1 and -2 in human pancreatic cancer cells. *Clin Cancer Res* 10: 581–590.
- Yasuoka H, Kodama R, Tajimoto M, Yoshidome K, Akamatsu H, et al. (2009) Neuropilin-2 expression in breast cancer: correlation with lymph node metastasis, poor prognosis, and regulation of CXCR4 expression. *BMC Cancer* 7: 220.
- Vales A, Kondo R, Aichberger KJ, Mayerhofer M, Kainz B, et al. (2007) Myeloid leukemias express a broad spectrum of VEGF receptors including neuropilin-1 (NRP-1) and NRP-2. *Leuk Lymphoma* 48: 1997–2007.
- Cai Y, Wang R, Zhao YF, Jia J, Sun ZJ, et al. (2010) Expression of Neuropilin-2 in salivary adenoid cystic carcinoma: Its implication in tumor progression and angiogenesis. *Pathol Res Pract*.
- Calcechio ML, Collins T, Kozakewich HP (2009) Identification of signaling systems in proliferating and involuting phase infantile hemangiomas by genome-wide transcriptional profiling. *Am J Pathol* 174: 1638–1649.
- Osada R, Horinuchi A, Kikuchi N, Ohira S, Ota M, et al. (2006) Expression of semaphorins, vascular endothelial growth factor, and their common receptor neuropilins and allelic loss of semaphorin locus in epithelial ovarian neoplasms: increased ratio of vascular endothelial growth factor to semaphorin is a poor prognostic factor in ovarian carcinomas. *Hum Pathol* 37: 1414–1425.
- Sanchez-Carbajo M, Succi ND, Lozano JJ, Li W, Charytonowicz E, et al. (2003) Gene discovery in bladder cancer progression using cDNA microarrays. *Am J Pathol* 163: 505–516.
- Guarino M (2007) Epithelial-mesenchymal transition and tumour invasion. *Int J Biochem Cell Biol* 39: 2153–2160.
- Boireau W, Rouleau A, Luchini G, Ducoroy P (2009) Revisited BIA-MS combination: entire "on-a-chip" processing leading to the proteins identification at low femtomole to sub-femtomole levels. *Biosens Bioelectron* 24: 1121–1127.
- Chalmin F, Ladoire S, Mignot G, Vincent J, Bruchard M, et al. (2010) Membrane Hsp72 from tumor-derived exosomes mediates pStat3 dependent immunosuppressive function of myeloid derived suppressor cells through the TLR2-MyD88 pathway. *Journal of Clinical Investigation* 120: 457–471.
- Costa R, Carneiro A, Rocha A, Pirrao A, Falcao M, et al. (2009) Bevacizumab and ranibizumab on microvascular endothelial cells: A comparative study. *J Cell Biochem* 108: 1410–1417.
- Futamura M, KH, Miyamoto Y, Kitamura N, Nakamura Y, Ohnishi S, Masuda Y, Arakawa H (2007) Possible role of semaphorin 3F, a candidate tumor suppressor gene at β 21.3, in p53-regulated tumor angiogenesis suppression. *Cancer Res* 15: 1451–1460.
- Mak P, Leav I, Pursell B, Bae D, Yang X, et al. (2010) ERbeta impedes prostate cancer EMT by destabilizing HIF-1 α and inhibiting VEGF-mediated snail nuclear localization: implications for Gleason grading. *Cancer Cell* 17: 319–332.
- Lee JM, Dedhar S, Kalluri R, EW T (2006) The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *J Cell Biol* 172: 973–981.
- Cano A, Perez-Moreno MA, Rodrigo I, Locascio A, Blanco MJ, et al. (2000) The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol* 2: 76–83.
- Yang J, Mani SA, Donaher JL, Ramaswamy S, Itzykson RA, et al. (2004) Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell* 117: 927–939.
- Varnat F, Duquet A, Malarba M, Zbinden M, Mas C, et al. (2009) Human colon cancer epithelial cells harbour active HEDGEHOG-Gli1 signaling that is

- essential for tumour growth, recurrence, metastasis and stem cell survival and expansion. *EMBO Mol Med* 1: 338–351.
34. Bèiter K, Hiendlmeyer E, Brabletz T, Hlubek F, Hayn A, et al. (2005) beta-Catenin regulates the expression of tenascin-C in human colorectal tumors. *Oncogene* 24: 8200–8204.
 35. Piek E, Moustakas A, Kuriaki A, Heldin CH (1999) TGF- β type I receptor/ALK-5 and Smad proteins mediate epithelial to mesenchymal transdifferentiation in NMuMG breast epithelial cells. *J Cell Sci* 112 4557–4568.
 36. Portella G, Cumming SA, Liddell J, Cui W, Ireland H, et al. (1998) Transforming growth factor beta is essential for spindle cell conversion of mouse skin carcinoma in vivo: implications for tumor invasion. *Cell Growth Differ* 9: 393–404.
 37. Glinka Y, Prud'homme GJ (2008) Neuropilin-1 is a receptor for transforming growth factor beta-1, activates its latent form, and promotes regulatory T cell activity. *J Leukoc Biol* 84: 302–310.
 38. Glinka Y, Stoilova S, Mohammed N, Prud'homme GJ (2010) Neuropilin-1 exerts coreceptor function for TGF- β -1 on the membrane of cancer cells and enhances responses to both latent and active TGF- β . *Carcinogenesis*.
 39. Cao Y, Szabolcs A, Dutta SK, Yaqoob U, Jagavelu K, et al. (2010) Neuropilin-1 mediates divergent R-Smad signaling and the myofibroblast phenotype. *J Biol Chem*.
 40. Inman GJ, Nicolis FJ, Callahan JF, Harling JD, Gaster LM, et al. (2002) SB-431542 is a potent and specific inhibitor of transforming growth factor-beta superfamily type I activin receptor-like kinase (ALK) receptors ALK4, ALK5, and ALK7. *Mol Pharmacol* 62: 65–74.
 41. Laping NJ, Grygielko E, Mathur A, Butter S, Bomberger J, et al. (2002) Inhibition of transforming growth factor (TGF)- β -1-induced extracellular matrix with a novel inhibitor of the TGF- β type I receptor kinase activity: SB-431542. *Mol Pharmacol* 62: 58–64.
 42. Uhl M, Aulwurm S, Wischhusen J, Weiler M, Ma JY, et al. (2004) SD-208, a novel transforming growth factor beta receptor I kinase inhibitor, inhibits growth and invasiveness and enhances immunogenicity of murine and human glioma cells in vitro and in vivo. *Cancer Res* 64: 7954–7961.
 43. Brabletz T, Hlubek F, Spadema S, Schmalhofer O, Hiendlmeyer E, et al. (2005) Invasion and metastasis in colorectal cancer: epithelial-mesenchymal transition, mesenchymal-epithelial transition, stem cells and beta-catenin. *Cells Tissues Organs* 179: 56–65.
 44. Geretti E, Shimizu A, Klagsbrun M (2008) Neuropilin structure governs VEGF and semaphorin binding and regulates angiogenesis. *Angiogenesis* 11: 31–39.
 45. Ellis LM (2006) The role of neuropilins in cancer. *Mol Cancer Ther* 5: 1099–1107.
 46. Hendrix MJ, Sefior EA, Sefior RE, Trevor KT (1997) Experimental co-expression of vimentin and keratin intermediate filaments in human breast cancer cells results in phenotypic interconversion and increased invasive behavior. *Am J Pathol* 150: 483–495.
 47. Brabletz T, Jung A, Reu S, Porzner M, Hlubek F, et al. (2001) Variable beta-catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 10356–10361.
 48. Pino MS, Kikuchi H, Zeng M, Herraiz MT, Sperduti I, et al. (2009) The epithelial to mesenchymal transition is impaired in colon cancer cells with microsatellite instability. *Gastroenterology*.
 49. Valcourt U, Kowanetz M, Nümi H, Heldin CH, Moustakas A (2005) TGF- β and the Smad signaling pathway support transcriptomic reprogramming during epithelial-mesenchymal cell transition. *Mol Biol Cell* 16.

Supporting information n°1



Supporting information n°2

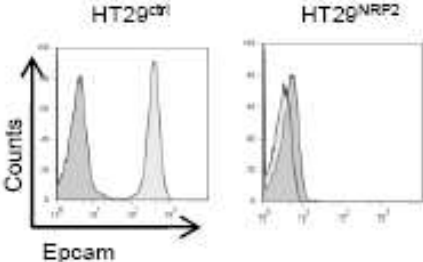


Supporting information n°3

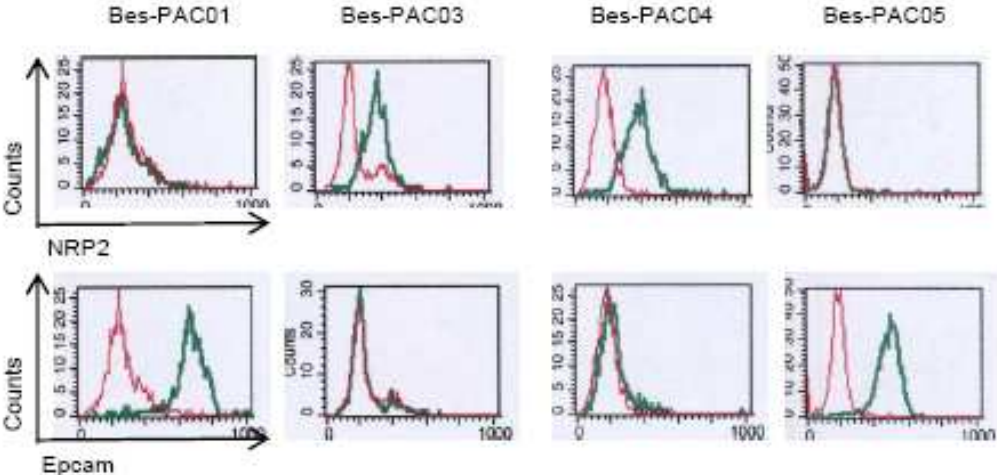
A



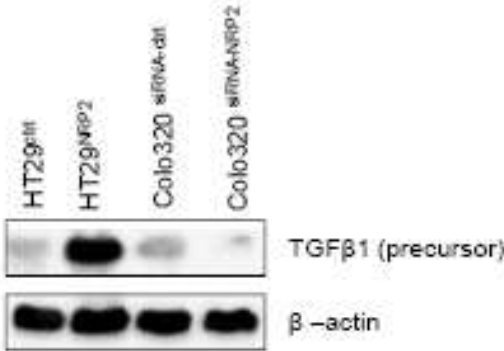
B



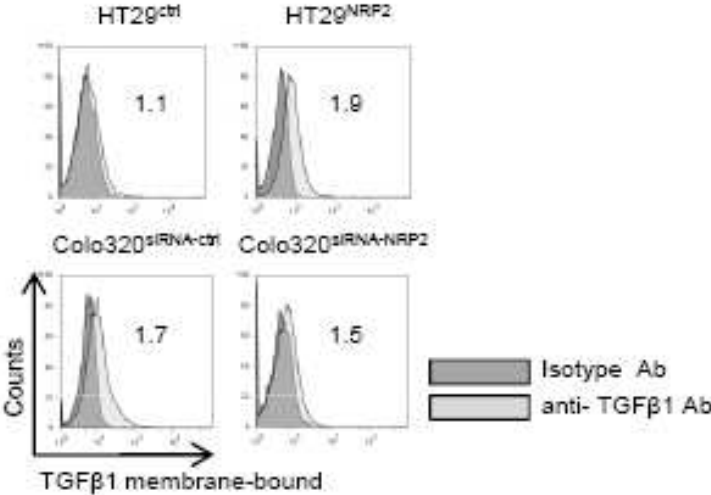
C



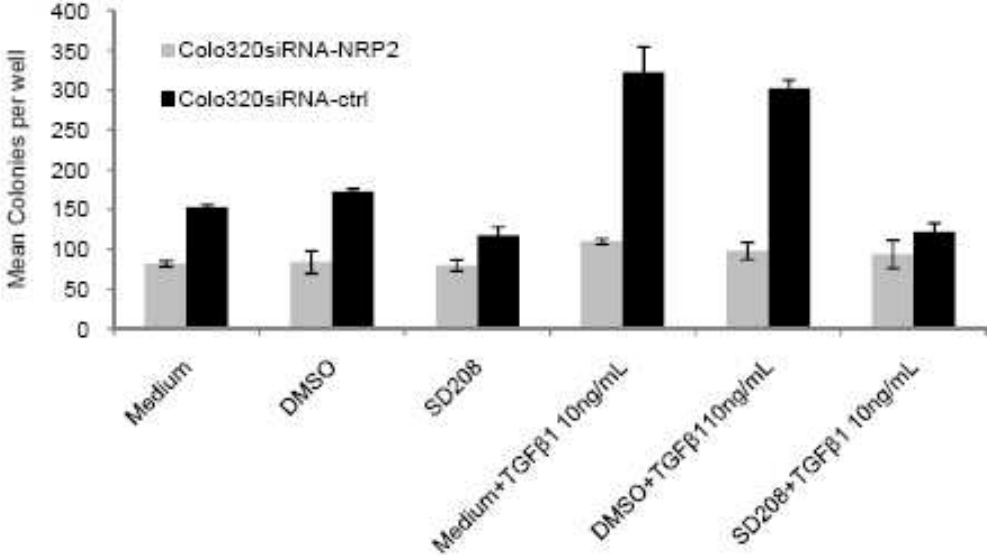
Supporting information n°4



Supporting information n°5



Supporting information n°6



RESULTATS DE LA PUBLICATION N°1

Dans le cadre d'une collaboration avec le laboratoire d'Anatomie-Pathologie du CHU de Besançon, nous avons tout d'abord caractérisé l'expression de la NRP2 dans des tissus sains et tumoraux de diverses origines (pancréas, colon, sein, rein) par immunohistochimie. L'expression membranaire de la NRP2 par des lignées cellulaires humaines de diverses origines a également été étudiée *in vitro* par cytométrie en flux. (Figure 1). Une forte expression de NRP2 est retrouvée dans les tissus tumoraux de cancer colorectal, du sein, du pancréas, du rein tandis que les tissus sains des mêmes origines n'expriment pas la NRP2. L'expression de la NRP2 étant spécifique des tissus tumoraux, nous nous sommes naturellement demandé si cette protéine n'était pas elle-même impliquée dans l'oncogénèse. L'étude du rôle précis de la NRP2 dans la progression tumorale a été rendu possible par l'utilisation de lignées transgéniques pour l'expression de NRP2. L'expression de la NRP2 dans la lignée Colo320 a été diminuée par un siRNA ciblant spécifiquement la NRP2 tandis que l'expression de NRP2 a été induite dans la lignée HT29 grâce à une technique de transfert de gène.

En culture, nous nous sommes rapidement aperçus que les cellules exprimant la NRP2 (HT29^{NRP2} et Colo320^{siRNA-ctrl}) proliféraient plus rapidement en culture. (Figure 2) Tandis que différentes études suggéraient que la NRP2 participait à la progression tumorale en raison de ses interactions avec la voie de signalisation du VEGF, la NRP2 augmente la prolifération de nos cellules de cancer colorectal indépendamment du VEGF. En effet, la neutralisation du VEGF par le bevacizumab n'a aucun impact sur la prolifération cellulaire de cellules exprimant la NRP2 dans notre étude. (Figure 2) Par ailleurs, les sémaphorines, et en particulier la sémaphorine 3F qui est un ligand spécifique de la NRP2, ne semblent pas non plus intervenir dans ce processus. Le rôle de la NRP2 dans divers aspects de l'oncogénèse a

ensuite été étudié, notamment son implication dans la formation de colonies, dans l'invasion cellulaire *in vitro* et la formation de tumeurs *in vivo*. (Figures 2 et 3) Tandis que la NRP2 augmente la prolifération cellulaire, l'invasion cellulaire, la formation de colonies en milieu semi gélosé agar, elle est à l'origine de tumeurs plus grosses dans des expériences de xénogreffes murines. (Figures 2 et 3) Ces résultats sont en partie confirmés par deux études parues en 2008. [52,53]

En outre, très rapidement, par simple observation au microscope inversé, nous avons remarqué que l'expression de NRP2 était également à l'origine de modifications structurales et phénotypiques importantes des cellules en culture. En effet, 72h après transfection par le vecteur d'expression pcDNA3.1-NRP2+, les cellules HT29 prennent une forme allongée, fibroblastique en culture tandis que les cellules HT29 transfectées avec un vecteur contrôle pcDNA3.1 sont plutôt rondes. Ce changement inattendu de morphologie des cellules en culture est caractéristique du processus de TEM. Durant la TEM, les cellules perdent un nombre important de leurs caractéristiques épithéliales pour gagner des propriétés de cellules mésenchymateuses. Nous avons donc analysé l'expression de marqueurs épithéliaux et mésenchymateux par western-blot et IHC dans nos cellules tumorales en fonction de l'expression de NRP2. L'expression de NRP2 dans les cellules HT29 inhibe complètement l'expression des marqueurs épithéliaux comme la E-cadhérine ou la cytokératine-20 et induit l'expression de marqueurs mésenchymateux tels que la vimentine. (Figure 4) La diminution d'expression de NRP2 par siRNA dans la lignée Colo320 diminue l'expression de vimentine et restaure l'expression d'E-cadhérine. L'expression de NRP2 semble donc associée à un phénotype mésenchymateux dans ces cellules de cancer colorectal. (Figure 4)

De nombreux facteurs de transcription régulant la TEM sont connus, comme les facteurs de transcription de la famille de Snail, de Twist, de la voie Sonic-Hedgehog ou encore de la β -caténine. Grâce à des expériences de western-blotting et de RT-PCR, nous nous sommes

aperçus que la NRP2 induisait l'expression de Snail1, Twist1 ou encore Gli. De plus, par une technique de microscopie confocale, nous avons également montré que la NRP2 était à l'origine d'une translocation de la β -caténine du cytoplasme vers le noyau dans ces cellules. (Figure 4) L'ensemble des facteurs de transcription n'a pas été étudié dans notre étude ; néanmoins, la perte d'expression d'E-cadhérine apparaît comme la signature même du processus de TEM.

Nous avons par ailleurs étudié les expressions relatives de NRP2, de vimentine et d'E-cadhérine dans des lignées cellulaires de cancer du rein et du pancréas, en western-blot. La NRP2 est également corrélée à la perte d'expression d'E-cadhérine et à l'acquisition de vimentine dans ces lignées cellulaires, suggérant ainsi que nos observations dans le contexte du cancer colorectal pourraient être étendues à d'autres types de cancer et donc à un mécanisme plus général. Dans ce contexte, il serait intéressant d'étudier la corrélation entre les expressions d'E-cadhérine, de vimentine et de NRP2 dans des tumeurs humaines de diverses origines, par IHC.

Dans la littérature, le TGF β 1 apparaît comme une cytokine-clé du processus de TEM. Cette observation nous a conduits à investiguer le rôle de la NRP2 dans la voie de signalisation du TGF- β 1.

Au repos et après stimulation par du TGF β 1, les cellules tumorales exprimant la NRP2 possèdent une plus grande quantité de Smad2/3 phosphorylés dans leurs noyaux que les cellules dépourvues de NRP2. (Figure 5) Pour confirmer cette hypothèse d'une possible activation de la voie de signalisation du TGF β 1 par la NRP2, nous avons transfecté ces cellules tumorales par un vecteur possédant des éléments de réponse Smad2/3 et un gène rapporteur (luciférase) puis soumis ces cellules à une stimulation TGF β 1. L'activité luciférase est plus forte dans les cellules exprimant la NRP2 par rapport aux cellules dépourvues de

NRP2 après stimulation par du TGF β 1, suggérant ainsi une implication de la NRP2 dans la voie de signalisation du TGF β 1. (Figure 5)

La NRP2 n'est cependant pas un récepteur tyrosine-kinase. En raison d'une très courte portion intra-cytoplasmique, elle ne semble pas capable de transmettre des signaux biologiques par elle-même. De plus, les cellules Colo320 n'expriment que le récepteur du type 1 et pas de récepteur de type 2 du TGF β 1. Or la voie de signalisation du TGF β 1 semble active dans ces cellules, puisque des protéines Smad2/3 phosphorylées ont été retrouvées par western-blotting. L'hypothèse d'une interaction directe entre la NRP2 et le récepteur de type 1 du TGF β 1 pour la transmission du signal a donc été formulée. Pour confirmer cette hypothèse, des inhibiteurs chimiques spécifiques de ce TGFRI ont été utilisés, comme le SB-431542 ou le SD208. Le traitement de cellules exprimant la NRP2 par ces inhibiteurs restaure en partie le phénotype épithélial, suggérant ainsi que le TGFRI est impliqué dans la TEM médiée par la NRP2. (Figure 6) Des expériences de co-immunoprécipitation confirment également l'association entre la NRP2 et le TGFRI. Les cellules Colo320 n'expriment pas le TGFRII, récepteur responsable de la liaison du TGF β 1. Nous nous sommes alors demandé si la NRP2 ne pouvait pas jouer ce rôle de récepteur pour le TGF β 1. Des expériences de type Biacore nous ont confirmé que la NRP2 était un nouveau type de récepteur pour le TGF β 1 au même titre que pour le VEGF. L'ensemble des résultats apportés par ce travail peut être résumé par le schéma suivant :

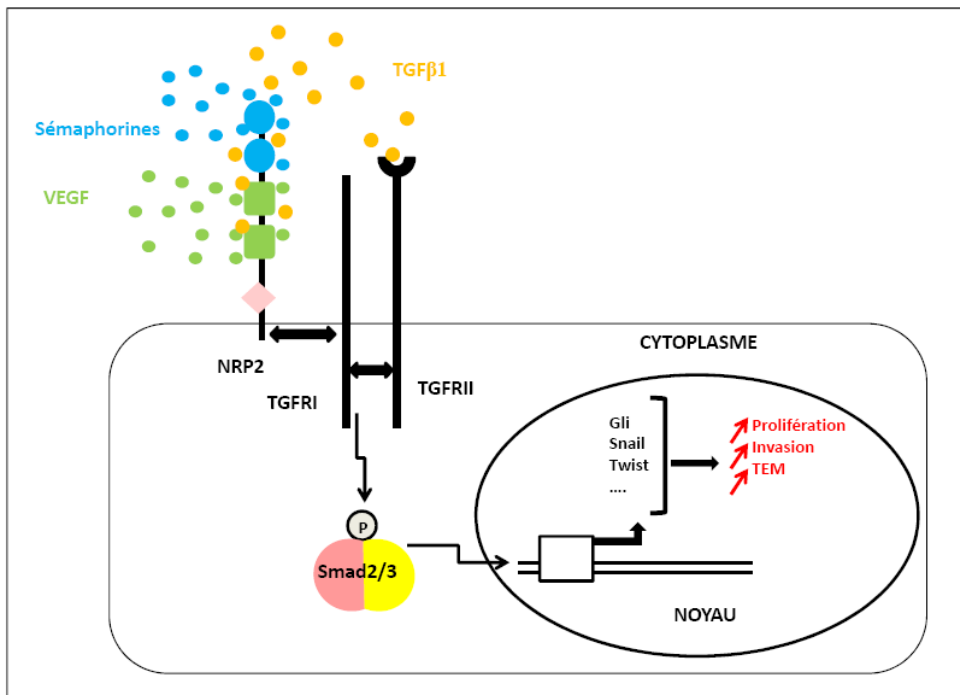


Figure 31 : La NRP2 induit une TEM TGFβ1-dépendante dans des cellules tumorales de cancer colorectal, via son interaction avec le TGFRI. La NRP2 est un nouveau type de récepteur pour le TGFβ1. Grâce à ses interactions avec le TGFRI, elle permet l'activation de la voie de signalisation du TGFβ1 et l'expression de facteurs de transcription impliqués dans la TEM, aboutissant alors à une TEM dans ces cellules tumorales de cancer colorectal.

PUBLICATION N°2

Grandclement C, Borg C, Wijdenes J « Induction of p53 expression by neutralization of neuropilin-2 for the treatment of cancers ». *WO2010/023382A1, 04/03/2010.*

INTRODUCTION A LA PUBLICATION N°2

1. Contexte de l'étude : Plateforme “Innovative Immune Targeting of Cancer” (ITAC)

La société de biotechnologie Diaclone, dirigée par le Dr John Wijdenes, est spécialisée dans le développement et la production d'anticorps monoclonaux murins et de tests associés. Se trouvant à proximité de notre laboratoire, cette société a généré plusieurs anticorps monoclonaux actuellement évalués en recherche clinique, principalement dans le domaine des maladies inflammatoires (clones B-E2 (CD2), B-F5 (CD4), B-B10 (CD25/Leukotac), B-C7 (anti-TNF- α), B-E8 (anti-IL-6) and B-B4 (anti-CD138). Dès 2006, nous avons collaboré avec cette société pour la production d'anticorps monoclonaux murins thérapeutiques dirigés contre la NRP2. Cette collaboration a permis notamment la création d'une plateforme de production d'anticorps monoclonaux en 2008, la plateforme ITAC “*Innovative Immune Targeting of Cancer*” pour favoriser le transfert des applications biotechnologiques des équipes de recherche de notre unité vers la recherche clinique.

La NRP2 semble réguler la progression tumorale par de nombreux mécanismes, tels que la prolifération, l'invasion cellulaires mais aussi la TEM. A la vue de ces multiples rôles dans la progression tumorale, la NRP2 apparait donc comme une cible extrêmement intéressante dans le cadre du développement de thérapies ciblées innovantes en cancérologie.

L'un des premiers projets réalisés au sein de cette plateforme biotechnologique a donc consisté en la production d'anticorps monoclonaux murins dirigés contre la NRP2 humaine. 5 fusions au total ont été réalisées depuis 2006 dans cet objectif (numéros des fusions : 612, 20, 21, 22, 24)

2. Production d'anticorps monoclonaux murins thérapeutiques anti-NRP2

Nous avons suivi la technique de production d'anticorps monoclonaux décrite par Köhler et Milstein.

Immunsation

La première étape consiste en une inoculation d'un antigène à un animal de laboratoire, (souvent un rongeur, les plus courants étant la souris, le rat ou le lapin), ce qui a pour effet de produire des plasmocytes libérant des anticorps dirigés contre cet antigène. Les principales voies d'injection d'un antigène chez la souris sont les voies intrapéritonéale, sous-cutanée, intraveineuse et dans les coussinets plantaires. [301]

Les antigènes utilisés sont souvent des protéines ou des peptides, mais les carbohydrates, les acides nucléiques, les petites molécules organiques (haptènes) conjuguées à des protéines porteuses appropriées, les cellules, les extraits de cellules ou de tissus peuvent aussi être utilisés. Il est possible d'obtenir des anticorps reconnaissant des substances qui ne sont pas immunogènes (=haptène), en les conjuguant à des vecteurs ou protéines « carrier » de haut poids moléculaire comme la BSA, le KLH ou le DNP.

La préparation antigénique est rarement administrée seule. Elle est souvent associée à une émulsion appelée adjuvant d'immunsation pour devenir plus immunogène. Correctement choisi et préparé, l'adjuvant augmente l'immunogénéité de l'antigène, ralentit sa libération dans la circulation sanguine et par conséquent sa dégradation et son élimination, favorise sa présentation au système immunitaire et entretient la stimulation. L'adjuvant permet aussi parfois de réduire la quantité de l'antigène utilisé, ce qui peut avoir une grande importance lorsqu'il s'agit de molécules rares ou particulièrement précieuses. Plusieurs types d'adjuvant peuvent être utilisés comme l'adjuvant complet ou incomplet de Freund, les adjuvants à base

de substances minérales (hydroxydes d'aluminium, phosphate d'aluminium, phosphate de calcium etc), les liposomes, etc. Cependant, l'adjuvant le plus utilisé est l'adjuvant de Freund. Plusieurs protocoles d'immunisation sont possibles en variant les doses, les intervalles des injections, l'adjuvant utilisé et la durée du traitement. Des anticorps sont retrouvés dans le sérum des animaux immunisés en moyenne 7 jours après la 1^{ère} injection et persistent à une faible concentration pendant quelques jours. [301] Il est bien souvent difficile de détecter des anticorps après cette première injection, bien que la sensibilisation soit efficace. Il faut respecter un certain délai avant de réintroduire un antigène chez un animal sensibilisé. Un minimum de 2 à 3 semaines est recommandé pour des immunisations faites en intra-péritonéal ou en intra-veineux, tandis qu'un délai de 7 jours seulement est observé pour des injections dans les coussinets plantaires de souris. [301]

Dans ce contexte, nous avons immunisé pour chaque fusion, cinq souris Balb/C femelles avec des cellules mastocytaires murines P815 transfectées avec la NRP2 humaine (P815^{NRP2}) une fois par semaine pendant 4 ou 5 semaines.

Chaque immunisation a consisté en l'administration en « foot-pad » (dans les coussinets plantaires des souris) de 1×10^6 cellules P815^{NRP2} dans chaque patte postérieure de la souris (soit 2×10^6 P815^{NRP2} par souris). Les cellules servant à l'immunisation d'une souris étaient diluées dans 25µL de PBS 1X et dans 25µL d'adjuvant Ribi. Chaque souris a reçu 50µL de mix cellulaire (25µL par patte postérieure) à chaque rappel durant le protocole d'immunisation.

Fusion cellulaire

Les souris immunisées ont été ensuite sacrifiées et les lymphocytes B isolés à partir des ganglions lymphatiques. Ces lymphocytes ont été fusionnés avec une lignée de myélome murin X63/AG 8653 (le rapport lymphocytes/cellules de myélome était de 5 :1), en présence de polyéthylène glycol (PEG). Cette étape de fusion peut être effectuée en utilisant le PEG ou par électroporation. Le PEG fusionne les membranes plasmiques des cellules de myélome et/ou des cellules sécrétant des anticorps, ce qui aboutit à la formation d'une cellule unique. Les cellules issues de cette étape de fusion sont ensuite lavées une fois et mises en culture dans un milieu sélectif composé de milieu RPMI 1640, additionné de 10% de SVF (Sérum de Veau Fœtal) inactivé par la chaleur, de 4 mM de L-glutamine, 100 µg/mL de streptomycine, de 100 UI/ml de pénicilline, de 13,6 µg/mL d'hypoxanthine, 0,19 µg/mL d'aminoptérine et 3.88 UI /mL de thymidine. (milieu HAT)

Les cellules de myélome utilisées pour la fusion ont été sélectionnées auparavant avec de la 8-azaguanine. En effet, l'addition de 8-azaguanine dans le milieu de culture des myélômes a permis de sélectionner des cellules ayant une mutation dans le gène codant pour l'hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transférase (HPRT), rendant non fonctionnelle cette dernière. Les cellules eucaryotes disposent en effet de deux voies distinctes pour synthétiser les nucléotides : la voie de néosynthèse à partir de sucres et d'acides aminés et la voie de secours, à partir de nucléosides. L'HGPRT assure une étape essentielle de cette voie de secours. La sélection des cellules fusionnées se fait avec les composés chimiques hypoxanthine, aminoptérine et thymidine (milieu HAT). [301] L'aminoptérine en bloquant la voie de néosynthèse des nucléotides, oblige les cellules à utiliser la voie de secours. Les myélomes parents n'ayant pas l'enzyme essentielle à la voie de secours, seules les cellules

fusionnées et l'ayant ainsi acquis pourront survivre. [301] L'hypoxanthine et la thymidine sont les substrats de cette voie de sauvetage. (Figure 32)

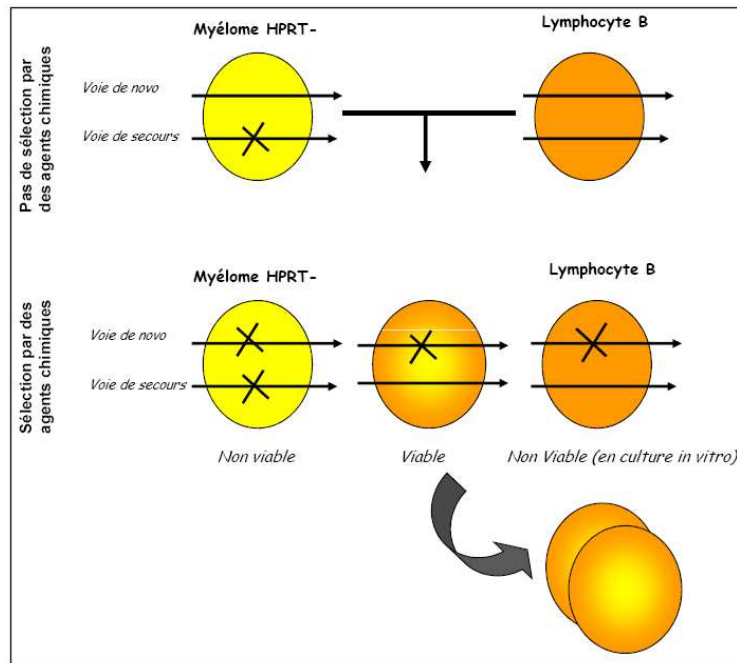


Figure 32 : Sélection des hybridomes par culture en milieu sélectif HAT. Inspiré de Harlow et al, 1991 [301].

Au bout de quelques semaines de sélection, le milieu HAT est remplacé par du milieu HT, (Hypoxanthine, Thymidine) puis par le milieu habituel. [302] Au bout d'un laps de temps variant de 10 jours à un mois, les hybridomes se mettent à proliférer en culture et se développent en colonies. Il faut alors sélectionner les hybridomes produisant les anticorps d'intérêt, les cloner puis les sous-cloner. [302]

« Screening »

Chaque clone est donc testé lors de la phase de « screening » pour sa capacité à produire des anticorps spécifiques la plupart du temps en cytométrie de flux, en Western Blot, ou par ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).

Dans notre étude, dix jours après la fusion, les surnageants des cultures dans lesquelles une croissance d'hybridomes a été observée sont testés pour détecter la production d'anticorps monoclonaux anti-NRP2. Dans ce but, les surnageants de chaque puits culture d'hybridomes sont testés par une technique d'immunofluorescence indirecte (IFI) sur les lignées cellulaires exprimant ou non la NRP2. (HT29^{ctrl}, HT29^{NRP2}, P815, P815^{NRP2}). Les surnageants sont incubés avec ces cellules pendant 20min à 4°C, et révélés ensuite par l'ajout d'un anticorps secondaire chèvre anti-souris couplé au FITC (fluorescein isothiocyanate) (Figure 33). La fluorescence est ensuite analysée par un cytomètre de flux.

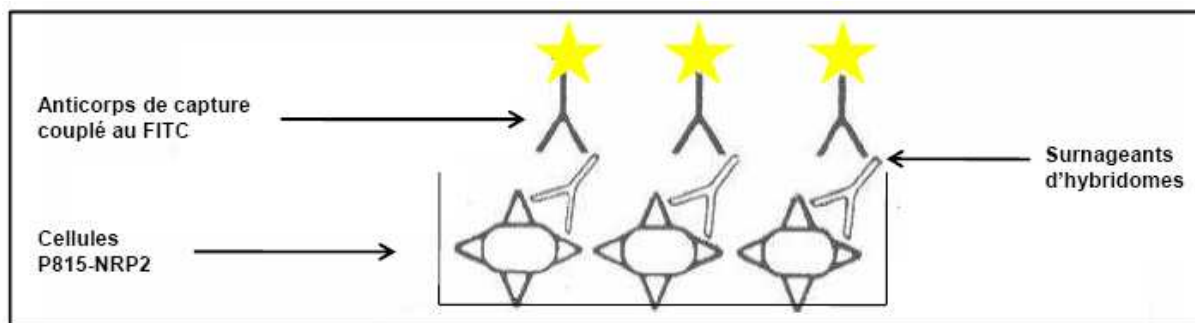


Figure 33 : Technique de screening par immunofluorescence indirecte.

Les hybridomes qui produisent des anticorps reconnaissant les lignées P815^{NRP2} et HT29^{NRP2} et qui ne reconnaissent pas les lignées P815 et HT29^{ctrl} sont donc sélectionnés puis clonés en utilisant la méthode de la dilution limite (densité d'ensemencement de 1 cellule par puits de culture).

A l'issue de ces 5 fusions, de nombreux hybridomes candidats sécrétant des anticorps reconnaissant spécifiquement la NRP2 humaine ont été isolés. Ces hybridomes et les anticorps anti-NRP2 qu'ils secrètent sont tous deux désignés par le terme « ITAC-B ». Leur capacité à produire des anticorps anti-NRP2 bioactifs a été ensuite évaluée grâce à des tests de bioactivité in vitro puis in vivo.

Production

Après la phase de sélection, la production de lots d'anticorps se fait par purification d'un milieu biologique contenant l'anticorps en solution, celui-ci étant soit un ascite produit chez l'animal (c'est-à-dire une injection intrapéritonéale de l'hybridome dans un animal préparé à l'avance) soit un surnageant de culture cellulaire ayant servi à cultiver l'hybridome in vitro. Selon l'échelle de grandeur désirée, la production en suspension cellulaire peut se faire dans des bioréacteurs. Nous avons choisi dans notre étude de faire une production d'anticorps grâce à la réalisation d'ascite dans des souris Balb/c. La phase de purification proprement dite de nos anticorps anti-NRP2 a été réalisée par chromatographie d'affinité. Elle peut également se faire par d'autres manières, comme par exemple la chromatographie liquide haute performance ou encore par précipitation à l'ammonium.

Les clones d'hybridome sécrétant un anticorps de spécificité voulue sont ensuite caractérisés afin de connaître la classe des chaînes d'immunoglobine, leur affinité, ou l'épitope reconnu (epitope mapping). Nous avons choisi de ne retenir que des anticorps de la classe IgG1. Les anticorps IgG1 sont en effet souvent à l'origine d'une bonne bioactivité in vivo. Pour cette raison, nous avons choisi de retenir entre autres, un anticorps monoclonal IgG1, l'anticorps ITAC-B1, en raison de sa bonne spécificité.

Il est également possible de déterminer la séquence d'ADN du gène des immunoglobulines de ce clone, de le sous-cloner et de le modifier. Nous avons dans ce contexte séquencé les gènes des immunoglobulines du clone ITAC-B1, dans l'objectif ensuite de produire des anticorps chimériques, humanisés ou des fragments d'anticorps.

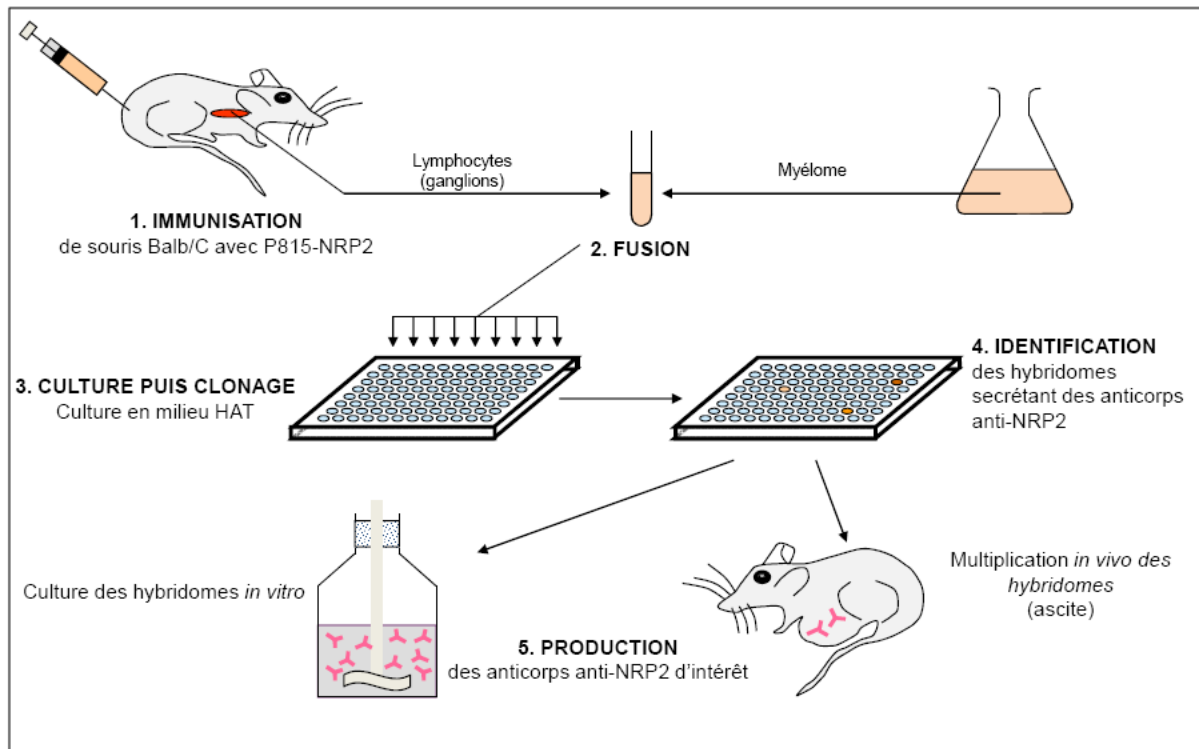


Figure 34: Les différentes étapes de production d'anticorps monoclonaux murins anti-NRP2.

3. Détermination de la bioactivité des anticorps monoclonaux anti-NRP2

Plusieurs études montrent que la NRP2 est impliquée dans la régulation de l'apoptose cellulaire. En effet, 2 ligands de la NRP2, les sémaphorines 3B et 3F semblent pouvoir induire une apoptose des cellules tumorales et endothéliales exprimant la NRP2. [119,126] A l'inverse la liaison des membres de la famille du VEGF sur les NRPs semblent être à l'origine d'un signal induisant plutôt la survie cellulaire. Nous nous sommes alors demandé si la neutralisation de l'expression de la NRP2 par nos anticorps anti-NRP2 ne pouvait pas réguler les mécanismes de survie/mort des cellules tumorales exprimant la NRP2. Pour cela, la capacité d'induction d'apoptose des cellules tumorales par l'anticorps monoclonal ITAC-B1 a été en premier lieu étudiée dans notre travail. Des cellules humaines de cancer colorectal ou de cancer du pancréas exprimant la NRP2 ont été mises en présence avec des quantités

variables d'anticorps anti-NRP2, en culture, pendant au moins 5h. L'externalisation des phosphatidylsérines a été mise en évidence par un marquage membranaire pour une analyse en cytométrie de flux. L'anticorps ITAC-B1 semble en effet capable d'induire l'apoptose de cellules tumorales du colon et du pancréas en 5h.

Le clivage de la procaspase-3 constituant le dernier événement commun aux différentes voies d'apoptose, nous avons également étudié l'expression de caspases clivées après traitement par l'anticorps ITAC-B1 ou par un anticorps contrôle par une technique de western-blotting. L'anticorps ITAC-B1 semble induire le clivage de la pro-caspase-3. De plus, le traitement par le zvad-fmk, une molécule chimique inhibitrice de la plupart des caspases diminue l'apoptose induite par nos anticorps, soulignant donc bien une participation des caspases et notamment de la caspase-3 dans ce mécanisme. Nous avons ensuite cherché à connaître le mécanisme précis d'induction d'apoptose de nos anticorps, notamment s'ils induisaient une apoptose intrinsèque ou extrinsèque. Pour cela, nous avons notamment étudié la capacité de l'anticorps à dépolariser la membrane mitochondriale, grâce à un marqueur de la dépolarisation, le mitotracker. Le traitement de cellules cancéreuses exprimant la NRP2 pendant 5h avec l'anticorps ITAC-B1 dépolarise la membrane mitochondriale, suggérant que ITAC-B1 pourrait induire une apoptose dépendante de la mitochondrie (voie intrinsèque).

La présence de molécules impliquées dans la voie extrinsèque d'apoptose, notamment les récepteurs DR4, DR5 et Fas a également été étudiée par cytométrie de flux. L'expression de la NRP2 semble être à l'origine d'une expression réduite des récepteurs de mort DR4, DR5 et Fas à la surface de cellules tumorales de cancer colorectal et du pancréas. Dès lors, nous nous sommes alors demandé si la neutralisation de la NRP2 par l'anticorps ITAC-B1 ne pouvait pas restaurer l'expression de ces récepteurs à la surface membranaire et donc restaurer la

sensibilité de ces cellules tumorales à la mort induite par les cellules immunitaires et les molécules FasL et Trail. Ce point de notre travail reste encore à être déterminé avec précision.

De plus, dans notre étude, l'expression de NRP2 semble inversement corrélée à l'expression de p53 dans les cellules de cancer colorectal. En outre, la neutralisation de la NRP2 par l'anticorps ITACB1 semble capable de restaurer en partie l'expression de la p53 et l'apoptose induite par cet anticorps dans la lignée Colo320.

La capacité de l'anticorps monoclonal ITAC-B1 à restaurer l'expression de la protéine p53 et à induire l'apoptose de lignées de cancer colorectal a fait l'objet d'un dépôt de brevet en 2010 : Grandclement C, Borg C, Wijdenes J « *Induction of p53 expression by neutralization of neuropilin-2 for the treatment of cancers* ». WO2010/023382A1, 04/03/2010.

PUBLICATION N°2

Grandclement C, Borg C, Wijdenes J « Induction of p53 expression by neutralization of neuropilin-2 for the treatment of cancers ». *WO2010/023382A1, 04/03/2010.*

**DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)**

(43) Date de la publication internationale **(10) Numéro de publication internationale**
04 mars 2010 (04.03.2010) **PCT** **WO 2010/023382 A1**

(51) Classification internationale des brevets:

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale:

PCT/FR2009/001035

(22) Date de dépôt international:

26 août 2009 (26.08.2009)

(25) Langue de dépôt:

France

(26) Langue de publication:

France

(30) Données relatives à la priorité

0804725 27 août 2008 FR
(27.08.2008)

(71) Déposants : DIACLONE [FR/FR]; 1, bd

Alexandre Fleming (FR). **EFS BOURGOGNE
FRANCHE COMTE** [FR/FR]; 1, bd Alexandre
Fleming (FR). **UNIVERSITE DE FRANCHE
COMTE** [FR/FR]; 1, rue Claude Goudimel
(FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants : BORG, Christophe
[FR/FR]; 2, impasse Monet (FR). **WIJDENES,
John** [FR/FR]; 21, chemin de la Gratte (FR).

**(74) Mandataire : VIALLE-PRESLES, Marie-José
et al.;** Cabinet Ores (FR).

(81) États désignés (national): AE, AG, AL, AM,
AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY,
BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP,
KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR,
LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN,
MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM,
PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE,
SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(84) États désignés (régional): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ,
UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ,
MD, RU, TJ, TM), AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE,
DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT,
LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO,
SE, SI, SK, SM, TR, OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD,
TG)

GRAND CLEMENT, Camille [FR/FR]; 4, rue
du Refuge (FR).

Publiée

- *avec rapport de recherche internationale*
- *avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues*
- *avec une (des) indication(s) relative(s) à du matériel biologique déposé, fournie(s) selon la règle 13bis, séparément, et non avec la description*
- *avec la partie réservée au listage des séquences de la description publiée séparément sous forme électronique et disponible sur demande auprès du Bureau international*

(54) : INDUCTION OF P53 EXPRESSION BY NEUTRALIZATION OF NEUROPILIN-2 FOR THE TREATMENT OF CANCERS

(54) : INDUCTION DE L'EXPRESSION DE P53 PAR NEUTRALISATION DE LA NEUROPILINE-2 POUR LE TRAITEMENT DES CANCERS

(57)

The present invention relates to the use of anti-human neuropilin-2 antibodies, or of ligands of human neuropilin-2 derived from these antibodies, for obtaining a medicament for increasing p53 expression and for inducing tumour cell apoptosis in the context of an anticancer treatment.

(57)

La présente invention est relative à l'utilisation d'anticorps anti-neuropiline 2 humaine, ou des ligands de la neuropiline 2 humaine dérivés de ces anticorps, pour l'obtention d'un médicament destiné à augmenter l'expression de p53 et à induire l'apoptose des cellules tumorales dans le cadre d'un traitement anticancéreux.

INDUCTION DE L'EXPRESSION DE P53 PAR NEUTRALISATION DE LA NEUROPILINE-2 POUR LE TRAITEMENT DES CANCERS

La présente invention est relative au traitement du cancer par surexpression du gène suppresseur des tumeurs p53 et induction de l'apoptose des cellules tumorales par ciblage de la neuropiline 2.

Le cancer est caractérisé par une prolifération cellulaire incontrôlée généralement due à des mutations au niveau des gènes contrôlant positivement (les oncogènes) ou négativement (les gènes suppresseurs des tumeurs) la prolifération cellulaire. De par leur prolifération anarchique, les cellules tumorales envahissent localement le tissu sain, et après avoir subi de nouvelles mutations, peuvent acquérir la faculté de migrer dans la circulation sanguine et de se propager à distance de la tumeur initiale pour former des métastases. Cependant, la néovascularisation de la tumeur via le mécanisme d'angiogénèse est essentielle à la croissance tumorale, puisque toute cellule, et en particulier les cellules tumorales très exigeantes en oxygène et en énergie, ne peuvent survivre à plus de quelques dizaines de millimètres d'un vaisseau sanguin.

Les traitements anticancéreux actuels ont donc pour cibles principales, d'une part les cellules tumorales elles-mêmes, et d'autre part l'angiogénèse tumorale.

En ce qui concerne les stratégies anti-angiogénèse, l'implication des facteurs de croissance, notamment l'EGF ou le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), dans la progression des cancers et dans l'angiogénèse a été mise en évidence. Plusieurs molécules ciblant l'action des VEGFs ont été développées comme médicament anti-angiogénèse : le bevacizumab (Avastin®), anticorps monoclonal humanisé dirigé contre le VEGF, a été utilisé dès 2004 pour le traitement du cancer colorectal métastatique ; le sunitinib et le sorafénib, molécules inhibant la transduction du signal de la voie VEGF/VEGF-Receptor, ont été utilisés dans des stratégies anti-angiogénèse pour le traitement du carcinome rénal métastatique.

Concernant les stratégies ciblant la tumeur et les cellules tumorales, l'ablation des tissus tumoraux par voie chirurgicale (lorsque cela est possible), la radiothérapie des tumeurs solides, des immunothérapies visant à renforcer la réponse immunitaire contre les cellules cancéreuses, et les chimiothérapies représentent les traitements thérapeutiques standards. Les avancées majeures dans la compréhension des mécanismes moléculaires de la cancérogénèse ont permis le développement de nouvelles chimiothérapies, dont l'efficacité dépend cependant du type de cancer à traiter et de l'organe atteint. En outre, de nombreux cancers posent encore des problèmes de santé publique majeurs et s'avèrent résistants aux thérapeutiques classiques. Par exemple, les cancers digestifs (pancréas, cholangiocarcinomes, cancers colorectaux) deviennent au cours de leur histoire naturelle, rapidement résistants à la chimiothérapie. La perte du gène suppresseur des tumeurs codant pour la protéine p53 est un des mécanismes majeurs expliquant la résistance des cellules tumorales à l'apoptose et aux traitements anti-néoplasiques conventionnels comme la chimiothérapie ou la radiothérapie. En effet, la protéine p53 a pour fonction d'arrêter le cycle cellulaire ou d'induire l'apoptose d'une cellule en réponse aux

dommages de l'ADN cellulaire ou à l'activation des oncogènes. La protéine p53 joue donc un rôle central dans le contrôle du cycle cellulaire et dans le maintien de l'intégrité du génome, en permettant à la cellule dont le cycle cellulaire est interrompu de réparer l'anomalie génétique, ou bien en entraînant sa destruction par apoptose. p53 étant essentielle pour protéger l'organisme des effets d'une division cellulaire aberrante ou incontrôlée, l'absence de p53, sa sous-expression ou l'expression d'une protéine p53 non-fonctionnelle, a pour conséquence la survie des cellules tumorales.

Dans un modèle d'étude *in vitro* et dans des modèles murins, il a été montré que la restauration de l'expression de p53 par transfert de gène favorise la régression des cancers et améliore l'efficacité des traitements cytotoxiques. Des études *in vitro* ont également montré que dans des cellules exprimant une protéine sauvage et une protéine p53 mutante ayant un effet dominant négatif envers la protéine sauvage, l'interférence par un si ARN ciblant spécifiquement FARNm codant pour la protéine p53 mutante rétablit la fonction de p53 (MARTINEZ et al. P.N.A.S., 99(23): 14849-54, 2002). Il a par ailleurs été montré qu'il est possible de "réactiver" des protéines p53 mutantes en stabilisant une conformation fonctionnelle de ces protéines. Les molécules CP-31398, PRIMA-I et MIRA-I, premières molécules développées présentant cette capacité, ont été utilisées avec succès dans un modèle de xénogreffe humaine pour inhiber la croissance tumorale (pour revue, cf. par exemple LEVESQUE & EASTMAN, Carcinogenesis., 28(1) :13-20, 2007). La restauration de l'expression d'une protéine p53 fonctionnelle, ainsi que l'induction de la surexpression de cette protéine, représentent donc des objectifs essentiels dans le développement de thérapies antitumorales.

Les Inventeurs ont maintenant mis en évidence l'existence d'une corrélation inverse entre la neuropiline-2 (NRP-2) et l'expression de la protéine p53, et ont montré que de façon surprenante l'expression de p53 pouvait être induite ou augmentée en inhibant l'expression de la neuropiline-2 par siARN.

La neuropiline-2, glycoprotéine transmembranaire d'environ 130 kDa, est un récepteur des sémaphorines, notamment de la sémaphorine 3F, et de facteurs de croissance de la famille du VEGF. Elle est exprimée chez l'homme par les neurones, les cellules endothéliales, les ostéoblastes et par une large variété de néoplasmes. Elle est composée d'un domaine intracytoplasmique de 40 acides aminés environ, d'un domaine transmembranaire et d'un domaine extracellulaire. Ce domaine extracellulaire comprend un domaine A, constitué de 2 sous-domaines (ala2), un domaine B également constitué de 2 sous-domaines (blb2), et un domaine C. Il a été montré que le domaine B constituait le site de liaison du VEGF, alors que la liaison avec la sémaphorine 3 F impliquait à la fois le domaine A et le domaine B (GERETTI et al., J. Biol. Chem., 282, 25698-707, 2007) ; le domaine C est quant à lui impliqué dans l'oligomérisation de la NRP-2.

Dans de nombreux cas, les neuropilines sont les seuls récepteurs des VEGF exprimés par les cellules cancéreuses (BIELENBERG et al. Exp. Cell. Res., 312(5) :584-593, 2006), et plusieurs études ont montré que l'expression, voire la surexpression des neuropilines,

est généralement corrélée à une augmentation de la croissance tumorale et du caractère invasif et métastatique des cancers, ainsi qu'à un pronostic défavorable.

En outre, de nombreuses observations indiquent que ces récepteurs jouent un rôle crucial dans la progression tumorale en activant l'angiogénèse : notamment, la liaison du VEGF à la NRP-2 est responsable d'une activité pro-angiogénique, médiée par une coopération entre le court domaine intracytoplasmique de NRP-2 et celui du récepteur au VEGF VEGFR1. Il a été rapporté que NRP-2 a la capacité d'induire la phosphorylation du récepteur VEGFR1 et de la protéine AKT, favorisant ainsi la progression des cancers, et que la suppression de la neuropiline-2 par siARN s'oppose à l'apparition de métastases dans des xénogreffes et réduit la taille des tumeurs (GRAY et al. J. Natl. Cancer Inst., 100 : 109- 120, 2008). Il a par ailleurs été montré qu'un anticorps anti-NRP-2 (dénommé anti-Nrp2^B), dirigé contre le site de liaison au VEGF du domaine B de NRP-2, pouvait réduire la lymphangiogenèse tumorale et la formation de métastases ; cet anticorps agit en inhibant la migration des cellules endothéliales lymphatiques, mais n'a aucun effet sur la migration, la prolifération, ou l'apoptose des cellules tumorales (CAUNT et al., Cancer Cell, 13, 331-42, 2008).

Les inventeurs ont généré des anticorps anti-NRP-2, et ont constaté que certains d'entre eux produisaient les mêmes effets sur l'expression de p53 et l'induction de l'apoptose des cellules tumorales que l'inhibition de NRP-2 par siARN, et que ces effets étaient indépendants du VEGF. En outre, ils ont constaté in vitro et in vivo dans un modèle murin que ces anticorps potentialisaient l'efficacité de traitements anticancéreux.

Ces données ouvrent de nouvelles perspectives thérapeutiques, en particulier concernant la possibilité de développer des stratégies innovantes de sensibilisation à la chimiothérapie ou à la radiothérapie ou à d'autres agents anti-cancéreux.

Ainsi, la présente invention a pour objet un anticorps anti-neuropiline-2 humaine, ou un ligand de la neuropiline-2 humaine dérivé dudit anticorps, caractérisé en ce que sa fixation à des cellules tumorales exprimant la neuropiline 2 humaine induit l'apoptose desdites cellules tumorales.

Avantageusement, des anticorps ou ligands anti-neuropiline 2 humaine conformes à l'invention possèdent, outre leur capacité d'induction de l'apoptose des cellules tumorales exprimant la neuropiline 2 humaine, les caractéristiques suivantes :

- ils induisent l'expression de p53, et leur capacité à induire l'apoptose est dépendante de cette expression de p53 (elle est diminuée par un inhibiteur de p53, la pifithrin- α) ;

- leurs propriétés de liaison à la neuropiline, et leur capacité à induire l'apoptose sont indépendantes du VEGF (leur fixation à la surface de cellules tumorales exprimant la neuropiline-2 humaine et leur capacité à induire l'apoptose desdites cellules ne sont pas modifiées par la présence de VEGF).

Des anticorps conformes à l'invention peuvent ainsi être sélectionnés, à partir d'anticorps anti-neuropiline 2 humaine ou de ligands dérivés de ceux-ci, sur la base de leur

capacité à induire l'apoptose de cellules tumorales exprimant la neuropiline-2 humaine, et/ou sur la base d'une ou plusieurs des autres caractéristiques mentionnées ci-dessus.

Les anticorps conformes à l'invention peuvent être des anticorps naturels, polyclonaux ou monoclonaux, des anticorps recombinants, notamment des anticorps chimériques ou

humanisés. On entend par « anticorps chimérique » un anticorps possédant les domaines variables de l'anticorps monoclonal dont il est issu, couplés aux domaines constants d'un autre anticorps, de préférence un anticorps humain.

Le terme « anticorps humanisé » se réfère à un anticorps initialement produit par un animal non humain, de préférence la souris, ayant conservé sa spécificité de liaison à la neuropiline 2, mais dans lequel, afin de réduire son immunogénicité chez l'homme, le plus de séquences murines possible ont été remplacées par les séquences humaines correspondantes. En ce qui concerne les domaines variables, les séquences remplacées sont en général les régions FR (framework), c'est-à-dire les séquences situées entre les boucles hypervariables CDRs.

Des anticorps chimériques ou humanisés conformes à l'invention sont de préférence des immunoglobulines de classe IgG, et notamment d'isotypes IgG1, 2, 3 ou 4.

On entend par « ligand de la neuropiline 2 humaine dérivé d'un anticorps anti- neuropiline 2 », tout ligand de la neuropiline 2 comprenant au moins les CDR3 de la chaîne lourde et ceux de la chaîne légère dudit anticorps, et de préférence comprenant également les CDR2 et/ou les CDRI de la chaîne lourde et de la chaîne légère dudit anticorps. Des ligands de la neuropiline 2 conformes à l'invention peuvent être en particulier :

- tout fragment d'un anticorps anti-neuropiline-2 conforme à l'invention comprenant au moins les CDR3, et de préférence comprenant en outre les CDR2 et/ou les CDRI des chaînes lourde et légère dudit anticorps ; - toute protéine recombinante, y compris une molécule d'immunoglobuline recombinante, comprenant un fragment d'anticorps anti-neuropiline-2 conforme à l'invention tel que défini ci-dessus.

Des fragments d'anticorps anti-neuropiline 2 conformes à l'invention sont notamment des fragments Fv, dsFv, Fab, Fab'2 ou scFv. Les fragments Fv sont constitués des domaines variables des chaînes lourde et légère VH et VL d'un anticorps, associés l'un à l'autre par des interactions hydrophobes. Le fragment dsFv est constitué d'un dimère VH :: VL relié par un pont disulfure. Les fragments scFv sont constitués des portions variables des chaînes lourdes et légères d'un anticorps, reliées entre elles par l'intermédiaire d'un Heur flexible (CLACKSON et al, Nature, 352: 624-628, 1991), formant ainsi une protéine simple-chaîne. Les fragments Fab résultent de l'action de la papaïne sur une molécule d'immunoglobuline, et contiennent chacun une chaîne légère et la première moitié d'une chaîne lourde reliées entre elles par un pont disulfure. Le fragment F(ab')₂ peut être obtenu par traitement d'un anticorps par la pepsine : ce fragment comprend deux fragments Fab et une partie de la région charnière. Les fragments Fab' peuvent être obtenus à partir des fragments F(ab')₂ par coupure du pont disulfure dans la région charnière.

Ces fragments se liant à l'antigène peuvent également être combinés afin d'obtenir des dérivés plurivalents, tels que les « diabodies » ou « triabodies », résultant de l'association de 2 ou 3 de ces fragments se liant à l'antigène.

Des protéines recombinantes comprenant un fragment d'anticorps anti- neuropiline-2 conforme à l'invention peuvent être notamment :

- des protéines associant au moins un fragment d'anticorps anti-neuropiline-2 conforme à l'invention avec au moins un fragment d'un autre anticorps ; on citera à titre d'exemples, des

immunoglobulines bi-spécifiques, des conjugués d'un fragment Fv ou Fab d'un anticorps anti-neuropiline-2 avec un fragment Fv ou Fab d'un anticorps de spécificité différente, des « diabodies bi-spécifiques » résultant de l'association d'un fragment scFv d'un anticorps anti-neuropiline-2 avec un fragment Fv ou Fab d'un anticorps de spécificité différente ;

- des protéines associant au moins un fragment d'anticorps anti-neuropiline-2 conforme à l'invention avec une molécule permettant de prolonger sa demi-vie plasmatique lors de son administration *in vivo*, notamment avec un polypeptide hydrosoluble de masse moléculaire suffisante pour que la masse moléculaire du polypeptide de fusion ainsi obtenu soit supérieure au seuil de filtration rénale.

Des anticorps chimériques ou recombinants, des fragments scFv et leurs dérivés, etc. peuvent être obtenus par les techniques classiques du génie génétique, telles que celles décrites par SAMBROOK et al. (MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 1989).

Des polynucléotides codant les régions variables d'un anticorps anti-neuropiline 2 conforme à l'invention peuvent être obtenus par clonage desdites régions à partir d'une banque d'ADNc d'un hybridome produisant ledit anticorps. Ils peuvent également être préparés totalement ou partiellement par synthèse d'acides nucléiques, à partir des séquences nucléotidiques desdites régions variables.

Diverses méthodes pour obtenir des anticorps humanisés sont également bien connues en elles-mêmes (pour revue cf. par exemple ALMAGRO & FRANSSON, *Frontiers in Bioscience*, 13, 1619-1633, 2008).

On peut citer les méthodes basées sur la greffe de CDRs qui consiste à transférer les CDRs d'un anticorps non-humain dans les régions de charpente (FR pour « framework régions ») d'un anticorps d'origine humaine (cf. par exemple ROUTLEDGE et al., "Reshaping antibodies for therapy", in *Protein Engineering of Antibody Molecules for Prophylactic and Therapeutic Applications in Man*, 13-44, Académie Titles, Nottingham, England, 1993, ou ROGUSKA et al., *Protein Engineering*, 9(10): 895-904, 1996). La greffe de CDRs est généralement complétée par l'optimisation des régions de charpente, qui consiste à modifier quelques résidus des régions de charpente afin d'augmenter l'affinité de liaison à l'antigène de l'anticorps humanisé. L'utilisation de bibliothèques combinatoires permet de simplifier cette étape d'optimisation (ROSOK. et al. *J. Biol. Chem.* 271 : 22611-22618, 1996; BACA et al. *J. Biol. Chem.* 272: 10678-10684, 1997). Une autre stratégie d'humanisation d'anticorps consiste à conserver uniquement les CDR3 des chaînes lourdes et légères de l'anticorps

d'origine, et à sélectionner le reste de la séquence à partir de banques naïves de gènes V humains (RADER et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95: 8910-8915, 1998).

Deux exemples d'anticorps monoclonaux anti-neuropiline-2 humaine conformes à l'invention, sont les anticorps ITAC-B1 et ITAC-B2 décrits ci-après. Ces anticorps monoclonaux ont été sélectionnés par les Inventeurs, sur la base de leur capacité à induire l'apoptose de cellules tumorales exprimant NRP-2.

Les séquences de la chaîne lourde et de la chaîne légère d'ITAC-B1 et d'ITAC-B2, ont été déterminées. Ces séquences, ainsi que les séquences polypeptidiques déduites, sont

représentées dans le Tableau 1 ci-après (pour la chaîne légère et la chaîne lourde d'ITAC-B1) et dans le Tableau 2 ci-après (pour la chaîne légère et la chaîne lourde d'ITAC-B2). Les séquences nucléotidiques sont également représentées dans la liste de séquences en annexe respectivement sous les numéros SEQ ID NO: 1, 3, 5 et 7, et les séquences polypeptidiques sont également représentées respectivement sous les numéros SEQ ID NO:2, 4, 6 et 8.

L'hybridome CNCM 1-4054, produisant l'anticorps ITAC-B1 a d'autre part été déposé, selon le Traité de Budapest, le 30 juillet 2008 auprès de la Collection Nationale de Culture de Microorganismes (Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, France, sous le numéro CNCM 1-4054.

TABLEAU 1

ITAC-B1	
Chaîne lourde (Région V-D-J)	
Séquence nucléotidique	gaagttaagctgcaggagtcaggggcagagcttgtgaagccagggcctcagt caagttgtcctgcacagtttctggcttcaacattaaagacacctatatacact gggtgatacagaggcctgaacagggcctggagtggcttggaggattgatcct gcgaatggtaataactaaatgacccgaagttccagggcaaggccactataac agcagacacatcctccaacacagcctacctgcagctcagcagcctgacctctg aggacactgccgtctattactgtgctagatgggcggtttaggtgactactgg ggccaaggcaccactctcacagtctcctcag (SEQ ID NO: 3)
Séquence peptidique	EVKLQESGAELVKPGASVKLSCTVSGFNIKDTYIHWVIQRPEQGLEWLGRIDP ANGNTKYDPKFQ GKATITADTSSNTAYLQLSSLTSEDYAVVYCARWAVVGDYV GQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 4)
Chaîne légère (Région V-J)	
Séquence nucléotidique	gatattgtgatcaccactctacaaattcctgcatgatcagcaggagacagg gttaccataacctgcaaggccagtcagagtgtgagtgatgatgtggcttggtgta ccaacagaagccagggcagtcctcctaaactgctgatatactctgcatccaatc gctacactggagtccctgatcgcttactggcagtgatgggacggatttc actttcaccatcagcactgtgcagcctgaagacctggcagtttatttctgtca gcaggattatagctctcccagttcggttctgggaccaagctggagctgaaac (SEQ ID NO: 5)
Séquence peptidique	YCDHPLYKFLHVSAGDRVTITCKASQSVSDDVAWYQQKPGQSPKLLIYSASNR YTGVPDRFTGSGYGTDFTFITISTVQPEDLAVYFCQQDYSSPTFGSGTKLELK (SEQ ID NO: 6)

TABLEAU 2

ITAC-B2	
Chaîne lourde (Région V-D-J)	
Séquence nucléotidique	gaggtgcagctggaggagtcaagggaggcttagtgaagcctggagggtcct gaaactctcctgtgcagcctctggattcactttcagtgactattacatgtatt gggttcgccagactccggaaaagaggctggagtgggtcgcaaccattagtgat ggtggtagttacacctactatccagacagtattaagggccgattcaccatctc cagggacaatgccaggaacaacctgtaccttcaaagagcagctgaagtctg aggacacagccatgtattactgtgcaagaggtgggcccctataggtcctggttt gctttctggggccaaggactctggctcactgtctctgcag (SEQ ID NO: 7)
Séquence peptidique	EVQLEESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTFSDYYMYWVRQTPEKRLEWVATISD GGSYTYYPDSIKGRFTISRDNARNNLYLQMSLKS EDTAMYCARGGPYRSWF AFWGQGTLVTVSA (SEQ ID NO: 8)
Chaîne légère (Région V-J)	
Séquence nucléotidique	gatattgtgatcaccagactccactctccctgcctgtcagctctggagatca agcctccatctcttgcagatctagtcagagcattgtgtatagtaatggaaaca cctatttagaatggtagctgcagaaaccaggccagctctcaaagctcctgac tacaaaagtttccaaccgattttctgggggtcccagacaggttcagtgccagtg atcagggacagatttcacactcaagatcagcagagtgaggctgaggatctgg gagtttattactgctttcaaggttcacatgttcctccgacgttcgggtggaggc accaagctggaaatcaaac (SEQ ID NO: 9)
Séquence peptidique	DIVITQTPLSLPVS LGDQASISCRSSQSIVYSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLI YKVS NRFSGV PDRFSGSGS GTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHPPTFGGG TKLEIK (SEQ ID NO: 10)

Les séquences codant les CDRs d' ITAC-B1 et ITAC-B2 ont également été déterminées, à partir des séquences des chaînes lourdes et des chaînes légères ci-dessus, à l'aide du logiciel IMGT/V-QUEST (GIUDICELLI et al., Nucleic Acids Research 32, W435-W440, 2004). Les séquences polypeptidiques déduites sont représentées ci après dans le Tableau 3 pour l'anticorps ITAC-B1, et le tableau 4 pour l'anticorps ITAC-B2. Elles sont également représentées dans la liste de séquences en annexe sous les numéros SEQ ID NO: 9 à 20.

TABLEAU 3

ITAC-B1	Séquence
Chaîne lourde	
VH-CDR1	GFNIKDTY (SEQ ID NO:11)
VH-CDR2	IDPANGNT (SEQ ID NO:12)
VH-CDR3	ARWAVVDY (SEQ ID NO:13)
Chaîne légère	
VL-CDR1	QSVSDD (SEQ ID NO:14)
VL-CDR2	SAS (SEQ ID NO:15)
VL-CDR3	QQDYSSPT (SEQ ID NO:16)

TABLEAU 4

ITAC-B2	Séquence
Chaîne lourde	
VH-CDR1	GFTFSDYY (SEQ ID NO:17)
VH-CDR2	ISDGGSYT (SEQ ID NO:18)
VH-CDR3	ARGGPYRSWFAF (SEQ ID NO:19)
Chaîne légère	
VL-CDR1	QSIVYSNGNTY (SEQ ID NO:20)
VL-CDR2	KVS (SEQ ID NO:21)
VL-CDR3	FQGSHPPT (SEQ ID NO:22)

Les anticorps comprenant les domaines variables d'ITAC-B1 (c'est-à-dire comprenant une chaîne lourde dont le domaine variable est défini par la séquence SEQ ID NO: 2 et une chaîne légère dont le domaine variable est défini par la séquence SEQ ID NO: 4) ou les domaines variables d'ITAC-B2 (c'est-à-dire comprenant une chaîne lourde dont le domaine variable est défini par la séquence SEQ ID NO: 6 et une chaîne légère dont le domaine variable est défini par la séquence SEQ ID NO: 8), ainsi que les anticorps ou ligands dérivés d'anticorps, tels que définis ci-dessus, comprenant au moins les CDR3 d'IT AC-B1 ou d'ITAC-B2 constituent des modes de réalisation préférés de l'objet de la présente invention. La présente invention a également pour objet tout polynucléotide codant pour un anticorps conforme à l'invention ou pour un ligand de la neuropiline 2 humaine dérivé dudit anticorps, ainsi qu'un vecteur recombinant, notamment un vecteur d'expression contenant ledit nucléotide. La présente invention a également pour objet des cellules produisant des anticorps ou des dérivés d'anticorps conformes à l'invention. Il peut s'agir notamment d'hybridomes, par exemple l'hybridome CNCM 1-4054, et de cellules-hôtes transformées par un vecteur d'expression conforme à l'invention. Ladite cellule-hôte peut être une cellule procaryote ou eucaryote. Parmi les cellules eucaryotes utilisables, on citera en particulier des cellules végétales, des cellules de levure, telles que *Saccharomyces*, des cellules d'insecte, telles que les cellules de *Drosophila*, ou de *Spodoptera* et des cellules de mammifères telles que les cellules HeLa, CHO, 3T3, C 127, BHK, COS, etc..

La construction de vecteurs d'expression conformes à l'invention, et la transformation des cellules-hôtes peut être effectuée par les techniques classiques de biologie moléculaire.

La présente invention a également pour objet un anticorps anti-neuropiline-2 humaine conforme à l'invention, ou un ligand de la neuropiline-2 humaine dérivé dudit anticorps pour l'utilisation comme médicament, notamment comme médicament anti-tumoral.

Selon un mode de réalisation préféré de la présente invention, ledit médicament est destiné à induire l'apoptose de cellules tumorales exprimant la neuropiline 2, notamment en augmentant l'expression de p53 dans lesdites cellules tumorales. L'invention est applicable à tous les types de tumeurs exprimant la neuropiline-

2, et notamment aux cancers colorectaux, aux cancers du sein, au cancer du rein, et aux mélanomes. L'expression de la neuropiline-2 dans une tumeur peut aisément être détectée, par exemple à l'aide d'anticorps anti-neuropiline-2 humaine.

Pour la mise en œuvre de la présente invention, l'anticorps ou le ligand de la neuropiline-2 humaine conforme à l'invention peut être administré par voie intraveineuse, intra- artérielle ou intra-péritonéale.

De manière avantageuse, il peut être administré en combinaison avec un autre agent anti-tumoral.

Des agents antitumoraux utilisables en combinaison avec un anticorps ou un ligand de la neuropiline-2 humaine conforme à l'invention sont en particulier les agents de chimiothérapie (de type alkylants, analogues nucléotidiques ou inhibiteurs de topoisomérase), des radiations ionisantes ou des biothérapies (notamment des molécules de thérapies ciblées neutralisant par exemple le VEGF, ou le récepteur à l'EGF, des inhibiteurs de tyrosine kinases ou des inhibiteurs de la voie mTor).

La présente invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à des exemples non-limitatifs illustrant l'effet de l'inhibition de NRP-2 par siRNA sur l'expression de p53, et l'apoptose des cellules tumorales, et la préparation d'anticorps anti-NRP-2 reproduisant ces effets.

EXEMPLE 1 : GENERATION DE LIGNEES CELLULAIRES PRESENTANT LA NEUROPILINE-2 HUMAINE A LEUR SURFACE MEMBRANAIRE

Deux lignées cellulaires ont été transfectées afin d'exprimer NRP-2 à leur surface. Une lignée murine, le mastocytome P815 (Diacclone), tumeur expérimentale largement utilisée comme modèle en immunologie tumorale, et qui n'exprime pas naturellement la NRP-2 humaine, ainsi qu'une lignée tumorale humaine, élaborée à partir de cellules cancéreuses colorectales HT29 n'exprimant pas naturellement la NRP-2 à sa surface membranaire, ont été transfectées par un vecteur d'expression de la NRP-2 humaine. Le vecteur d'expression utilisé, basé sur un plasmide pcDNA3.1 (Invitrogen) a été décrit par Rossignol M et al, (Genomics. 2000 Dec 1;70(2):211-22). La lignée murine p815 transfectée a été utilisée pour la production d'anticorps monoclonaux murins dirigés contre la glycoprotéine NRP-2 humaine, la lignée humaine transfectée a ensuite été utilisée lors d'expériences fonctionnelles évaluant l'intérêt des anticorps anti-NRP-2.

La transfection des lignées a été réalisée à l'aide d'un kit Effecten® (Qiagen). Les cellules mastocytaires P815 et tumorales HT29 ont été cultivées dans 20mL de milieu DMEM jusqu'à une concentration de 200000 cellules/mL. Les cellules ont alors été lavées une fois avec 20mL de PBS et mises à une concentration de 2×10^5 cellules/mL dans 4mL de milieu DMEM en flasque. Les cellules ont alors été transfectées avec 1µg de vecteur (vecteur plasmidique à 1 µg/µL dans du tampon TBE). Les cellules P815 et HT29 transfectées ont été laissées en petites flasques et mises à l'incubateur à 37°C sous 5% de CO₂ dans une atmosphère humidifiée, pendant 48h. A J3, les milieux de cultures ont été changés par un nouveau milieu comprenant 0,8 mg/mL de geneticine (G418, Invitrogen, France), pour la sélection des cellules transfectées.

Les cellules efficacement transfectées et exprimant NRP-2 à leur surface sont nommées P815-NRP-2 et HT29-NRP-2. L'efficacité de la transfection est évaluée à J7 par marquage membranaire avec un anticorps IgG murin anti-NRP-2 humaine (Clone C9, Santa Cruz Biotechnology) puis lecture en cytométrie en flux. Le résultat de l'étude en cytométrie de flux est représenté à la Figure 1.

Les panneaux A et C (P815 et HT29ctr) de la Figure 1 représentent les résultats obtenus par cytométrie en flux avec les cellules contrôles alors que les panneaux B et D (P815-NRP-2 et HT29-NRP-2) représentent les résultats obtenus avec des cellules exprimant NRP-2 à leur surface membranaire. Les courbes de distribution en traits noirs représentent les résultats du marquage avec un anticorps contrôle, les courbes de distribution en traits gris représentent les résultats du marquage avec l'anticorps IgG murin anti-NRP-2 humaine.

Pour chacun des panneaux de la Figure 1, le nombre d'événements (nombre de cellules) est indiqué en ordonnée, l'intensité de fluorescence (correspondant au marquage des cellules par l'anticorps IgG murin anti-NRP-2 humaine) est représentée en abscisse. Les panneaux A et C (P815 et HT29ctrl) de la Figure 1 montrent que les pics de distribution représentant la population cellulaire P815 et HT29ctrl (témoins non transfectées) en contact avec l'anticorps anti-NRP-2 humaine (trait gris) ou avec un anticorps IgG contrôle (trait noir) se superposent : ceci signifie que les cellules P815 et HT29ctrl (témoins non transfectées) ne sont pas davantage marquées par l'anticorps anti-NRP-2 humaine que par un anticorps IgG contrôle et qu'elles n'expriment donc pas NRP-2. En revanche, lorsque les cellules P815 et HT29 transfectées par un vecteur d'expression de la NRP-2 humaine (panneaux B et D, P815-NRP-2 et HT29-NRP-2 respectivement) sont mises en présence de l'anticorps anti-NRP-2 humaine, il y a un net déplacement du pic de distribution de la population cellulaire vers la droite (pic trait gris) par rapport au marquage avec l'anticorps IgG contrôle (pic trait noir). Ces résultats attestent que les cellules transfectées expriment bien NRP-2 à leur surface membranaire.

EXEMPLE 2 : PRODUCTION ET CARACTÉRISATION D'ANTICORPS MONOCLONAUX ANTI-NRP-2 HUMAINE

Un protocole d'immunisation dérivé de celui décrit par MATTHEW et SANDROCK (J. Immunol. Methods, 100: 73-82, 1987) a été utilisé. Dans chaque expérience, cinq souris Balb/C femelles (Charles River Laboratories) ont été immunisées avec des cellules transfectées P815-NRP-2 une fois par semaine pendant 5 semaines.

Chaque immunisation consiste en l'administration en « foot-pad » de 1×10^6 cellules P815-NRP-2 dans chaque patte postérieure de la souris (soit 2×10^6 P815-NRP-2 par souris). Les cellules servant à l'immunisation d'une souris ont été diluées dans 25 μ L de PBS IX et dans 25 μ L d'adjuvant Ribi (Immunochem Research, USA). 50 μ L de mélange cellulaire ont alors été injectés à chaque souris (25 μ L par patte postérieure) à plusieurs reprises durant le protocole d'immunisation. Cinq jours après la dernière injection, les ganglions des souris ont été prélevés et les lymphocytes ont été fusionnés avec une lignée de myélome. La fusion a été effectuée de la façon suivante : les lymphocytes prélevés ont été fusionnés avec des cellules de myélome murin X63/AG 8653 (le rapport lymphocytes/cellules de myélome est de 5 :1), en présence de polyéthylène glycol (KEARNEY et al, J. of Immunol., 123: 1548, 1978). Le myélome murin P3X63/AG8.653 provient de l'ATCC (ref CRL-1580).

La suspension de cellules fusionnées a été lavée une fois, et cultivée sur un milieu sélectif composé de 500 mL de milieu RPMI 1640 (Sigma, France), additionné de 10% de SVF inactivé par la chaleur (Abcys, France), de 4 mM de L-glutamine (Sigma, France), 100 µg/mL de streptomycine, de 100 UI/ml de pénicilline (Sigma, France), de 13,6 µg/mL d'hypoxanthine, 0,19 µg/mL d'aminoptérine et 3.88 UI /mL de thymidine (solution 5OX, Sigma, France). Ce milieu ne permet ni la survie des cellules myéломateuses n'ayant pas fusionné, puisque celles-ci sont incapables de synthétiser l'inositol monophosphate, ni la survie des lymphocytes qui n'ont pas la capacité de se multiplier indéfiniment in vitro. En revanche les

hybridomes survivent car ils présentent d'une part la capacité de métaboliser l'hypoxanthine exogène (propriété des lymphocytes), et d'autre part ont la capacité de se multiplier indéfiniment (« immortalité ») des cellules X63/AG 8653.

Dix jours après la fusion, les surnageants des cultures dans lesquelles une croissance d'hybridomes a été observée ont été testés pour détecter la production d'anticorps monoclonaux anti-NRP-2. Dans ce but, les surnageants de chaque puits de culture d'hybridomes ont été testés par cytométrie en flux sur les lignées cellulaires exprimant ou non la neuropiline 2.

Les hybridomes produisant des anticorps reconnaissant la lignée P815-NRP-2 ont été clones en utilisant la méthode de la dilution limite (densité d'ensemencement de 1 cellule par puits de culture).

Plusieurs candidats reconnaissant spécifiquement NRP-2 ont été générés et sélectionnés pour leur capacité à induire une apoptose des cellules tumorales exprimant la neuropiline 2, dont les clones ITAC-B1 et ITAC-B2. Le clone ITAC-B1 a été déposé selon le Traité de Budapest, auprès de la CNCM (Collection Nationale des Microorganismes, Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, France) le 30 juillet 2008 sous le numéro de dépôt CNCM 1-4054. Afin de caractériser les anticorps monoclonaux ITAC-B1 et ITAC-B2, un marquage membranaire a été réalisé par cytométrie en flux en mettant en présence 200000 cellules HT29, HT29-NRP-2, P815 ou P815-NRP-2 avec 5µg/mL d'ITAC-B1 ou d'ITAC-B2, 15 minutes, à 4°C. Un anticorps secondaire de chèvre anti-souris couplé à du FITC a été incubé ensuite 15 minutes dans le noir, à 4°C, avant lecture par cytométrie en flux. Les résultats de l'analyse par cytométrie de flux obtenus pour ITAC-B1 sont représentés à la figure 2.

Pour chacun des panneaux de la Figure 2, le nombre d'événements (nombre de cellules) est indiqué en ordonnée, l'intensité de fluorescence (correspondant au marquage des cellules par l'anticorps ITAC-B1) est représentée en abscisse. Les panneaux A et C (P815 + ITAC-B1 et HT29ctr + ITAC-B1) de la Figure 2 représentent les résultats obtenus par cytométrie en flux avec les cellules contrôle alors que les panneaux B et D (P815-NRP-2 + ITAC-B1 et HT29-NRP-2 + ITAC-B1) représentent les résultats obtenus avec des cellules exprimant NRP-2 à leur surface membranaire. Les courbes de distribution en traits noirs représentent les résultats du marquage avec un anticorps contrôle, les courbes de distribution en traits gris représentent les résultats du marquage avec les anticorps ITAC-B1. On constate, pour les lignées cellulaires exprimant NRP-2, un net déplacement vers la droite du pic de distribution des populations cellulaire lors du marquage par ITAC-B1 (trait gris) en comparaison du marquage avec l'anticorps IgG contrôle (trait noir). Pour les lignées cellulaires n'exprimant pas NRP-2 ce

déplacement du pic de distribution est très faible. Ces résultats montrent que les anticorps ITAC- B 1 reconnaissent spécifiquement la neuropiline-2 présente à la surface membranaire. Des résultats similaires ont été obtenus pour l'anticorps ITAC-B2. Les séquences génomiques de la région variable des chaînes lourdes des hybridomes produisant les anticorps ITAC-B1 et ITAC-B2 ont été analysées par séquençage respectivement avec les amorces :

- 5'-GARGTTAAGCTGSAGGAGTCAGG- 3' (amorce sens dégénérée) (SEQ ID NO : 21)

- 5'-ATAGACAGATGGGGGTGTCGTTTTGGC- 3' (amorce anti-sens) (SEQ ID NO : 22) ;
et

- 5'-GAGGTGCAGCTGGAGGAGTCAGG- 3' (amorce sens) (SEQ ID NO : 23) - 5'-
ATAGACAGATGGGGGTGTCGTTTTGGC- 3' (amorce anti-sens) (SEQ ID NO : 24).

Les séquences génomiques de la région variable des chaînes lourdes des hybridomes produisant les anticorps ITAC-B1 et ITAC-B2 ont été analysées par séquençage respectivement avec les amorces :

- 5'-GATATTGTGATSACMCARDCTACA- 3' (amorce sens dégénérée) (SEQ ID NO : 25) -
5'-GGATACAGTTGGTGCAGCATTA- 3' (amorce anti-sens) (SEQ ID NO : 26); et

- 5'-GATATTGTGMTSACCCAGACTCCA- 3' (amorce sens dégénéré) (SEQ ID NO : 27)

- 5'-GGATACAGTTGGTGCAGCATTA- 3' (amorce anti-sens) (SEQ ID NO : 28).

Les séquences d'acides aminés des boucles hypervariables CDR1, CDR2 et CDR3 des régions variables des anticorps ITAC-B1 et ITAC-B2 ont été déterminées à l'aide du logiciel IMGT/V-QUEST version 3.0.0 sur la base de données d'immunoglobulines de « the international ImMunoGeneTics information System® » (IMGT/GENE-DB).

EXEMPLE 3 : ROLE DE LA NEUROPILINE-2 DANS LA PROLIFERATION CELLULAIRE

Production d'un vecteur exprimant des siARN double brin ciblant le gène de la NRP-2 humaine

Un oligonucléotide sens 5'-AAA GGC TGG AAG TCA GCA CTA AT-3'

(SEQ ID NO : 29), et un oligonucléotide anti-sens : 5'-AAA AAT TAG TGC TGA CTT CCA

GC-3' (SEQ ID NO : 30) correspondant à une partie de la séquence génique de la NRP-2 humaine ont été hybrides, et le duplex résultant a été inséré dans un vecteur d'expression double promoteur (pFiv HI/U6puro SiARN Expression vector, System Biosciences) préalablement digéré par l'enzyme BbsI.

Après avoir vérifié que l'insert avait bien la taille attendue (21 paires de bases), 100µL de bactéries compétentes E. Coli HB101 (Gibco) ont été transformées par 1µg du vecteur contenant cet insert. Une colonie a été amplifiée dans 200mL de milieu LB avec ampicilline

en utilisant un Hi-speed midi prep kit (Qiagen), puis une maxiprep (Qiagen) a été réalisée et a conduit à la purification du plasmide pFiv HI/U6puro SiARN-NRP-2.

Puisque le plasmide pFiv HI/U6puro SiARN -NRP-2 contient les promoteurs

HI et U6 de TARN polymérase III bordant l'insert, chacun des brins de l'insert est transcrit dans les cellules transfectées par ce plasmide, aboutissant à la génération de siARN double brin dirigé contre les transcrits NRP-2, constitué de:

Brin sens : 5'- GGC UGG AAG UCA GCA CUA AUU U -3' (SEQ ID NO : 31);

Brin anti-sens : 5'- AUU AGU GCU GAC UUC CAG CCU U - 3' (SEQ ID NO : 32);

Production d'une lignée cellulaire exprimant un siARN ciblant le gène de la NRP-2 humaine

La lignée Colo320 exprimant naturellement la Neuropiline 2 à sa surface membranaire a été transfectée par le plasmide pFiv HI/U6puro siARN-NRP-2 en utilisant le kit Effectene®, (Qiagen). Parallèlement, des cellules Colo320 ont été transfectées par un siARN contrôle (siARN-ctrl) fourni avec le kit pFiv HIAJópuro SiARN Expression vector (System Biosciences). Les cellules transfectées Colo320^{siARN_{NRP}"2} et Colo320^{siARN_{ctrl}"} ont ensuite été sélectionnées à J2 par 2µg/mL de puromycine. L'efficacité de la transfection a été évaluée dès il par marquage avec un anticorps IgG murin anti-NRP-2 humaine (Clone C9, Santa Cruz Biotechnology) en cytométrie en flux : les résultats obtenus sont représentés à la Figure 3.

Pour chacun des panneaux de la Figure 3, le nombre d'événement (le nombre de cellules) est indiqué en ordonnée, l'intensité de fluorescence (correspondant au marquage des cellules par l'anticorps anti-NRP-2 C9) est représentée en abscisse. Les courbes de distribution en traits noirs représentent les résultats obtenus après marquage avec un anticorps contrôle, les courbes de distribution en traits gris représentent les résultats obtenus après marquage avec l'anticorps C9. Le panneau B de la Figure 3, qui représente l'analyse réalisée avec les cellules Colo320^{siARN_{NRP}"2} exprimant naturellement NRP-2, montre un déplacement vers la gauche du pic de distribution des cellules marquées par l'anticorps C9, par rapport à l'analyse réalisée avec les cellules Colo320^{siARN_{ctrl}"} qui est représentée sur le panneau A. Ces résultats montrent que l'expression de la protéine NRP-2 est efficacement inhibée dans les cellules exprimant le siARN-NRP-2.

Test de prolifération en présence du siARN-NRP-2 : test MTT

Le test de prolifération MTT se base sur la réduction du bromure de 3 -(4,5- dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium), par la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes actives, en formazan. L'intensité de la coloration (DO) induite par cette réaction est proportionnelle au nombre de cellules vivantes présentes lors du test, et à leur activité métabolique.

4000 cellules HT29_{ctrl}, HT29-NRP-2, Colo320^{siARN_{ctrl}"} ou Colo320^{siARN_{NRP}"2} ont été ensemencées dans une plaque Maxisorp 96 puits, dans 100µL de milieu DMEM contenant 10% de SVF inactivé. Le test a été effectué en triplicate. A 24, 48 et 72 heures respectivement, 10 µL de MTT à 5 mg/mL ont été ajoutés dans chaque puits. Après 2 heures d'incubation à 37°C, 5% CO₂, 200µL de DMSO ont été ajoutés à chaque puits après agitation,

et la DO a été lue à 570nm par un spectrophotomètre. Les résultats de ces expériences sont représentés à la Figure 4 Les Figures 4.A et 4.B sont des histogrammes représentant les résultats obtenus lors du test de prolifération réalisé respectivement avec les cellules HT29ctrl et HT29-NRP-2, et avec les cellules Colo320^{siARN^{ctrl}} et Colo320^{siARN^{NRP}2}. L'intensité de coloration (la densité optique « DO ») correspondant à la production de formazan par les cellules est indiquée en ordonnée, et les temps auxquels ont été réalisés les tests de viabilité sont indiqués en abscisse.

Pour le panneau A, les barres gris claires représentent les mesures réalisées sur les cellules HT29-NRP-2, les barres gris foncées représentent les mesures réalisées sur les cellules témoins HT29ctrl. Pour le panneau B, les barres gris claires représentent les mesures réalisées sur les Colo320^{siARN^{NRP}2}, cellules dont l'expression de NRP-2 est réprimée, les barres gris foncées représentent les mesures réalisées sur les cellules témoins Colo320^{siARN^{ctrl}} exprimant NRP-2.

La Figure 4.A montre que la DO augmente lorsque les cellules expriment NRP-2, ce qui signifie que l'expression de NRP-2 par les cellules HT29-NRP-2 induit une prolifération et une survie cellulaire supérieure à celle des cellules n'exprimant pas NRP-2.

La Figure 4.B montre que la DO diminue lorsque l'expression de NRP-2 dans les cellules Colo320 est supprimée (cf. barres représentant Colo320^{siARN^{NRP}2} en comparaison de Colo320^{siARN^{ctrl}}). Ce résultat confirme le résultat obtenu avec les cellules HT29 : NRP-2 induit une prolifération et une survie cellulaire supérieure chez les cellules.

L'influence de la neuropiline 2 sur le cycle cellulaire a été étudiée. 50000 cellules HT29 ou HT29-NRP-2 ont étéensemencées dans ImL de DMEM- 10%S VF en plaque 24 puits. 24heures après ensemencement, les cellules ont été trypsinées, lavées 2fois avec 3mL de PBS et reprises dans ImL d'éthanol 70%. Elles ont été laissées une nuit à 4°C dans l'éthanol

70%. Le lendemain, les cellules sont lavées 2 fois avec 3mL de PBS, digérées avec de la Dnase et marquées avec de l'IP. 30min après, les cellules sont analysées grâce à un cytomètre EPICC

Altra (Beckman Coulter) et au logiciel d'analyse de cycle Wincycles. Les résultats de cette analyse sont présentés à la Figure 4bis

La Figure 4 bis montre que lorsque les cellules expriment NRP-2, le nombre de cellules en phase G2M et S augmente, alors que le nombre de cellules en phase G1 diminue. Ainsi, l'expression de la neuropiline 2 est associée à une augmentation de la fraction de cellules en phase S et G2M. L'influence oncogénique de la neuropiline-2 a également été évaluée en comparant chez des souris le développement de xénogreffes de diverses lignées tumorales en fonction de l'expression de la neuropiline-2 dans ces lignées.

Les Figures 5.A, 5.B, 5.C et 5.D sont des photographies de souris ayant été inoculées par voie sous-cutanée respectivement par les cellules HT29ctrl, HT29-NRP-2, Colo320^{siARN^{ctrl}} et Colo320^{siARN^{NRP}2}.

Alors que chez les souris inoculées avec des cellules n'exprimant pas NRP-2 (Fig. 5.A et Fig. 5.D), il n'y a pas de progression anormale de la xénogreffe, une augmentation anormale de la

prolifération de la xéno greffe est observée chez les souris inoculées avec des cellules exprimant NRP-2 (Fig. 5.B et Fig. 5.C). Ces expériences montrent que l'expression de la neuropiline-2 après transfection, ou la répression de cette protéine par ARN interférence, influencent l'oncogenèse des lignées

Modulation de l'expression de p53 par un siARN ciblant le gène de la NRP-2 humaine.

L'expression de p53, des E-Cadhérines et de la cytokératine 20 dans les xéno greffes de cellules tumorales exprimant ou non la neuropiline-2 (lignée HT29ctrl ou HT29- NRP -2) a été étudiée par immunohistochimie à l'aide d'anticorps spécifiques de chacune des ces trois protéines.

Les Figures 6.A, 6.C et 6.E sont des photographies de coupes de xéno greffes prélevées chez des souris inoculées par la lignée contrôle HT29ctrl, les Figures 6.B, 6.D et 6.F sont des photographies de coupes de xéno greffes prélevées chez des souris inoculées par la lignée exprimant NRP-2 (HT29-NRP-2). Les coupes de xéno greffes des Figures 6.A et 6.B ont été marquées par un anticorps anti-cytokératine, les coupes de xéno greffes des Figures 6.C et 6.D ont été marquées par un anticorps anti-E-Cadhérine, et les coupes de xéno greffes des Figures 6.E et 6.F ont été marquées par un anticorps anti-p53.

Les Figures 6.A, 6.C et 6.E montrent que les xéno greffes issues de la lignée contrôle HT29ctrl sont fortement marquées par les anticorps anti-cytokératine, anti- E-Cadhérine et anti-p53, alors que les xéno greffes issues de la lignée contrôle HT29-NRP-2 ne sont marquées par aucun des ces anticorps.

Cette étude a montré que la transfection de la neuropiline-2, qui favorise la progression des xéno greffes (Figures 5.A à 5.D), est associée à une perte de l'expression de l'anti-oncogène p53 au niveau des noyaux des cellules tumorales (Figure 6). En outre, l'étude immunohistochimique objective une perte de l'expression des E-Cadhérines et de la cytokératine 20 dans les xéno greffes exprimant la neuropiline-2 (Figure 6), suggérant que l'acquisition de la neuropiline-2 favoriserait la transition épithélio-mésenchymateuse.

L'influence de la neuropiline-2 sur l'expression de p53 a également été étudiée. Pour cela, les lignées HT29-NP2 ou Colo320 ont été traitées soit avec des si ARN inhibant la traduction de la neuropiline-2, soit avec des anticorps monoclonaux provenant de l'hybridome ITAC-B1.

La Figure 7 représente les résultats obtenus par cytométrie en flux pour les cellules HT29-ctrl (panneau A), HT29-NRP-2 (panneau B), Colo320^{siARN ctrl} (panneau C) et Colo320^{siARN^{NRP}2} (panneau D) marquées à l'aide d'un anticorps anti-p53. Les courbes en traits noirs représentent les résultats du marquage avec un anticorps contrôle, les courbes en traits gris représentent les résultats du marquage avec l'anticorps anti-p53. Le nombre d'événements (le nombre de cellules) est indiqué en ordonnée, l'intensité de fluorescence (correspondant au marquage des cellules par l'anticorps anti-p53) est représentée en abscisse. Les panneaux B et C présentant les résultats obtenus pour les lignées exprimant

NRP-2, à savoir les panneaux HT29-NRP-2 et Colo320^{siARN ctrl}, montrent que la protéine p53 n'est pas, ou très peu exprimée (les courbes des populations marquées avec l'anticorps contrôle ou l'anticorps anti-p53 se superposent). En revanche, concernant les panneaux A et D

qui présentent les résultats obtenus pour les lignées n'exprimant pas la protéine NRP -2, à savoir les

panneaux HT29ctrl et Colo320^{siARN NRP⁻²}, lors du marquage par l'anticorps anti-p53 (trait gris), il y a un déplacement du pic de distribution des populations cellulaires vers la droite, en comparaison du marquage avec anticorps IgG contrôle (trait noir).

Ces expériences montrent qu'il existe une corrélation négative entre la présence de la neuropiline-2 et celle de p53. En particulier, lorsque colo320, lignée tumorale exprimant constitutivement la neuropiline-2, est traitée par ARN interférence pour inhiber la traduction de cette protéine (lignées Colo320^{siARN NRP⁻²}), une restauration de l'expression de p53 dans les lignées tumorales est clairement observée.

Les extraits protéiques des lignées cellulaires HT29-ctrl, HT29-NRP-2, Colo320^{siARN ctrl} et Colo320^{siARN_NRp_2} ont également été analysés par transfert de Western à l'aide d'anticorps anti-p53. Après lyse des lignées cellulaires, migration des culots protéiques obtenus sur gel de polyacrylamide 10% (10 µg de protéine par puits, normalisée par rapport à l'immunoblotting de l'actine), puis transfert sur membrane PVDF, la membrane PVDF a été incubée durant une nuit avec l'anticorps primaire p53 (BD Biosciences, mouse anti-human p53) dilué au 1/500. Les membranes, après lavage dans du TBS 0,1% Tween20, ont été incubées pendant 1 heure avec un anticorps secondaire anti-mouse HRP dilué au 1/12500. Les résultats sont représentés sur la Figure 8.

La Figure 8 montre que la protéine p53 est fortement exprimée dans la lignée

HT29-ctrl n'exprimant pas NRP-2 alors qu'elle est indétectable dans la lignée HT29-NP2. De la même manière, p53 ne peut être mis en évidence dans la lignée Colo320^{siARN ctrl} qui exprime

NRP-2, alors qu'elle est fortement exprimée dans la lignée Colo320^{siARN NRP⁻²} dans laquelle l'expression de NRP-2 est réprimée.

Cette expérience confirme qu'il existe une corrélation négative entre la présence de la neuropiline-2 et l'expression de p53. Ces données indiquent que l'inhibition de l'expression de la neuropiline-2 permet l'augmentation de l'expression de p53.

EXEMPLE 4 : EFFET DE L'ANTICORPS ITAC-BI SUR LA CROISSANCE DE CELLULES TUMORALES

Test de formation de colonies tumorales en milieu gélose semi-solide Afin de déterminer si l'anticorps ITAC-BI possède une activité de neutralisation de la formation de colonies tumorales in vitro, des tests de formation de colonies tumorales in vitro en milieu gélose semi-solide contenant de l'agar ont été effectués. Le principe de ce test repose sur la mise en contact de cellules tumorales humaines Colo320 (qui expriment la NRP-2 à leur surface membranaire, et d'autre part sécrètent naturellement du VEGF dans le milieu de culture) et de l'anticorps ITAC-BI . 4000 cellules Colo320 sontensemencées dans chaque puits d'une plaque 24 puits, en milieu semi-solide contenant de l'agar, et en présence de 10 µg/mL d'anticorps anti-NRP-2 ITAC-BI. A titre de comparaison, le même test est effectué en présence de cytotoxiques d'action prouvée, à savoir du 5-fluoro-uracile (5-FU) utilisé à raison de 50µg/mL ou de l'Avastin® (bevacizumab : anticorps monoclonal humanisé dirigé contre le

VEGF) utilisé à raison de 50 µg/mL, ou en présence d'un anticorps contrôle isotypique (anticorps monoclonal IgG1 de souris (BZ1)), utilisé à raison de 10 µg/mL

A 10 jours post ensemencement, le comptage des colonies a été effectué au microscope optique. La Figure 9 représente les résultats obtenus. Le nombre de colonies formées est indiqué en ordonnée, et les différentes molécules testées sont indiquées en abscisse.

Ces résultats montrent qu'en présence de l'anticorps ITAC-B1 comme en présence de 5 FU, le nombre de colonies est d'environ 40, contre plus de 140 pour le témoin cellules seules ou le contrôle négatif, et environ 120 colonies lorsque les cellules sont cultivées en présence d'Avastin® (bevacizumab).

Il ressort de cette étude *in vitro* que les anticorps anti-NRP-2 ITAC-B 1 inhibent presque totalement la formation de colonies tumorales de cellules exprimant la NRP-2 à leur surface, et ceci d'une façon plus efficace que l'Avastin® (bevacizumab).

La neuropiline-2 étant un co-récepteur du VEGF, il a été vérifié si l'activité d'ITAC-B1 était dépendante d'une interaction entre NRP-2 et le VEGF produit par les cellules Colo320. Dans ce but, les tests de formation de colonies de cellules CoIo 320 ont été effectués dans les conditions décrites ci-dessus, et en présence d'anticorps ITAC-B1 (10 µg/mL), de bevacizumab (50µg/mL) ou d'anticorps contrôle (10 µg/mL), utilisés isolément ou en association. Les résultats sont présentés sur la Figure 10: l'ordonnée représente le nombre de colonies formées ; en abscisse les anticorps présents dans le milieu de culture sont indiqués par un « + ».

La Figure 10 montre que la présence de bevacizumab dans le milieu de culture affecte très peu la prolifération des cellules CoIo 320 : le nombre de colonies observées en présence de l'anticorps contrôle, du bevacizumab, ou de l'association de ces 2 anticorps est similaire, et ne diffère que peu de celui observé avec le témoin cellules seules. En revanche, le nombre de colonies observé en présence de l'anticorps ITAC-B1 est fortement diminué par rapport au témoin cellules seules ; en outre lorsque le milieu de culture contient l'anticorps ITAC-B1 et le bevacizumab (qui neutralise VEGF-A), le nombre de colonies est identique à celui observé lorsque le milieu contient l'anticorps ITAC-B1 seul. Ce résultat indique qu'ITAC-B1 inhibe aussi efficacement la prolifération cellulaire en présence de VEGF qu'en l'absence de VEGF, et donc que l'effet thérapeutique de ITAC-B1 est indépendant de l'interaction NRP- 2/VEGF.

Test MTT de prolifération de cellules tumorales : L'effet de l'anticorps ITAC-B1 sur la prolifération de cellules tumorales humaines présentant la NRP-2 à leur surface membranaire, a également été étudié en utilisant le test MTT, comme décrit à l'Exemple 3 ci-dessus.

4000 cellules par puits de cellules Colo320^{siARN^{ctrl}} (cellules contrôle transfectées par un vecteur vide) ou de cellules Colo320^{siARN^{NRP}2} (transfectées par un si ARN

ciblant la NRP-2) , dans 100µL de milieu DMEM contenant 10% de SVF inactivé, ont été ensemencées en plaque Maxisorp 96 puits. Après adhérence des cellules, 5µg/mL d'anticorps anti-NRP-2 ITAC-B ou 5µg/mL µg/mL d'anticorps contrôle ont été ajoutés. Après 24, 48, ou 72 heures de culture, 10 µL de MTT reconstitué à 5 mg/mL dans du PBS ont été ajoutés à chaque puits de culture. Les plaques ont ensuite été incubées 3 heures dans le noir, à 37°C, et 5% de CO₂, centrifugées, puis le surnageant a été éliminé. 200µL de DMSO ont alors été

ajoutés dans chaque puits. La densité optique a été lue dans l'heure, à 570 nm, après agitation de la plaque. Le test a été effectué en triplicate. Les résultats sont présentés sur la Figure 11.

Les panneaux A et B de la Figure 11 représentent respectivement les résultats obtenus lors du test de prolifération réalisé avec les cellules Colo320^{siARN^{ctrl}} ou Colo320^{siARN^{NRP-2}}. La densité optique « DO » traduisant la production de formazan par les cellules est indiquée en ordonnée, et la durée de culture est indiquée en abscisse. Le témoin cellules seules est représenté par 0, les cellules cultivées en présence de l'anticorps contrôle sont représentées par α , et les cellules cultivées en présence de l'anticorps ITAC-BI sont représentées par δ . Ces résultats montrent que dans le cas des cellules Colo320^{siARN^{ctrl}} qui expriment NRP-2, la prolifération en présence de l'anticorps ITAC-BI est inférieure à celle des cellules seules et celle observée en présence de l'anticorps contrôle. En revanche, dans le cas des cellules Colo320^{siARN^{NRP-2}} la prolifération en présence de l'anticorps ITAC-BI est identique à celle des cellules témoin et à celle observée en présence de l'anticorps contrôle. Les anticorps ITAC-BI ralentissent donc spécifiquement la prolifération des cellules présentant NRP-2 à la surface (cellules Colo320^{siARN^{ctrl}}) et non celle des cellules n'exprimant pas NRP-2 (cellules Colo320^{siARN^{NRP-2}}).

EXEMPLE 5 : L'ANTICORPS ITAC-BI POSSEDE LA CAPACITE D'INDUIRE L'APOPTOSE DE CELLULES TUMORALES EXPRIMANT LA NEUROPILINE-2

Afin de déterminer la capacité de l'anticorps ITAC-BI à induire l'apoptose de cellules tumorales exprimant la NRP-2, un test *in vitro* d'apoptose Annexine V-APC a été réalisé (BD Pharmingen, San Diego, CA). Ce test repose sur l'externalisation de la phosphatidylsérine par les cellules apoptotiques, et sur la fixation de l'Annexine V-APC sur cette molécule.

I - Effet pro-apoptotique d'IT AC-BI seul ImL de milieu DMEM contenant 10% de SVF inactivé et 100000 cellules

HT29-NRP-2 ou 100000 cellules HT29ctrl ont étéensemencées par puits dans une plaque Nunc 24 puits. Après adhérence des cellules (3heures), trois concentrations d'anticorps anti-NRP-2 ITAC-B (0,5 μ g/mL, 1 μ g/mL et 5 μ g/mL) ont été testées dans différents puits. En parallèle, des témoins cellules seules ont été réalisés, ainsi que des contrôles négatifs (anticorps de souris IgG1 anti-human (BZ1) aux mêmes concentrations que l'anticorps ITAC-BI).

Après 16 heures d'incubation, le surnageant de culture a été aspiré et 500 μ L de trypsine-EDTA ont été ajoutés dans chaque puits, et laissés en contact pendant 10 minutes. Lorsque les cellules ont commencé à se détacher, 500 μ L de milieu DMEM- 10% SVF ont été ajoutés par puits. Les cellules ont alors été centrifugées, lavées 2 fois dans du PBS puis reprises

dans 300 μ L de Tampon Binding Buffer IX (fourni dans le kit), puis 5 μ L d'Annexine V-APC ont ensuite été ajoutés à 100 μ L de cette solution. L'analyse par cytométrie en flux des populations de cellules marquées par PAnnexine V-APC en fonction des concentrations en anticorps ITAC- BI, et en anticorps contrôle, est présenté à la Figure 12. Pour chacun des panneaux de la Figure 12, le nombre d'événements (nombre de cellules) est indiqué en ordonnée et l'intensité de fluorescence (correspondant au marquage des cellules par l'annexine V-APC) est représentée en abscisse. Les panneaux A, C et E représentent les expériences réalisées avec les cellules HT29-NRP-2, les panneaux B, D et F représentent les expériences

réalisées avec les cellules HT29ctrl. Les expériences pour lesquelles la concentration en anticorps ITAC-B1 est de 0,5µg/mL sont représentées aux panneaux A et B de la Figure 12. Les expériences pour lesquelles la concentration en anticorps ITAC-B1 est de 1µg/mL sont représentées aux panneaux C et D de la Figure 12, et les expériences pour lesquelles la concentration en anticorps ITAC-B1 est de 5µg/mL sont représentées aux panneaux E et F de la Figure 12. Pour chaque panneau, la courbe de distribution (1) représente les cellules seules, la courbe de distribution (2) représente les cellules cultivées en présence d'un anticorps isotypique murin contrôle et la courbe de distribution (3) représente les cellules cultivées en présence de l'anticorps ITAC-B1.

On constate, pour les panneaux C et E représentant les expériences réalisées avec les cellules HT29-NRP-2 exprimant NRP-2 un déplacement vers la droite du pic de distribution correspondant respectivement aux concentrations 1 et 5 µg/mL d'anticorps ITAC- B1. Ce déplacement du pic de distribution n'est pas observé pour les témoins cellules seules et anticorps contrôle. Ce résultat indique que l'apoptose est spécifiquement induite chez les cellules exprimant NRP-2 à partir de 1 µg/mL d'anticorps ITAC-B1 dans le milieu de culture.

En ce qui concerne les expériences correspondantes réalisées avec les cellules HT29ctrl qui n'expriment pas NRP-2, les courbes représentant les conditions cellules seules, témoins anticorps contrôle et anticorps ITAC-B1 se superposent, indiquant que l'anticorps ITAC-B1 n'entraîne pas l'apoptose de cellules n'exprimant pas NRP-2.

On constate que l'anticorps ITAC-B1 induit l'apoptose de cellules exprimant la NRP -2 à leur surface cellulaire, à une dose égale ou supérieure à 1 µg/mL. L'apoptose induite par ITAC-B1 est dose-dépendante puisqu'une concentration plus importante d' ITAC-B1 entraîne une apoptose plus importante.

Ces expériences montrent donc que les anticorps ITAC-B1 induit spécifiquement l'apoptose de cellules tumorales présentant la NRP-2 (HT29-NRP-2) à leur surface membranaire, sans induire l'apoptose de cellules ne présentant pas la NRP-2 (HT29). II - Effet pro-apoptotique d'ITAC-B1 en combinaison avec d'autres agents anti-cancéreux

Des expériences similaires d'évaluation de la capacité d'ITAC-B1 à induire l'apoptose de cellules exprimant NRP-2 ont été réalisées avec des cellules cultivées en présence soit de 5FU (5 fluoro-uracile), soit d'irinotecan, deux anticancéreux couramment utilisés en chimiothérapie. Dans cette série d'expériences, les concentrations en anticorps ITAC-B1 de

2,5µg/mL et 5µg/mL ont été testées. En parallèles, des témoins cellules seules ont été réalisés, ainsi que des contrôles avec l'anticorps BZ1 aux concentrations 2,5µg/mL et 5µg/mL. Le 5FU et

Pirinotecan sont utilisés à 10µg/mL. Les résultats de ces expériences sont représentés à la Figure

13. Les panneaux de la Figure 13 sont des représentations en nuage de points de l'analyse par cytométrie en flux. Pour chacun des panneaux, l'intensité de fluorescence

(correspondant au marquage des cellules par l'annexine V-APC) est représentée en abscisse.

L'ordonnée indique la granulosité des cellules (Side Scatter ou SSC). Les conditions de traitement par les anticorps sont indiquées au dessus des panneaux, et le traitement par le 5FU ou l'irinotecan est indiqué à droite des panneaux. Le pourcentage de cellules marquées par l'annexine V-APC, (correspondant au pourcentage de cellules entrées en apoptose), est indiqué en bas à droite de chaque panneau.

Les cellules seules présentent environ 12% d'apoptose, et les cellules cultivées en présence de 5FU ou d'irinotecan seuls, ou associés à l'anticorps contrôle BZI présentent entre 34 et 43% environ d'apoptose dans le cas du 5FU, et entre 21 et 35% d'apoptose dans celui de l'irinotecan.

L'apoptose chez les cellules cultivées conjointement en présence de 5FU et de l'anticorps ITAC-BI est de l'ordre de 78,5% pour une concentration d'ITAC-BI dans le milieu de 2,5µg/mL, et de l'ordre de 80% pour une concentration d'ITAC-BI de 5µg/mL. Pour les cellules cultivées en présence d'irinotecan et d'ITAC-BI, l'apoptose est de l'ordre de 51% pour une concentration d'anticorps ITAC-BI de 2,5µg/mL, et de l'ordre de

58% pour une concentration de 5µg/mL.

Ces résultats mettent donc en évidence une synergie d'action entre les anticorps ITAC-BI et les molécules anticancéreuses, la combinaison 5FU/ITAC-BI étant la plus efficace dans les conditions testées.

HI - L'effet pro-apoptotique d'ITAC-BI est corrélé à l'expression de p53

Afin de corréler l'induction d'apoptose à l'expression de p53, les cellules Colo320siARN-ctrl ont été prétraitées 18h avec un inhibiteur chimique de p53, la pifithrin- α , à une dose de 27µM (PFT α , Sigma). Après prétraitement, les cellules sont lavées 2 fois avec 3mL de PBS et mises en plaque 24 puits, à raison de 100000 cellules/puits dans 1mL de RPMI- 10% SVF. Des cellules non prétraitées sont mises dans les mêmes conditions. Les cellules sont incubées pendant 5h avec un anticorps isotypique murin contrôle (BZI) ou ITAC-BI à 20µg/mL et l'apoptose est mesurée comme décrit ci-dessus.

La Figure 14 représente les résultats des expériences d'induction de l'apoptose réalisées avec les cellules Colo320siARN-ctrl prétraitées ou non par la PFT α . Le pourcentage de cellules marquées par l'annexine V-APC est indiqué en ordonnée, les conditions de cultures des cellules sont indiquées en abscisse (témoin milieu, témoin milieu additionné d'un anticorps contrôle isotypique -BZI-, essai milieu additionné de l'anticorps ITAC-BI). Les résultats des

essais réalisés avec des cellules prétraitées par la PFT α sont représentés en gris clair, ceux des essais réalisés avec des cellules non prétraitées sont représentés en gris foncé.

Alors que dans les témoins milieu et milieu additionné d'anticorps contrôle le marquage à l'annexine V-APC est similaire que les cellules soient traitées ou non par la PFT α , on constate que les cellules cultivées en présence d'anticorps ITAC-BI sont plus faiblement marquées lorsqu'elles sont prétraitées avec la PFT α (environ 28% de marquages contre 41% pour les cellules non prétraitées).

Ces résultats montrent que le prétraitement par la PFT α prévient l'apoptose dépendante d'ITAC-BI. L'apoptose induite par ITAC-BI semble donc dépendre de l'expression de p53.

IV - L'effet pro-apoptotique d'ITAC-BI est indépendant du VEGF

Afin de déterminer si l'effet apoptotique observé lors du traitement des cellules par l'anticorps ITAC-BI était dépendant de la liaison du VEGF à NRP-2, les cellules tumorales HT29-NP2 exprimant NRP-2 (et qui comme les cellules Colo320 sécrètent naturellement du VEGF dans le milieu de culture) ont été cultivées en présence de l'anticorps monoclonal humanisé anti-VEGF Avastin® (bevacizumab) à 50 μ g/mL, puis les cellules ont été incubées en présence d'un anticorps isotypique murin contrôle (BZI) ou d'ITAC-BI à 20 μ g/mL durant 6 heures. L'apoptose induite a alors été mesurée par marquage à l'annexine V-APC comme décrit ci-dessus. Les résultats sont présentés sur la Figure 15. Les panneaux de la Figure 15 sont des représentations en nuage de points de l'analyse par cytométrie en flux. Pour chacun des panneaux, l'intensité de fluorescence (correspondant au marquage des cellules par l'annexine V-APC) est représentée en abscisse. L'ordonnée indique la granulosité des cellules. Les conditions de traitement par les anticorps et l'Avastin® sont indiquées à gauche des panneaux. Le pourcentage de cellules marquées par l'annexine V-APC, correspondant au pourcentage de cellules entrées en apoptose, est indiqué en haut à droite de chaque panneau.

Les cellules cultivées en présence de l'anticorps contrôle BZI, avec ou sans Avastin®, présentent respectivement 12 et 13% d'apoptose. L'apoptose chez les cellules HT29-NP2 cultivées en présence de l'anticorps ITAC-BI est de l'ordre de 51%, et d'environ 58% lorsque les cellules ont été préalablement traitées par l'Avastin®.

Ces résultats montrent clairement que la neutralisation du VEGF n'altère pas la capacité de l'anticorps ITAC-BI à induire l'apoptose, ce qui confirme que les propriétés pro-apoptotiques de l'anticorps ITAC-BI sont indépendantes du VEGF.

EXEMPLE 6 : ITAC-BI N'INFLUENCE PAS LA PHOSPHORYLATION DU RECEPTEUR VEGFR1 OU DE LA PROTEINE AKT.

L'effet éventuel de l'anticorps ITAC-BI sur le degré de phosphorylation d'un récepteur au VEGF (VEGFR1), ainsi que sur la phosphorylation de la protéine AKT qui est activée par l'intermédiaire des récepteurs du VEGF a été étudié sur des cellules tumorales HT29-NP2 et Colo320^{siARN_ctrl}.

Les cellules ont été cultivées pendant 24 heures en milieu RPMI + 10% SVF en présence de l'anticorps contrôle BZI à 20 μ g/mL, d'ITAC-BI à 20 μ g/mL ou de 5FU à

50 μ g/mL. Un témoin cellules non-traitées a été ajouté (témoin « médium »). Les cellules ont ensuite été isolées et lysées, et la phosphorylation de VEGFR-I et d'AKT a été évaluée par Western Blot sur les extraits protéiques cellulaires, en utilisant des anticorps dirigés contre le

VEGFR1 non-phosphorylé (anticorps polyclonal de lapin anti-VEGFR1) ou phosphorylé

(anticorps polyclonal de lapin anti-phospho-VEGFR1^{Tyr213}, R&D System) ou des anticorps dirigés contre AKT non-phosphorylé (anticorps polyclonal de lapin C67E7, Cell Signaling

technology) ou phosphorylé (anticorps polyclonal de lapin anti-phospho-AKT^{Ser473} DE-9, Cell Signaling technology). Les résultats sont représentés sur les Figures 16 et 17.

Ces résultats montrent que le statut de phosphorylation de VEGFR, ainsi que la quantité d'AKT et son statut de phosphorylation sont similaires, que les cellules soient traitées ou non par ITAC-B1, démontrant que les effets de cet anticorps ne sont pas liés à la voie de signalisation VEGF/VEGFR. **EXEMPLE 7 : RECHERCHE D'UNE EVENTUELLE INTERACTION ENTRE LE VEGF ET L'EPITOPE DE LA NEUROPILINE 2 RECONNU PAR ITAC-B1.**

Afin de mettre en évidence une éventuelle compétition entre le VEGFa et ITAC B1 pour la reconnaissance de la neuropiline 2, des cellules tumorales HT29-NRP-2 exprimant la neuropiline 2 ont été préincubées avec ou sans VEGF (1000 ng/mL) pendant 15 minutes. Ces cellules ont ensuite été incubées avec l'anticorps ITAC B1, ou avec un anticorps contrôle isotypique (anticorps BZI), et analysés en cytométrie de flux comme décrit dans l'Exemple 2 ci-dessus.

Les résultats sont illustrés par la Figure 18. Ces résultats montrent que la présence du VEGFA ne prévient pas la fixation de ITAC B1 sur les cellules tumorales. **EXEMPLE 8 : LES ANTICORPS ITAC-B1 ET ITAC-B2 ONT LA CAPACITE D'INDUIRE L'EXPRESSION DE LA PROTEINE P53**

Après avoir montré que la neuropiline-2 a la capacité d'altérer l'expression de p53 dans la lignée HT29 et de la restaurer dans la lignée Colo320^{siARN^{NRP2}}, l'influence de l'anticorps ITAC-B1 sur l'expression de p53 dans des lignées exprimant la neuropiline-2, comme HT29-NRP-2 et Colo320siARN-ctrl, a été étudiée.

Les cellules tumorales HT29, HT29-NRP-2, Colo320^{siARN^{ctrl}} et Colo320^{siARN^{NRP2}} ont été exposées à 20µg/ml d'anticorps ITAC-B1 ou d'anticorps contrôle, et cultivées pendant 48 heures. Après lyse des lignées cellulaires, migration des culots protéiques obtenus sur gel de polyacrylamide 10% (10 µg de protéine par puits), puis transfert sur membrane PVDF, la membrane a été incubée durant une nuit avec l'anticorps primaire anti-p53 (BD Biosciences, mouse anti-human p53) dilué au 1/500. Les membranes, après lavage dans du TBS 0,1% Tween20, ont été incubées pendant 1 heure avec un anticorps secondaire anti IgG-HRP de souris dilué au 1/6000. Les résultats sont représentés à la Figure 19.

Ces résultats montrent que la protéine p53 est fortement exprimée dans les lignées HT29-ctrl et Colo320^{siARN^{NRP-2}} n'exprimant pas NRP-2, que l'anticorps ITAC-B1 soit présent ou non dans le milieu. Lorsque les lignées HT29-NRP-2 et Colo320^{siARN^{ctrl}} exprimant NRP-2 sont cultivées seules ou en présence de l'anticorps contrôle, p53 n'est pas détectée, alors que la présence de l'anticorps ITAC-B1 dans le milieu de culture restaure en partie l'expression de p53. Ces résultats montrent donc que le traitement de cellules exprimant NRP-2 à leur surface membranaire (HT29-NP2 et Colo320^{siARN^{ctrl}}) par ITAC-B1 aboutit à la restauration de l'expression de p53 dans les lignées tumorales.

Cette expérience confirme qu'il existe une corrélation négative entre la présence de la neuropiline-2 et de p53, et que ITAC-B1 possède la capacité originale de pouvoir moduler le niveau d'expression de p53.

EXEMPLE 7 : UTILISATION DE L'ANTICORPS ITAC-BI POUR POTENTIALISER L'EFFET DE TRAITEMENTS ANTI-NEOPLASIQES IN VIVO

Des cellules tumorales HT29-NRP-2 ont été injectées en sous-cutané à 20 souris immunodéficientes, à raison de 1.10^6 cellules par souris, au niveau du flanc droit. 10 jours après l'injection, les tumeurs mesurent environ 5mm x 5mm. Quatre groupes de 3 souris possédant des tumeurs comparables ont été formés : chaque groupe a reçu par voie intrapéritonéale soit du PBS (Groupe contrôle A), soit l'anticorps ITAC-B1 (Groupe B), soit du 5FU (Groupe C), soit du 5FU et l'anticorps ITAC-B1 (Groupe D). Le protocole de traitement de chimiothérapie est schématisé sur la figure 20.

Conformément au protocole décrit ci-dessus, le Groupe B a été inoculé avec ITAC-B1 à JO (12mg/kg), J3 (6mg/kg), J7 (12mg/kg) et J10 (6mg/kg). Le Groupe C a été inoculé avec 20mg/kg de 5FU de JO à J4 puis avec 100mg/kg à J9. Le Groupe D a été inoculé avec ITAC-B1 à JO (12mg/kg), J3 (6mg/kg), J7 (12mg/kg) et J10 (6mg/kg) et avec 20mg/kg de 5FU de JO à J4 et 100mg/kg de 5FU à J9. Les tumeurs ont été mesurées 2 fois par semaine, et le calcul du volume des tumeurs a été effectué avec la formule: $V \text{ (mm}^3\text{)} = d^2 \times D / 2$. Les résultats de ces mesures sont présentés dans la Figure 21.

La Figure 21 représente le volume des tumeurs en fonction du temps. Le Groupe A (témoin PBS) est représenté par (0), le Groupe B (souris inoculées avec l'anticorps ITAC-B1) est représenté par (m), le Groupe C (souris inoculées avec le 5FU) est représenté par (δ), et le Groupe D (souris inoculées à la fois avec l'anticorps ITAC-B 1 et avec le 5FU) est représenté par (x).

On observe une réduction du volume des tumeurs à partir de J14 chez les souris inoculées avec l'anticorps ITAC-B1 ou avec du 5FU. Cette réduction est plus marquée lors du traitement combiné 5FU/ITAC-B1. Ces résultats montrent que l'anticorps ITAC-B1 est capable de ralentir in vivo la croissance tumorale. En outre, puisque les souris traitées par du 5FU associé à ITAC-B1 connaissent le ralentissement de croissance tumorale le plus important, par rapport aux souris traitées par 5FU seul ou ITAC-B1 seul, ces résultats montrent clairement que l'utilisation de l'anticorps ITAC-B1 potentialise l'efficacité du 5-fluorouracile.

REVENDEICATIONS

- 1) Anticorps anti-neuropiline 2 humaine caractérisé en ce que sa fixation à des cellules tumorales exprimant la neuropiline 2 humaine induit l'apoptose desdites cellules tumorales.
- 2) Anticorps anti-neuropiline-2 humaine selon la revendication 1, choisi parmi : i) un anticorps comprenant le domaine variable de la chaîne lourde et le domaine variable de la chaîne légère de l'anticorps ITAC-B1, lesdits domaines étant respectivement définis par les séquences SEQ ID NO: 2 et SEQ ID NO: 4; ii) un anticorps comprenant le domaine variable de la chaîne lourde et le domaine variable de la chaîne légère de l'anticorps ITAC-B2, lesdits domaines étant respectivement définis par les séquences SEQ ID NO: 6 et SEQ ID NO: 8.
- 3) Ligand de la neuropiline 2 humaine, caractérisé en ce qu'il comprend au moins les CDR3 de la chaîne lourde et le CDR3 de la chaîne légère d'un anticorps selon une quelconque des revendications 1 ou 2.
- 4) Ligand de la neuropiline-2 humaine selon la revendication, caractérisé en ce qu'il comprend en outre les CDR2 et/ou les CDR1 de la chaîne lourde et de la chaîne légère de l'anticorps ITAC-B1 ou ITAC-B2. 5) Utilisation d'un anticorps selon une quelconque des revendications 1 ou 2, ou d'un ligand selon une quelconque des revendications 3 ou 5 pour l'obtention d'un médicament anti-tumoral.
- 6) Utilisation selon la revendication 5, caractérisée en ce que ledit médicament induit l'apoptose des cellules tumorales exprimant la neuropiline 2 humaine en augmentant l'expression de p53 dans lesdites cellules.

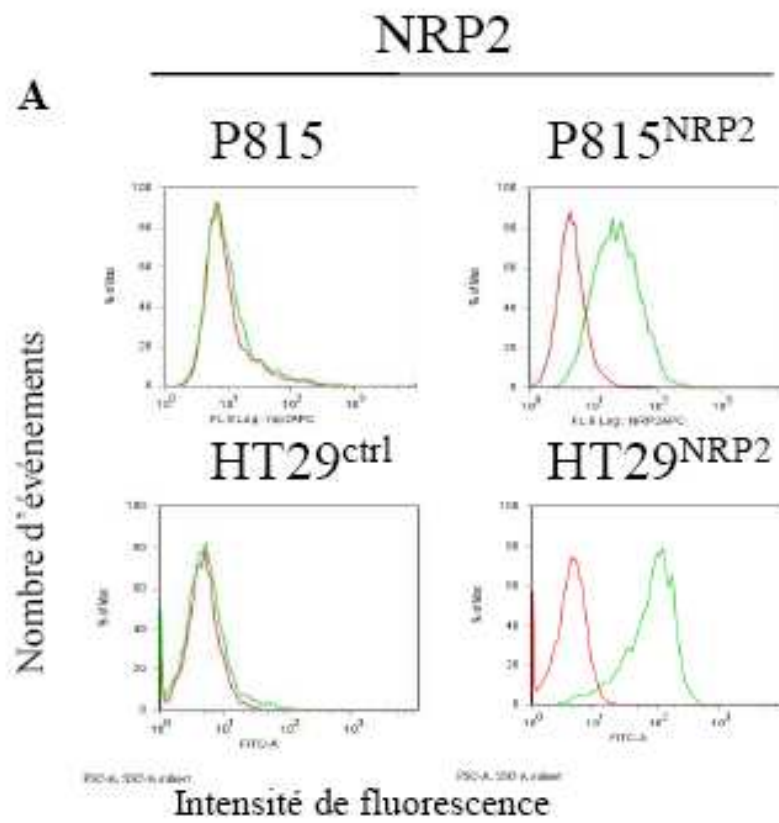


Figure 1

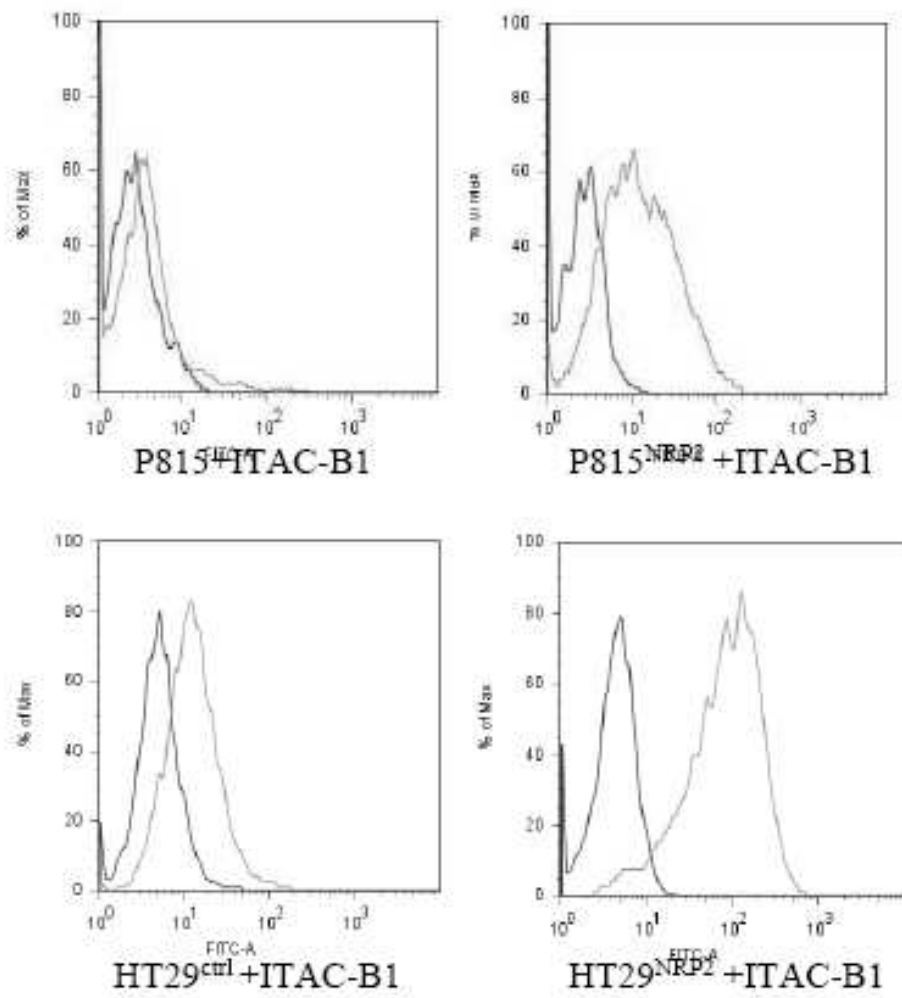


Figure 2

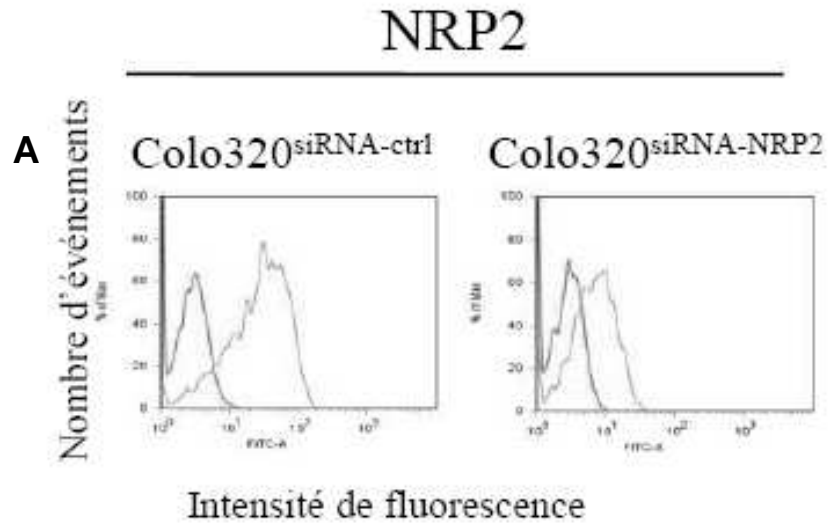


Figure 3

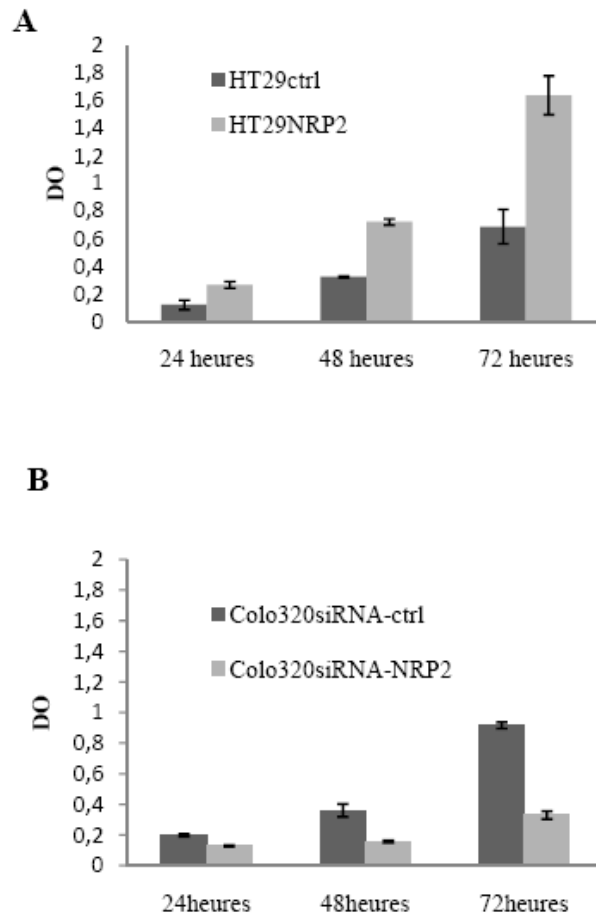
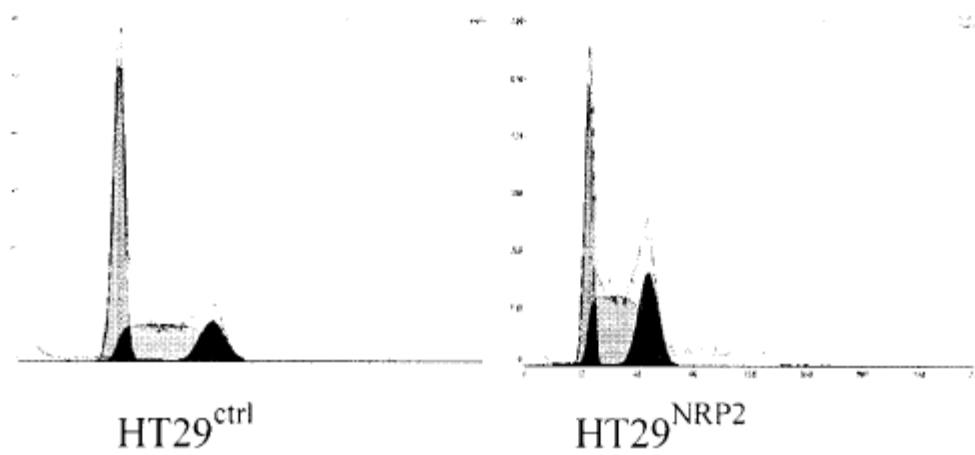


Figure 4



	%G1	%G2	%S
HT29	48	14,4	37,6
HT29-NRP2+	30,9	24,6	44,5

Figure 4 bis

A



HT29^{ctrl}

B



HT29^{NRP2}

C



Colo320^{siRNA-ctrl}

D



Colo320^{siRNA-NRP2}

Figure 5

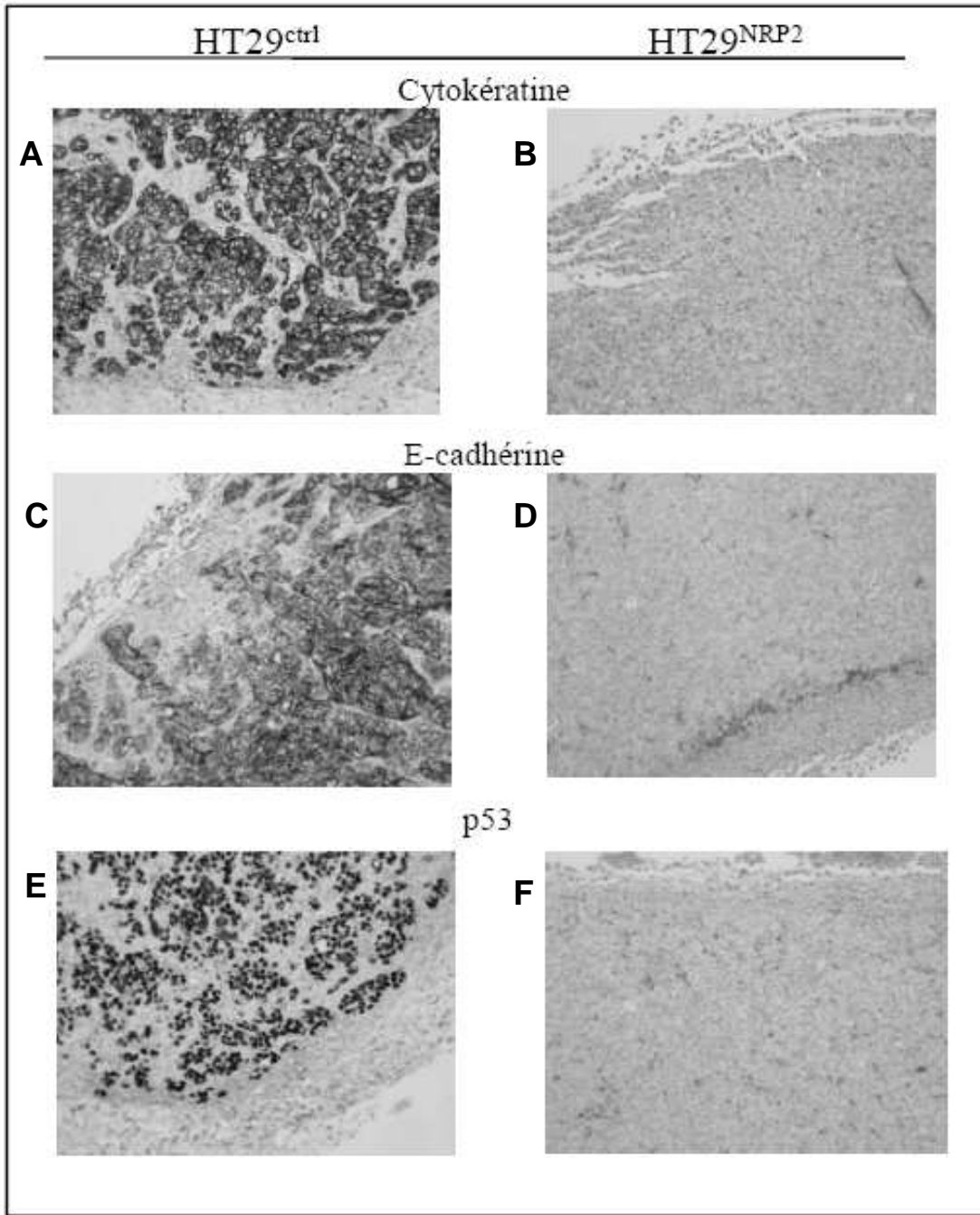


Figure 6

p53

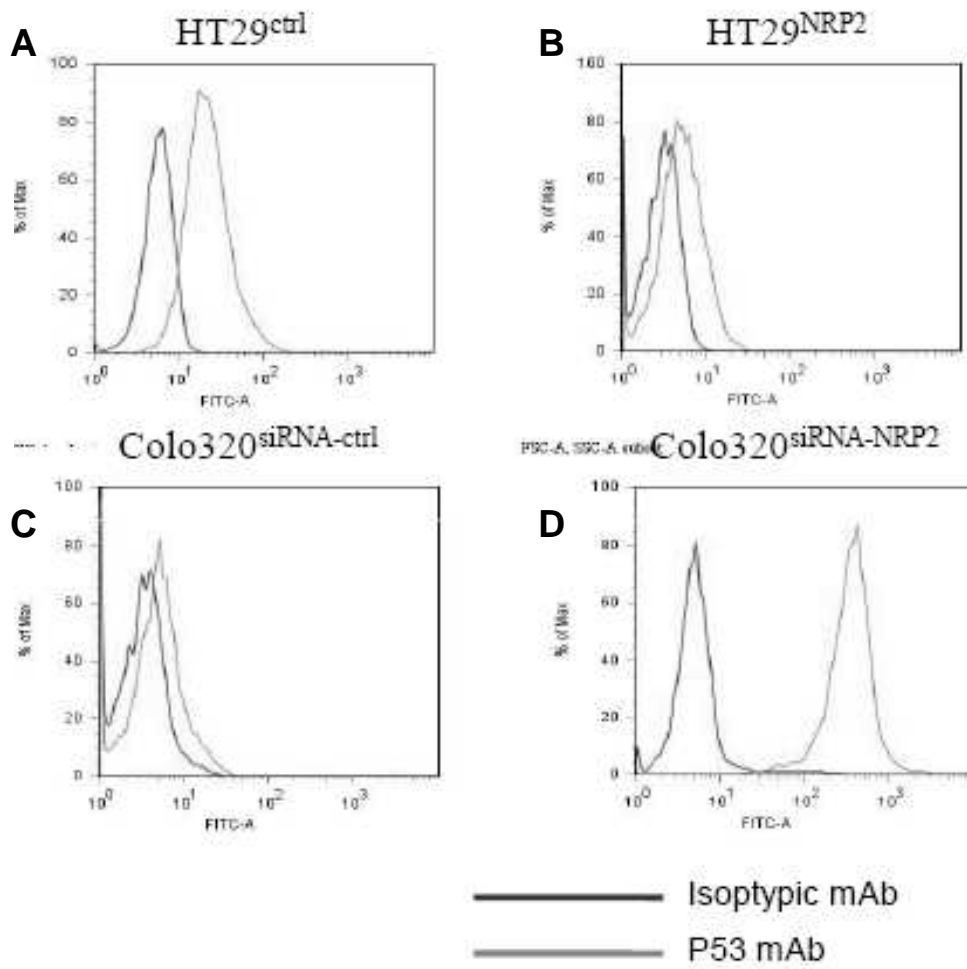


Figure 7

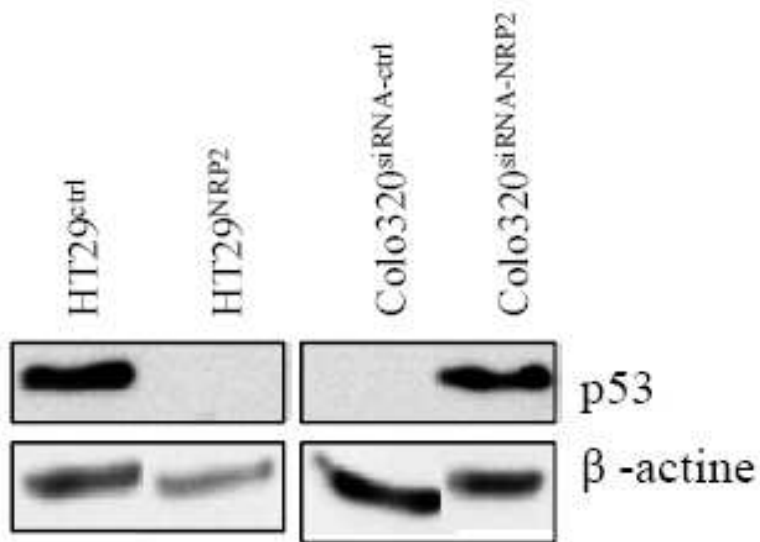


Figure 8

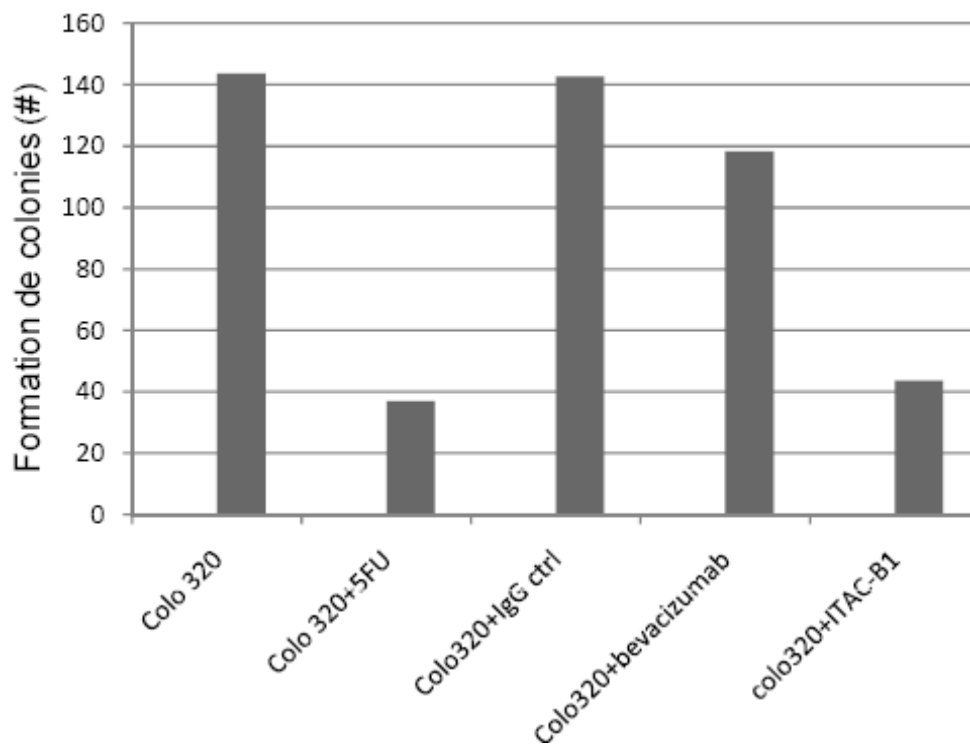


Figure 9

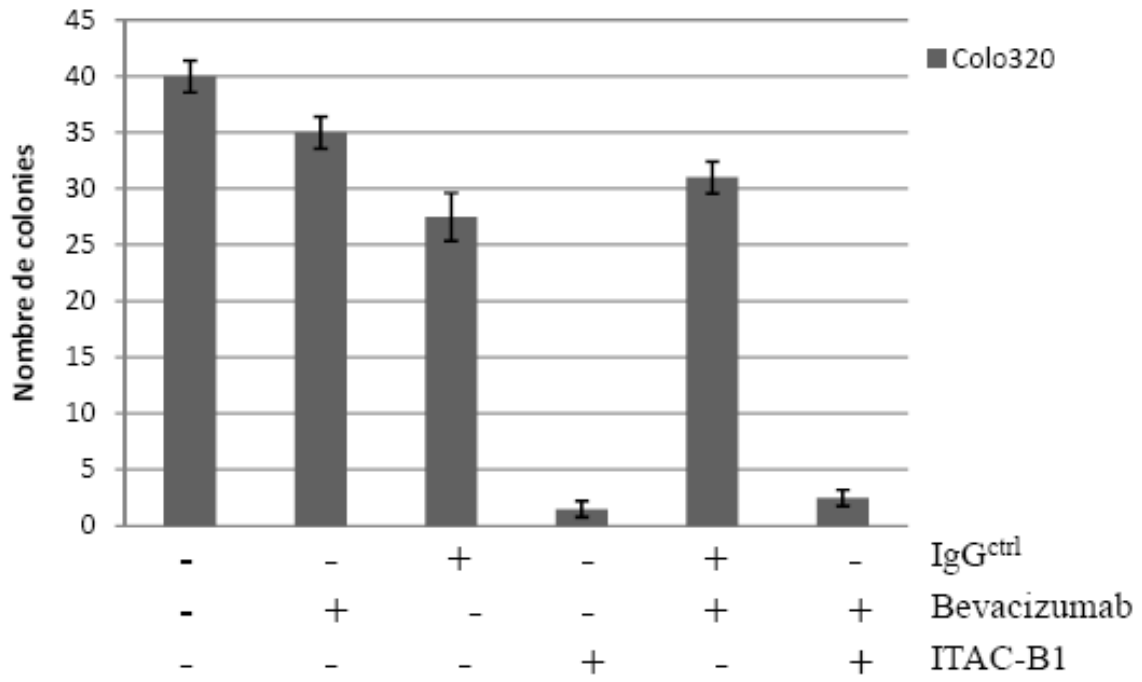


Figure 10

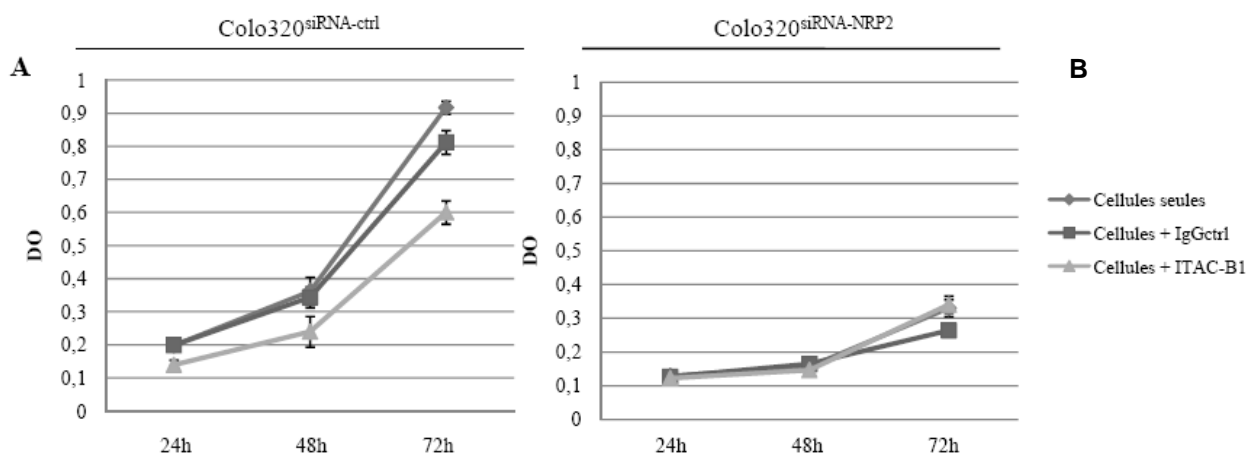


Figure 11

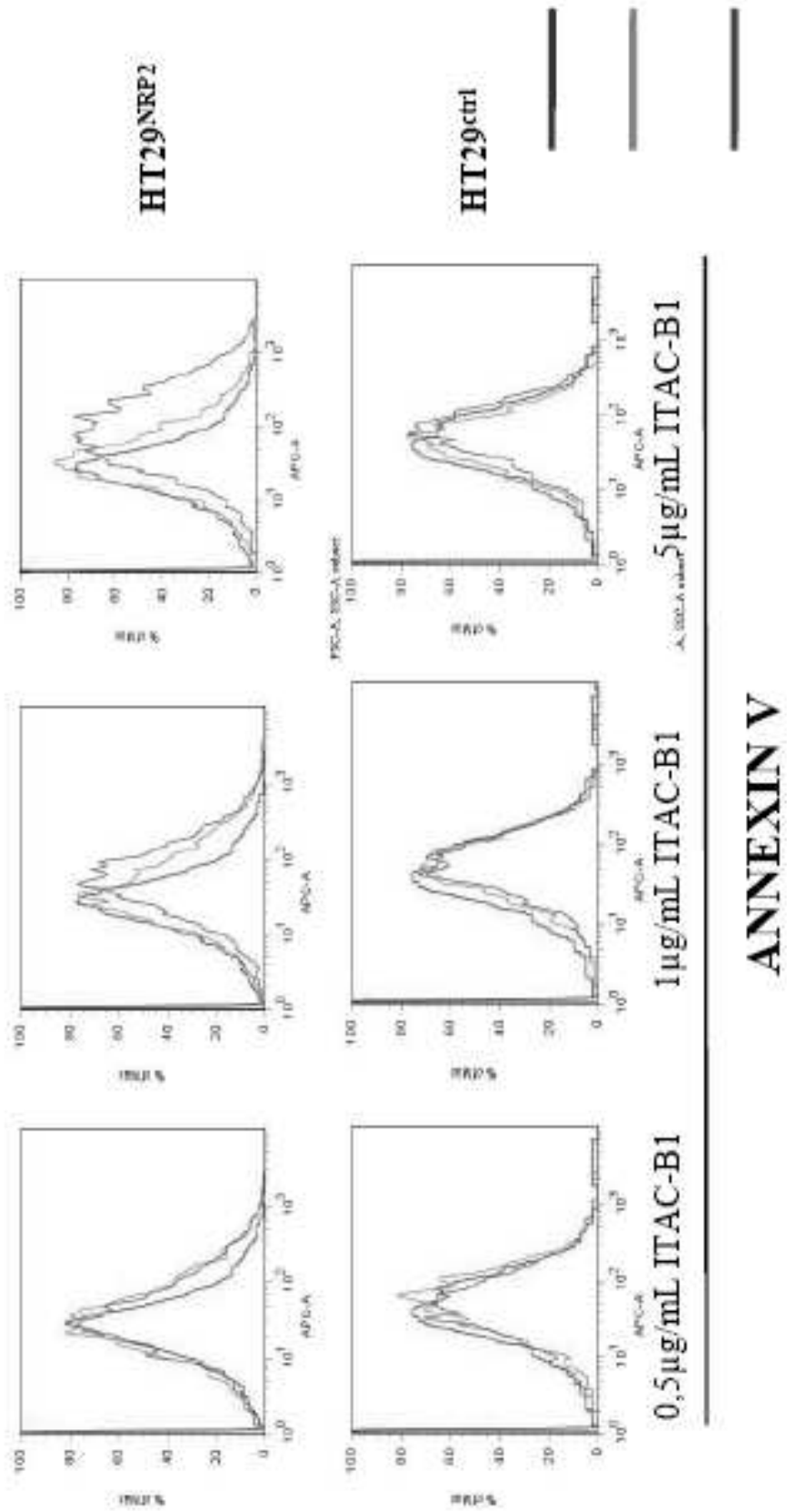


Figure 12

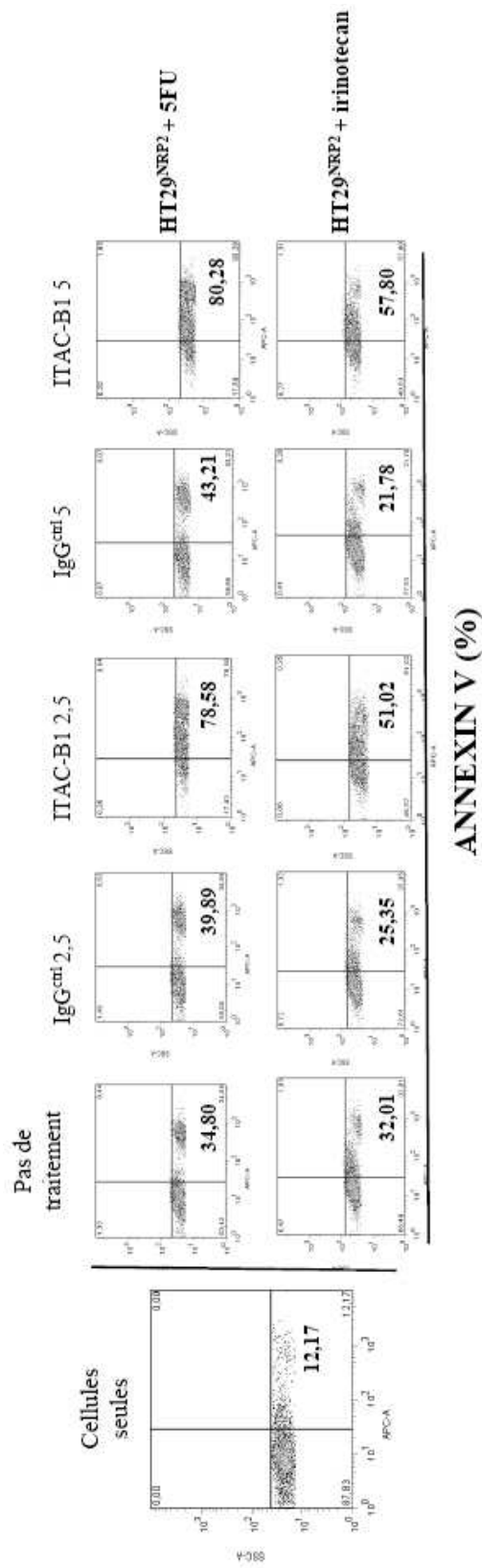


Figure 13

080521

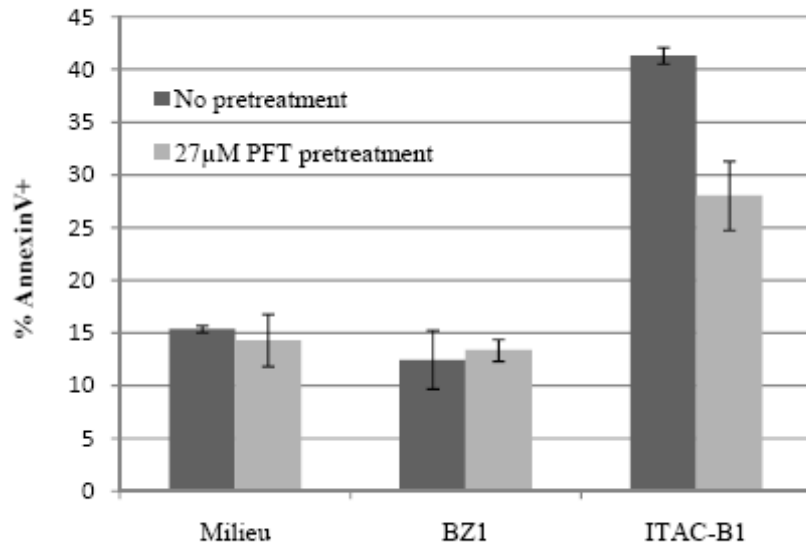


Figure 14

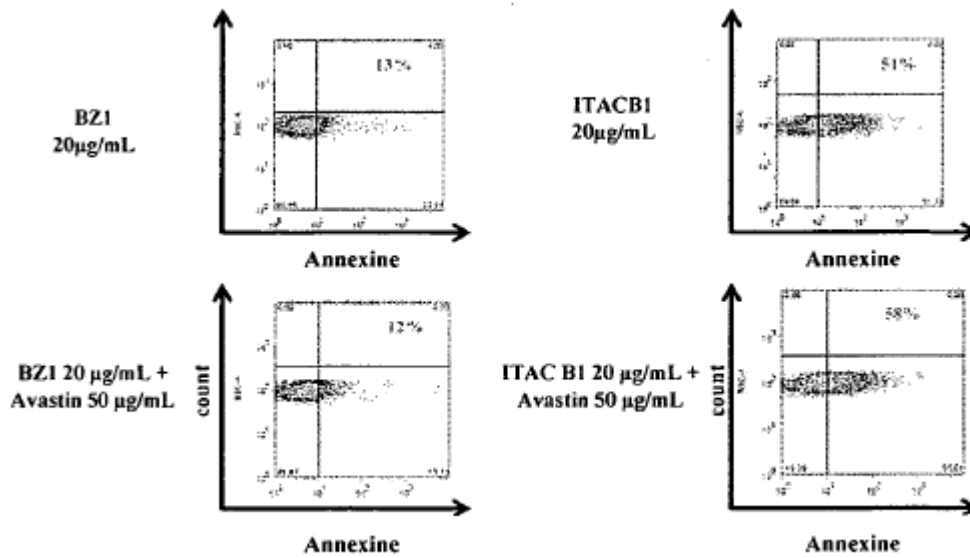


Figure 15

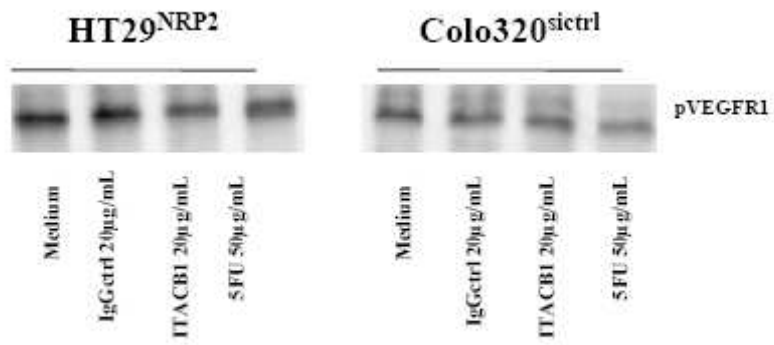


Figure 16

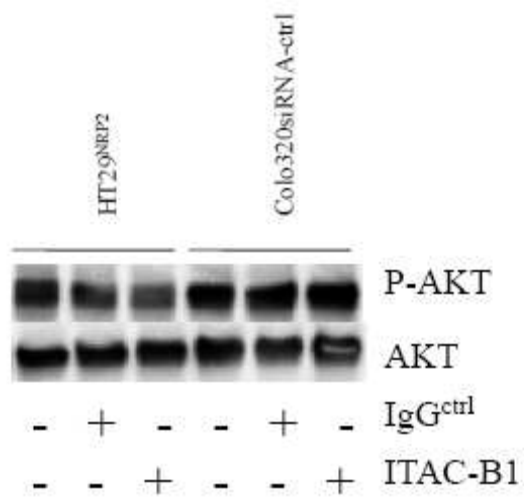


Figure 17

Compétition VEGF/ITACB1
HT29NRP2+

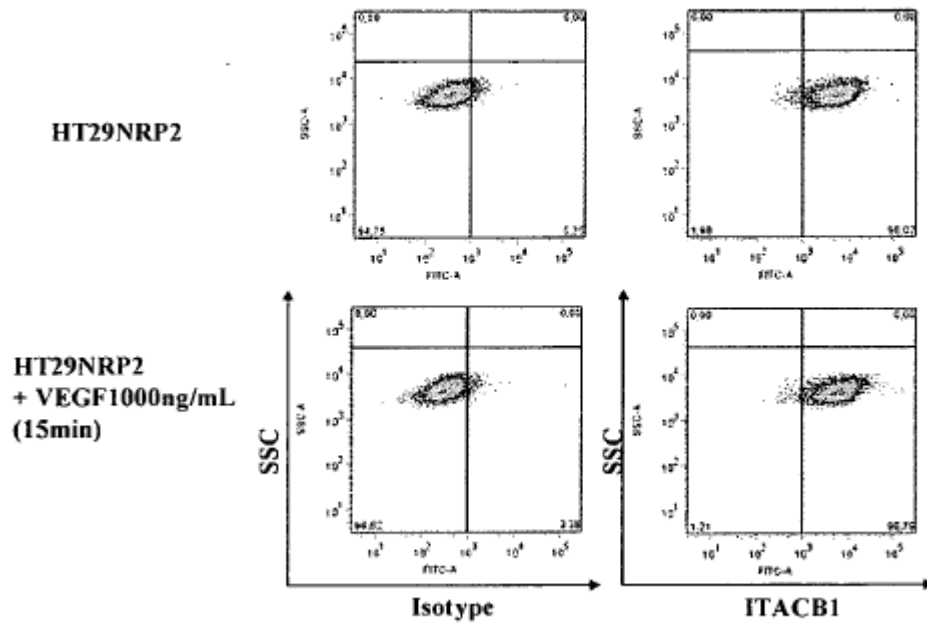


Figure 18

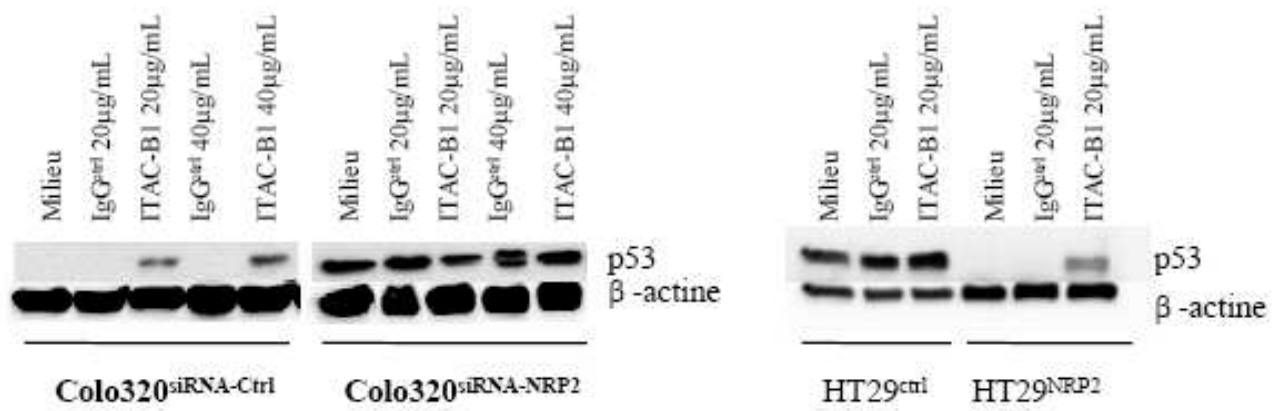


Figure 19

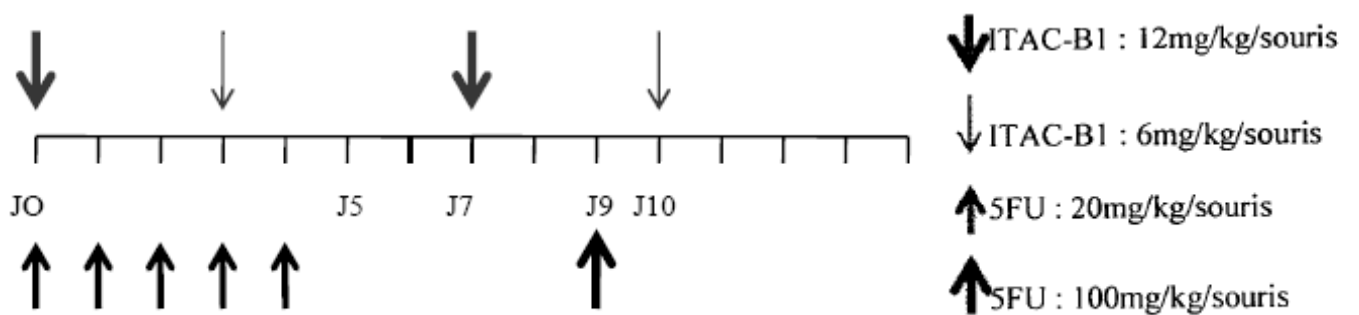


Figure 20

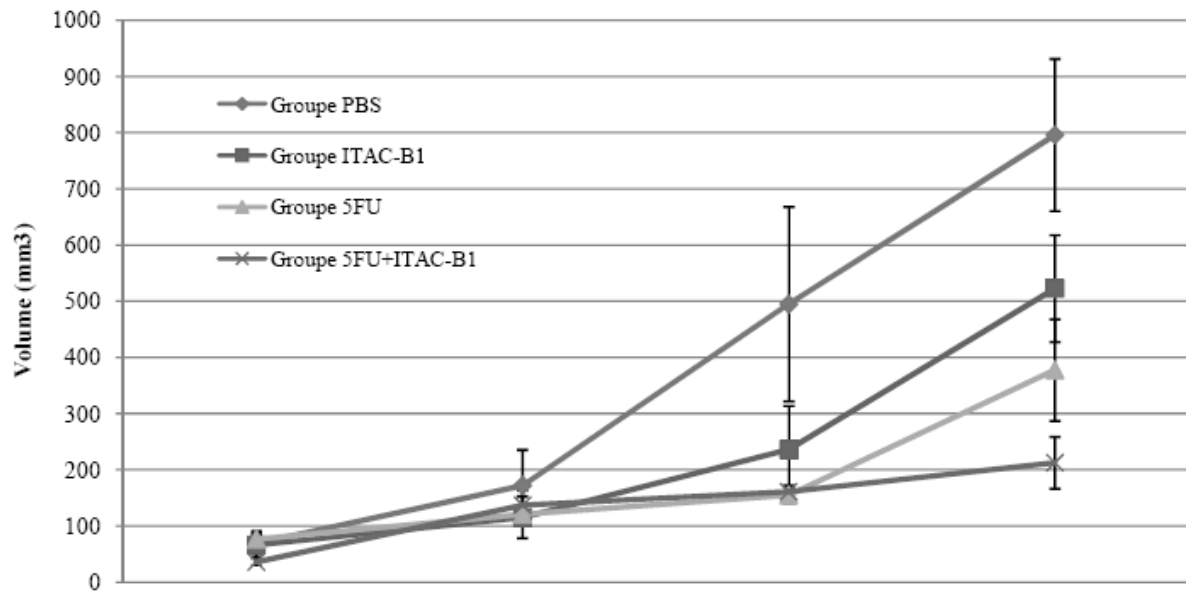


Figure 21

RESULTATS DE LA PUBLICATION N°2

1. Production et isolement d'anticorps spécifiques de la NRP2

Cinq fusions cellulaires ont été réalisées au sein de la plateforme ITAC pour la production d'anticorps murins spécifiques de la NRP2 humaines. Rapidement, un hybridome issu de la fusion 612 nous est apparu comme étant particulièrement bioactif, l'hybridome 1E12, renommé ITAC-B1. La spécificité des anticorps sécrétés par ITAC-B1 a été évaluée par un marquage membranaire sur les cellules HT29^{ctrl}, HT29^{NRP2}, P815, P815^{NRP2}, P815, Colo320^{siRNA-ctrl} et Colo320^{siRNA-NRP2}. Les anticorps ITAC-B1 reconnaissent spécifiquement HT29^{NRP2}, P815^{NRP2} et Colo320^{siRNA-ctrl} et ne reconnaissent pas ou beaucoup moins HT29^{ctrl}, P815, Colo320^{siRNA-NRP2}. (Figure 35)

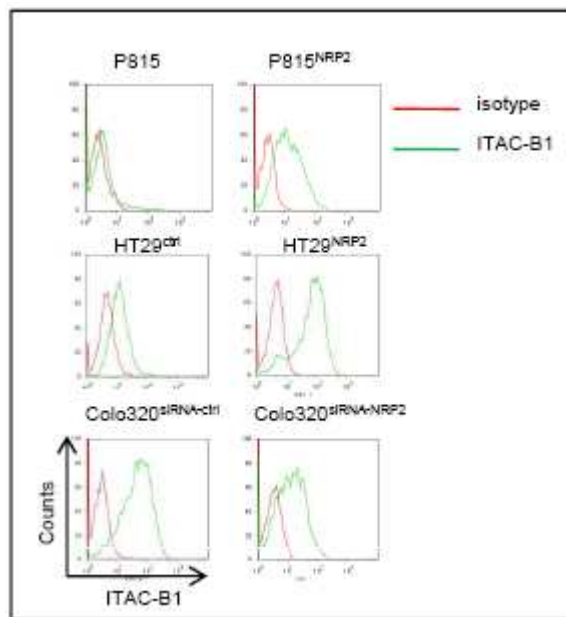


Figure 35 : Spécificité de l'anticorps ITAC-B1 par IFI.

2. Effets sur la prolifération cellulaire et la formation de colonies

Plusieurs tests ont été mis en place pour évaluer la bioactivité de nos anticorps anti-NRP2.

En premier lieu, des tests *in vitro* de prolifération cellulaire (tests MTT), de formation de colonies en milieu semi-gélosé agar et des tests d'induction d'apoptose cellulaire (marquage des phosphatidylsérines externalisées par cytométrie en flux) nous ont permis d'isoler des hybridomes sécrétant des anticorps anti-NRP2 bioactifs.

L'hybridôme ITAC-B1 sécrète des anticorps anti-NRP2 capables de ralentir la prolifération de cellules tumorales exprimant la NRP2 dans des tests MTT et de diminuer la pousse de colonies dans des tests en milieu agar. (Figures 36 et 37)

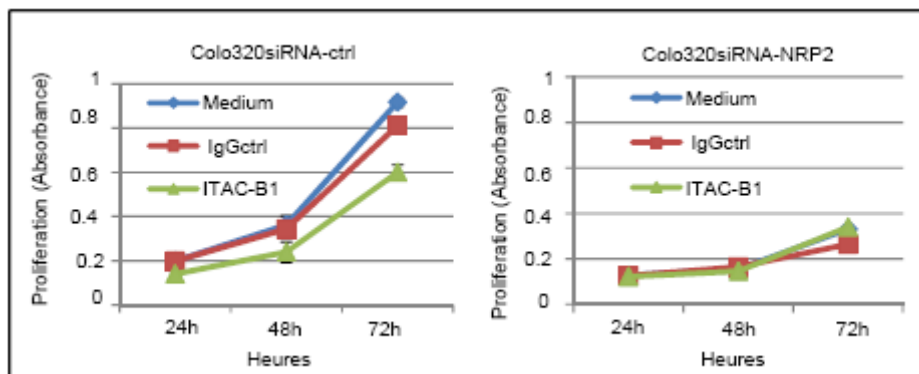


Figure 36 : La neutralisation de la NRP2 diminue la prolifération cellulaire. L'anticorps ITAC-B1 ralentit spécifiquement la prolifération cellulaire des cellules exprimant la NRP2 (Colo320^{siRNA-ctrl}) dans des tests MTT.

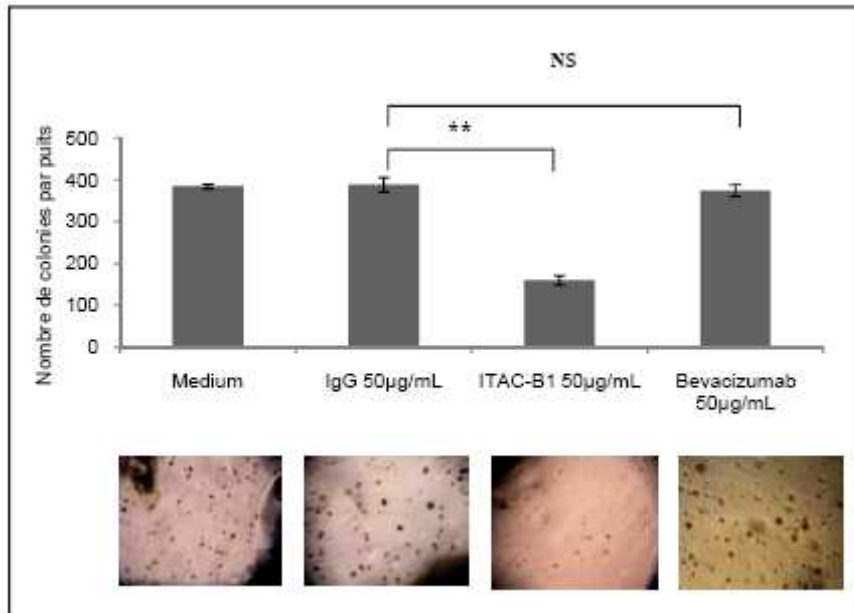


Figure 37 : L'anticorps ITAC-B1 diminue significativement la formation de colonies de cellules Colo320 dans des tests en milieu semi-gélosé agar.

3. Induction de l'apoptose

3.1 Lignées de cancer colorectal

La capacité d'induction de l'apoptose a été étudiée par des marquages Annexin-V en cytométrie de flux. L'anticorps ITAC-B1 semble capable d'induire l'apoptose de cellules tumorales en 5heures, utilisé seul ou en association avec des molécules de chimiothérapie. L'induction de l'apoptose par notre anticorps est donc rapide, dose-dépendante et synergique avec d'autres molécules de chimiothérapie anti-cancéreuse comme le 5-FU (5-Fluorouracile), l'irinotecan ou l'oxaliplatine. (Figures 38 et 39)

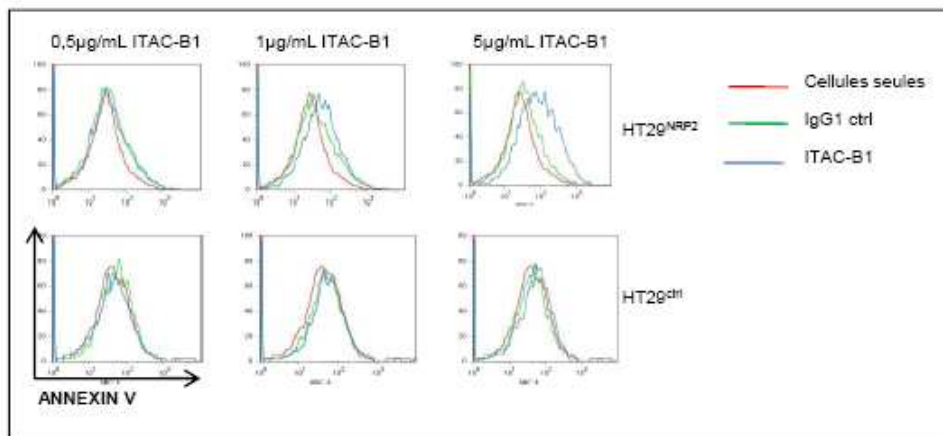


Figure 38 : L'anticorps ITAC-B1 induit l'apoptose de cellules tumorales exprimant la NRP2 (HT29^{NRP2}) d'une façon dose-dépendante, tandis qu'il n'a aucune action sur les cellules déficientes en NRP2 (HT29^{ctrl}).

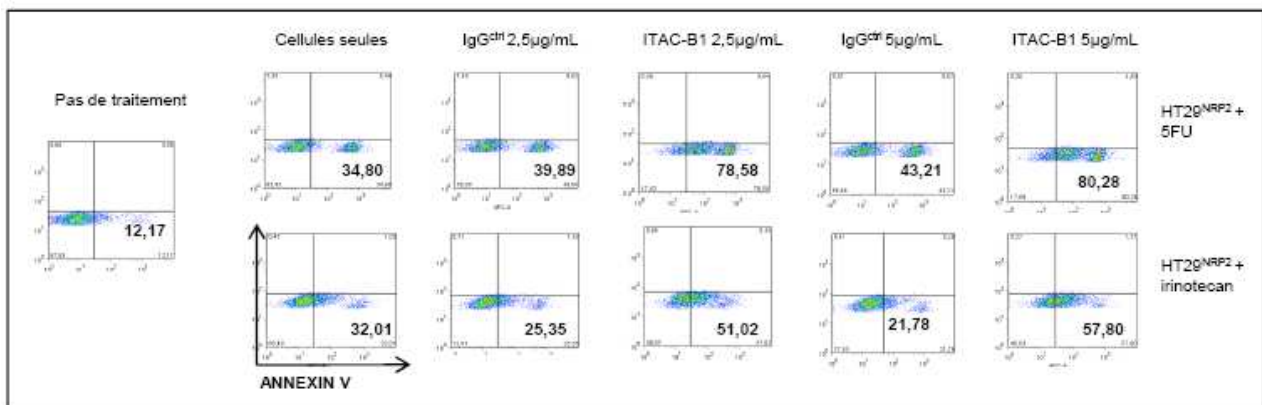


Figure 39 : L'anticorps induit l'apoptose de cellules tumorales exprimant la NRP2 (HT29^{NRP2}) d'une façon synergique avec le 5FU ou l'irinotecan.

3.2. Lignées de cancer du pancréas

Dans le cadre d'une collaboration avec l'hôpital Jean Minjoz, nous avons pu obtenir des ponctions d'ascite réalisées chez des patients porteurs d'adénocarcinômes pancréatiques et ainsi générer des lignées cellulaires dérivant de ces fluides ascitiques. 4 lignées cellulaires

issues d'adénocarcinôme pancréatique ont ainsi pu être générées : Bes-PAC01, Bes-PAC03, Bes-PAC04, Bes-PAC05. Nous avons donc dans un premier temps étudié l'expression de NRP2 sur ces lignées cellulaires par un marquage membranaire avec notre anticorps ITAC-B1. (Figure 40)

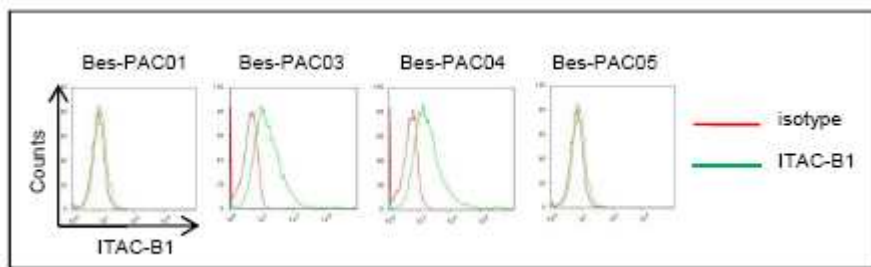


Figure 40 : Les lignées Bes-PAC03 et Bes-PAC04 permettent la fixation d'ITACB1 à leur membrane cellulaire, contrairement aux lignées Bes-PAC01 et Bes-PAC05.

Bes-PAC03 et Bes-PAC04 expriment la NRP2 à leur surface membranaire, contrairement aux lignées Bes-PAC01 et Bes-PAC05. L'anticorps ITAC-B1 reconnaissant la NRP2 à la surface des cellules Bes-PAC03 et Bes-PAC04, la capacité de cet anticorps à induire l'apoptose de ces cellules tumorales a ensuite été évaluée. Utilisé à 20 μ g/mL pendant 5h, ITACB1 semble permettre l'externalisation des phosphatidylsérines et donc induire l'apoptose des lignées Bes-PAC03 et Bes-PAC04, alors qu'il n'a aucun effet sur les lignées n'exprimant pas la NRP2, Bes-PAC01 et Bes-PAC05. (Figure 41) L'induction d'apoptose-ITACB1 dépendante semble donc bien spécifique de la NRP2.

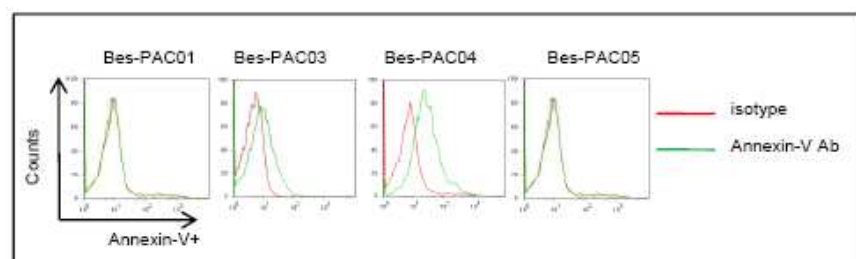


Figure 41 : ITAC-B1 induit l'apoptose des cellules tumorales exprimant la NRP2, Bes-PAC03 et Bes-PAC04 tandis qu'il n'a aucun effet sur les cellules déficientes en NRP2, Bes-PAC01 et Bes-PAC05.

3.3 Implication des caspases

Le clivage de la procaspase-3 constituant le dernier événement commun aux 2 voies d'apoptose extrinsèque et intrinsèque, nous nous sommes tout d'abord penchés sur l'implication de cette caspase-3 dans l'apoptose induite par nos anticorps.

Pour cela, les cellules HT29^{NRP2} ont été incubées avec 20µg/mL de notre anticorps ITACB1, avec un anticorps contrôle IgG1 ou avec 50µg/mL de 5FU pendant 24h. Le traitement au 5FU sert de contrôle positif pour le clivage de la procaspase-3. La présence de procaspase-3 et des caspases-3 clivées a été évaluée par western-blot. L'incubation des cellules HT29^{NRP2} avec ITACB1 ou le 5FU semble entraîner le clivage de la procaspase-3 et donc l'apparition de caspases-3 clivées, ce qui nous confirme la cytotoxicité de notre anticorps monoclonal ITACB1. (Figure 42)

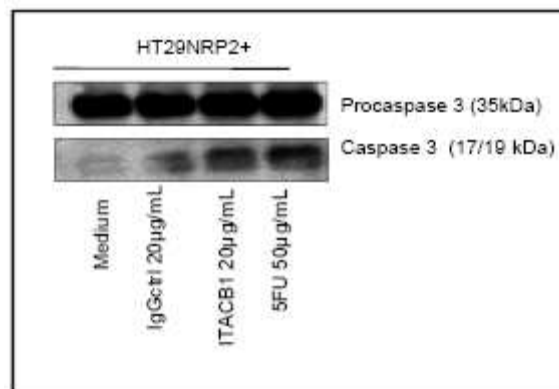


Figure 42: L'incubation des cellules HT29^{NRP2} avec l'anticorps ITACB1 permet le clivage de la caspase 3, par western-blot.

De plus, le pré-traitement de nos cellules avec zvad-FMK, un inhibiteur des caspases, diminue en partie l'apoptose induite par notre anticorps anti-NRP2. (Figure 43)

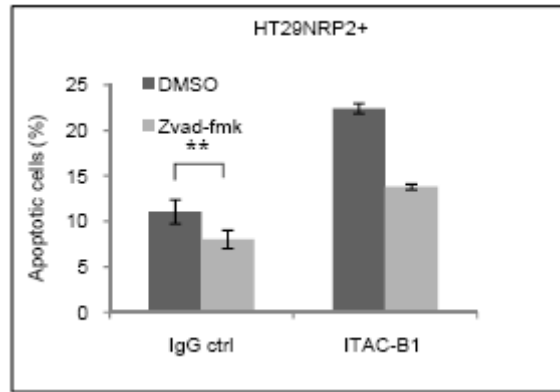


Figure 43 : le prétraitement des cellules HT29^{NRP2} par un inhibiteur des caspases, le zvad-FMK, diminue en partie l'apoptose induite par ITACB1.

3.4 Voie intrinsèque mitochondriale

Dans un second temps, nous avons souhaité caractériser l'apoptose induite par ITACB1. Cette apoptose implique-t-elle la mitochondrie (voie intrinsèque) et/ou des récepteurs de mort (voie extrinsèque) ?

Pour cela, les cellules HT29^{ctrl}, HT29^{NRP2} et BesPAC-04 ont été incubées in vitro pendant 24h avec 20µg/mL d'ITACB1, d'anticorps contrôle IgG-ctrl ou 50µg/mL de 5FU. L'ajout de mitotracker dans le milieu de culture de ces cellules a permis la mise en évidence de la dépolarisation de la membrane mitochondriale de ces cellules. L'incubation avec ITAC-B1 ou 5FU entraîne une dépolarisation mitochondriale seulement dans les cellules exprimant la NRP2 (HT29^{NRP2} et Bepac-04), ce qui nous amène à penser que l'apoptose induite par nos anticorps implique la mitochondrie. (Figure 44)

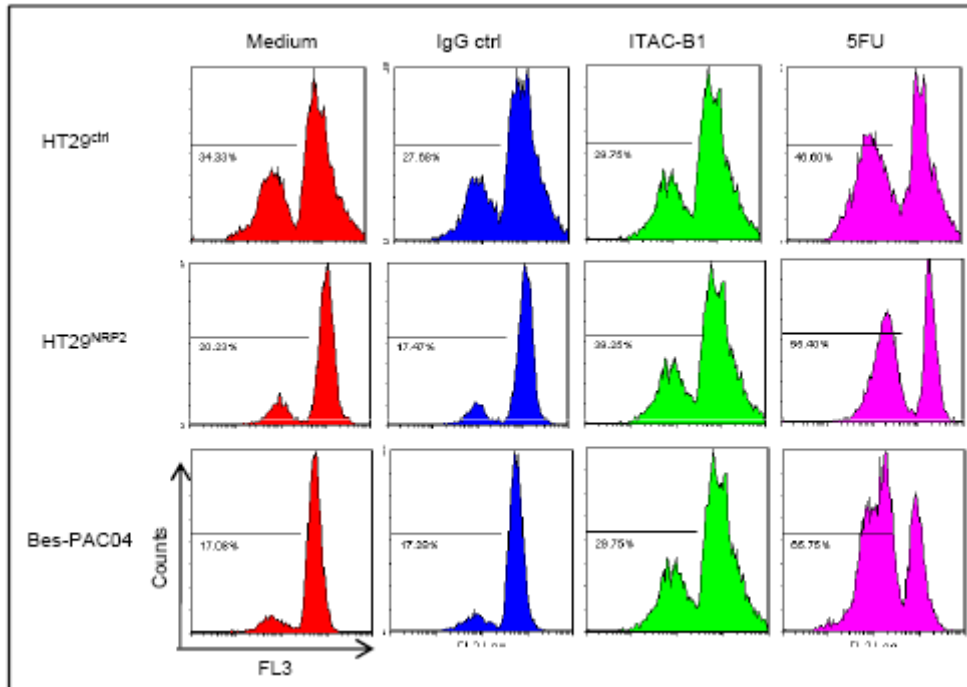


Figure 44 : Le traitement des cellules exprimant la NRP2 (HT29^{NRP2} et BesPAC-04) par ITACB1 ou 5FU induit une dépolarisation de la membrane mitochondriale externe. L'apoptose induite par ITAC-B1 semble donc dépendre en partie de la mitochondrie.

3.5 Voie extrinsèque

En outre, la NRP2 semble réguler l'expression de nombreuses protéines. Nous nous sommes également intéressés à l'expression des récepteurs de mort, DR4, DR5 et Fas, à la surface de nos cellules de cancer colorectal, exprimant ou non la NRP2, par cytométrie en flux. Les récepteurs DR4, DR5 et Fas sont des récepteurs fonctionnels, capables d'induire une apoptose après liaison de leur ligand TRAIL ou FasL.

Par un marquage et une analyse en cytométrie de flux, nous pouvons observer que l'expression de NRP2 par les cellules de cancer colorectal et pancréatique est à l'origine d'une expression membranaire réduite de l'ensemble de ces récepteurs de mort. (Figure 45)

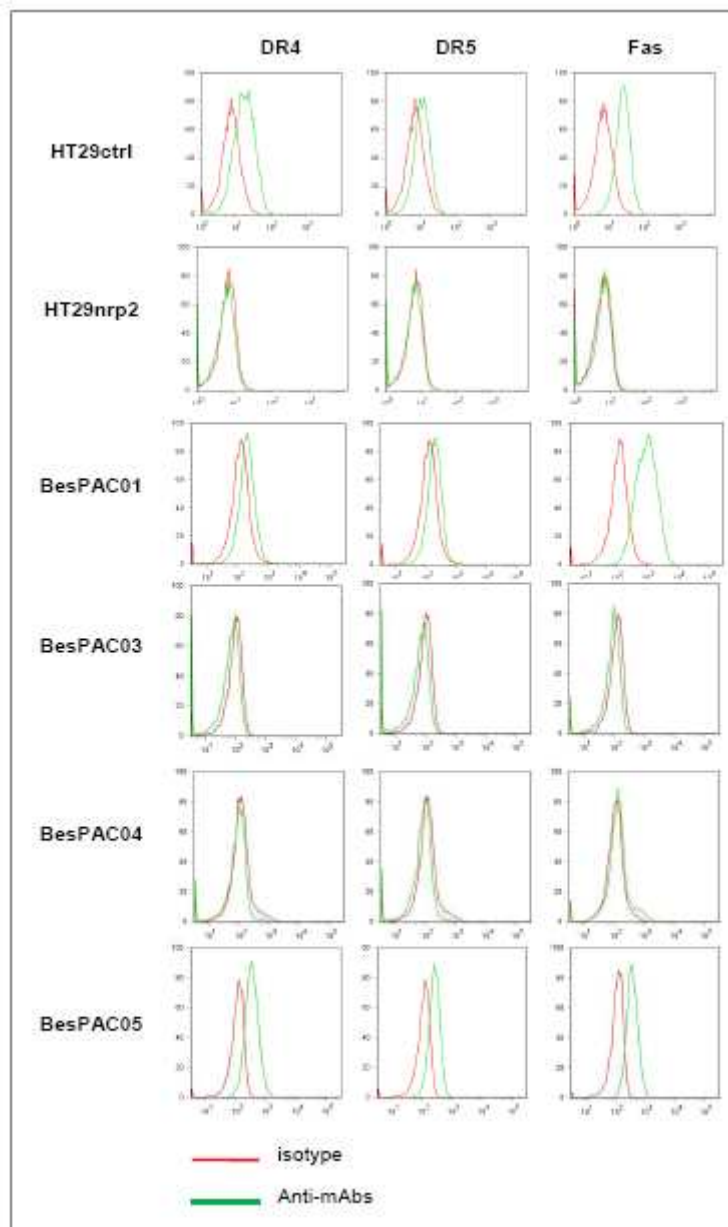


Figure 45 : Les expressions de NRP2 et des récepteurs de mort DR4, DR5 et Fas sont inversement corrélées dans des lignées humaines de cancer colorectal et des lignées de cancer du pancréas. (Les lignées HT29^{NRP2}, BesPAC03 et BesPAC04 expriment NRP2 tandis que les lignées HT29^{ctrl}, BesPAC01, BesPAC05 n'expriment pas NRP2.)

Durant la progression tumorale, les cellules tumorales deviennent de plus en plus résistantes à l'apoptose. La perte des récepteurs de mort DR4, DR5 ou encore Fas constitue un des mécanismes pouvant expliquer cette résistance progressive à l'apoptose. La NRP2 entraînant la perte d'expression membranaire de ces récepteurs pourrait donc conférer une certaine résistance des cellules tumorales à l'apoptose. Il nous reste cependant à évaluer si la

neutralisation de la NRP2 par ITAC-B1 permettrait la restauration de l'expression de ces récepteurs de mort à la surface membranaire et de la sensibilité des cellules tumorales à la mort induite par FasL et/ou Trail.

4. NRP2 et p53

La protéine p53 a pour fonction d'arrêter le cycle cellulaire ou d'induire l'apoptose d'une cellule en réponse aux dommages de l'ADN cellulaire ou à l'activation des oncogènes. Elle joue donc un rôle central dans le contrôle du cycle cellulaire et dans le maintien de l'intégrité du génome en permettant à la cellule dont le cycle cellulaire est interrompu de réparer l'anomalie génétique, ou bien d'entraîner sa destruction par apoptose. p53 étant essentielle pour protéger l'organisme des effets d'une division cellulaire aberrante ou incontrôlée, l'absence de p53, sa sous-expression ou l'expression d'une protéine p53 non-fonctionnelle, a pour conséquence la survie des cellules tumorales. La restauration de l'expression de p53, ainsi que l'induction de la surexpression de cette protéine, représentent donc des objectifs essentiels dans le développement de thérapies anti-tumorales.

Grâce à des analyses de cytométrie en flux, nous avons montré que l'expression de NRP2 par les cellules HT29 est à l'origine d'une expression diminuée de p53. Inversement, la répression de NRP2 par siRNA dans les cellules Colo320 entraîne quant à elle une surexpression de p53 dans ces cellules. (Figure 46) Cette corrélation inverse entre les expressions de NRP2 et p53 a également été observée dans les lignées de cancer du pancréas. (non montré ici)

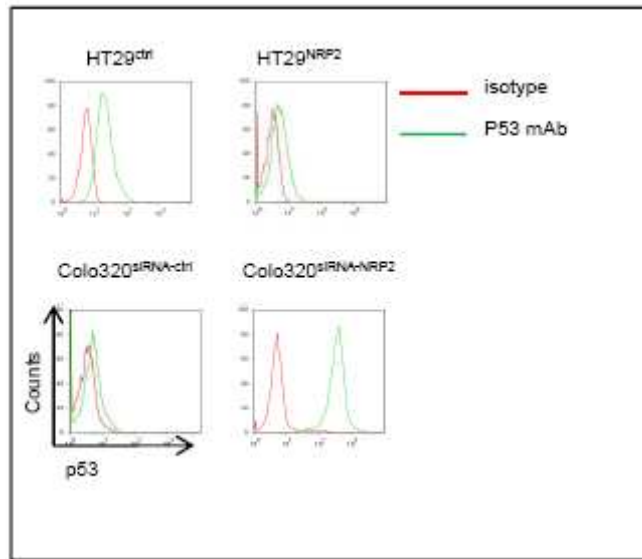


Figure 46 : Les expressions de NRP2 et de p53 sont inversement corrélées sur des lignées de cancer colorectal. L'expression de NRP2 dans HT29 réprime l'expression de p53 tandis que la répression de NRP2 par siRNA dans Colo320 restaure l'expression de p53 dans ces cellules.

Par ailleurs, le traitement de cellules tumorales HT29^{NRP2} et Colo320^{siRNA-ctrl} exprimant la NRP2 par notre anticorps ITAC-B1 semble restaurer l'expression de p53 dans nos cellules. (Figure 47)

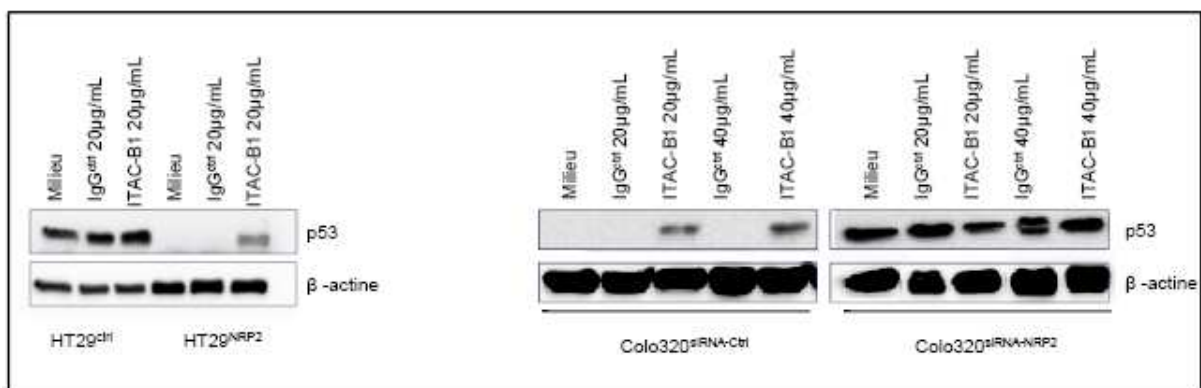


Figure 47: Le traitement pendant 24h de cellules tumorales HT29^{NRP2} et Colo320^{siRNA-NRP2} par notre anticorps ITAC-B1 entraîne une restauration de l'expression de p53.

En outre, les cellules HT29 possèdent une protéine p53 mutée contrairement aux Colo320, qui semblent posséder quant à elles une protéine p53 sauvage. Le pré-traitement des cellules Colo320 exprimant la forme p53 sauvage par la pifithrine- α (PFT), un inhibiteur chimique de p53, suivi de l'incubation avec notre anticorps pendant 5h diminue en partie l'apoptose induite par notre anticorps ITAC-B1. (Figure 48)

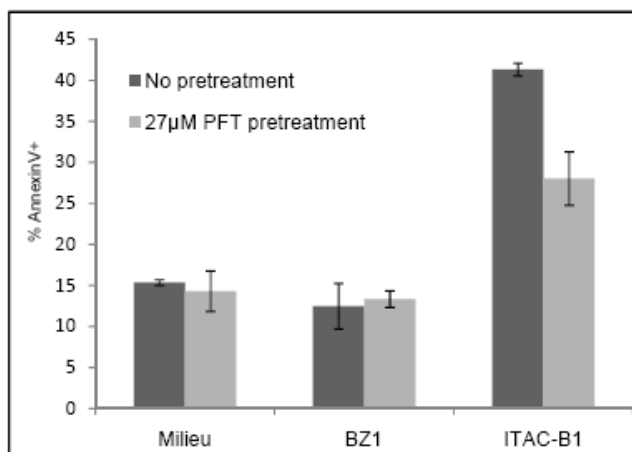


Figure 48 : Le pré-traitement des cellules Colo320 par la pifithrine- α (PFT) diminue l'apoptose induite par notre anticorps ITAC-B1.

L'apoptose induite par notre anticorps anti-NRP2 dans les cellules Colo320 semble donc dépendre en partie de p53. (Figure 48). Les cellules HT29 possédant une protéine p53 mutée, la restauration de l'expression de p53 après traitement par notre anticorps ITAC-B1 ne permet cependant pas d'expliquer l'apoptose induite par cet anticorps.

En outre, l'expression de la protéine p21, une protéine cible de p53 a été étudiée dans nos cellules de cancer colorectal. La protéine p21 est une protéine inhibitrice de protéines cycline-kinase dont l'expression est directement contrôlée par p53. Elle est l'un des principaux médiateurs de l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1. Nous avons donc logiquement voulu savoir si en raison de son action sur la protéine p53, la NRP2 régulait également l'expression de la protéine p21, par microscopie confocale. (Figure 49)

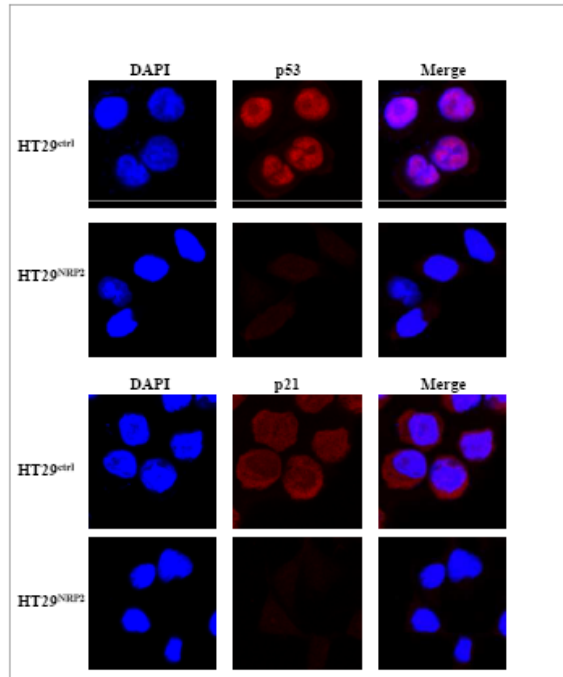


Figure 49 : L'expression de NRP2 par les cellules HT29 entraîne une diminution de l'expression des protéines p53 et p21 par microscopie confocale.

L'expression de NRP2 semble inhiber l'expression de p21 et p53 dans nos cellules de cancer colorectal. (Figure 49)

En somme, ces différentes observations suggèrent que la NRP2 régule l'expression de la protéine p53. Mais régule-t-elle négativement sa transcription ou agit-elle plutôt sur la dégradation de cette protéine ?? L'analyse des ARNm de cellules tumorales exprimant ou non la NRP2 ne montre aucune corrélation entre les ARNm de NRP2 et p53. (non montré).

Par ailleurs, dans une étude parue en 2008, la diminution d'expression de NRP1 par sh-RNA dans des cellules de cancer colorectal semble entraîner une diminution de MDM2 et p63 et une augmentation de p53. [303] La protéine MDM2 est une protéine ubiquitine-ligase essentielle pour la dégradation de p53. L'expression de NRP2, p53 et MDM2 a donc été étudiée par western-blot dans nos cellules d'adénocarcinôme colorectal. (Figure 50)

La NRP2 pourrait donc augmenter l'expression de la protéine HDM2, responsable de la dégradation par ubiquitinylation de la protéine p53.

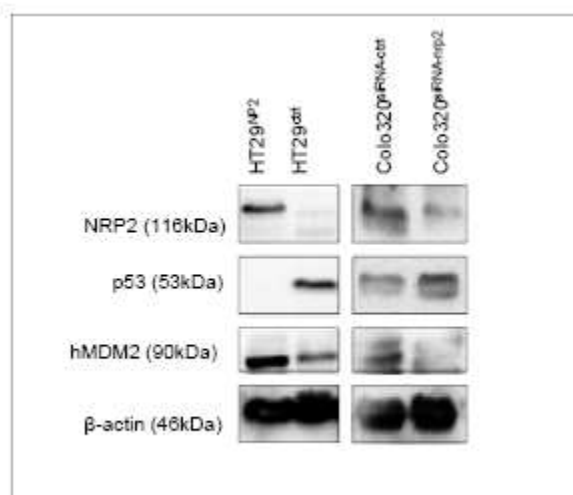


Figure 50 : Les protéines p53 et NRP2 sont inversement corrélées. Les cellules exprimant la NRP2 possèdent une plus grande quantité de HDM2 que les cellules n'exprimant pas la NRP2.

Pour confirmer cette hypothèse, nous avons traité nos cellules HT29^{NRP2} par une molécule inhibitrice du protéasome, le MG132. Le traitement pendant 24h de nos cellules HT29^{NRP2} par cette molécule permet la restauration en partie de l'expression de p53 dans nos cellules. (Figure 51)

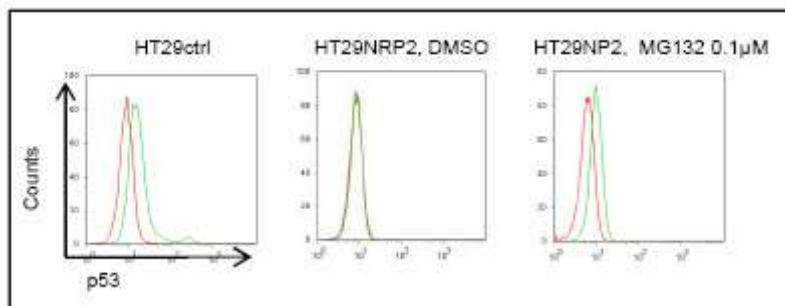


Figure 51 : Le traitement des cellules HT29^{NRP2} par le MG132, une molécule inhibitrice du protéasome restaure l'expression de la protéine p53.

Tout nous porte à croire que la NRP2 agirait donc plutôt sur la dégradation de p53, et non sur sa transcription.

5. Bioactivité in vivo

Par la suite, nous avons souhaité tester la bioactivité de 5 de nos anticorps anti-NRP2 in vivo, dans des modèles pré-cliniques de xénogreffes murines. Pour cela, nous avons inoculé des cellules tumorales humaines exprimant la NRP2 (HT29^{NRP2}) en sous-cutané à des souris immunodéficientes Nude. 6 groupes de 10 souris ont été formés. Une fois les tumeurs d'une taille proche de 5x5mm, différents traitements ont alors été administrés par voie intrapéritonéale ; le groupe contrôle n'a reçu que du serum physiologique, le second a reçu du sérum contrôle et une association de 2 molécules de chimiothérapie utilisée en pratique courante en oncologie (bevacizumab et oxaliplatine), et les autres groupes ont reçu nos différents anticorps anti-NRP2 (ITAC-B1, ITAC-B2, ITAC-B3, ITAC-B4, ITAC-B5) associés à ces 2 molécules de chimiothérapie.

Tous les groupes traités par nos anticorps ITAC-B ont développé des tumeurs plus petites que les souris ayant reçu aucun traitement, ou la chimiothérapie seule. (Figure 52) Nos anticorps anti-NRP2 semblent donc capables de ralentir in vivo la croissance tumorale.

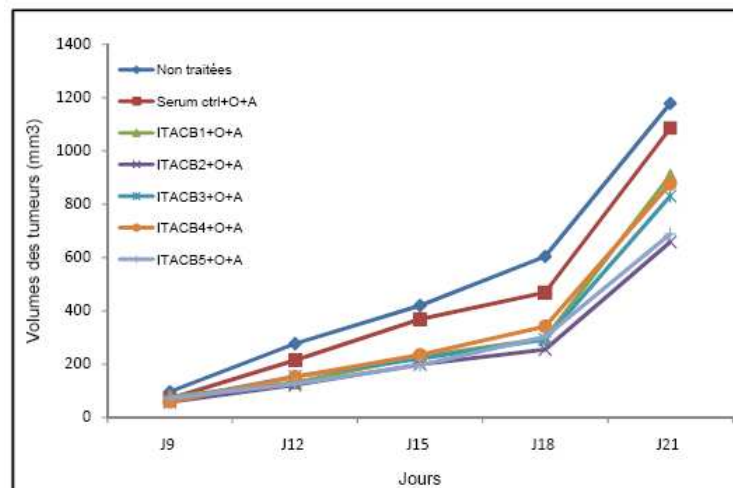


Figure 52 : Xénogreffes murines. Des cellules de cancer colorectal exprimant la NRP2 (HT29^{NRP2}) ont été injectées en sous cutané à des souris Nude. Les souris ont ensuite été traitées par différents anticorps anti-NRP2 (ITACB) associés à des molécules de chimiothérapie (Bevacizumab et oxaliplatine). Les tumeurs ont été mesurées tous les deux jours.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES
DE TRAVAIL

1. Thérapies ciblées en oncologie

1.1 A la recherche de nouvelles cibles

Le cancer est à l'heure actuelle un important problème de santé publique. Lors d'un diagnostic précoce, une opération chirurgicale est en premier lieu envisagée accompagnée ou non d'une radiothérapie. Cependant la radiothérapie s'accompagne bien souvent d'effets secondaires lourds : brûlures, anomalies de la formule sanguine...Lorsque le cancer a atteint un stade de dissémination métastatique, une chimiothérapie est alors envisagée. La chimiothérapie vise à enrayer ou ralentir l'évolution de la prolifération des cellules tumorales. Malheureusement, elle présente également des inconvénients : atteinte de la moelle osseuse, chute des plaquettes, globules blancs et anémie, perturbations des métabolismes hépatique, rénal, cardiaque...Ces thérapies destructrices ne sont certes pas totalement efficaces. Les effets secondaires et les modes de traitement sont lourds, le taux de récurrence est important et les cellules normales voisines sont affectées. Pour ces raisons, de nouvelles thérapies ciblant spécifiquement des molécules impliquées dans le développement tumoral sont à l'étude. Il s'agit d'approches thérapeutiques utilisant des molécules capables de neutraliser spécifiquement l'activité de molécules biologiques participant à la progression tumorale. Dans le cadre du développement de thérapies ciblées en cancérologie, les chercheurs et les cliniciens sont à la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques. L'identification de nouvelles cibles moléculaires (protéines, gènes, récepteurs) jouant un rôle dans le développement de la maladie constitue actuellement un des enjeux majeurs de la recherche en oncologie médicale de nos jours.

Les thérapies ciblées peuvent posséder différents modes d'action qui visent principalement à:

- **bloquer la croissance de la tumeur ou la prolifération des cellules cancéreuses;**
- **s'opposer à la formation des vaisseaux sanguins** qui irriguent la tumeur et interviennent, de ce fait, dans sa croissance;
- **diriger des mécanismes spécifiques de défense** de l'organisme contre les cellules cancéreuses.

Les anticorps monoclonaux et les inhibiteurs enzymatiques sont les deux types de substances les plus couramment proposées aujourd'hui.

1.2 Intérêt du ciblage des NRPs

Les NRPs sont des récepteurs pour les membres de la famille du VEGF et sont exprimées par les cellules endothéliales humaines. Dans ce contexte, les premières études scientifiques se sont attachées à caractériser le rôle des NRPs dans les mécanismes généraux de vasculogénèse et d'angiogénèse. Les NRPs semblent participer activement à l'angiogénèse tumorale et constituent donc en ce sens des cibles attractives dans le cadre du développement de stratégies thérapeutiques ciblées anti-angiogéniques en oncologie.

De plus, les NRPs peuvent être également exprimées par des cellules tumorales de diverses origines. Très peu d'études s'étaient intéressées à l'expression de la NRP2 dans des tissus tumoraux au début de notre travail de thèse.

Dans notre publication n°1, nous avons dans un premier temps caractérisé l'expression de la NRP2 par marquage IHC dans des tissus sains et tumoraux de diverses origines et par cytométrie en flux sur des lignées cellulaires humaines. La NRP2 semble spécifique des tissus

tumoraux puisqu'une expression modérée à forte de NRP2 était retrouvée sur des tissus tumoraux de cancers du sein, du pancréas, du colon, du rein tandis qu'aucune expression de cette protéine n'était retrouvée sur les tissus sains correspondants.

En 2008, parallèlement à notre étude, l'équipe d'Ellis montre une expression de NRP2 dans des tissus d'adénocarcinomes ductaux pancréatiques (PDAC) et de cancers colorectaux. [52,53], nous confirmant alors tout l'intérêt du ciblage thérapeutique de la NRP2. Dans ces études, la NRP2 était retrouvée dans 10 tissus d'adénocarcinome colorectal sur 12 analysés (83%) et dans 5 métastases hépatiques sur 7 (71%). [52] 7 tissus tumoraux d'adénocarcinômes pancréatiques sur 11 analysés (64%) étaient positifs pour la NRP2 [53]

En 2009, Yasuoka et al reportent également une expression de NRP2 dans 60 carcinomes invasifs mammaires sur 113 analysés (53.1%). [57] De plus, dans cette même étude l'expression de NRP2 semblait être corrélée aux métastases, à la survie globale, à l'expression de VEGF-C, suggérant ainsi que la NRP2 était un bon marqueur pronostique dans le cancer du sein. [57]

La NRP2 semble donc être préférentiellement retrouvée au niveau de tissus tumoraux de diverses origines alors qu'elle n'est pas ou que très peu retrouvée au niveau des tissus sains.

Par ailleurs, dans notre étude, la NRP2 semble augmenter la prolifération, la formation de colonies en milieu agar, l'invasion cellulaire de cellules tumorales in vitro et même induire des tumeurs plus grosses dans des expériences de xénogreffes murines in vivo. L'équipe d'Ellis confirme ces résultats en 2008 dans les cancers du colon et du pancréas. [52,53] En effet, la diminution de l'expression de NRP2 par shRNA dans des lignées de cancer du colon et du pancréas diminue également le nombre de colonies dans leurs tests agar, de migration, et d'invasion cellulaire mais pas la prolifération cellulaire dans leur étude [52,53] In vivo, la

neutralisation de la NRP2 par shRNA est à l'origine de tumeurs plus petites et d'un nombre réduit de métastases dans des expériences de xénogreffe murine. [52,53] Dans notre étude, nous n'avons pas retrouvé de métastases dans les souris ayant reçu de cellules tumorales HT29^{ctrl} ou HT29^{NRP2} en sous-cutané (SC). Ceci est sans doute lié à cette voie d'injection SC. En effet, une injection des cellules tumorales en intra-veineux (IV) pourrait plus facilement conduire à la formation de métastases et permettrait ainsi d'étudier le rôle de la NRP2 dans la formation des métastases.

Dans notre étude, la voie de signalisation du VEGF ne semble pas impliquée les différents effets oncogéniques de la NRP2, puisque le traitement par le bevacizumab, un anticorps monoclonal anti-VEGF ne module pas la prolifération cellulaire ni la formation de colonies en milieu agar in vitro. L'équipe d'Ellis implique quant-à-elle le VEGFR1 et la voie de signalisation PI3K dans les différents effets oncogéniques de la NRP2, proposant ainsi une coopération entre NRP2 et VEGFR1 pour la transmission du signal biologique. [52,53] La NRP2 dans notre étude semble augmenter la prolifération cellulaire, mais nous n'avons pas étudié les différentes voies de signalisation pouvant être impliquées dans cette augmentation de prolifération cellulaire, telles que les voies PI3K, MAPK, ERK1/2, NF-KB (Nuclear-factor kappa B light chain enhancer of activated B-Cells). Ceci reste encore à être investigué.

En outre, la NRP2 est un récepteur pour deux isoformes du VEGF, le VEGF-C et VEGF-D, [27,29] isoformes impliqués dans la lymphangiogénèse et le développement des métastases. [304] Deux études récentes confirment en effet cette implication de la NRP2 dans la lymphangiogénèse tumorale et dans la formation des métastases via ses interactions avec VEGF-C, VEGF-D et VEGFR3. [27,134]. Nous ne nous sommes pas intéressés à l'implication des ces différentes molécules dans les effets médiés par la NRP2 dans notre

étude. Le rôle des isoformes VEGF-C et VEGF-D dans la prolifération cellulaire et dans la formation de colonies en milieu agar pourrait également être évalué dans notre étude.

En somme, ces données suggèrent que la NRP2 est impliquée dans de nombreux mécanismes participant à la progression tumorale. La NRP2 n'est par ailleurs très peu retrouvée sur des tissus sains, alors qu'elle est davantage retrouvée sur des tissus tumoraux. En ce sens, la NRP2 apparaît comme une cible intéressante et innovante dans le cadre du développement de thérapies ciblées en oncologie.

2. NRP2 et TEM

Bien que largement controversée initialement, la TEM semble participer activement à la progression tumorale *in vivo*. Dans de nombreux carcinômes, la progression tumorale est associée à une perte des marqueurs épithéliaux et à une acquisition de marqueurs mésenchymateux. Ce processus, appelé TEM, augmente la migration et l'invasion des cellules et est souvent considéré comme une étape essentielle à la migration, à l'invasion et à la formation des métastases. De plus, de nombreuses études ont à présent établi une corrélation entre l'expression de marqueurs associés à la TEM au sein de prélèvements biologiques de patients cancéreux et le pronostic de la maladie. Le ciblage et la neutralisation de molécules impliquées dans la TEM semble donc d'un intérêt particulier pour prévenir la progression tumorale.

Dans notre publication n°1, l'expression de NRP2 par des cellules de cancer colorectal humaines est à l'origine d'un phénotype caractéristique du processus TEM, consistant en une inhibition des marqueurs épithéliaux tels que la cytokératine-20 et E-cadhérine et en une surexpression de marqueurs mésenchymateux tels que la vimentine. Ceci a été également confirmé au niveau de cellules de cancer du pancréas et de cancer du rein par western-blotting

dans notre étude : l'expression de NRP2 est positivement corrélée à l'expression de marqueurs mésenchymateux et inversement corrélée à l'expression de marqueurs épithéliaux dans ces lignées cellulaires, suggérant ainsi que nos observations dans le contexte du cancer colorectal pourraient être étendues à d'autres types de cancer et à un mécanisme d'action plus général. Un rôle direct de la vimentine dans l'invasion tumorale lorsqu'elle est co-exprimée avec des kératines a été suggéré dans des cellules de cancer du sein. [305] Dans notre étude, l'expression de NRP2 entraîne également l'expression et l'activation de facteurs de transcription caractéristiques de la TEM, tels que les facteurs de transcription de la famille de Snail, Twist1, de la β -caténine suggérant un rôle direct de la NRP2 dans le processus de TEM. Le rôle de la β -caténine dans l'invasion cellulaire a notamment été reporté par Brabletz et al. [175,306] Brabletz et al montrent en effet une expression nucléaire de β -caténine dans des cellules de cancer colorectal dédifférenciées sur le front invasif des tumeurs. [175,306]

La NRP2 semble induire et activer des facteurs de transcription impliqués dans la TEM, mais nous n'avons pas encore identifié le ou les facteur(s) de transcription « critique(s) » lors de cette induction de TEM médiée par la NRP2. L'utilisation de siRNA ciblant spécifiquement ces différents facteurs de transcription dans les cellules HT29^{NRP2} ou Colo320 permettrait d'identifier le(s) facteur(s) de transcription essentiel(s) à cette TEM. Des vecteurs d'expression de ces différents facteurs de transcription pourraient être également utilisés dans cet objectif dans les cellules HT29. La voie de signalisation intra-cellulaire de la NRP2 reste encore bien méconnue à ce jour. Des analyses micro-arrays permettraient par exemple l'identification des différentes voies de signalisation modulées par la NRP2. Nous avons d'ores et déjà entrepris ces expériences de micro-arrays, l'analyse des résultats obtenus va être prochainement effectuée.

Seuls certains marqueurs de la TEM ont été étudiés dans notre étude. D'autres facteurs de transcription comme les membres de la famille de ZEB, Gli ou encore Brachyurie semblent très importants lors de la TEM [307-309] ; leur implication dans la TEM médiée par la NRP2 est actuellement en cours de caractérisation au sein de notre laboratoire.

Le TGF β 1 est décrit dans la littérature comme une cytokine-clé de ce processus de TEM. Une étude récente de Pino et al montre que le traitement de cellules de cancer colorectal par du TGF β 1 induit même une expression de vimentine et une TEM dans ces cellules. [310] Logiquement, nous avons donc étudié les interactions entre les voies de signalisation du TGF β 1, de la NRP2 et de la TEM. Cependant dans notre étude, contrairement à la publication de Pino et al, le traitement de cellules épithéliales de cancer colorectal HT29 par du TGF β 1 recombinant n'est pas suffisant pour l'induction d'une TEM dans ces cellules. Seule la transfection du gène de la NRP2 humaine permet l'induction de cette TEM dans ces cellules HT29.

En outre, plusieurs études suggèrent que la NRP1 est un récepteur pour le TGF β . Un peptide (RKFK) du domaine b2 de la NRP1 a été récemment impliqué dans la liaison du TGF β 1. [141] La comparaison des séquences en acides aminés de la NRP1 et de la NRP2 suggère que ce peptide est également exprimé dans le domaine b2 de la NRP2. La NRP2 semble entraîner une activation constitutive de la voie de signalisation du TGF β 1 dans notre étude, puisque l'expression de NRP2 par les cellules HT29^{NRP2} ou Colo320 est à l'origine d'une phosphorylation constitutive des protéines Smad2/3 nucléaires, sans aucun traitement préalable par du TGF β 1. Les cellules Colo320 n'expriment pas naturellement TGFRII, le récepteur responsable de la fixation du TGF β 1 au niveau de la membrane et donc de la signalisation intra-cellulaire. Or des protéines Smad2/3 phosphorylées sont retrouvées dans

ces cellules, suggérant ainsi que la NRP2 pourrait directement activer le TGFRI sans interagir avec le TGFRII.

Le traitement de cellules exprimant la NRP2 (HT29^{NRP2}, Colo320) par un inhibiteur du TGFRI, le SB-431542 reverse en partie la TEM dans ces cellules, suggérant donc une interaction entre NRP2 et TGFRI. Des expériences de co-immunoprécipitation confirment cette interaction. Grâce à des expériences Biacore, nous avons montré que la NRP2 était également un récepteur pour le TGF β 1.

Cependant les molécules impliquées dans l'activation du TGFRI par la NRP2 restent encore à être identifiées. Les 3 derniers acides aminés SEA en position C-terminale des NRPs sont impliqués dans l'interaction avec des protéines à domaines PDZ comme GIPC. [34,103-105] Or, il a été montré dans plusieurs études que les protéines GIPC pouvaient interagir avec le récepteur de type 3 du TGF β (TGFRIII) via leur domaines PDZ et inhiber la voie de signalisation du TGF β 1. [311,312] La perte d'expression de TGFRIII a également été associée à la TEM dans plusieurs études. [311,313] Il semblerait donc intéressant d'étudier l'implication du TGFRIII et de GIPC dans cette TEM médiée par la NRP2.

Par ailleurs, le traitement des cellules exprimant NRP2 par l'inhibiteur du TGFRI ne reverse qu'en partie la TEM, suggérant que d'autres voies de signalisation pourraient être impliquées dans la TEM induite par la NRP2.

Certains ligands des NRPs, comme les membres de la famille du VEGF ont été récemment impliqués dans la TEM. Dans plusieurs études, différents isoformes du VEGF induisent une TEM dans des cellules tumorales. [314,315] Le récepteur VEGFR1 semble notamment participer à cette TEM induite par le VEGF. [315,316] L'inhibition de VEGFR1 par des

molécules chimiques ou des anticorps neutralisants peut même réverser la TEM de cellules tumorales de diverses origines [315,317]

La NRP2 est un récepteur pour différents isoformes du VEGF. Nous avons donc cherché à savoir si le VEGF était impliqué dans divers effets oncogéniques médiés par la NRP2. Dans notre étude, la NRP2 semble augmenter la prolifération de nos cellules de cancer colorectal et la formation de colonies en milieu agar (non montré) indépendamment du VEGF. En effet, la neutralisation du VEGF par le bevacizumab n'a aucun impact sur la prolifération cellulaire de cellules exprimant la NRP2 ni sur leur capacité à former des colonies en milieu agar dans notre étude. Nous n'avons cependant pas réellement étudié l'implication du VEGF et du VEGFR1 dans la TEM induite par la NRP2. Le récepteur VEGFR1 est en effet exprimé par les cellules HT29^{NRP2}. Plusieurs études ont par ailleurs montré que la NRP2 pouvait interagir avec ce récepteur et que ce dernier pouvait médier la TEM. Il serait donc intéressant de traiter les cellules tumorales exprimant NRP2 par du bevacizumab ou des inhibiteurs des VEGFRs, afin de voir si ces différents traitements pourraient réverser également la TEM dans ces cellules.

Par ailleurs, la liaison de la sémaphorine 3F sur la NRP2 est à l'origine d'une perte d'expression membranaire d'E-cadhérine et d'une localisation nucléaire de β -caténine dans des cellules de cancer du sein. [318] Nous nous sommes donc demandé si la sémaphorine 3F était impliquée dans la TEM induite par la NRP2. Par western-blotting, nous avons observé que les cellules HT29^{ctrl} et HT29^{NRP2} exprimaient le même niveau de sémaphorine 3F. Les cellules Colo320 n'expriment pas la sémaphorine 3F, suggérant que cette sémaphorine n'est pas impliquée dans la TEM médiée par la NRP2 dans ces cellules.

Des études récentes montrent une corrélation entre l'expression de la NRP1 et un phénotype mésenchymateux. En effet, dans des fibroblastes humains, la NRP1 semble pouvoir interagir

avec le TGFRII et ainsi activer la voie de signalisation du TGF β 1 dans ces cellules. [144] Elle serait dans ce contexte également à l'origine de l'acquisition de α -SMA et donc d'un phénotype myofibroblastique dans ces cellules. [144] Dans un modèle de cirrhose du foie, la NRP1 semble également conférer un phénotype myofibroblastique à des cellules stellaires hépatiques humaines via l'activation des voies TGF β 1/PDGF. [143] La TEM jouant un rôle important dans le développement des fibroses tissulaires, cette étude suggère donc que la NRP1 permettrait une TEM dans ces cellules hépatiques. En outre, un rôle plus précis de la NRP1 dans le phénomène de TEM a été suggéré dans une étude très récente, parue en 2010. Mak et al montrent en effet que la NRP1 serait à l'origine d'une translocation du facteur de transcription Snail dans le noyau de cellules de cancer de la prostate. [145] Il apparaît également dans cette étude que les cellules exprimant la NRP1 seraient plus sensibles à l'induction d'une TEM par le TGF β 1 par rapport aux cellules dont l'expression de NRP1 a été diminuée par shRNA. [145] En effet, le traitement par TGF β 1 de cellules de cancer de la prostate PC3 exprimant la NRP1 augmente l'expression de marqueurs mésenchymateux (N-cadhérine, Vimentine, pGSK-3B) et diminue l'expression de marqueurs épithéliaux (E-cadhérine). Ce traitement n'a par ailleurs aucun effet sur des cellules dont l'expression de la NRP1 a été diminuée par shRNA, suggérant ainsi que la NRP1 serait essentielle pour l'induction de TEM par le TGF β 1. [145] Les cellules HT29 et Colo320 n'expriment pas NRP1. Nous pouvons donc exclure totalement la participation de cette molécule dans la TEM médiée par la NRP2.

Tandis que l'expression de NRP2 dans les cellules HT29 est à l'origine du passage d'un phénotype épithélial à un phénotype mésenchymateux, le traitement de ces cellules par l'anticorps anti-NRP2 (ITAC-B1) s'est avéré inefficace dans le rétablissement du phénotype épithélial de ces cellules. (non montré).

Une explication peut cependant être fournie : le TGF β 1 étant impliqué dans le phénomène de TEM induite par la NRP2, les anticorps anti-NRP2 n'empêchent peut être pas l'activation de la voie de signalisation du TGF β 1 et ne peuvent donc pas réverser la TEM induite par cette cytokine dans ces cellules. Dans ce cas, seules des molécules capables d'inhiber la voie de signalisation intra-cellulaire de la NRP2 ou du TGF β 1 seraient alors capables de réverser la TEM de cellules tumorales.

En outre, il serait également intéressant d'étudier les corrélations entre les expressions d'E-cadhérine, de vimentine, de β -caténine nucléaire et de NRP2 dans des tissus tumoraux de diverses origines par IHC, afin de confirmer le rôle de la NRP2 sur la TEM in vivo, dans des prélèvements de patients. L'expression de ces différentes protéines pourrait également être rapportée à la survie globale de patients cancéreux, afin de voir si ces marqueurs de la TEM (NRP2 incluse) seraient des marqueurs pronostiques efficaces.

3. NRP2 et apoptose

Plusieurs études montrent que la NRP2 est impliquée dans la régulation des mécanismes de survie et d'apoptose des cellules. En effet, 2 ligands de la NRP2, les sémaphorines 3B et 3F semblent pouvoir induire une apoptose des cellules endothéliales et tumorales exprimant la NRP2. [119,126] A l'inverse la liaison des membres de la famille du VEGF sur les NRPs est plutôt à l'origine d'un signal induisant la survie cellulaire. Le traitement par voie intra-péritonéale de souris porteuses de xénogreffes par des liposomes contenant des siRNA-NRP2 entraîne une apoptose des cellules tumorales in vivo.[52]

Cependant, dans notre modèle expérimental, le VEGF ne semble pas réguler les effets oncogéniques médiés par la NRP2. En effet, dans notre article n°1 sur l'induction de TEM par la NRP2, nous montrons que la NRP2 augmente la prolifération cellulaire, l'invasion

cellulaire et la formation de colonies en milieu agar indépendamment du VEGF. En conséquence, l'apoptose induite par nos anticorps ne semble pas pouvoir s'expliquer par le blocage de la liaison du VEGF sur la NRP2. Les anticorps anti-NRP2 pourraient plutôt mimer le mécanisme d'action des sémaphorines et venir ainsi se fixer sur les mêmes épitopes de la NRP2 que ces sémaphorines. Des expériences de mutations insertionnelles ou des techniques d'« epitope-mapping » pourraient ainsi nous permettre d'identifier clairement l'épitope reconnu par l'anticorps ITAC-B1 et donc de proposer un mécanisme d'action plus clair de ces anticorps. En outre, la voie de signalisation du TGFβ1 régule également l'apoptose et la prolifération cellulaire. Dans notre article n°1, le TGFβ1 semble impliqué dans l'ensemble des effets oncogéniques médiés par la NRP2 in vitro et in vivo. La bioactivité des anticorps anti-NRP2 pourrait notamment s'expliquer par le blocage de la liaison du TGFβ1 sur la NRP2. Pour confirmer cette hypothèse, il faudrait tout d'abord confirmer ce blocage de la liaison du TGFβ1 sur la NRP2 par les anticorps anti-NRP2 par des expériences ELISA ou de Biacore. Ensuite, il serait intéressant de refaire les expériences d'apoptose en présence de TGFβ1 ou d'inhibiteurs de la voie de signalisation du TGFβ1 comme des anticorps bloquant le TGFβ1, ou des inhibiteurs chimiques SD208 et SB-431542. Ces inhibiteurs chimiques ont-ils une action synergique avec nos anticorps anti-NRP2 ?

Par ailleurs, nous souhaitons également visualiser l'apoptose induite par nos anticorps anti-NRP2 in vivo. Pour cela, les cellules apoptotiques présentes dans les tumeurs murines traitées ou non par les anticorps anti-NRP2 pourraient être visualisées grâce à la méthode TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labelling). L'objet de notre brevet scientifique concerne l'induction d'apoptose par nos anticorps anti-NRP2, mais l'étude de l'angiogénèse et de la lymphangiogénèse par marquage IHC des molécules impliquées dans ces mécanismes d'action serait également très intéressante (marquages des molécules CD31+,

VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, VEGF-A, VEGF-C...) Récemment Caunt et al ont montré que la NRP2 jouait un rôle important dans la lymphangiogénèse tumorale et dans la formation de métastases. [134] Dans ce contexte, il serait intéressant d'étudier la capacité de nos anticorps anti-NRP2 à diminuer la lymphangiogénèse tumorale et la formation de métastases, par des marquages IHC de nos tumeurs xéno greffées. Cependant, nous n'avions pas vu de métastases dans les souris ayant reçu HT29^{ctrl} ou HT29^{NRP2} en sous-cutané. L'utilisation de la voie IV pour l'injection de tumeurs devrait permettre la formation de métastases. D'autres lignées cellulaires connues pour leur potentiel métastatique pourraient également être utilisées pour de futures expériences de traitement de xéno greffes in vivo par des anticorps anti-NRP2. Des données de pharmacocinétique, pharmacodynamie et toxicologie concernant l'administration d'ITAC-B1 aux souris nous permettraient également de compléter efficacement nos études pré-cliniques. Par ailleurs, nous souhaitons éclaircir le mécanisme d'apoptose entraîné par nos anticorps anti-NRP2. L'apoptose induite par les anticorps anti-NRP2 passe-t-elle par un mécanisme intrinsèque, extrinsèque ?? Notre étude est encore à un stade très préliminaire sur ce point. L'étude de l'implication de la voie intrinsèque d'apoptose pourrait dans un premier temps passer par l'étude de l'expression des protéines pro-apoptotiques (Bax, Bid, Noxa, PUMA) et anti-apoptotiques (Bcl2, Bcl-XL) dans les cellules tumorales après traitement par les anticorps anti-NRP2. Les protéines Bax, Bid sont elles induites après incubation des cellules tumorales avec des anticorps anti-NRP2 ?? De plus, les membres de cette famille de protéines pro-apoptotiques sont des cibles de p53.

4. NRP2 et p53

Une corrélation inverse entre l'expression de NRP1 et de la protéine de tumeur p53 était suggérée dans plusieurs études dès 2007. En effet, la diminution de l'expression de NRP1 semble être à l'origine d'une apoptose des cellules nerveuses et endothéliales de poissons zèbres. [319] La protéine suppresseur de tumeur p53 semble impliquée dans cette apoptose puisque son expression est augmentée dans les cellules downrégulant la NRP1. [319] Dans une étude plus récente, Cao et al s'intéressent à l'expression et au rôle de la NRP1 dans des cellules de cancer du rein. [303] La diminution de l'expression de NRP1 par sh-RNA dans ces cellules s'accompagne d'une diminution de MDM2 et de p63 et d'une augmentation de p53 dans ces cellules. [303] Les cellules de cancer du rein avec une expression de NRP1 diminuée semblent moins invasives, moins agressives in vitro et in vivo. [303] Aucune étude ne mentionnait jusqu'à présent une corrélation entre les expressions de NRP2 et les protéines de la famille de p53, ce qui nous a incités à étudier cette possible corrélation dans nos lignées cellulaires de cancer colorectal, exprimant ou n'exprimant pas la NRP2.

En effet, des éléments de réponse à p53 ont été récemment identifiés dans les gènes Bax, PUMA et Noxa. [281,282] L'induction d'expression des protéines Bax ou Bid après traitement par nos anticorps anti-NRP2 pourrait alors expliquer la restauration de p53 dans les cellules tumorales. Cependant la protéine p53 est mutée dans les cellules HT29 contrairement aux cellules Colo320 qui possèdent quant à elles une protéine p53 sauvage. Les mutations de p53 empêchent la liaison de p53 à l'ADN et donc son activité transcriptionnelle. La restauration de l'expression de p53 après traitement par les anticorps anti-NRP2 ne permet donc pas d'expliquer l'apoptose induite par ces anticorps dans les cellules HT29. L'implication de la protéine p53 dans le mécanisme d'apoptose des anticorps anti-NRP2 reste encore à être considérablement étudiée.

Les expressions de NRP2 et des récepteurs de mort DR4, DR5 et Fas semblent inversement corrélées dans nos cellules de cancer colorectal et de cancer du pancréas. Or, l'expression des récepteurs de mort est modulée par p53. [278] Des éléments de réponse à p53 ont en effet été retrouvés dans le promoteur du gène Fas. [278] Dans notre étude, la NRP2 entraîne l'inhibition de l'expression de p53. Ceci pourrait être à l'origine d'une diminution d'expression de Fas sur la cellule tumorale et donc d'une sensibilité diminuée à l'apoptose induite par les ligands de Fas et donc par les cellules immunitaires. La NRP2 pourrait être de cette façon être impliquées directement dans un mécanisme d'échappement des tumeurs au système immunitaire. Un mécanisme d'apoptose extrinsèque pourrait donc être également impliqué dans l'apoptose induite par nos anticorps anti-NRP2. Il serait dans ce contexte extrêmement intéressant de savoir si le traitement de cellules tumorales NRP2+ ayant perdu l'expression de ces récepteurs de mort par nos anticorps anti-NRP2 permettrait de restaurer l'expression de ces récepteurs dans ces cellules, et ainsi de restaurer la sensibilité de ces cellules à une apoptose médiée par les ligands FasL et Trail.

En outre, il serait également intéressant d'étudier les corrélations entre les expressions de ces récepteurs de mort et de NRP2 dans des tissus tumoraux de diverses origines par IHC, afin de confirmer cette corrélation inverse in vivo. L'expression de ces différentes protéines pourrait également être rapportée à la survie globale de patients cancéreux, afin de voir si ces marqueurs seraient des marqueurs pronostiques efficaces.

Par ailleurs, nous ne connaissons pas le statut muté ou sauvage de la protéine p53 dans les lignées de cancer pancréatique dérivées d'ascites malignes de patients. Le séquençage de cette protéine p53 pourrait également nous aider dans cette étude de l'implication de p53 dans l'apoptose.

5. NRP2 et miRNA

Les miRNA sont des petits ARNm, non codant, composés de 19 à 24 nucléotides et qui régulent l'expression de multiples gènes soit en inhibant leur transcription soit en dégradant l'ARNm de ces gènes. [320] Ces miRNA jouent des rôles essentiels dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques, en régulant l'expression de nombreux ARNm. Bien que l'importance des miRNA dans l'oncogénèse est à présent établie, très peu d'études mentionnent des miRNA promoteurs ou inhibiteurs de métastases. La famille du miR-200 semble impliquée dans la maintenance d'un phénotype épithélial. En inhibant spécifiquement ZEB1 et ZEB2, des répresseurs transcriptionnels de la E-cadhérine, les membres de la famille miR-200 inhibent la TEM et la formation de métastases.

La famille du miR200 comprend 5 membres répartis en 2 groupes : les miR-200a/b/429 et miR-200c/141. Plusieurs études reportent à présent que cette famille de miRNA est impliquée dans la TEM, et dans le processus inverse, la TME. L'expression ectopique de miR-200 dans des cellules cancéreuses entraîne une sur-expression de la E-cadhérine et diminue leur motilité. [199] A l'inverse, l'inhibition de ces miRNA endogènes paraît suffire à l'induction de TEM dans ces mêmes cellules. [197,199]

In vivo, dans des prélèvements de patients, l'expression de la E-cadhérine est significativement corrélée à l'expression du miR-200c dans des tumeurs ovariennes. [199] De même, l'expression des miR-200 est significativement plus faible dans des tumeurs du sein métastatique que dans des carcinômes épithéliaux mammaires.[197]

Récemment, Schikel et al a montré que le miR-200c régulait également l'expression de FAP1 (Phosphatase associée à Fas). [321] FAP-1 est un inhibiteur de l'apoptose médiée par Fas. Son action se résume à diminuer l'expression membranaire de Fas ainsi que la sensibilité des

cellules tumorales à l'apoptose médiée par Fas. Une corrélation inverse entre FAP-1 et la sensibilité des cellules à l'apoptose médiée par Fas a été observée dans de nombreux cancers.[322,323]

Dans un article très récent, Chang et al montrent que le gène suppresseur de tumeur p53 peut activer l'expression du miR-200c et ainsi réguler la TEM et le phénotype souche associé à la TEM. [324]

La famille des miR-200, et notamment miR-200c semble impliquée à la fois dans la régulation de la TEM, dans l'apoptose médiée par Fas, dans les voies de signalisation du TGF β 1 et de p53. Ainsi, puisque la NRP2 semble induire la TEM et inhiber l'expression de p53 et de Fas dans notre modèle, l'hypothèse suivante peut être formulée : la NRP2 via sa régulation de p53, pourrait inhiber l'expression des miR-200. L'inhibition des miR-200 induirait alors la TEM et la diminution de l'expression de Fas dans les cellules tumorales. Cette hypothèse est résumée par le schéma suivant : (Figure 53)

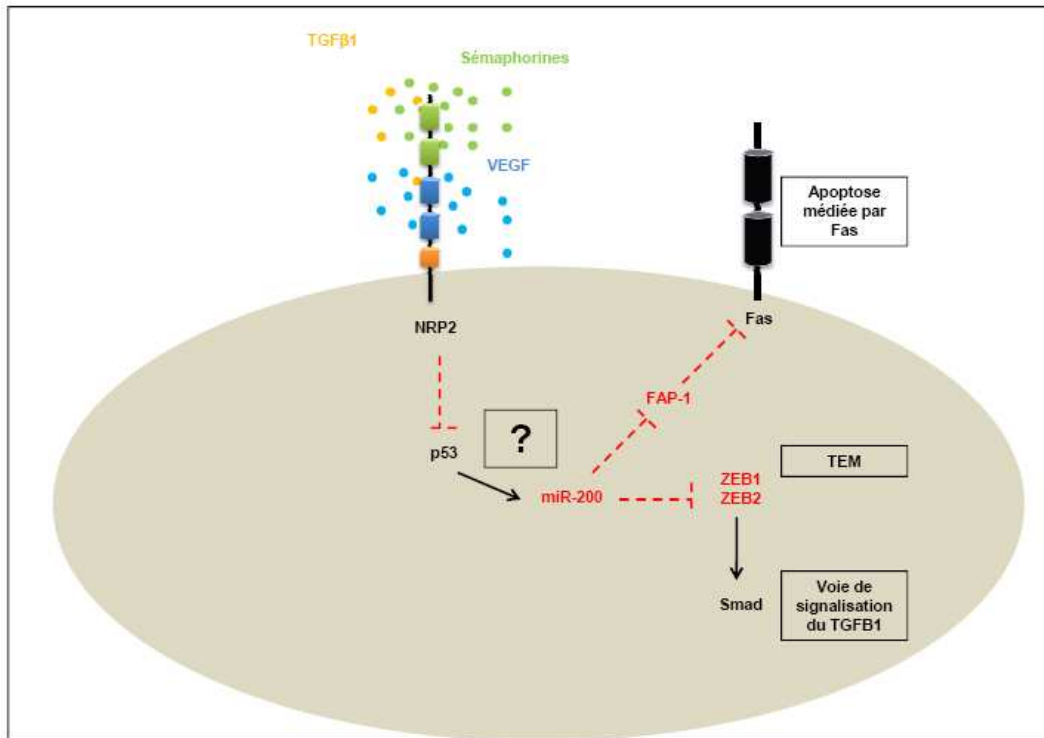


Figure 53 : Possible implication des miR-200 dans la régulation des effets oncogéniques de la NRP2.

Pour confirmer cette hypothèse, il serait intéressant d'évaluer l'expression des miR-200 dans nos cellules colorectales exprimant ou non la NRP2. Si la NRP2 diminue l'expression des miR-200, il serait ensuite intéressant d'induire l'expression de ces miRNA dans ces cellules afin de voir si le phénomène de TEM peut être réversé.

Dans ce cas, les miR-200 pourraient être au centre de l'action biologique de la NRP2 et moduler ses effets oncogènes.

6. Développement d'anticorps monoclonaux thérapeutiques anti-NRP2

Nous avons produit des anticorps monoclonaux murins ciblant spécifiquement la NRP2 humaine lors de notre travail de thèse. En raison d'une trop grande immunogénécité, ces anticorps murins ne pourraient cependant pas être directement utilisés en clinique chez l'homme. Les prochaines étapes de ce développement d'anticorps monoclonaux

thérapeutiques vont donc consister en « l'humanisation » de ces anticorps monoclonaux anti-NRP2, et en particulier d'ITAC-B1. Grâce à des techniques de biologie moléculaire, nous souhaiterions produire des anticorps monoclonaux chimériques et humanisés anti-NRP2. Des fragments d'anticorps pourraient être également formulés ou encore des anticorps bispécifiques. En effet, NRP2 semble assez spécifique des tissus tumoraux et des métastases et ne pas être exprimée au niveau des tissus sains. En conséquence la production d'anticorps bispécifiques anti-NRP2 et anti-CD3 (ou anti-CD28) permettrait notamment l'activation du système immunitaire sur le site tumoral et au niveau des métastases. Par ailleurs, ces anticorps anti-NRP2 pourraient être également couplés à des molécules de chimiothérapie ou de radiothérapie comme l'yttrium 90 (^{90}Y) ou l'astatine 211 (^{211}At). En effet, des résultats très prometteurs ont été rapportés dans des expériences de xénogreffes murines avec des diabodies anti-HER2 couplés à l' ^{211}At . Pour cela, des collaborations avec des industries pharmaceutiques pourraient être envisagées. [293]

Nous pourrions par ailleurs réaliser de nouvelles immunisations de souris avec des cellules P815^{NRP2} et utiliser ensuite la technique de production de « Phage-display » afin de produire des anticorps monoclonaux humanisés anti-NRP2.

CONCLUSION

Bien que les NRPs soient décrites depuis plus de 30 ans, leur participation à la progression tumorale n'a été suggérée que très récemment. La NRP1 fut la première NRP à être identifiée puis caractérisée. Très rapidement, de nombreuses études ont suggéré que la NRP1 participait activement à l'angiogénèse tumorale et donc à la progression tumorale, faisant de cette molécule une cible très intéressante dans le cadre du développement de nouvelles thérapies anti-angiogéniques. Très peu d'études s'étaient intéressées au rôle de la NRP2 dans la progression tumorale au début de notre travail de thèse en 2007. Notre travail de thèse a permis dans un premier temps la mise en évidence d'un processus de TEM médié par la NRP2 et dépendant du TGF β 1. Grâce à son interaction avec le TGFRI, la NRP2 active constitutivement la voie de signalisation du TGF β 1. Elle est en outre capable d'induire une TEM dans des lignées de cancer colorectal et de cancer du pancréas.

Le ciblage de la TEM semble être un des enjeux majeurs de la recherche en oncologie à l'heure actuelle. La TEM semble réguler en effet l'ensemble du processus cancéreux et être impliquée notamment dans la migration et l'invasion des cellules tumorales. En raison de son implication dans la formation des métastases, le ciblage thérapeutique de la TEM pourrait donner lieu aux premiers traitements anti-métastatiques.

Parallèlement à cette étude, nous avons développé des anticorps monoclonaux ciblant spécifiquement la NRP2 et pouvant induire l'apoptose de cellules tumorales de cancer colorectal et du pancréas exprimant la NRP2. Ceci a fait l'objet d'un dépôt de brevet international en 2010. Les mécanismes d'apoptose induits par ces anticorps restent encore bien méconnus et doivent encore être éclaircis dans de futures études.

En somme, la NRP2 semble être vraiment « au cœur » de nombreux processus participant collectivement à la progression tumorale. Dans ce contexte, elle apparaît comme une cible

thérapeutique extrêmement intéressante dans le cadre du développement de thérapeutiques ciblées en oncologie.

REFERENCES

1. Takagi S, Tsuji T, Amagai T, Takamatsu T and Fujisawa H (1987) Specific cell surface labels in the visual centers of *Xenopus laevis* tadpole identified using monoclonal antibodies. *Dev Biol.*, **122**, 90-100.
2. Takagi S, Kasuya Y, Shimizu M, Matsuura T, Tsuboi M, Kawakami A and H., F. (1995) Expression of a cell adhesion molecule, neuropilin, in the developing chick nervous system. *Dev Biol.*, **170**, 207-22.
3. Yamagata M, Herman JP and Sanes JR (1995) Lamina-specific expression of adhesion molecules in developing chick optic tectum. *J Neurosci.*, **15**, 4556-71.
4. Kawakami A, Kitsukawa T, Takagi S and H., F. (1996) Developmentally regulated expression of a cell surface protein, neuropilin, in the mouse nervous system. *J Neurobiol.*, **29**, 1-17.
5. Kolodkin A, Levengood D, Rowe E, Tai Yu-Tzu, Giger R and Ginty D (1997) Neuropilin Is a Semaphorin III Receptor. *Cell* **90**, 753-762.
6. He Z and Tessier-Lavigne M (1997) Neuropilin is a receptor for the axonal chemorepellent Semaphorin III. *Cell*, **90**, 739-51.
7. Chen H, Chedotal A, He Z , Goodman C.S and Tessier-Lavigne M (1997) Neuropilin-2, a novel member of the neuropilin family, is a high affinity receptor for the semaphorins Sema E and Sema IV but not Sema III. *Neuron*, **19**, 547-559.
8. Giger RJ, Cloutier JF, Sahay A, Prinjha RK, Levengood DV, Moore SE, Pickering S, Simmons D, Rastan S, Walsh FS, Kolodkin AL, Ginty DD and Geppert M (2000) Neuropilin-2 is required in vivo for selective axon guidance responses to secreted semaphorins. *Neuron.*, **25**.
9. Kitsukawa T, Shimizu M, Sanbo M, Hirata T, Taniguchi M, Bekku Y, Yagi T and Fujisawa H (1997) Neuropilin-semaphorin III/D-mediated chemorepulsive signals play a crucial role in peripheral nerve projection in mice. *Neuron.*, **19**, 995-1005.
10. Chen H, Bagri A and Zupicich JA (2000) Neuropilin-2 regulates the development of selective cranial and sensory nerves and hippocampal mossy fiber projections. *Neuron*, **25**, 43-56.
11. Giger RJ, Urquhart ER, Gillespie SK, Levengood DV, Ginty DD and Kolodkin AL (1998) Neuropilin-2 is a receptor for semaphorin IV: insight into the structural basis of receptor function and specificity. *Neuron.*, **21**, 1079-92.
12. Kitsukawa T, Shimon A, Kawakami A, Kondoh H and Fujisawa H (1995) Overexpression of a membrane protein, neuropilin, in chimeric mice causes anomalies in the cardiovascular system, nervous system and limbs. *Development*, **121**, 4309-18.
13. Kawasaki T, Kitsukawa T, Bekku Y, Matsuda Y, Sanbo M, Yagi T and Fujisawa H (1999) A requirement for neuropilin-1 in embryonic vessel formation. *Development.* , **126**, 4895-902.
14. Takashima S, Kitakaze M, Asakura M, Asanuma H, Sanada S, Tashiro F, Niwa H, Miyazaki Ji J, Hirota S, Kitamura Y, Kitsukawa T, Fujisawa H, Klagsbrun M and Hori M (2002) Targeting of both mouse neuropilin-1 and neuropilin-2 genes severely impairs developmental yolk sac and embryonic angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 3657-62.
15. Yuan, L., Moyon, D., Pardanaud, L., Breant, C., Karkkainen, M. J., Alitalo, K., Eichmann, A. (2002) Abnormal lymphatic vessel development in neuropilin 2 mutant mice. *Development* **129**, 4797-4806.
16. Ferrara, N., Carvermoore, K., Chen, H., Dowd, M., Lu, L., O Shea, K.S., Powellbraxton, L., Hillan, K.J. and Moore, M.W. (1996) Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature*, **380**, 439-442.
17. Carmeliet, P., Ferreira, V., Breier, G., Pollefeyt, S., Kieckens, L., Gertsenstein, M., Fahrig, M., Vandenhoek, A., Harpal, K., Eberhardt, C., Declercq, C., Pawling, J., Moons, L., Collen, D.,

- Risau, W. and Nagy, A. (1996) Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature*, **380**, 435-439.
18. Carmeliet, P. (2004) Manipulating angiogenesis in medicine. *Journal of Internal Medicine*, **255**, 538-561.
 19. Ferrara, N. and Henzel, W. (1989) Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **161**, 851-858.
 20. Gerber HP, McMurtrey A, Kowalski J, Yan M, Keyt BA, Dixit V and Ferrara N (1998) Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J Biol Chem.* , **273**, 30336-43.
 21. Roskoski R (2007) Vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in tumor progression. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*.
 22. Aase K, von Euler G, Li X, Pontén A, Thorén P, Cao R, Cao Y, Olofsson B, Gebre-Medhin S, Pekny M, Alitalo K, Betsholtz C and Eriksson U (2001) Vascular endothelial growth factor-B-deficient mice display an atrial conduction defect. *Circulation.*, **104**, 358-64.
 23. Mäkinen, T., Olofsson, B., Karpanen, T., Hellman, U., Soker, S., Klagsbrun, M., Eriksson, U., Alitalo, K. (1999) Differential binding of vascular endothelial growth factor B splice and proteolytic isoforms to neuropilin-1. *J. Biol. Chem*, **274**, 21217-21222.
 24. Migdal M, Huppertz B, Tessler S, Comforti A, Shibuya M, Reich R, Baumann H and Neufeld G (1998) Neuropilin-1 is a placenta growth factor-2 receptor. *J Biol Chem.*, **273**, 22272-8.
 25. Gluzman-Poltorak, Z., Cohen, T., Herzog, Y., Neufeld, G. (2000) Neuropilin-2 and neuropilin-1 are receptors for the 165-amino acid form of vascular endothelial growth factor (VEGF) and of placenta growth factor-2, but only neuropilin-2 functions as a receptor for the 145-amino acid form of VEGF. *J. Biol. Chem*, **275**, 18040-18045.
 26. Fuh G, Garcia KC and de Vos AM (2000) The interaction of neuropilin-1 with vascular endothelial growth factor and its receptor flt-1. *J Biol Chem.*, **275**, 26690-5.
 27. Kärpänen T, Heckman CA, Keskitalo S, Jeltsch M, Ollila H, Neufeld G, Tamagnone L and Alitalo K (2006) Functional interaction of VEGF-C and VEGF-D with neuropilin receptors. *FASEB J.* , **20**, 1462-72.
 28. Soker, S., Takashima, S., Miao, H.Q., Neufeld, G. and Klagsbrun, M. (1998) Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell* **92**, 735-745.
 29. Karkkainen MJ, Saaristo A, Jussila L, Karila KA, Lawrence EC, Pajusola K, Bueler H, Eichmann A, Kauppinen R, Kettunen MI, Yla-Herttuala S, Finegold DN, Ferrell RE and Alitalo K (2001) A model for gene therapy of human hereditary lymphedema. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 12677-82.
 30. West DC, Rees CG, Duchesne L, Patey SJ, Terry CJ, Turnbull JE, Delehedde M, Heegaard CW, Allain F, Vanpouille C, Ron D and DG., F. (2005) Interactions of multiple heparin binding growth factors with neuropilin-1 and potentiation of the activity of fibroblast growth factor-2. *J Biol Chem.*, **280**, 13457-64.
 31. Sulpice E, Plouët J, Bergé M, Allanic D, Tobelem G and Merkulova-Rainon T (2008) Neuropilin-1 and neuropilin-2 act as coreceptors, potentiating proangiogenic activity. *Blood*, **111**, 2036-45.
 32. Rossignol M, Gagnon ML and Klagsbrun M (2000) Genomic organization of human neuropilin-1 and neuropilin-2 genes: identification and distribution of splice variants and soluble isoforms. *Genomics.*, **70**, 211-22.
 33. Takagi S, Hirata T, Agata K, Mochii M, Eguchi G and Fujisawa H (1991) The A5 antigen, a candidate for the neuronal recognition molecule, has homologies to complement components and coagulation factors. *Neuron.*, **7**, 295-307.

34. Cai H. B and Reed R. R (1999) Cloning and characterization of neuropilin-1 interacting protein : A PSD-95/Dlg/ZO-1 domain-containing protein that interacts with the cytoplasmic domain of neuropilin-1. *J. Neurosci.*, **19**, 6519-6527.
35. Cackowski FC, Xu L, Hu B and Cheng SY (2004) Identification of two novel alternatively spliced Neuropilin-1 isoforms. *Genomics.*, **84**, 82-94.
36. Gagnon ML, Bielenberg DR, Gechtman Z, Miao HQ, Takashima S, Soker S and Klagsbrun M (2000) Identification of a natural soluble neuropilin-1 that binds vascular endothelial growth factor: In vivo expression and antitumor activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 2573-8.
37. Fujisawa H, Takagi S and Hirata T (1995) Growth-associated expression of a membrane protein, neuropilin, in *Xenopus* optic nerve fibers. *Dev Neurosci*, **17**, 343-9.
38. Tordjman R, Lepelletier Y, Lemarchandel V, Cambot M, Gaulard P, Hermine O and Roméo PH (2002) A neuronal receptor, neuropilin-1, is essential for the initiation of the primary immune response. *Nat Immunol.*, **3**, 477-82.
39. Bruder D, Probst-Kepper M, Westendorf AM, Geffers R, Beissert S, Loser K, von Boehmer H, Buer J and Hansen W (2004) Neuropilin-1: a surface marker of regulatory T cells. *Eur J Immunol.* , **34**, 623-30.
40. Sarris M, Andersen KG, Randow F, Mayr L and Betz AG (2008) Neuropilin-1 expression on regulatory T cells enhances their interactions with dendritic cells during antigen recognition. *Immunity.*, **28**, 402-13.
41. Milpied P, Renand A, Bruneau J, Mendes-da-Cruz DA, Jacquelin S, Asnafi V, Rubio MT, MacIntyre E, Lepelletier Y and Hermine O (2009) Neuropilin-1 is not a marker of human Foxp3+ Treg. *Eur J Immunol.*, **39**, 1466-71.
42. Curreli S, Arany Z, Gerardy-Schahn R, Mann D and Stamatou NM (2007) Polysialylated neuropilin-2 is expressed on the surface of human dendritic cells and modulates dendritic cell-T lymphocyte interactions. *J Biol Chem.* , **282**, 30346-56.
43. Rey-Gallardo A, Delgado-Martín C, Gerardy-Schahn R, Rodríguez-Fernández JL and Vega MA (2011) Polysialic acid is required for Neuropilin-2a/b-mediated control of CCL21-driven chemotaxis of mature dendritic cells, and for their migration in vivo. *Glycobiology*.
44. Rey-Gallardo A, Escribano C, Delgado-Martín C, Rodríguez-Fernández JL, Gerardy-Schahn R, Rutishauser U, Corbi AL and Vega MA (2010) Polysialylated neuropilin-2 enhances human dendritic cell migration through the basic C-terminal region of CCL21. *Glycobiology.*, **20**, 1139-46.
45. Bielenberg D.R., C.A., P., Takashima S and Klagsbrun M (2006) Neuropilins in neoplasms: expression, regulation, and function. *Exp. Cell Res*, **312**, 584-593.
46. Handa A, Tokunaga T, Tsuchida T, Lee YH, Kijima H, Yamazaki H, Ueyama Y, Fukuda H and Nakamura M (2000) Neuropilin-2 expression affects the increased vascularization and is a prognostic factor in osteosarcoma. *Int J Oncol*, **17**, 291-5.
47. Lacial PM, Failla CM, Pagani E, Odorisio T, Schietroma C, Falcinelli S, Zambruno G and D'Atri S (2000) Human melanoma cells secrete and respond to placenta growth factor and vascular endothelial growth factor. *J Invest Dermatol.*, **115**, 1000-1007.
48. Kawakami T, Tokunaga T, Hatanaka H, Kijima H, Yamazaki H, Abe Y, Osamura Y, Inoue H, Ueyama Y and Nakamura M (2002) Neuropilin 1 and neuropilin 2 co-expression is significantly correlated with increased vascularity and poor prognosis in nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer.* , **95**, 2196-201.
49. Tomizawa Y, Sekido Y, Kondo M, Gao B, Yokota J, Roche J, Drabkin H, Lerman MI, Gazdar AF and Minna JD (2001) Inhibition of lung cancer cell growth and induction of apoptosis after reexpression of 3p21.3 candidate tumor suppressor gene SEMA3B. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 13954-9.
50. Rieger J, Wick W and Weller M (2003) Human malignant glioma cells express semaphorins and their receptors, neuropilins and plexins. *Glia.*, **42**, 379-89.

51. Fakhari M, Pullirsch D, Abraham D, Paya K, Hofbauer R, Holzfeind P, Hofmann M and Aharinejad S (2002) Selective upregulation of vascular endothelial growth factor receptors neuropilin-1 and -2 in human neuroblastoma. *Cancer.*, **94**, 258-63.
52. Gray MJ, Van Buren G, Dallas NA, Xia L, Wang X, Yang AD, Somcio RJ, Lin YG, Lim S, Fan F, Mangala LS, Arumugam T, Logsdon CD, Lopez-Berestein G, Sood AK and Ellis LM (2008) Therapeutic targeting of neuropilin-2 on colorectal carcinoma cells implanted in the murine liver. *J Natl Cancer Inst* **100** 109 - 120.
53. Dallas NA, Gray MJ, Xia L, Fan F, van Buren G 2nd, Gaur P, Samuel S, Lim SJ, Arumugam T, Ramachandran V, Wang H and Ellis LM (2008) Neuropilin-2-mediated tumor growth and angiogenesis in pancreatic adenocarcinoma. *Clin Cancer Res*, **14**, 8052-60.
54. Cohen T, Herzog Y, Brodzky A, Greenson JK, Eldar S, Gluzman-Poltorak Z, Neufeld G and Resnick MB (2002) Neuropilin-2 is a novel marker expressed in pancreatic islet cells and endocrine pancreatic tumours. *J Pathol.*, **198**, 77-82.
55. Fukahi K, Fukasawa M, Neufeld G, Itakura J and Korc M (2004) Aberrant expression of neuropilin-1 and -2 in human pancreatic cancer cells. *Clin Cancer Res.*, **10**, 581-90.
56. Li M, Yang H, Chai H, Fisher WE, Wang X, Brunicardi FC, Yao Q and Chen C (2004) Pancreatic carcinoma cells express neuropilins and vascular endothelial growth factor, but not vascular endothelial growth factor receptors. *Cancer.*, **101**, 2341-50.
57. Yasuoka H, Kodama R, Tsujimoto M, Yoshidome K, Akamatsu H, Nakahara M, Inagaki M, Sanke T and Nakamura Y (2009) Neuropilin-2 expression in breast cancer: correlation with lymph node metastasis, poor prognosis, and regulation of CXCR4 expression. *BMC Cancer*, **7**, 220.
58. Vales A, Kondo R, Aichberger KJ, Mayerhofer M, Kainz B, Sperr WR, Sillaber C, Jäger U and Valent P (2007) Myeloid leukemias express a broad spectrum of VEGF receptors including neuropilin-1 (NRP-1) and NRP-2. *Leuk Lymphoma*, **48**, 1997-2007.
59. Cai Y, Wang R, Zhao YF, Jia J, Sun ZJ and Chen XM (2010) Expression of Neuropilin-2 in salivary adenoid cystic carcinoma: Its implication in tumor progression and angiogenesis. *Pathol Res Pract*.
60. Calicchio ML, Collins T and Kozakewich HP (2009) Identification of signaling systems in proliferating and involuting phase infantile hemangiomas by genome-wide transcriptional profiling. *Am J Pathol.*, **174**, 1638-49.
61. Osada R, Horiuchi A, Kikuchi N, Ohira S, Ota M, Katsuyama Y and Konishi I (2006) Expression of semaphorins, vascular endothelial growth factor, and their common receptor neuropilins and allelic loss of semaphorin locus in epithelial ovarian neoplasms: increased ratio of vascular endothelial growth factor to semaphorin is a poor prognostic factor in ovarian carcinomas. *Hum Pathol.*, **37**, 1414-25.
62. Sanchez-Carbayo M, Socci ND, Lozano JJ, Li W, Charytonowicz E, Belbin TJ, Prystowsky MB, Ortiz AR, Childs G and Cordon-Cardo C (2003) Gene discovery in bladder cancer progression using cDNA microarrays. *Am J Pathol.*, **163**, 505-16.
63. Ding H, Wu X, Roncari L, Lau N, Shannon P, Nagy A and Guha A (2000) Expression and regulation of neuropilin-1 in human astrocytomas. *Int J Cancer.*, **88**, 584-92.
64. Broholm H and Laursen H (2004) Vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor neuropilin-1's distribution in astrocytic tumors. *APMIS.*, **112**, 257-63.
65. Onofri C, Theodoropoulou M, Losa M, Uhl E, Lange M, Arzt E, Stalla GK and Renner U (2006) Localization of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptors in normal and adenomatous pituitaries: detection of a non-endothelial function of VEGF in pituitary tumours. *J Endocrinol.*, **191**.
66. Parikh AA, Liu WB and Fan F (2003) Expression and regulation of the novel vascular endothelial growth factor receptor neuropilin-1 by epidermal growth factor in human pancreatic carcinoma. *Cancer* **98**, 720-9.

67. Feurino LW, Zhang Y, Bharadwaj U, Zhang R, Li F, Fisher WE, Brunicardi FC, Chen C, Yao Q and Min L (2007) IL-6 stimulates Th2 type cytokine secretion and upregulates VEGF and NRP-1 expression in pancreatic cancer cells. *Cancer Biol Ther.* , **6**, 1096-100.
68. Akagi M, Kawaguchi M, Liu W, McCarty MF, Takeda A, Fan F, Stoeltzing O, Parikh AA, Jung YD, Bucana CD, Mansfield PF, Hicklin DJ and Ellis LM (2003) Induction of neuropilin-1 and vascular endothelial growth factor by epidermal growth factor in human gastric cancer cells. *Br J Cancer*, **88**, 796-802.
69. Hansel DE, Wilentz RE, Yeo CJ, Schulick RD, Montgomery E and Maitra A (2004) Expression of neuropilin-1 in high-grade dysplasia, invasive cancer, and metastases of the human gastrointestinal tract. *Am J Surg Pathol.* , **28**, 347-56.
70. Parikh AA, Fan F and Liu WB (2004) Neuropilin-1 in human colon cancer : expression, regulation, and role in induction of angiogenesis. *Am J Pathol* **164**, 2139-51.
71. Ochiuni T, Kitadai Y, Tanaka S, Akagi M, Yoshihara M and Chayama K (2006) Neuropilin-1 is involved in regulation of apoptosis and migration of human colon cancer. *Int J Oncol.*, **29**, 105-16.
72. Kreuter M, Woelke K, Bieker R, Schliemann C, Steins M, Buechner T, Berdel WE and Mesters RM (2006) Correlation of neuropilin-1 overexpression to survival in acute myeloid leukemia. *Leukemia.* , **20**, 1950-4.
73. Kreuter M, Steins M, Woelke K, Buechner T, Berdel WE and Mesters RM (2007) Downregulation of neuropilin-1 in patients with acute myeloid leukemia treated with thalidomide. *Eur J Haematol.*, **79**, 392-7.
74. Lu L, Zhang L, Xiao Z, Lu S, Yang R and Han ZC (2008) Neuropilin-1 in acute myeloid leukemia: expression and role in proliferation and migration of leukemia cells. *Leuk Lymphoma.* , **49**, 331-8.
75. Nowakowski GS, Mukhopadhyay D, Wu X and Kay NE (2008) Neuropilin-1 is expressed by chronic lymphocytic leukemia B cells. *Leuk Res.*, **32**, 1634-6.
76. Stephenson JM, Banerjee S, Saxena NK, Cherian R and Banerjee SK (2002) Neuropilin-1 is differentially expressed in myoepithelial cells and vascular smooth muscle cells in preneoplastic and neoplastic human breast: a possible marker for the progression of breast cancer. *Int J Cancer.*, **101**, 409-14.
77. Ghosh S, Sullivan CA, Zerkowski MP, Molinaro AM, Rimm DL, Camp RL and Chung GG (2008) High levels of vascular endothelial growth factor and its receptors (VEGFR-1, VEGFR-2, neuropilin-1) are associated with worse outcome in breast cancer. *Hum Pathol.*, **39**, 1835-43.
78. Lantuéjoul S, Constantin B, Drabkin H, Brambilla C, Roche J and Brambilla E (2003) Expression of VEGF, semaphorin SEMA3F, and their common receptors neuropilins NP1 and NP2 in preinvasive bronchial lesions, lung tumours, and cell lines. *J Pathol.*, **200**, 336-47.
79. Straume O and Akslen LA (2003) Increased expression of VEGF-receptors (FLT-1, KDR, NRP-1) and thrombospondin-1 is associated with glomeruloid microvascular proliferation, an aggressive angiogenic phenotype, in malignant melanoma. *Angiogenesis.*, **6**, 295-301.
80. Latil A, Bièche I, Pesche S, Valéri A, Fournier G, Cussenot O and Lidereau R (2000) VEGF overexpression in clinically localized prostate tumors and neuropilin-1 overexpression in metastatic forms. *Int J Cancer.*, **89**, 167-71.
81. Vanveldhuizen PJ, Zulfiqar M, Banerjee S, Cherian R, Saxena NK, Rabe A, Thrasher JB and Banerjee SK (2003) Differential expression of neuropilin-1 in malignant and benign prostatic stromal tissue. *Oncol Rep.*, **10**, 1067-71.
82. Zhang S and Kong W (2006) Expression of neuropilin-1 in human laryngeal carcinoma and cell lines. *Lin Chuang Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi*, **20**, 634-5.
83. Hall GH, Turnbull LW, Bedford K, Richmond I, Helboe L and Atkin SL (2005) Neuropilin-1 and VEGF correlate with somatostatin expression and microvessel density in ovarian tumours. *Int J Oncol.*, **27**, 1283-8.

84. Baba T, Kariya M, Higuchi T, Mandai M, Matsumura N, Kondoh E, Miyanishi M, Fukuhara K, Takakura K and Fujii S (2007) Neuropilin-1 promotes unlimited growth of ovarian cancer by evading contact inhibition. *Gynecol Oncol.* , **105**, 703-11.
85. Ottino P, Finley J, Rojo E, Ottlecz A, Lambrou GN, Bazan HE and Bazan NG (2004) Hypoxia activates matrix metalloproteinase expression and the VEGF system in monkey choroid-retinal endothelial cells: Involvement of cytosolic phospholipase A2 activity. *Mol Vis.*, **10**, 341-50.
86. Brusselmans K, Bono F, Collen D, Herbert JM, Carmeliet P and Dewerchin M (2005) A novel role for vascular endothelial growth factor as an autocrine survival factor for embryonic stem cells during hypoxia. *J Biol Chem.*, **280**, 3493-9.
87. Jögi A, Vallon-Christersson J, Holmquist L, Axelson H, Borg A and Pählman S (2004) Human neuroblastoma cells exposed to hypoxia: induction of genes associated with growth, survival, and aggressive behavior. *Exp Cell Res.*, **295**, 469-87.
88. Zhang ZG, Tsang W, Zhang L, Powers C and Chopp M (2001) Up-regulation of neuropilin-1 in neovasculature after focal cerebral ischemia in the adult rat. *J Cereb Blood Flow Metab.* , **21**, 541-9.
89. Beck H, Acker T, Püschel AW, Fujisawa H, Carmeliet P and Plate KH (2002) Cell type-specific expression of neuropilins in an MCA-occlusion model in mice suggests a potential role in post-ischemic brain remodeling. *J Neuropathol Exp Neurol.* , **61**, 339-50.
90. Li M, Zhang Y, Feurino LW, Wang H, Fisher WE, Brunicardi FC, Chen C and Yao Q (2008) Interleukin-8 increases vascular endothelial growth factor and neuropilin expression and stimulates ERK activation in human pancreatic cancer. *Cancer Sci.*, **99**, 733-7.
91. Giraudo E, Primo L, Audero E, Gerber HP, Koolwijk P, Soker S, Klagsbrun M, Ferrara N and Bussolino F (1998) Tumor necrosis factor-alpha regulates expression of vascular endothelial growth factor receptor-2 and of its co-receptor neuropilin-1 in human vascular endothelial cells. *J Biol Chem.*, **273**, 22128-35.
92. Schramek H, Sarközi R, Lauterberg C, Kronbichler A, Pirklbauer M, Albrecht R, Noppert SJ, Perco P, Rudnicki M, Strutz FM and Mayer G (2009) Neuropilin-1 and neuropilin-2 are differentially expressed in human proteinuric nephropathies and cytokine-stimulated proximal tubular cells. *Lab Invest.*, **89**, 1304-16.
93. Wang L, Zeng H, Wang P, Soker S and Mukhopadhyay D (2003) Neuropilin-1-mediated vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor-dependent endothelial cell migration. *J Biol Chem*, **278**, 48848-60.
94. Neufeld G and Kessler O (2008) The semaphorins: versatile regulators of tumour progression and tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer.* , **8**, 632-45.
95. Gherardi E, Love CA, Esnouf RM and Jones EY (2004) The sema domain. *Curr Opin Struct Biol.*, **14**, 669-78.
96. Capparuccia L and Tamagnone L (2009) Semaphorin signaling in cancer cells and in cells of the tumor microenvironment--two sides of a coin. *J Cell Sci.*, **122**, 1723-36.
97. Winberg ML, Noordermeer JN, Tamagnone L, Comoglio PM, Spriggs MK, Tessier-Lavigne M and Goodman CS (1998) Plexin A is a neuronal semaphorin receptor that controls axon guidance. *Cell.*, **95**, 903-16.
98. Takahashi T, Fournier A, Nakamura F, Wang LH, Murakami Y, Kalb RG, Fujisawa H and Strittmatter SM (1999) Plexin-neuropilin-1 complexes form functional semaphorin-3A receptors. *Cell.*, **99**, 59-69.
99. Rohm B, Ottemeyer A, Lohrum M and Püschel AW (2000) Plexin/neuropilin complexes mediate repulsion by the axonal guidance signal semaphorin 3A. *Mech Dev*, **93**, 95-104.
100. Fazzari P, Penachioni J, Gianola S, Rossi F, Eickholt BJ, Maina F, Alexopoulou L, Sottile A, Comoglio PM, Flavell RA and Tamagnone L (2007) Plexin-B1 plays a redundant role during mouse development and in tumour angiogenesis. *BMC Dev Biol.*, **7**.

101. Aurandt J, Vikis HG, Gutkind JS, Ahn N and Guan KL (2002) The semaphorin receptor plexin-B1 signals through a direct interaction with the Rho-specific nucleotide exchange factor, LARG. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 12085-90.
102. Swiercz JM, Kuner R, Behrens J and Offermanns S (2002) Plexin-B1 directly interacts with PDZ-RhoGEF/LARG to regulate RhoA and growth cone morphology. *Neuron.*, **35**, 51-63.
103. Rohm B, Rahim B, Kleiber B, Hovatta I and Püschel AW (2000) The semaphorin 3A receptor may directly regulate the activity of small GTPases. *FEBS Lett*, **486**, 68-72.
104. Vikis HG, Li W, He Z and Guan KL (2000) The semaphorin receptor plexin-B1 specifically interacts with active Rac in a ligand-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 12457-62.
105. Driessens MH, Hu H, Nobes CD, Self A, Jordens I, Goodman CS and Hall A (2001) Plexin-B semaphorin receptors interact directly with active Rac and regulate the actin cytoskeleton by activating Rho. *Curr Biol.*, **11**, 339-44.
106. Roche J, Boldog F, Robinson M, Robinson L, Varella-Garcia M, Swanton B, Waggoner B, Fishel R, Franklin W, Gemmill R and Drabkin H (1996) Distinct 3p21.3 deletions in lung cancer, analysis of deleted genes and identification of a new human semaphorin. *Oncogene.*, **12**, 1289 - 1297.
107. Xiang RH, Hensel CH, Garcia DK, Carlson HC, Kok K, Daly MC, Kerbacher K, van den Berg A, Veldhuis P, Buys CH and Naylor SL (1996) Isolation of the human semaphorin III/F gene (SEMA3F) at chromosome 3p21, a region deleted in lung cancer. *Genomics.*, **32**, 39-48.
108. Joseph D, Ho SM and Syed V (2010) Hormonal regulation and distinct functions of semaphorin-3B and semaphorin-3F in ovarian cancer. *Mol Cancer Ther.* , **9**, 499-509.
109. Burbee DG, Forgacs E, Zöchbauer-Müller S, Shivakumar L, Fong K, Gao B, Randle D, Kondo M, Virmani A, Bader S, Sekido Y, Latif F, Milchgrub S, Toyooka S, Gazdar AF, Lerman MI, Zabarovsky E, White M and Minna JD (2001) Epigenetic inactivation of RASSF1A in lung and breast cancers and malignant phenotype suppression. *J Natl Cancer Inst.*, **93**, 691-9.
110. Dammann R, Li C, Yoon JH, Chin PL, Bates S and Pfeifer GP (2000) Epigenetic inactivation of a RAS association domain family protein from the lung tumour suppressor locus 3p21.3. *Nat Genet.*, **25**, 315-9.
111. Kuroki T, Trapasso F, Yendamuri S, Matsuyama A, Alder H, Williams NN, Kaiser LR and Croce CM (2003) Allelic loss on chromosome 3p21.3 and promoter hypermethylation of semaphorin 3B in non-small cell lung cancer. *Cancer Res.*, **63**, 3352-5.
112. Ito M, Ito G, Kondo M, Uchiyama M, Fukui T, Mori S, Yoshioka H, Ueda Y, Shimokata K and Sekido Y (2005) Frequent inactivation of RASSF1A, BLU, and SEMA3B on 3p21.3 by promoter hypermethylation and allele loss in non-small cell lung cancer. *Cancer Lett.*, **225**, 131-9.
113. Bagnard D, Vaillant C, Khuth ST, Dufay N, Lohrum M, Puschel AW, Belin MF, Bolz J and Thomasset N (2001) Semaphorin 3A-vascular endothelial growth factor-165 balance mediates migration and apoptosis of neural progenitor cells by the recruitment of shared receptor. *J Neurosci.*, **21**, 3332-41.
114. Guttmann-Raviv N, Shraga-Heled N, Varshavsky A, Guimaraes-Sternberg C, Kessler O and Neufeld G (2007) Semaphorin-3A and semaphorin-3F work together to repel endothelial cells and to inhibit their survival by induction of apoptosis. *J Biol Chem.*, **282**, 26294-305.
115. Moretti S, Procopio A, Lazzarini R, Rippo MR, Testa R, Marra M, Tamagnone L and Catalano A (2008) Semaphorin3A signaling controls Fas (CD95)-mediated apoptosis by promoting Fas translocation into lipid rafts. *Blood.*, **111**, 2290-9.
116. Kigel B, Varshavsky A, Kessler O and Neufeld G (2008) Successful inhibition of tumor development by specific class-3 semaphorins is associated with expression of appropriate semaphorin receptors by tumor cells. *PLoS One.*, **3**.
117. Maione F, Molla F, Meda C, Latini R, Zentilin L, Giacca M, Seano G, Serini G, Bussolino F and Giraudo E (2009) Semaphorin 3A is an endogenous angiogenesis inhibitor that blocks tumor

- growth and normalizes tumor vasculature in transgenic mouse models. *J Clin Invest.*, **119**, 3356-72.
118. Tse C, Xiang RH, Bracht T and Naylor SL (2002) Human Semaphorin 3B (SEMA3B) located at chromosome 3p21.3 suppresses tumor formation in an adenocarcinoma cell line. *Cancer Res.*, **62**, 542-6.
 119. Castro-Rivera E, Ran S, Thorpe P and Minna JD (2004) Semaphorin 3B (SEMA3B) induces apoptosis in lung and breast cancer, whereas VEGF165 antagonizes this effect. *Proc Natl Acad Sci USA*, **101**, 11432-7.
 120. Castro-Rivera E, Ran S, Brekken RA and Minna JD (2008) Semaphorin 3B inhibits the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway through neuropilin-1 in lung and breast cancer cells. *Cancer Res.*, **68**, 8295-303.
 121. Rolny C, Capparuccia L, Casazza A, Mazzone M, Vallario A, Cignetti A, Medico E, Carmeliet P, Comoglio PM and Tamagnone L (2008) The tumor suppressor semaphorin 3B triggers a prometastatic program mediated by interleukin 8 and the tumor microenvironment. *J Exp Med.*, **205**, 1155-71.
 122. Brambilla E, Constantin B, Drabkin H and Roche J (2000) Semaphorin SEMA3F localization in malignant human lung and cell lines: A suggested role in cell adhesion and cell migration. *Am J Pathol.*, **156**, 939-50.
 123. Xiang R, Davalos AR, Hensel CH, Zhou XJ, Tse C and Naylor SL (2002) Semaphorin 3F gene from human 3p21.3 suppresses tumor formation in nude mice. *Cancer Res.*, **62**, 2637-43.
 124. Kusy S, Nasarre P, Chan D, Potiron V, Meyronet D, Gemmill RM, Constantin B, Drabkin HA and Roche J (2005) Selective suppression of in vivo tumorigenicity by semaphorin SEMA3F in lung cancer cells. *Neoplasia.*, **7**, 457-65.
 125. Kessler O, Shraga-Heled N and Lange T (2004) Semaphorin-3F is an inhibitor of tumor angiogenesis. *Cancer Res.*, **64**, 1008-15.
 126. Bielenberg D. R, Hida Y, Shimizu, A., Kaipainen A, Kreuter M, Choi Kim C and Klagsbrun M (2004) Semaphorin 3F, a chemorepellent for endothelial cells, induces a poorly vascularized, encapsulated, nonmetastatic tumor phenotype. *J Clin Invest*, **114**, 1260-68.
 127. Chabbert-de Ponnat I, Buffard V, Leroy K, Bagot M, Bensussan A, Wolkenstein P and Marie-Cardine A (2006) Antiproliferative effect of semaphorin 3F on human melanoma cell lines. *J Invest Dermatol.*, **126**, 2343-5.
 128. Christensen C, Ambartsumian N, Gilestro G, Thomsen B, Comoglio P, Tamagnone L, Guldberg P and Lukanidin E (2005) Proteolytic processing converts the repelling signal Sema3E into an inducer of invasive growth and lung metastasis. *Cancer Res.*, **65**, 6167-77.
 129. Pan H, Wanami LS, Dissanayake TR and Bachelder RE (2009) Autocrine semaphorin3A stimulates alpha2 beta1 integrin expression/function in breast tumor cells. *Breast Cancer Res Treat.*, **118**, 197-205.
 130. Casazza A, Fu X, Johansson I, Capparuccia L, Andersson F, Giustacchini A, Squadrito ML, Venneri MA, Mazzone M, Larsson E, Carmeliet P, De Palma M, Naldini L, Tamagnone L and Rolny C (2011) Systemic and Targeted Delivery of Semaphorin 3A Inhibits Tumor Angiogenesis and Progression in Mouse Tumor Models. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*
 131. Nasarre P, Constantin B and Rouhaud L (2003) Semaphorin SEMA3F and VEGF have opposing effects on cell attachment and spreading. *Neoplasia*, **5**, 83-92.
 132. Nasarre P, Kusy S and Constantin B (2005) Semaphorin SEMA3F has a repelling activity on breast cancer cells and inhibits E-cadherin-mediated cell adhesion. *Neoplasia*, **7**, 180-9.
 133. Gluzman-Poltorak Z, Cohen T, Shibuya M and Neufeld G (2001) Vascular endothelial growth factor receptor-1 and neuropilin-2 form complexes. *J Biol Chem.*, **276**, 18688-94.
 134. Caunt M, Mak J, Liang WC, Stawicki S, Pan Q, Tong RK, Kowalski J, Ho C, Reslan HB, Ross J, Berry L, Kasman I, Zlot C, Cheng Z, Le Couter J, Filvaroff EH, Plowman G, Peale F, French D,

- Carano R, Koch AW, Wu Y, Watts RJ, Tessier-Lavigne M and Bagri A (2008) Blocking Neuropilin-2 function inhibits tumor cell metastasis. *Cancer Cell*, **13**, 331-342.
135. Xu Y, Yuan L, Mak J, Pardanaud L, Caunt M, Kasman I, Larrivée B, Del Toro R, Suchting S, Medvinsky A, Silva J, Yang J, Thomas JL, Koch AW, Alitalo K, Eichmann A and Bagri A (2010) Neuropilin-2 mediates VEGF-C-induced lymphatic sprouting together with VEGFR3. *J Cell Biol.*, **188**, 115-30.
136. Fukasawa M, Matsushita A and Korc M (2007) Neuropilin-1 interacts with integrin beta1 and modulates pancreatic cancer cell growth, survival and invasion. *Cancer Biol Ther.*, **6**, 1173-80.
137. Valdembri D, Caswell PT, Anderson KI, Schwarz JP, König I, Astanina E, Caccavari F, Norman JC, Humphries MJ, Bussolino F and Serini G (2009) Neuropilin-1/GIPC1 signaling regulates alpha5beta1 integrin traffic and function in endothelial cells. *PLoS Biol.*, **7**.
138. Robinson SD, Reynolds LE, Kostourou V, Reynolds AR, da Silva RG, Tavora B, Baker M, Marshall JF and Hodivala-Dilke KM (2009) Alpha5 beta3 integrin limits the contribution of neuropilin-1 to vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis. *J Biol Chem.*, **284**, 33966-81.
139. Hu B, Guo P, Bar-Joseph I, Imanishi Y, Jarzynka MJ, Bogler O, Mikkelsen T, Hirose T, Nishikawa R and Cheng SY (2007) Neuropilin-1 promotes human glioma progression through potentiating the activity of the HGF/SF autocrine pathway. *Oncogene.* , **26**, 5577-86.
140. Matsushita A, Götze T and Korc M (2007) Hepatocyte growth factor-mediated cell invasion in pancreatic cancer cells is dependent on neuropilin-1. *Cancer Res.*, **67**, 10309-16.
141. Glinka Y and Prud'homme GJ (2008) Neuropilin-1 is a receptor for transforming growth factor beta-1, activates its latent form, and promotes regulatory T cell activity. *J Leukoc Biol*, **84**, 302-310.
142. Glinka Y, Stoilova S, Mohammed N and Prud'homme GJ (2010) Neuropilin-1 exerts coreceptor function for TGF-beta-1 on the membrane of cancer cells and enhances responses to both latent and active TGF-beta. *Carcinogenesis*.
143. Cao S, Yaqoob U, Das A, Shergill U, Jagavelu K, Huebert RC, Routray C, Abdelmoneim S, Vasdev M, Leof E, Charlton M, Watts RJ, Mukhopadhyay D and Shah VH (2010) Neuropilin-1 promotes cirrhosis of the rodent and human liver by enhancing PDGF/TGF-beta signaling in hepatic stellate cells. *J Clin Invest.* , **120**, 2379-94.
144. Cao Y, Szabolcs A, Dutta SK, Yaqoob U, Jagavelu K, Wang L, Leof EB, Urrutia RA, Shah VH and Mukhopadhyay D (2010) Neuropilin-1 mediates divergent R-Smad signaling and the myofibroblast phenotype. *J Biol Chem*.
145. Mak P, Leav I, Pursell B, Bae D, Yang X, Taglienti C.A, Gouvin L.M, Sharma V. S and Mercurio A.M (2010) ERbeta impedes prostate cancer EMT by destabilizing HIF-1alpha and inhibiting VEGF-mediated snail nuclear localization: implications for Gleason grading. *Cancer Cell.*, **17**, 319-32.
146. Guarino M (2007) Epithelial-mesenchymal transition and tumour invasion. *Int J Biochem Cell Biol*, **39**, 2153-60.
147. Favier B, Alam A, Barron P, Bonnin J, Laboudie P, Fons P, Mandron M, Herault J.P, Neufeld G and Savi P (2006) Neuropilin-2 interacts with VEGFR-2 and VEGFR-3 and promotes human endothelial cell survival and migration. *Blood*, **108**, 1243-1250.
148. Glinka Y, Stoilova S, Mohammed N and Prud'homme GJ (2010) Neuropilin-1 exerts coreceptor function for TGF-beta-1 on the membrane of cancer cells and enhances responses to both latent and active TGF-beta. *Carcinogenesis.* , **32**, 613-21.
149. Grandclement C, Bedel R, Kantelip B, Bouard A, Mougey V, Klagsbrun M, Ferrand C, Tiberghien P, Pivot X.B and Borg C (2010) Neuropilin-2 and epithelial to mesenchymal transition in colorectal cancer cells. *Journal of Clinical Oncology ASCO Annual Meeting Proceedings (Post-Meeting Edition)*. **28**.

150. Bergé M, Bonnin P, Sulpice E, Vilar J, Allanik D, Silvestre JS, Lévy BI, Tucker GC, Tobelem G and Merkulova-Rainon T (2010) Small interfering RNAs induce target-independent inhibition of tumor growth and vasculature remodeling in a mouse model of hepatocellular carcinoma. *Am J Pathol.*, **177**, 3192-201.
151. Raskopf E, Vogt A, Standop J, Sauerbruch T and Schmitz V (2010) Inhibition of neuropilin-1 by RNA-interference and its angiostatic potential in the treatment of hepatocellular carcinoma. *Z Gastroenterol.*, **48**, 21-7.
152. Hong TM, Chen YL, Wu YY, Yuan A, Chao YC, Chung YC, Wu MH, Yang SC, Pan SH, Shih JY, Chan WK and Yang PC (2007) Targeting neuropilin 1 as an antitumor strategy in lung cancer. *Clin Cancer Res.*, **13**, 4759-68.
153. Schuch G, Machluf M, Bartsch G Jr, Nomi M, Richard H, Atala A and Soker S (2002) In vivo administration of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its antagonist, soluble neuropilin-1, predicts a role of VEGF in the progression of acute myeloid leukemia in vivo. *Blood*, 4622-8.
154. Geretti E, Van Meeteren LA, Shimizu A, Dudley AC, Claesson-Welsh L and Klagsbrun M (2010) A mutated soluble neuropilin-2 B domain antagonizes vascular endothelial growth factor bioactivity and inhibits tumor progression. *Mol Cancer Res.*, **8**, 1063-73.
155. Sugahara KN, Teesalu T, Karmali PP, Kotamraju VR, Agemy L, Greenwald DR and Ruoslahti E (2010) Coadministration of a tumor-penetrating peptide enhances the efficacy of cancer drugs. *Science.*, **328**, 1031-5.
156. Sugahara KN, Teesalu T, Karmali PP, Kotamraju VR, Agemy L, Girard OM, Hanahan D, Mattrey RF and Ruoslahti E (2009) Tissue-penetrating delivery of compounds and nanoparticles into tumors. *Cancer Cell.*, **16**, 510-20.
157. Teesalu T, Sugahara KN, Kotamraju VR and Ruoslahti E (2009) C-end rule peptides mediate neuropilin-1-dependent cell, vascular, and tissue penetration. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **106**, 16157-62.
158. Jarvis A, Allerston CK, Jia H, Herzog B, Garza-Garcia A, Winfield N, Ellard K, Aqil R, Lynch R, Chapman C, Hartzoulakis B, Nally J, Stewart M, Cheng L, Menon M, Tickner M, Djordjevic S, Driscoll PC, Zachary I and Selwood DL (2010) Small molecule inhibitors of the neuropilin-1 vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) interaction. *J Med Chem.*, **53**, 2215-26.
159. Karjalainen K, Jaalouk DE, Bueso-Ramos CE, Zurita AJ, Kuniyasu A, Eckhardt BL, Marini FC, Lichtiger B, O'Brien S, Kantarjian HM, Cortes JE, Koivunen E, Arap W and Pasqualini R (2011) Targeting neuropilin-1 in human leukemia and lymphoma. *Blood.*, **117**, 920-7.
160. Nasarre C, Roth M, Jacob L, Roth L, Koncina E, Thien A, Labourdette G, Poulet P, Hubert P, Crémel G, Roussel G, Aunis D and Bagnard D (2010) Peptide-based interference of the transmembrane domain of neuropilin-1 inhibits glioma growth in vivo. *Oncogene.*, **29**, 2381-92.
161. Liang WC, Dennis MS, Stawicki S, Chanthery Y, Pan Q, Chen Y, Eigenbrot C, Yin J, Koch AW, Wu X, Ferrara N, Bagri A, Tessier-Lavigne M, Watts RJ and Wu Y (2007) Function blocking antibodies to neuropilin-1 generated from a designed human synthetic antibody phage library. *J Mol Biol.*, **366**, 815-29.
162. Pan Q, Chanthery Y, Liang WC, Stawicki S, Mak J, Rathore N, Tong RK, Kowalski J, Yee SF, Pacheco G, Ross S, Cheng Z, Le Couter J, Plowman G, Peale F, Koch AW, Wu Y, Bagri A, Tessier-Lavigne M and Watts RJ (2007) Blocking neuropilin-1 function has an additive effect with anti-VEGF to inhibit tumor growth. *Cancer Cell*, **11**, 53-67.
163. <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00747734?term=neuropilin&rank=1> (2010).
164. Kalluri R and Weinberg RA (2009) The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest.*, **119**, 1420-8.
165. Greenburg G and Hay ED (1982) Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells. *J Cell Biol.*, **95**, 333-9.

166. Zeisberg M and Neilson EG (2009) Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J Clin Invest.*, **119**, 1429-37.
167. Bates RC, Bellovin DI, Brown C, Maynard E, Wu B, Kawakatsu H, Sheppard D, Oettgen P and Mercurio AM (2005) Transcriptional activation of integrin beta6 during the epithelial-mesenchymal transition defines a novel prognostic indicator of aggressive colon carcinoma. *J Clin Invest.*, **115**, 339-47.
168. Qian F, Zhang ZC, Wu XF, Li YP and Xu Q (2005) Interaction between integrin alpha(5) and fibronectin is required for metastasis of B16F10 melanoma cells. *Biochem Biophys Res Commun.* , **333**, 1269-75.
169. Raymond WA and Leong AS (1989) Vimentin--a new prognostic parameter in breast carcinoma? *J Pathol.*, **158**, 107-14.
170. Sarrió D, Rodríguez-Pinilla SM, Hardisson D, Cano A, Moreno-Bueno G and Palacios J (2008) Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer relates to the basal-like phenotype. *Cancer Res.*, **68**, 989-97.
171. Nelson WJ and Nusse R (2004) Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science.* , **303**, 1483-7.
172. Liebner S, Cattelino A, Gallini R, Rudini N, Iurlaro M, Piccolo S and Dejana E (2004) Beta-catenin is required for endothelial-mesenchymal transformation during heart cushion development in the mouse. *J Cell Biol.*, **166**, 359-67.
173. Larsen M, Tremblay M. L and Yamada K, M. (2003) Phosphatases in cell-matrix adhesion and migration. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **4**, 700-711.
174. Bachelder RE, Yoon SO, Franci C, de Herreros AG and Mercurio AM (2005) Glycogen synthase kinase-3 is an endogenous inhibitor of Snail transcription: implications for the epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Biol.*, **168**, 29-33.
175. Brabletz T, Jung A, Hermann K, Günther K, Hohenberger W and Kirchner T (1998) Nuclear overexpression of the oncoprotein beta-catenin in colorectal cancer is localized predominantly at the invasion front. *Pathol Res Pract.* , **194**, 701-4.
176. Carpenter PM, Wang-Rodriguez J, Chan OT and Wilczynski SP (2008) Laminin 5 expression in metaplastic breast carcinomas. *Am J Surg Pathol.*, **32**, 345-53.
177. Giannelli G, Bergamini C, Fransvea E, Sgarra C and Antonaci S (2005) Laminin-5 with transforming growth factor-beta1 induces epithelial to mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology.* , **129**, 1375-83.
178. Marinkovich MP (2007) Tumour microenvironment: laminin 332 in squamous-cell carcinoma. *Nat Rev Cancer.* , **7**, 370-80.
179. Moreno-Bueno G, Cubillo E, Sarrió D, Peinado H, Rodríguez-Pinilla SM, Villa S, Bolós V, Jordá M, Fabra A, Portillo F, Palacios J and Cano A (2006) Genetic profiling of epithelial cells expressing E-cadherin repressors reveals a distinct role for Snail, Slug, and E47 factors in epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Res*, **66**, 9543-56.
180. Wang X, Zheng M, Liu G, Xia W, McKeown-Longo PJ, Hung MC and Zhao J (2007) Krüppel-like factor 8 induces epithelial to mesenchymal transition and epithelial cell invasion. *Cancer Res*, **67**, 7184-93.
181. Mani SA, Yang J, Brooks M, Schwaninger G, Zhou A, Miura N, Kutok JL, Hartwell K, Richardson AL and Weinberg RA (2007) Mesenchyme Forkhead 1 (FOXC2) plays a key role in metastasis and is associated with aggressive basal-like breast cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 10069-74.
182. Sobrado VR, Moreno-Bueno G, Cubillo E, Holt LJ, Nieto MA, Portillo F and Cano A (2009) The class I bHLH factors E2-2A and E2-2B regulate EMT. *J Cell Sci.*, **122**, 1014-24.
183. Batlle E, Sancho E, Francí C, Domínguez D, Monfar M, Baulida J and García De Herreros A (2000) The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat Cell Biol.* , **2**, 84-9.

184. Hemavathy K, Guru SC, Harris J, Chen JD and Ip YT (2000) Human Slug is a repressor that localizes to sites of active transcription. *Mol Cell Biol.*, **20**, 5087-95.
185. Castanon I and Baylies MK (2002) A Twist in fate: evolutionary comparison of Twist structure and function. *Gene.*, **287**, 11-22.
186. Kida Y, Asahina K, Teraoka H, Gitelman I and Sato T (2007) Twist relates to tubular epithelial-mesenchymal transition and interstitial fibrogenesis in the obstructed kidney. *J Histochem Cytochem.*, **55**, 661-73.
187. Yang J, Mani SA, Donaher JL, Ramaswamy S, Itzykson RA, Come C, Savagner P, Gitelman I, Richardson A and RA., W. (2004) Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell*, **117**, 927-39.
188. Yang J, Mani SA, Donaher JL, Ramaswamy S, Itzykson RA, Come C, Savagner P, Gitelman I, Richardson A and Weinberg RA (2004) Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell.*, **117**, 927-39.
189. Perez-Moreno MA, Locascio A, Rodrigo I, Dhondt G, Portillo F, Nieto MA and Cano A (2001) A new role for E12/E47 in the repression of E-cadherin expression and epithelial-mesenchymal transitions. *J Biol Chem.* , **276**, 27424-31.
190. Kondo M, Cubillo E, Tobiume K, Shirakihara T, Fukuda N, Suzuki H, Shimizu K, Takehara K, Cano A, Saitoh M and Miyazono K (2004) A role for Id in the regulation of TGF-beta-induced epithelial-mesenchymal transdifferentiation. *Cell Death Differ.* , **11**, 1092-101.
191. Mani SA, Yang J, Brooks M, Schwaninger G, Zhou A, Miura N, Kutok JL, Hartwell K, Richardson AL and Weinberg RA (2007) Mesenchyme Forkhead 1 (FOXC2) plays a key role in metastasis and is associated with aggressive basal-like breast cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* , **104**, 10069-74.
192. Shirakihara T, Saitoh M and Miyazono K (2007) Differential regulation of epithelial and mesenchymal markers by deltaEF1 proteins in epithelial mesenchymal transition induced by TGF-beta. *Mol Biol Cell.*, **18**, 3533-44.
193. Eger A, Aigner K, Sonderegger S, Dampier B, Oehler S, Schreiber M, Berx G, Cano A, Beug H and Foisner R (2005) DeltaEF1 is a transcriptional repressor of E-cadherin and regulates epithelial plasticity in breast cancer cells. *Oncogene.*, **24**, 2375-85.
194. Vandewalle C, Comijn J, De Craene B, Vermassen P, Bruyneel E, Andersen H, Tulchinsky E, Van Roy F and Berx G (2005) SIP1/ZEB2 induces EMT by repressing genes of different epithelial cell-cell junctions. *Nucleic Acids Res.*, **33**, 6566-78.
195. Altaba AR, Palma V and Dahmane N (2002) Hedgehog-Gli signaling and the growth of the brain. *Nature Reviews Neuroscience*, **3**, 24-33.
196. Ma L, Teruya-Feldstein J and Weinberg RA (2007) Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer. *Nature*, **449**, 682-8.
197. Gregory PA, Bert AG, Paterson EL, Barry SC, Tsykin A, Farshid G, Vadas MA, Khew-Goodall Y and Goodall GJ (2008) The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. *Nat Cell Biol.*, **10**, 593-601.
198. Korpala M, Lee ES, Hu G and Kang Y (2008) The miR-200 family inhibits epithelial-mesenchymal transition and cancer cell migration by direct targeting of E-cadherin transcriptional repressors ZEB1 and ZEB2. *J Biol Chem*, **283**, 14910-4.
199. Park SM, Gaur AB, Lengyel E and Peter ME (2008) The miR-200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by targeting the E-cadherin repressors ZEB1 and ZEB2. *Genes Dev.*, **22**, 894-907.
200. Blanco MJ, Moreno-Bueno G, Sarrio D, Locascio A, Cano A, Palacios J and Nieto MA (2002) Correlation of Snail expression with histological grade and lymph node status in breast carcinomas. *Oncogene.*, **21**, 3241-6.

201. Rosivatz E, Becker I, Specht K, Fricke E, Luber B, Busch R, Höfler H and Becker KF (2002) Differential expression of the epithelial-mesenchymal transition regulators snail, SIP1, and twist in gastric cancer. *Am J Pathol.*, **161**, 1881-91.
202. Shioiri M, Shida T, Koda K, Oda K, Seike K, Nishimura M, Takano S, M. and iyazaki M (2006) Slug expression is an independent prognostic parameter for poor survival in colorectal carcinoma patients. *Br J Cancer*, **94**, 1816-22.
203. Usami Y, Satake S, Nakayama F, Matsumoto M, Ohnuma K, Komori T, Semba S, Ito A and Yokozaki H (2008) Snail-associated epithelial-mesenchymal transition promotes oesophageal squamous cell carcinoma motility and progression. *J Pathol.*, **215**, 330-9.
204. Waldmann J, Feldmann G, Slater EP, Langer P, Buchholz M, Ramaswamy A, Saeger W, Rothmund M and Fendrich V (2008) Expression of the zinc-finger transcription factor Snail in adrenocortical carcinoma is associated with decreased survival. *Br J Cancer*, **99**, 1900-7.
205. Bruyere F, Namdarian B, Corcoran NM, Pedersen J, Ockrim J, Voelzke BB, Mete U, Costello AJ and Hovens CM (2010) Snail expression is an independent predictor of tumor recurrence in superficial bladder cancers. *Urol Oncol.*, **28**, 591-6.
206. Thiery JP (2003) Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies. *Curr Opin Cell Biol* **15**, 740-746.
207. Schmierer B and Hill CS (2007) TGFbeta–SMAD signal transduction: molecular specificity and functional flexibility. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **8**, 970-982.
208. Miettinen PJ, Ebner R, Lopez AR and Derynck R (1994) TGF-beta induced transdifferentiation of mammary epithelial cells to mesenchymal cells: involvement of type I receptors. *J Cell Biol*, **127**, 2021-36.
209. Valcourt U, Kowanzetz M, Niimi H, Heldin CH and Moustakas A (2005) TGF-beta and the Smad signaling pathway support transcriptomic reprogramming during epithelial-mesenchymal cell transition. *Mol Biol Cell.*, **4**.
210. Sato M, Muragaki Y, Saika S, Roberts AB and Ooshima A (2003) Targeted disruption of TGF-beta1/Smad3 signaling protects against renal tubulointerstitial fibrosis induced by unilateral ureteral obstruction. *J Clin Invest.*, **112**, 1486-94.
211. Takano S, Kanai F, Jazag A, Ijichi H, Yao J, Ogawa H, Enomoto N, Omata M and Nakao A (2007) Smad4 is essential for down-regulation of E-cadherin induced by TGF-beta in pancreatic cancer cell line PANC-1. *J Biochem.*, **141**, 345-51.
212. Kaimori A, Potter J, Kaimori JY, Wang C, Mezey E and Koteish A (2007) Transforming growth factor-beta1 induces an epithelial-to-mesenchymal transition state in mouse hepatocytes in vitro. *J Biol Chem*, **282**, 22089-101.
213. Deckers M, van Dinther M, Buijs J, Que I, Löwik C, van der Pluijm G and ten Dijke P (2006) The tumor suppressor Smad4 is required for transforming growth factor beta-induced epithelial to mesenchymal transition and bone metastasis of breast cancer cells. *Cancer Res.* , **66**, 2202-9.
214. Saika S, Ikeda K, Yamanaka O, Sato M, Muragaki Y, Ohnishi Y, Ooshima A, Nakajima Y, Namikawa K, Kiyama H, Flanders KC and Roberts AB (2004) Transient adenoviral gene transfer of Smad7 prevents injury-induced epithelial-mesenchymal transition of lens epithelium in mice. *Lab Invest.*, **84**, 1259-70.
215. Zavadil J, Bitzer M, Liang D, Yang YC, Massimi A, Kneitz S, Piek E and Bottinger EP (2001) Genetic programs of epithelial cell plasticity directed by transforming growth factor-beta. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **98**, 6686-91.
216. Bakin AV, Rinehart C, Tomlinson AK and Arteaga CL (2002) p38 mitogen-activated protein kinase is required for TGFbeta-mediated fibroblastic transdifferentiation and cell migration. *J Cell Sci.* , **115**, 3193-206.

217. Bakin AV, Tomlinson AK, Bhowmick NA, Moses HL and Arteaga CL (2000) Phosphatidylinositol 3-kinase function is required for transforming growth factor beta-mediated epithelial to mesenchymal transition and cell migration. *J Biol Chem.* , **275**, 36803-10.
218. Nawshad A, Medici D, Liu CC and Hay ED (2007) TGFbeta3 inhibits E-cadherin gene expression in palate medial-edge epithelial cells through a Smad2-Smad4-LEF1 transcription complex. *J Cell Sci.*, **120**, 1646-53.
219. Cho HJ, Baek KE, Saika S, Jeong MJ and Yoo J (2007) Snail is required for transforming growth factor-beta-induced epithelial-mesenchymal transition by activating PI3 kinase/Akt signal pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* , **353**, 337-43.
220. Barrallo-Gimeno A and Nieto MA (2005) The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer. *Development.* , **132**, 3151-61.
221. Shirakihara T, Saitoh M and Miyazono K (2007) Differential regulation of epithelial and mesenchymal markers by dEF1 proteins in epithelial mesenchymal transition induced by TGF-beta. *Mol Biol Cell* **18**, 3533-3544.
222. Postigo AA (2003) Opposing functions of ZEB proteins in the regulation of the TGFbeta/BMP signaling pathway. *EMBO J*, **22**, 2443-52.
223. Postigo AA, Depp JL, Taylor JJ and Kroll KL (2003) Regulation of Smad signaling through a differential recruitment of coactivators and corepressors by ZEB proteins. *EMBO J.*, **22**, 2453-62.
224. Kang Y, Chen CR and Massagué J (2003) A self-enabling TGFbeta response coupled to stress signaling: Smad engages stress response factor ATF3 for Id1 repression in epithelial cells. *Mol Cell.* , **11**, 915-26.
225. Xu J, Lamouille S and Derynck R (2009) TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Res.* , **19**, 156-72.
226. Elloul S, Elstrand MB, Nesland JM, Tropé CG, Kvalheim G, Goldberg I, Reich R and Davidson B (2005) Snail, Slug, and Smad-interacting protein 1 as novel parameters of disease aggressiveness in metastatic ovarian and breast carcinoma. *Cancer.* , **103**, 1631-43.
227. Dorudi S, Hanby AM, Poulson R, Northover J and Hart IR (1995) Level of expression of E-cadherin mRNA in colorectal cancer correlates with clinical outcome. *Br J Cancer.*, **71**, 614-6.
228. Mohri Y (1997) Prognostic significance of E-cadherin expression in human colorectal cancer tissue. *Surg Today.*, **27**, 606-12.
229. Uchikado Y, Okumura H, Ishigami S, Setoyama T, Matsumoto M, Owaki T, Kita Y and Natsugoe S (2011) Increased Slug and decreased E-cadherin expression is related to poor prognosis in patients with gastric cancer. *Gastric Cancer.* , **14**, 41-9.
230. Tang XL, Sun JF, Wang XY, Du LL and Liu P (2010) Blocking neuropilin-2 enhances corneal allograft survival by selectively inhibiting lymphangiogenesis on vascularized beds. *Mol Vis.*, **16**, 2354-61.
231. Wong SC, Lo ES, Lee KC, Chan JK and Hsiao WL (2004) Prognostic and diagnostic significance of beta-catenin nuclear immunostaining in colorectal cancer. *Clin Cancer Res.*, **10**, 1401-8.
232. Wong SC, Lo ES, Chan AK, Lee KC and Hsiao WL (2003) Nuclear beta catenin as a potential prognostic and diagnostic marker in patients with colorectal cancer from Hong Kong. *Mol Pathol.*, **56**, 347-52.
233. Thomas PA, Kirschmann DA, Cerhan JR, Folberg R, Seftor EA, Sellers TA and Hendrix MJ (1999) Association between keratin and vimentin expression, malignant phenotype, and survival in postmenopausal breast cancer patients. *Clin Cancer Res.* , **5**, 2698-703.
234. Otsuki S, Inokuchi M, Enjoji M, Ishikawa T, Takagi Y, Kato K, Yamada H, Kojima K and Sugihara K (2011) Vimentin expression is associated with decreased survival in gastric cancer. *Oncol Rep.*, **25**, 1235-42.

235. Yoshinaga K, Inoue H, Utsunomiya T, Sonoda H, Masuda T, Mimori K, Tanaka Y and Mori M (2004) N-cadherin is regulated by activin A and associated with tumor aggressiveness in esophageal carcinoma. *Clin Cancer Res.* , **10**, 5702-7.
236. Lascombe I, Clairotte A, Fauconnet S, Bernardini S, Wallerand H, Kantelip B and Bittard H (2006) N-cadherin as a novel prognostic marker of progression in superficial urothelial tumors. *Clin Cancer Res.*, **12**, 2780-7.
237. Franke FE, Von Georgi R, Zygmunt M and Münstedt K (2003) Association between fibronectin expression and prognosis in ovarian carcinoma. *Anticancer Res.*, **23**, 4261-7.
238. Waldmann J, Feldmann G, Slater EP, Langer P, Buchholz M, Ramaswamy A, Saeger W, Rothmund M and Fendrich V (2008) Expression of the zinc-finger transcription factor Snail in adrenocortical carcinoma is associated with decreased survival. *Br J Cancer.*, **99**, 1900-7.
239. Miyoshi A, Kitajima Y, Kido S, Shimonishi T, Matsuyama S, Kitahara K and Miyazaki K (2005) Snail accelerates cancer invasion by upregulating MMP expression and is associated with poor prognosis of hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer.*, **92**, 252-8.
240. Shih JY, Tsai MF, Chang TH, Chang YL, Yuan A, Yu CJ, Lin SB, Liou GY, Lee ML, Chen JJ, Hong TM, Yang SC, Su JL, Lee YC and Yang PC (2005) Transcription repressor slug promotes carcinoma invasion and predicts outcome of patients with lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res.* , **11**, 8070-8.
241. Shibata K, Kajiyama H, Ino K, Terauchi M, Yamamoto E, Nawa A, Nomura S and Kikkawa F (2008) Twist expression in patients with cervical cancer is associated with poor disease outcome. *Ann Oncol.* , **19**, 81-5.
242. Hosono S, Kajiyama H, Terauchi M, Shibata K, Ino K, Nawa A and Kikkawa F (2007) Expression of Twist increases the risk for recurrence and for poor survival in epithelial ovarian carcinoma patients. *Br J Cancer.*, **96**, 314-20.
243. Ru GQ, Wang HJ, Xu WJ and Zhao ZS (2010) Upregulation of Twist in Gastric Carcinoma Associated with Tumor Invasion and Poor Prognosis. *Pathol Oncol Res.*
244. Hung JJ, Yang MH, Hsu HS, Hsu WH, Liu JS and Wu KJ (2009) Prognostic significance of hypoxia-inducible factor-1alpha, TWIST1 and Snail expression in resectable non-small cell lung cancer. *Thorax*, **64**, 1082-9.
245. Kim MA, Lee HS, Lee HE, Kim JH, Yang HK and Kim WH (2009) Prognostic importance of epithelial-mesenchymal transition-related protein expression in gastric carcinoma. *Histopathology.* , **54**, 442-51.
246. Yauch RL, Januario T, Eberhard DA, Cavet G, Zhu W, Fu L, Pham TQ, Soriano R, Stinson J, Seshagiri S, Modrusan Z, Lin CY, O'Neill V and Amler LC (2005) Epithelial versus mesenchymal phenotype determines in vitro sensitivity and predicts clinical activity of erlotinib in lung cancer patients. *Clin Cancer Res.*, **11**, 8686-98.
247. Frederick BA, Helfrich BA, Coldren CD, Zheng D, Chan D, Bunn PA Jr and Raben D (2007) Epithelial to mesenchymal transition predicts gefitinib resistance in cell lines of head and neck squamous cell carcinoma and non-small cell lung carcinoma. *Mol Cancer Ther.*, **6**, 1683-91.
248. Fuchs BC, Fujii T, Dorfman JD, Goodwin JM, Zhu AX, Lanuti M and Tanabe KK (2008) Epithelial-to-mesenchymal transition and integrin-linked kinase mediate sensitivity to epidermal growth factor receptor inhibition in human hepatoma cells. *Cancer Res.*, **68**, 2391-9.
249. Shah AN, Summy JM, Zhang J, Park SI, Parikh NU and Gallick GE (2007) Development and characterization of gemcitabine-resistant pancreatic tumor cells. *Ann Surg Oncol.*, **14**, 3629-37.
250. Yang AD, Fan F, Camp ER, van Buren G, Liu W, Somcio R, Gray MJ, Cheng H, Hoff PM and Ellis LM (2006) Chronic oxaliplatin resistance induces epithelial-to-mesenchymal transition in colorectal cancer cell lines. *Clin Cancer Res.*, **12**, 4147-53.

251. Wang X, Ling MT, Guan XY, Tsao SW, Cheung HW, Lee DT and Wong YC (2004) Identification of a novel function of TWIST, a bHLH protein, in the development of acquired taxol resistance in human cancer cells. *Oncogene.*, **23**, 474-82.
252. Olmeda D, Jordá M, Peinado H, Fabra A and Cano A (2007) Snail silencing effectively suppresses tumour growth and invasiveness. *Oncogene.*, **26**, 1862-74.
253. Feldmann G, Dhara S, Fendrich V, Bedja D, Beaty R, Mullendore M, Karikari C, Alvarez H, Iacobuzio-Donahue C, Jimeno A, Gabrielson KL, Matsui W and Maitra A (2007) Blockade of hedgehog signaling inhibits pancreatic cancer invasion and metastases: a new paradigm for combination therapy in solid cancers. *Cancer Res.*, **67**, 2187-96.
254. Krützfeldt J, Rajewsky N, Braich R, Rajeev KG, Tuschl T, Manoharan M and Stoffel M (2005) Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. *Nature.*, **438**, 685-9.
255. Roberts AB, Tian F, Byfield SD, Stuelten C, Ooshima A, Saika S and Flanders KC (2006) Smad3 is key to TGF-beta-mediated epithelial-to-mesenchymal transition, fibrosis, tumor suppression and metastasis. *Cytokine Growth Factor Rev.*, **17**, 19-27.
256. Moore LD, Isayeva T, Siegal GP and Ponnazhagan S (2008) Silencing of transforming growth factor-beta1 in situ by RNA interference for breast cancer: implications for proliferation and migration in vitro and metastasis in vivo. *Clin Cancer Res.*, **14**, 4961-70.
257. Halder SK, Beauchamp RD and Datta PK (2005) A specific inhibitor of TGF-beta receptor kinase, SB-431542, as a potent antitumor agent for human cancers. *Neoplasia.* , **7**, 509-21.
258. Behring E (1890) Über das Zustandekommen der Diphtherie-Immunität und der Tetanus-Immunität bei Thieren. *Deutsche Medicinische Wochenschrift*, **14**.
259. Roux M (1894) The Antitoxin Treatment of Diphtheria: M. Roux at the Institut Pasteur. *Br Med J.*, **2**, 931-3.
260. Porter RR (1967) The structure of antibodies. The basic pattern of the principal class of molecules that neutralize antigens (foreign substances in the body) is four cross-linked chains. This pattern is modified so that antibodies can fit different antigens. *Sci Am.* , **217**, 81-7.
261. Edelman GM (1970) The structure and function of antibodies. *Sci Am.* , **223**, 34-42.
262. Köhler G and Milstein C (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature.*, **256**, 495-7.
263. Kubota T, Niwa R, Satoh M, Akinaga S, Shitara K and Hanai N (2009) Engineered therapeutic antibodies with improved effector functions. *Cancer Sci.* , **100**, 1566-72.
264. Winter G and Milstein C (1991) Man-made antibodies. *Nature.*, **349**, 293-9.
265. Neuberger MS, Williams GT, Mitchell EB, Jouhal SS, Flanagan JG and Rabbitts TH (1985) A hapten-specific chimaeric IgE antibody with human physiological effector function. *Nature.*, **314**, 268-70.
266. Jones PT, Dear PH, Foote J, Neuberger MS and Winter G (1986) Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature.*, **321**, 522-5.
267. Chames P, Van Regenmortel M, Weiss E and Baty D (2009) Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future. *Br J Pharmacol.* , **157**, 220-33.
268. Weng WK and Levy R (2003) Two immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms independently predict response to rituximab in patients with follicular lymphoma. *J Clin Oncol.* , **21**, 3940-7.
269. Weng WK and Levy R (2003) Two immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms independently predict response to rituximab in patients with follicular lymphoma. *J Clin Oncol.* , **21**, 3940-7.
270. Cartron G, Dacheux L, Salles G, Solal-Celigny P, Bardos P, Colombat P and Watier H (2002) Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcγRIIIa gene. *Blood.*, **99**, 754-8.

271. Shinkawa T, Nakamura K, Yamane N, Shoji-Hosaka E, Kanda Y, Sakurada M, Uchida K, Anazawa H, Satoh M, Yamasaki M, Hanai N and Shitara K (2003) The absence of fucose but not the presence of galactose or bisecting N-acetylglucosamine of human IgG1 complex-type oligosaccharides shows the critical role of enhancing antibody-dependent cellular cytotoxicity. *J Biol Chem.*, **278**, 3466-73.
272. Sibénil S, de Romeuf C, Bihoreau N, Fernandez N, Meterreau JL, Regenman A, Nony E, Gaucher C, Glacet A, Jorieux S, Klein P, Hogarth MP, Fridman WH, Bourel D, Béliard R and Teillaud JL (2006) Selection of a human anti-RhD monoclonal antibody for therapeutic use: impact of IgG glycosylation on activating and inhibitory Fc gamma R functions. *Clin Immunol.*, **2-3**, 170-9.
273. Preithner S, Elm S, Lippold S, Locher M, Wolf A, da Silva AJ, Baeuerle PA and Prang NS (2006) High concentrations of therapeutic IgG1 antibodies are needed to compensate for inhibition of antibody-dependent cellular cytotoxicity by excess endogenous immunoglobulin G. *Mol Immunol.*, **43**, 1183-93.
274. Nimmerjahn F and Ravetch JV (2007) The antiinflammatory activity of IgG: the intravenous IgG paradox. *J Exp Med.* , **204**, 11-5.
275. Golay J, Zaffaroni L, Vaccari T, Lazzari M, Borleri GM, Bernasconi S, Tedesco F, Rambaldi A and Introna M (2000) Biologic response of B lymphoma cells to anti-CD20 monoclonal antibody rituximab in vitro: CD55 and CD59 regulate complement-mediated cell lysis. *Blood.*, **95**, 3900-8.
276. Treon SP, Mitsiades C, Mitsiades N, Young G, Doss D, Schlossman R and Anderson KC (2001) Tumor cell expression of CD59 is associated with resistance to CD20 serotherapy in patients with B-cell malignancies. *J Immunother.*, **24**, 263-71.
277. Terui Y, Sakurai T, Mishima Y, Mishima Y, Sugimura N, Sasaoka C, Kojima K, Yokoyama M, Mizunuma N, Takahashi S, Ito Y and Hatake K (2006) Blockade of bulky lymphoma-associated CD55 expression by RNA interference overcomes resistance to complement-dependent cytotoxicity with rituximab. *Cancer Sci.*, **97**, 72-9.
278. Müller M, Wilder S, Bannasch D, Israeli D, Lehlbach K, Li-Weber M, Friedman SL, Galle PR, Stremmel W, Oren M and Krammer PH (1998) p53 activates the CD95 (APO-1/Fas) gene in response to DNA damage by anticancer drugs. *J Exp Med.*, **188**, 2033-45.
279. Bennett M, Macdonald K, Chan SW, Luzio JP, Simari R and Weissberg P (1998) Cell surface trafficking of Fas: a rapid mechanism of p53-mediated apoptosis. *Science.* , **282**, 290-3.
280. Wu GS, Burns TF, McDonald ER 3rd, Jiang W, Meng R, Krantz ID, Kao G, Gan DD, Zhou JY, Muschel R, Hamilton SR, Spinner NB, Markowitz S, Wu G and el-Deiry WS (1997) KILLER/DR5 is a DNA damage-inducible p53-regulated death receptor gene. *Nat Genet.* , **17**, 141-3.
281. Thornborrow EC, Patel S, Mastropietro AE, Schwartzfarb EM and Manfredi JJ (2002) A conserved intronic response element mediates direct p53-dependent transcriptional activation of both the human and murine bax genes. *Oncogene.*, **21**, 990-9.
282. Oda E, Ohki R, Murasawa H, Nemoto J, Shibue T, Yamashita T, Tokino T, Taniguchi T and Tanaka N (2000) Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science.*, **288**, 1053-8.
283. Bird RE, Hardman KD, Jacobson JW, Johnson S, Kaufman BM, Lee SM, Lee T, Pope SH, Riordan GS and Whitlow M (1988) Single-chain antigen-binding proteins. *Science.*, **242**, 423-6.
284. Fischer N and Léger O (2007) Bispecific antibodies: molecules that enable novel therapeutic strategies. *Pathobiology.* , **74**, 3-14.
285. Holliger P, Prospero T and Winter G (1993) "Diabodies": small bivalent and bispecific antibody fragments. *Proc Natl Acad Sci U S A.* , **90**, 6444-8.

286. Seimetz D, Lindhofer H and Bokemeyer C (2010) Development and approval of the trifunctional antibody catumaxomab (anti-EpCAM x anti-CD3) as a targeted cancer immunotherapy. *Cancer Treat Rev.*, **36**, 458-67.
287. Ströhlein MA, Lordick F, Rüttinger D, Grützner KU, Schemanski OC, Jäger M, Lindhofer H, Hennig M, Jauch KW, Peschel C and Heiss MM (2011) Immunotherapy of Peritoneal Carcinomatosis with the Antibody Catumaxomab in Colon, Gastric, or Pancreatic Cancer: An Open-Label, Multicenter, Phase I/II Trial. *Onkologie.*, **34**, 101-8.
288. Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, Robinson G, Hamers C, Songa EB, Bendahman N and Hamers R (1993) Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature.* , **363**, 446-8.
289. Dooley H, Flajnik MF and Porter AJ (2003) Selection and characterization of naturally occurring single-domain (IgNAR) antibody fragments from immunized sharks by phage display. *Mol Immunol.*, **40**, 25-33.
290. Blick SK and Curran MP (2007) Certolizumab pegol: in Crohn's disease. *BioDrugs.*, **21**, 195-201.
291. Müller D, Karle A, Meissburger B, Höfig I, Stork R and Kontermann RE (2007) Improved pharmacokinetics of recombinant bispecific antibody molecules by fusion to human serum albumin. *J Biol Chem.* , **282**, 12650-60.
292. Stork R, Zettlitz KA, Müller D, Rether M, Hanisch FG and Kontermann RE (2008) N-glycosylation as novel strategy to improve pharmacokinetic properties of bispecific single-chain diabodies. *J Biol Chem.*, **283**, 7804-12.
293. Robinson MK, Shaller C, Garmestani K, Plascjak PS, Hodge KM, Yuan QA, Marks JD, Waldmann TA, Brechbiel MW and Adams GP (2008) Effective treatment of established human breast tumor xenografts in immunodeficient mice with a single dose of the alpha-emitting radioisotope astatine-211 conjugated to anti-HER2/neu diabodies. *Clin Cancer Res*, **14**, 875-82.
294. Adams GP, Shaller CC, Dadachova E, Simmons HH, Horak EM, Tesfaye A, Klein-Szanto AJ, Marks JD, Brechbiel MW and Weiner LM (2004) A single treatment of yttrium-90-labeled CHX-A"-C6.5 diabody inhibits the growth of established human tumor xenografts in immunodeficient mice. *Cancer Res.*, **64**, 6200-6.
295. Onda M, Nagata S, FitzGerald DJ, Beers R, Fisher RJ, Vincent JJ, Lee B, Nakamura M, Hwang J, Kreitman RJ, Hassan R and Pastan I (2006) Characterization of the B cell epitopes associated with a truncated form of Pseudomonas exotoxin (PE38) used to make immunotoxins for the treatment of cancer patients. *J Immunol.*, **177**, 8822-34.
296. Ebbinghaus C, Ronca R, Kaspar M, Grabulovski D, Berndt A, Kosmehl H, Zardi L and Neri D (2005) Engineered vascular-targeting antibody-interferon-gamma fusion protein for cancer therapy. *Int J Cancer.* , **116**, 304-13.
297. Gillies SD, Lan Y, Williams S, Carr F, Forman S, Raubitschek A and Lo KM (2005) An anti-CD20-IL-2 immunocytokine is highly efficacious in a SCID mouse model of established human B lymphoma. *Blood.* , **105**, 3972-8.
298. Willemsen RA, Weijtens ME, Ronteltap C, Eshhar Z, Gratama JW, Chames P and Bolhuis RL (2000) Grafting primary human T lymphocytes with cancer-specific chimeric single chain and two chain TCR. *Gene Ther.* , **7**, 1369-77.
299. Elinav E, Adam N, Waks T and Eshhar Z (2009) Amelioration of colitis by genetically engineered murine regulatory T cells redirected by antigen-specific chimeric receptor. *Gastroenterology.*, **136**, 1721-31.
300. Chen SY, Bagley J and Marasco WA (1994) Intracellular antibodies as a new class of therapeutic molecules for gene therapy. *Hum Gene Ther.*, **5**, 595-601.
301. Harlow E and Lane D (1991) *Anticorps, un manuel de laboratoire.*

302. Siberil S, Dutertre CA, Boix C and Teillaud JL (2005) Therapeutic monoclonal antibodies: a little history, a lot of engineering, and... some clinical successes. *Transfus Clin Biol.*, **12**, 114-22.
303. Cao Y, Wang L, Nandy D, Zhang Y, Basu A, Radisky D and D, M. (2008) Neuropilin-1 Upholds Dedifferentiation and Propagation Phenotypes of Renal Cell Carcinoma Cells by Activating Akt and Sonic Hedgehog Axes. *Cancer Research*, **68**, 8667-8672.
304. Lohela M, Bry M, Tammela T and Alitalo K (2009) VEGFs and receptors involved in angiogenesis versus lymphangiogenesis. *Curr Opin Cell Biol.* , **21**, 154-65.
305. Hendrix MJ, Seftor EA, Seftor RE and Trevor KT (1997) Experimental co-expression of vimentin and keratin intermediate filaments in human breast cancer cells results in phenotypic interconversion and increased invasive behavior. *Am J Pathol.*, **150**, 483-95.
306. Brabletz T, Jung A, Reu S, Porzner M, Hlubek F, Kunz-Schughart LA, Knuechel R and Kirchner T (2001) Variable beta-catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 10356-61.
307. Peinado H, Olmeda D and Cano A (2007) Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer.* , **7**, 415-28.
308. Varnat F, Duquet A, Malerba M, Zbinden M, Mas C, Gervaz P and Ruiz i Altaba A (2009) Human colon cancer epithelial cells harbour active HEDGEHOG-GLI signalling that is essential for tumour growth, recurrence, metastasis and stem cell survival and expansion. *EMBO Mol Med.*, **1**, 338-51.
309. Fernando RI, Litzinger M, Trono P, Hamilton DH, Schlom J and Palena C (2010) The T-box transcription factor Brachyury promotes epithelial-mesenchymal transition in human tumor cells. *J Clin Invest.*, **120**, 533-44.
310. Pino MS, Kikuchi H, Zeng M, Herraiz MT, Sperduti I, Berger D, Park DY, lafrate AJ, Zukerberg LR and Chung DC (2009) The epithelial to mesenchymal transition is impaired in colon cancer cells with microsatellite instability. *Gastroenterology*.
311. Lee JD, Hempel N, Lee NY and Blobel GC (2010) The type III TGF-beta receptor suppresses breast cancer progression through GIPC-mediated inhibition of TGF-beta signaling. *Carcinogenesis.*, **31**, 175-83.
312. Lee NY, Ray B, How T and Blobel GC (2008) Endoglin promotes transforming growth factor beta-mediated Smad 1/5/8 signaling and inhibits endothelial cell migration through its association with GIPC. *J Biol Chem.* , **283**, 32527-33.
313. Gordon KJ, Dong M, Chislock EM, Fields TA and Blobel GC (2008) Loss of type III transforming growth factor beta receptor expression increases motility and invasiveness associated with epithelial to mesenchymal transition during pancreatic cancer progression. *Carcinogenesis.*, **29**, 252-62.
314. Gonzalez-Moreno O, Lecanda J, Green JE, Segura V, Catena R, Serrano D and Calvo A (2010) VEGF elicits epithelial-mesenchymal transition (EMT) in prostate intraepithelial neoplasia (PIN)-like cells via an autocrine loop. *Exp Cell Res.* , **316**, 554-67.
315. Yang AD, Camp ER, Fan F, Shen L, Gray MJ, Liu W, Somcio R, Bauer TW, Wu Y, Hicklin DJ and Ellis LM (2006) Vascular endothelial growth factor receptor-1 activation mediates epithelial to mesenchymal transition in human pancreatic carcinoma cells. *Cancer Res.*, **66**, 46-51.
316. Yi ZY, Feng LJ, Xiang Z and Yao H (2011) Vascular endothelial growth factor receptor-1 activation mediates epithelial to mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma cells. *J Invest Surg.*, **24**, 67-76.
317. Li Y, Yang X, Su LJ and Flaig TW (2010) VEGFR and EGFR inhibition increases epithelial cellular characteristics and chemotherapy sensitivity in mesenchymal bladder cancer cells. *Oncol Rep.*, **24**, 1019-28.

318. Nasarre P, Kusy S, Constantin B, Castellani V, Drabkin HA, Bagnard D and Roche J (2005) Semaphorin SEMA3F has a repulsing activity on breast cancer cells and inhibits E-cadherin-mediated cell adhesion. *Neoplasia*. , **7**, 180-9.
319. Wang L, Dutta SK, Kojima T, Xu X, Khosravi-Far R, Ekker SC and Mukhopadhyay D (2007) Neuropilin-1 modulates p53/caspases axis to promote endothelial cell survival. *PLoS One.*, **2**.
320. Bartel DP (2009) MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell.* , **136**, 215-33.
321. Schickel R, Park SM, Murmann AE and Peter ME (2010) miR-200c regulates induction of apoptosis through CD95 by targeting FAP-1. *Mol Cell.*, **38**, 908-15.
322. Elnemr A, Ohta T, Yachie A, Kayahara M, Kitagawa H, Fujimura T, Ninomiya I, Fushida S, Nishimura GI, Shimizu K and Miwa K (2001) Human pancreatic cancer cells disable function of Fas receptors at several levels in Fas signal transduction pathway. *Int J Oncol.*, **18**, 311-6.
323. Foehr ED, Lorente G, Vincent V, Nikolich K and Urfer R (2005) FAS associated phosphatase (FAP-1) blocks apoptosis of astrocytomas through dephosphorylation of FAS. *J Neurooncol.*, **74**, 241-8.
324. Chang CJ, Chao CH, Xia W, Yang JY, Xiong Y, Li CW, Yu WH, Rehman SK, Hsu JL, Lee HH, Liu M, Chen CT, Yu D and Hung MC (2011) p53 regulates epithelial-mesenchymal transition and stem cell properties through modulating miRNAs. *Nat Cell Biol.*, **13**, 317-23.

ANNEXE

Review

Neuropilins: A New Target for Cancer Therapy

Camille Grandclement^{1,2,3,*} and Christophe Borg^{1,2,3,4}

¹ INSERM UMR 645, F-25020 Besançon, France

² University of Franche-Comté, IFR133, F-25020 Besançon, France

³ EFS Bourgogne Franche-Comté, F-25020 Besançon, France

⁴ Department of Medical Oncology, CHU Besançon, F-25000 Besançon, France;

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail:

camille.grandclement@gmail.com; Tel.: +33-3-81-61-56-15 or +33-3-81-66-93-21; Fax:
+33-3-81-61-56-17.

Received: 23 February 2011; in revised form: 23 March 2011 / Accepted: 1 April 2011 /

Published: 8 April 2011

Abstract: Recent investigations highlighted strong similarities between neural crest migration during embryogenesis and metastatic processes. Indeed, some families of axon guidance molecules were also reported to participate in cancer invasion: plexins/semaphorins/neuropilins, ephrins/Eph receptors, netrin/DCC/UNC5. Neuropilins (NRPs) are transmembrane non tyrosine-kinase glycoproteins first identified as receptors for class-3 semaphorins. They are particularly involved in neural crest migration and axonal growth during development of the nervous system. Since many types of tumor and endothelial cells express NRP receptors, various soluble molecules were also found to interact with these receptors to modulate cancer progression. Among them, angiogenic factors belonging to the Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) family seem to be responsible for NRP-related angiogenesis. Because NRPs expression is often upregulated in cancer tissues and correlated with poor prognosis, NRPs expression might be considered as a prognostic factor. While NRP1 was intensively studied for many years and identified as an attractive angiogenesis

target for cancer therapy, the NRP2 signaling pathway has just recently been studied. Although NRP genes share 44% homology, differences in their expression patterns, ligands specificities and signaling pathways were observed. Indeed, NRP2 may regulate tumor progression by several concurrent mechanisms, not only angiogenesis but lymphangiogenesis, epithelial-mesenchymal transition and metastasis. In view of their multiples functions in cancer promotion, NRPs fulfill all the criteria of a therapeutic target for innovative anti-tumor therapies. This review focuses on NRP-specific roles in tumor progression.

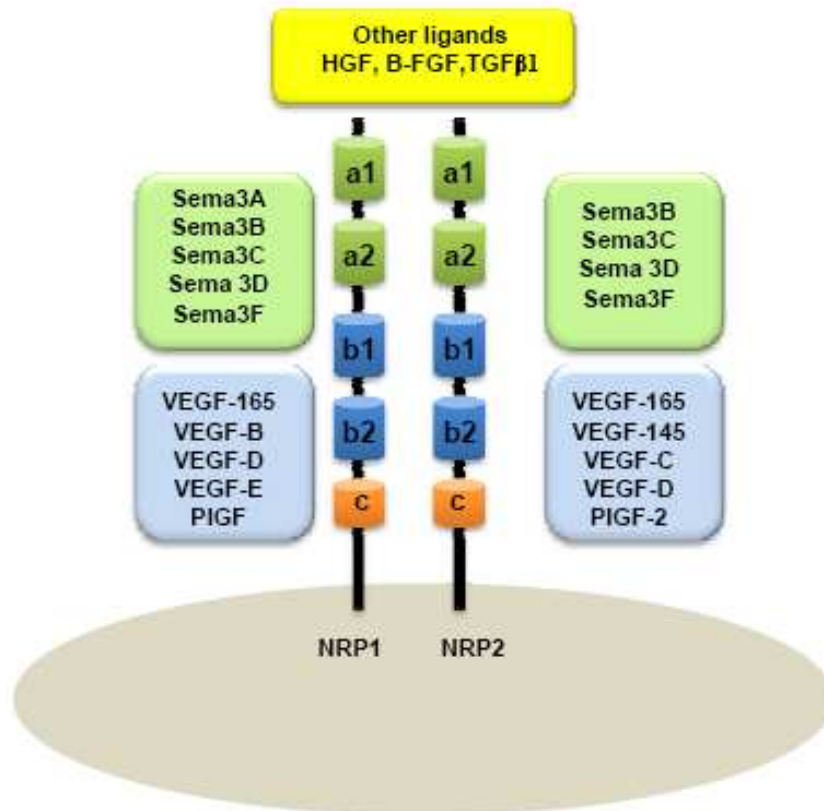
Keywords: neuropilins; cancer; angiogenesis; lymphangiogenesis; targeted therapies

1. Introduction

Neuropilins (NRPs; previously known as A5 protein) were first identified by Takagi *et al.* in 1987 by immunofluorescent staining of frozen sections of *Xenopus* tadpole nervous system [1]. This glycoprotein of 130–140 kDa, highly conserved among vertebrates, was then isolated in the nervous developing system of a broad spectrum of animal species, such as chicken [2,3], mice [4], and rats [5,6]. While NRP1 was the first member of the NRP family to be described, NRP2 was rapidly isolated by Chen *et al.* in 1997, by RT-PCR and gene transfer [7].

A major distinction between these two members of the NRP family is based on their ligand specificities. NRPs were originally described as high-affinity cell-surface receptors for axon guidance molecules such as class-3 semaphorins (Sema) [6]. Indeed, NRP1 is a receptor for semaphorin-3A, 3C, 3F [5,6] while NRP2 preferentially binds Semaphorin 3B, 3C, 3D, 3F [7,8] (Figure 1).

Figure 1. Neuropilins (NRPs) and their ligands. Class-3 semaphorins bind a1/a2 sub-units (green) whereas vascular-endothelial growth factors preferentially bind b1/b2 sub-units (blue). Other growth factors such as HGF, B-FGF, TGF β 1 have been recently reported to bind both NRPs (yellow).



Several analyses using mutant mice lacking NRPs function subsequently conferred to semaphorin/neuropilin an essential role in axon guidance during nervous system development [8-11].

In vivo models using NRPs transgenes also suggested other essential functions of NRPs. Indeed, overexpression of NRP1 in chimeric mice generated an excess of capillaries and blood vessels, suggesting an important role of NRP1 in angiogenesis and vasculogenesis [12]. In contrast, NRP1 null-mutant embryos showed severe types of vascular defects, especially in neuronal vasculature, yolk sac vessel network organization, aortic arch development [13] and in the cardiovascular system, resulting in death of homozygous embryos at E12.5 to E13.5 [13,14]. NRP2 knock-out mice are viable suggesting that NRP2 is not essential for vascular development, unlike NRP1 [9,11]. Moreover, NRP2 homozygous mutant mice are characterized by abnormal lymphatic and capillary development suggesting a selective requirement for NRP2 in the formation of lymphatic vessels [15]. However, double knock-out of NRPs genes (NRP1^{-/-} NRP2^{-/-}) constitutes the most severe phenotype observed, impairing any blood vessel development and causing earliest death *in utero* at E8.5 [14].

Because Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) plays a central role in the development of vascular network, interactions between NRPs and VEGF were rapidly considered. NRPs were indeed found to be receptors for several members of the VEGF family. NRP1 can effectively bind VEGF₁₆₅, PIGF-2 (Placenta Growth Factor), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D and VEGF-E [16-21], whereas NRP2 is a receptor for VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, PIGF-2 [18,22], VEGF-C [20,22], and VEGF-D [20]. NRPs are also reported to bind diverse

heparin-growth factors, such as FGF (Fibroblast Growth Factor) and HGF (Hepatocyte Growth Factor) [23,24] (Figure 1).

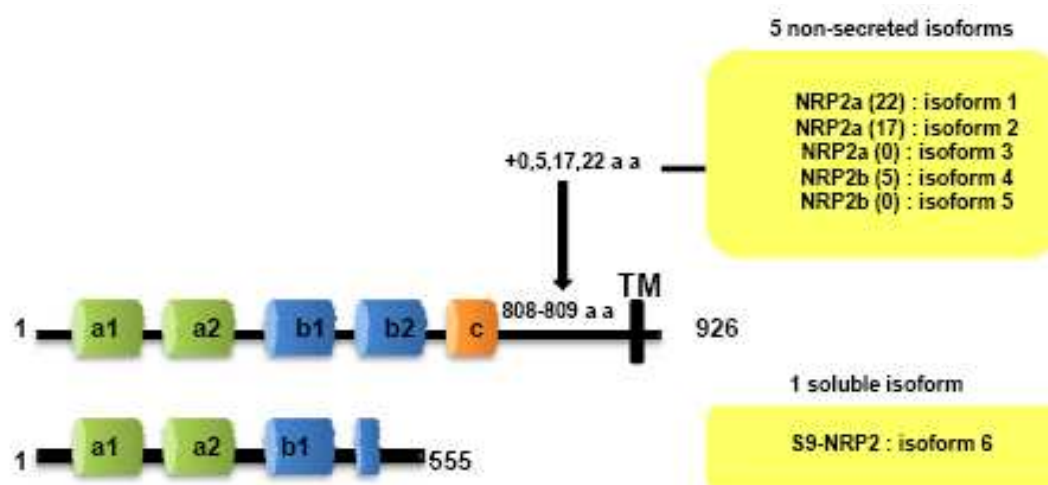
2. NRPs: Structural Particularities

In humans, NRP1 and NRP2 genes map to two different chromosomes: Chromosomes 10p12 and 2q34, respectively [25]. Although NRPs share only 44% homology in their amino acid sequences, some similarities to known proteins can be observed in their structure. NRPs are composed of an extracellular domain, transmembrane domain and a short intracellular domain. Indeed, the extracellular domain is composed of two Complement Binding motifs (CUB), homologous to the C1r and C1s complement components (named domains a1 and a2), two domains b1 and b2 homologous to the coagulation factors V and VIII and one third domain, c, homologous to the meprin domain sharing a tyrosine phosphatase activity μ [4,26]. a1/a2 domains are responsible for semaphorin binding, whereas b1/b2 are suggested for both VEGF and semaphorin binding. c-domain is involved in dimerization of the receptor [8] (Figure 1). Because NRPs have a short intracellular domain of only 40 amino acids, it was assumed that they cannot transmit any signal on their own.

2.1. Isoforms

Both NRPs genes are composed of 17 exons. Contrary to NRP1, NRP2 is expressed as several alternatively spliced forms. In particular, two isoforms of NRP2, NRP2a and NRP2b, that arise by alternative splicing, have been described subsequently in mouse [7] and humans [25]. Divergences between NRP2a and NRP2b are principally observed in the linker between transmembrane and cytoplasmic domains. NRP2 subisoforms were subsequently described by Chen [7] and Rossignol [25]. Insertions of 17 or 22 amino acids after amino acid 809 are described for NRP2a (NRP2a₍₁₇₎, NRP2a₍₂₂₎) whereas NRP2b is characterized by insertions of 0 or 5 amino acids after amino acid 808 (NRP2b₍₀₎, NRP2b₍₅₎) (Figure 2). NRP2a seems to be closer to NRP1 (44% homology) than NRP2b (11%) [25].

Figure 2. NRP2 transcript variants encode distinct isoforms.



2.2. Soluble Forms

Two soluble forms of NRP1 (s_{11} NRP1 and s_{12} NRP1) and one of NRP2 (s_9 NRP2) were cloned by Rossignol and collaborators [25]. Later, two novel soluble forms of NRP1, s_{III} NRP1 and s_{IV} NRP1 were characterized [27]. While these soluble isoforms have conserved their extracellular domains responsible for ligand binding, c-domain, transmembrane and intracellular domains were lacking. Moreover, Gagnon *et al.*, reported that s_{11} NRP1 is capable of tumor cell apoptosis by antagonizing VEGF binding, suggesting that sNRPs and NRPs have opposite functions [28].

3. Neuropilins Expression Pattern

3.1. Embryogenesis

First reports limited NRPs expression in the nervous developing tissues [1,2,4,7,29]. Indeed, Chen *et al.* observed increased NRP2 expression in most components of the developing nervous system including spinal cord, sympathetic ganglia, olfactory system, neocortex, hippocamp [7].

NRP were also found in development of many non neuronal tissues such as bones, several muscles, intestinal epithelium, kidney, lung, dorsal aorta [7]. Moreover, knock-out studies have suggested an important role of the NRPs in the development of the vascular system during embryogenesis. While NRP1 is preferentially expressed in arteries during embryonic development, NRP2 is required for the formation of veins and lymphatic vessels [12,15].

3.2. Immune System

NRP1 was rapidly identified on various immune cells such as some subpopulations of T lymphocytes and on dendritic cells (DC) *in vitro* and *in vivo* [30]. In this immune context, NRP1 enhances cell-cell interaction, especially in mediating DC-induced proliferation of resting T cells [30]. NRP1 is expressed by CD4+CD25+ murine regulatory T cells but not by naïve T cells [31]. When expressed on murine T reg cells, NRP1 inhibits T cell proliferation [32]. However, Milpied *et al.* observed in 2009 that NRP1 expression on murine T reg could not be extended in human [33]. On the other hand, NRP2's contribution in the immune system was only very recently studied. NRP2 is expressed on a polysialylated form on mature human DC [34]. Because polysialylation of proteins is a very rare phenomenon, its role has not been extensively characterized. However, polysialylation of NRP2 on DC seems to be essential for CCL21-dependent DC migration (CCL21: Chemokine C-C motif Ligand 21) to the lymph nodes during immune response [35,36].

3.3. Human Tumors

The contribution of NRPs in angiogenesis prompted the investigation of NRP's role in oncogenesis. Besides the presence of NRPs on tumor-associated vessels, authors have reported the wide expression of NRPs among different human tumors, suggesting a potential role of this molecular network in cancer progression. In 1998, Soker *et al.* isolated NRP1 from endothelial cells and tumor tissues [21]. Indeed, NRPs expression is not restricted in intra-tumoral vessels, but a large variety of cancer cells are reported to express one or both NRPs. Moreover, NRPs are often the only VEGF-receptors expressed by tumor cells [37,38], conferring an essential role of these glycoproteins as growth factor receptors. Although NRP1 is expressed by a large variety of tumors, even less is known concerning the expression of NRP2 (Table 1). However, NRP2 expression was found in osteosarcomas [39], melanomas [40], lung cancers [41,42], brain tumors [43,44] colon cancers [45], pancreatic cancers [46-49], breast cancers [50], myeloid leukemias [51], salivary adenoid cystic carcinomas (SACCs) [52], infantile hemangiomas [53], ovarian neoplasms [54] and bladder cancers [55] (Table 1).

Table 1. Neuropilins (NRPs) expression in cancer cells.

Tumors	NRP1	NRP2	References
Brain tumors			
Astrocytomas	x	ND	Ding H <i>et al.</i> , 2000 [56]
Neuroblastomas	x	x	Fakhari M <i>et al.</i> [44]
Gliomas	x	x	Rieger J <i>et al.</i> , 2003 [43]
	x	ND	Osada H <i>et al.</i> , 2004 [54]
Glioblastomas	x	ND	Broholm H <i>et al.</i> , 2004 [57]
Pituitary tumors	x	ND	Onofri C <i>et al.</i> , 2006 [58]
Digestive tumors			

Endocrine pancreatic tumors	ND	x	Cohen T <i>et al.</i> , 2002 [47]
Pancreatic adenocarcinomas	x	ND	Parikh AA <i>et al.</i> , 2003 [59]
	x	x	Fukahi K <i>et al.</i> , 2004 [48]
	x	x	Li M <i>et al.</i> , 2004 [49]
	x	ND	Feurino LW <i>et al.</i> , 2007 [60]
	x	x	Dallas NA <i>et al.</i> , 2008 [46]
Gastric cancer	x	ND	Akagi M <i>et al.</i> , 2003 [61]
	x	ND	Hansel DE <i>et al.</i> , 2004 [62]
Colon cancer	x	ND	Parikh AA <i>et al.</i> , 2004 [63]
	x	ND	Ochiumi T <i>et al.</i> , 2006 [64]
	ND	x	Gray MJ <i>et al.</i> , 2008 [45]
Leukemias			
Acute Myeloid Leukemia (AML)	x	ND	Kreuter M <i>et al.</i> , 2006 [65]
	x	ND	Kreuter M <i>et al.</i> , 2007 [66]
	x	x	Vales A <i>et al.</i> , 2007 [51]
	x	ND	Lu L <i>et al.</i> , 2007 [67]
Chronic lymphocytic leukemia B	x	ND	Nowakowski GS <i>et al.</i> , 2008 [68]
Other solid tumors			
Breast cancers	x	ND	Stephenson JM <i>et al.</i> , 2002 [69]
	x	ND	Ghosh M <i>et al.</i> , 2008 [70]
NSCLC	x	x	Kawakami T <i>et al.</i> , 2002 [41]
	x	x	Lantuejoul S <i>et al.</i> , 2003 [71]
Lung cancers	x	x	Tomizawa <i>et al.</i> , 2001 [42]
Melanomas	x	x	Lacal PM <i>et al.</i> , 2000 [40]
	x	ND	Straume O <i>et al.</i> , 2003 [72]
Prostate cancers	x	ND	Latil A <i>et al.</i> , 2000 [73]
	x	ND	Vanveldhuizen PJ <i>et al.</i> , 2003 [74]
Laryngeal carcinomas and papillomas	x	ND	Zhang S <i>et al.</i> , 2006 [75]
Salivary adenoid cystic carcinoma	ND	x	Cai Y <i>et al.</i> , 2010 [52]
Infantile hemangiomas	ND	x	Calicchio ML <i>et al.</i> , 2009 [53]
Ovarian carcinomas	x	ND	Hall GH <i>et al.</i> , 2005 [76]
	x	x	Osada R <i>et al.</i> , 2006 [54]
	x	ND	Baba T <i>et al.</i> , 2007 [77]
Bladder cancers	ND	x	Sanchez Carbayo M <i>et al.</i> , 2003 [55]
Osteosarcomas	ND	x	Handa <i>et al.</i> , 2000 [39]

3.4. Regulation of Neuropilins Expression

NRP1 expression was promoted by hypoxia in several models [78-80] and by ischemia in rats [81], and in mice [82]. Moreover, several growth factors and inflammatory cytokines are involved in NRP regulation too: In pancreatic cancer cells, IL-6 enhances NRP1 expression [60] whereas IL-8 increases NRP2 expression via activation of ERK1/2 pathway [83]. TNF α was shown to upregulate VEGFR2 and NRP1 in human vascular endothelial cells [84]. While TGF- β 1 and IL-1 β inhibit NRP1 expression, TGF- β 1 stimulates NRP2 expression in human proximal tubular cells through activation of MEK1/2-ERK1/2 pathway [85]. Oncostatin M activates both NRP1 and NRP2 expression [85].

4. Neuropilins Role in Oncogenesis

NRPs display a short intracytoplasmic tail of 40 amino acids which does not contain any kinase domain, leading to the suggestion that neuropilins can not directly transmit intracellular signals. This led to the proposal that hetero-dimerization with other membrane receptors are required to mediate neuropilin-downstream signaling.

4.1. Interactions with Plexins/Semaphorins

Semaphorins (Sema, also known as collapsins) are subdivided into eight classes, on the basis of structural similarities. Class 1 and 2 constitutes invertebrate semaphorins, whereas classes 3 to 7 comprise vertebrate semaphorins [86]. All semaphorins are characterized by an identical N-terminal 500-amino-acid-long sema domain, which is essential for semaphorin signaling. The structure of the sema domain is a seven-blade β -propeller fold which presented similarities with extracellular domain of α -integrins [87]. Next to the sema domain, semaphorins contain several distinct domains in their structure, such as a plexin-semaphorin-integrin domain (PSI), an immunoglobulin-like, a thrombospondin and a basic-C domains [88]. Class-3 semaphorins are secreted semaphorins characterized by a basic-charged domain at the C-terminus. Classes 4–7 semaphorins are membrane-bound semaphorins which are characterized by thrombospondin repeats (class-5 semaphorins) or glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor (class-7 semaphorins). Membrane-bound semaphorins can be cleaved into soluble forms through proteolytic degradation [89]. Two high affinity receptors have been identified for semaphorins: Plexins and Neuropilins. Various studies indicate that plexins are required for class 3 semaphorin/neuropilins signaling pathway during both embryonic development and tumorigenesis.

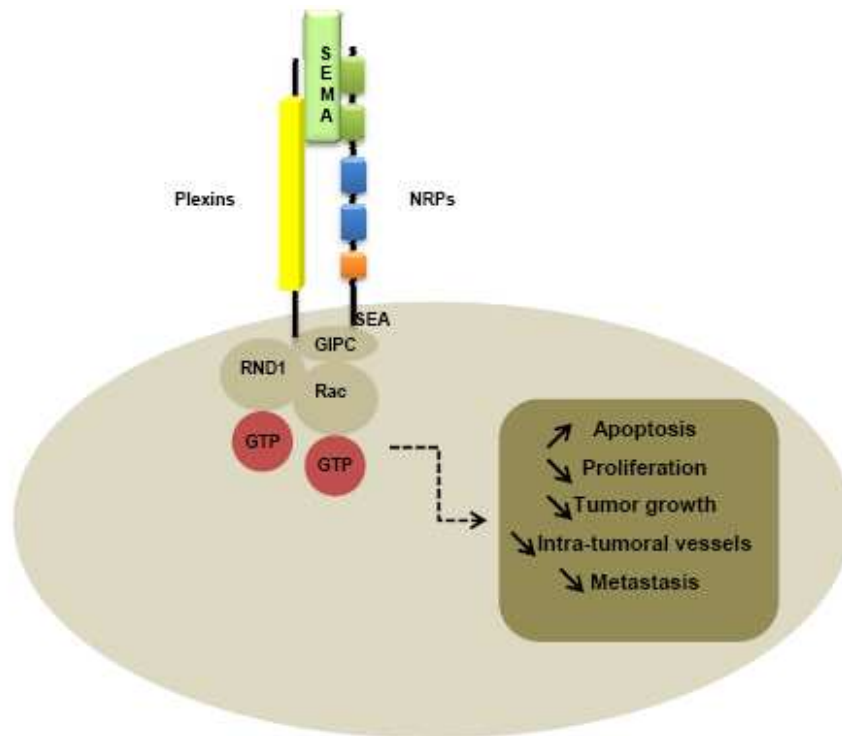
Plexin family is the first class of co-receptor identified. Plexins have been identified like NRPs, from immunostaining of *Xenopus* tadpoles nervous tissue [1]. While plexins play an important role in axon guidance [90] by forming complexes with NRPs [91,92], plexins have been identified on various tumor tissues, suggesting a role in tumorigenesis [93,94]. Nine

members of the plexin family have been identified, subdivided into four subfamilies comprising four type-A plexins, three type-B plexins, plexin C1 and plexin D1. Plexins can transduce intracellular signals through activation of Rho-like GTPases, such as Rnd1 for plexin A1 and Rac1 for plexin B1 [95-97]. Moreover, type B plexins contain a binding site for a PDZ domain in the C-terminal domain [98-100]. The extracellular domains of all plexins are characterized by the presence of a sema domain, and by the presence of PSI and glycine-proline (G-P)-rich motifs [86]. Membrane-bound semaphorins can directly bind to the plexins, whereas secreted semaphorins such as class-3 semaphorins required NRPs as co-receptor to mediate the signal [86].

Like type-B plexins, NRPs contain a binding site for PDZ domains in the C-terminal domain. Indeed, the PDZ domain of NIP, also called GIPC (GAIP interacting protein at the C terminus), is thought to be implicated in interaction with NRPs and plexins, activating small GTPase-activating proteins [101]. In particular, the last three amino-acids SEA of the C-terminal sequence of NRPs seem to be responsible for interaction with G-interacting proteins [101] (Figure 3).

Semaphorins are reported to be very often down-regulated or mutated in human cancers, allowing massive VEGF/NRPs interactions. Because semaphorins are frequently inactivated by allele loss or promoter methylation, they have been rapidly considered to function as a TSG (tumor suppressor gene). Indeed, deletions occur in the region 3p21.3 of the short arm of chromosome 3, a region encoding for Sema3B and Sema3F in various cancers, including lung cancer and even ovarian cancer [102-104]. Moreover, semaphorin promoter hypermethylation and various mutations occur in lung and breast cancers [42,105-108].

Figure 3. NRPs cooperate with class 3 semaphorins and plexins in endothelial and cancer cells.



4.1.1. Semaphorin 3A

First, Bagnard *et al.* reported that Semaphorin 3A (Sema3A) mediates cell repulsion and can even induce cell death in a neuroectodermal progenitor cell line, both effects depending on interactions with NRP1 [109]. When Sema3A is added to the culture medium of Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC) cells for 48 h with VEGF₁₆₅, cell survival decreases. NRP1 is implicated in this Sema3A-mediated apoptosis [110]. Moreover, Sema3A has been implicated directly in Fas-mediated apoptosis in a recent study [111]. After a stimulation of leukemic T cells by Sema3A, Fas localizes into the lipid rafts and sensitizes these T cells to FasL-mediated apoptosis [111] (Table 2).

Table 2. Class 3 semaphorins expression and function in tumor cells.

Semaphorins	Cells	Activity	References
Sema3A	Neural progenitor cells	Induction of cell repulsion and cell death	Bagnard D, 2001[109]
	Endothelial cells	Induction of apoptosis	Guttmann-Raviv N, 2007 [110]
	Leukemic T cells	Relocalization of Fas into the lipid raft	Moretti S, 2008 [111]
	Breast cancer cells	Inhibition of tumor growth, of intra-tumor vasculature	Kigel B, 2008 [112]
	Breast tumor cells	Inhibition of cell migration, increase of alpha2beta1 integrin level	Pan H, 2009 [127]
	murine pancreatic cells	Inhibition of tumor growth, of intra-tumor vasculature	Maione F, 2009 [113]
	murine mammary carcinoma cells	Inhibition of tumor growth, of intra-tumor vasculature and metastasis	Casazza A, 2011 [114]
Sema3B	Lung cancer cells	Inhibition of growth and induction of apoptosis	Tomizawa, 2001 [42]
	Ovarian adenocarcinoma cell line	Diminution of tumorigenicity in xenografts experiments, diminution of colony formation and cell proliferation	Tse C, 2002 [115]
	Lung and breast cancer cells	Induction of apoptosis	Castro-Rivera E, 2004, 2008 [116, 117]
	Breast cancer cells	NRP1-sema3B interactions increase IL8 production in tumor cells, promoting invasion and metastasis	Rolny C, 2008 [118]
Sema3D	Breast cancer cells	Inhibition of tumor progression	Kigel B, 2008 [112]
Sema3E	Breast cancer cells	Increase of tumor growth, metastasis	Christensen C, 2005 [126]
Sema3F	Lung cancer cells	Role in cell motility and cell adhesion	Brambilla E, 2000 [119]
	Small cell lung cancer cells, ovarian adenocarcinoma	Diminution of tumorigenicity in xenografts experiments, induction of apoptosis	Xiang R, 2002 [120]
	Breast cancer cells	Inhibition of cell migration	Nasarre P, 2003 [128]
	Endothelial, renal cancer cells	Inhibition of cell proliferation, inhibition of angiogenesis <i>in vivo</i>	Kessler O, 2004 [122]
	Melanomas	Inhibition of metastasis, of intra-tumor vessels and induction of large areas of apoptosis <i>in vivo</i>	Bielenberg BR, 2004[123]

	Breast cancer cells	Induction of cell repulsion, inhibition of cell contacts and proliferation	Nasarre P, 2005 [125]
	Lung cancer cells	Enhances survival in xenografts experiment	Kusy S, 2005 [121]
	Melanomas	Inhibition of cell proliferation	Chabbert-de Ponnat I, 2006 [124]
	Breast and melanoma cancer cells	Inhibition of tumor progression <i>in vivo</i>	Kigel B, 2008 [112]

In another study, Kigel and colleagues transfected breast cancer cells expressing NRP1 and-or NRP2 with each semaphorin to analyze their role in tumor progression in xenograft experiments [112]. *Sema3A*, *sema3D*, *sema3E* and *sema3G* overexpression in breast cancer cells significantly inhibits the development of tumor in xenograft models and decreases the number of intra-tumor blood vessels, suggesting an anti-angiogenic role of these molecules [112]. In this model, the anti-tumor effect of each of the semaphorins correlated very well with the expression of the related receptor on tumor cells [112]. Furthermore, in a very recent study using multiple murine models of tumorigenesis, Maione and collaborators showed that inhibition of *sema3A* in the later stages of carcinogenesis is responsible for enhanced angiogenesis and tumor progression [113]. By contrast, restoration of *Sema3A* expression in these cells normalizes intra-tumor vasculature, indicating that *Sema3A* could be used as a potential anti-angiogenic agent [113]. In another recent study, *Sema3A* role in tumor progression and in tumor angiogenesis was evaluated using three experimental approaches, using different systems for the release of the semaphorins [114]. In all experiments, NRP1 seems to be essential for *Sema3A*-mediated inhibition of tumor growth, angiogenesis and metastasis [114] (Table 2).

4.1.2. Semaphorin 3B

In lung and ovarian cancer cells, Semaphorin 3B (*Sema3B*) expression decreases colony formation, proliferation, and even tumorigenicity in murine xenograft experiments [42,115]. Similarly, *Sema3B* was shown to induce apoptosis in cancer cells, in particularly by blocking VEGF-binding to the NRPs [116,117] (Table 2). Moreover, NRP1-*Sema3B* interactions induce high level of IL-8 in tumor cells, leading to a massive monocyte/macrophage recruitment, promoting invasion and metastasis formation [118]. As a consequence, when *sema3B* is inhibited using RNA interference and IL-8 neutralized with blocking monoclonal antibodies, a decrease of invasion and metastasis is observed in murine xenograft experiments [118] (Table 2).

4.1.3. Semaphorin 3F

First observations that Semaphorin 3F (Sema3F) might have a role in cell motility and cell invasion was suggested by Brambilla and colleagues, in lung cancer cells [119]. Then, some studies reported that Sema3F can even induce apoptosis in cancer cells as well as tumor suppression in various xenograft experiments. Indeed, transfection of Sema3F in the murine fibrosarcoma cell line A9 and in HEY ovarian cell line suppresses tumor formation in nude mice, whereas no effect was observed after transfection of Sema3F in the small cell lung cancer cell line GLC45 [120]. When nude rats were orthotopically implanted with lung cancer cells transfected or not with Sema3F gene, all animals injected with cells expressing sema3f survived to 100 days whereas all the other rats died [121] (Table 2).

A role of Sema3F in tumor angiogenesis was then suggested. Implantation of BHK-21 (Baby Hamster Kidney-21) cells transfected with Sema3F concomitantly with cells producing VEGF-165 inhibited tumor-related angiogenesis in mice whereas no effect on angiogenesis was observed when BHK-21 cells transfected with empty vector were implanted with the same VEGF-165 producing cells [122]. Moreover, Sema3F transfection in the renal cell line HEK293 induced smaller tumors and a poorly-vascularized phenotype in xenograft experiments [122]. As a consequence, Sema3F and VEGF were rapidly considered to generate opposite activities. In fact, in highly metastatic melanoma cells, Sema3F completely inhibits metastasis *in vivo* and decreased the number of intra-tumor vessels, suggesting that Sema3F has huge potential in anti-angiogenic and anti-metastasis therapies [123] (Table 2). In addition, Sema3F can represent a powerful inhibitor of melanoma cell proliferation through its relation with NRP receptors [124].

Moreover, Sema3F blocks cell attachment and spreading in MCF7 and C100 breast cell lines, this effect depending on its interactions either with NRP1 or NRP2 [125] (Table 2).

4.1.4. Semaphorin 3E

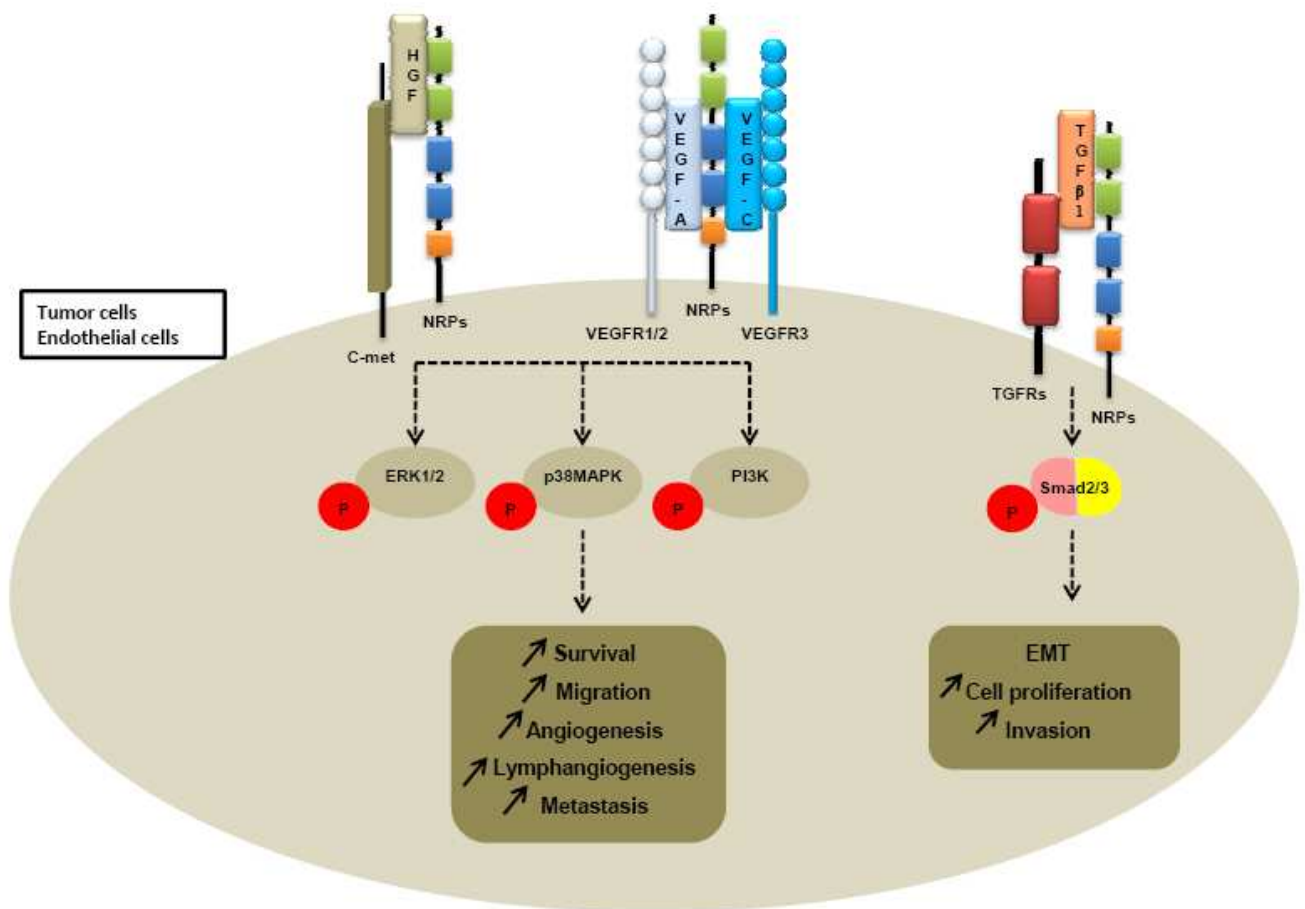
Although most class 3 semaphorins are considered to be TSG, it appears that others support opposite activities. Indeed, Semaphorin 3E (Sema3E) is described as an enhancer of tumor growth and metastasis *in vitro* and *in vivo* in xenograft experiments using breast cancer cells [126] (Table 2).

4.2. Cooperation with Growth Factor Receptors

4.2.1. VEGFRs

Further investigations of neuropilin-dependent molecular pathways suggested that neuropilins contribute to tumor growth and angiogenesis through their cooperation with both VEGFR receptors, VEGFR1 and VEGFR2 (Figure 4).

Figure 4. NRPs interactions with growth factor receptors.



First, Soker *et al.* reported that coexpression of NRP1 and VEGFR2 on porcine aortic endothelial cells enhances at least four-times the VEGF binding to VEGFR2 and in this way modulates downstream signaling and biological responses [21]. Later, Biacore analysis revealed that NRP1 interacts with both VEGFR1 and VEGFR2 [19]. Moreover, NRP1 enhances binding of VEGF to these two high affinity receptors. Similar results were obtained for NRP2. Indeed, co-immunoprecipitation studies revealed that NRP2 and VEGFR1 associate with each other to transduce intracellular signals [129]. NRP2 enhances VEGFR1 phosphorylation and subsequently activates multiple intracellular pathways like extracellular signal-regulated kinase (ERK) or phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) pathways in colorectal cancer cells and pancreatic adenocarcinoma cells [45,46]. (Table 3) While NRP1 implication in the angiogenesis process has now considerable evidence, NRP2 appears to regulate lymphangiogenesis and metastatic processes. Indeed, NRP2 homozygous mutant mice are characterized by abnormal lymphatic and capillaries development proposing a selective requirement for NRP2 in the formation of lymphatic vessels [15]. Karpänen *et al.* propose that NRP2 contributes to lymphangiogenesis and metastatic processes through direct interactions with VEGF-C, VEGF-D and VEGFR3 [20]. NRP2 increases VEGF-A and VEGF-C-induced survival and migration of endothelial

cells [130]. Moreover, Caunt *et al.* recently reported that NRP2 blocking with a monoclonal antibody (anti-NRP2^B) leads to a reduction of VEGFC-mediated migration of Lymphatic Endothelial cells (LEC) *in vitro* and to an inhibition of lymphangiogenesis *in vivo* [131]. Metastasis formation is found to be subsequently reduced in mice in xenograft models after anti-NRP2^B treatment [131]. Double-heterozygous *nrp2^{+/-}vegfr2^{+/-}* mice have normal lymphatic development unlike double-heterozygous *nrp2^{+/-}vegfr3^{+/-}* mice, indicating that Nrp2 partners with VEGFR3 to modulate lymphatic vessel sprouting and lymphangiogenesis [132]. Finally, another recently published study has reinforced the essential role of NRP2 in lymphangiogenesis process. Indeed, NRP2 knockdown by RNA interference improves corneal graft survival by suppressing lymphangiogenesis in vascular beds in a murine model of corneal transplantation [133] (Table 3).

Table 3. NRPs interactions with growth factor receptors.

Complexes	Cells	Activity	References
NRP/VEGFR1	Biacore analysis	NRP1 associates with VEGFR1 and VEGFR2	Fuh <i>et al.</i> , 2000 [19]
	Endothelial Porcine Aortic Endothelial (PAE) cells	NRP2 co-immunoprecipitates with VEGFR1	Gluzman-Poltorak <i>et al.</i> , 2001 [129]
	Colorectal cancer cells	NRP2 enhances VEGFR1 phosphorylation, migration, invasion in tumor cells through PI3K and ERK activation. Targeting NRP2 with shRNA reduces tumor growth, metastasis formation in xenograft experiments.	Gray <i>et al.</i> , 2008 [45]
	Pancreatic Adenocarcinoma cancer cells	NRP2 enhances VEGFR1 phosphorylation, migration, invasion in tumor cells through PI3K and ERK activation. Reduced NRP-2 expression decreases migration, invasion, and anchorage-independent growth. Targeting NRP2 with shRNA reduces tumor growth, tumor vasculature and metastasis formation in xenograft experiments.	Dallas <i>et al.</i> , 2008 [46]
NRP/VEGFR2	Endothelial Porcine Aortic Endothelial (PAE) cells	NRP1 enhances the binding of VEGF to VEGFR2	Soker <i>et al.</i> , 1998 [21]
	Biacore analysis	NRP1 associates with VEGFR1 and VEGFR2	Fuh <i>et al.</i> , 2000 [19]
	293T, PAE, human microvascular	NRP2 interacts with VEGFR2 and VEGFR3 and enhances their activation. NRP2	Favier <i>et al.</i> , 2006 [130]

	endothelial cells	overexpression enhances VEGF-A and VEGF-C induced survival and migration of human endothelial cells.	
	Lymphatic endothelial cells	NRP2 interacts with VEGFR2 and VEGFR3, enhances their phosphorylation and activation.	Caunt <i>et al.</i> , 2008 [131]
NRP/VEGFR3	Lymphatic endothelial cells and transfected 293T	NRP2 interacts with VEGFR3 in co-immunoprecipitation studies.	Karpänen <i>et al.</i> , 2006 [20]
	293T, PAE, human microvascular endothelial cells	NRP2 interacts with VEGFR2 and VEGFR3 and enhances their activation. NRP2 overexpression enhances VEGF-A and VEGF-C induced survival and migration of human endothelial cells.	Favier <i>et al.</i> , 2006 [130]
	Lymphatic endothelial cells	NRP2 interacts with VEGFR2 and VEGFR3, enhances their phosphorylation and activation.	Caunt <i>et al.</i> , 2008 [131]
NRP/c-met	HUVEC	HGF binds NRP1 and NRP2. NRP1 and NRP2 enhance c-met phosphorylation and migration through ERK activation.	Sulpice <i>et al.</i> , 2008 [24]
	Glioma	NRP1 promotes glioma progression through activation of HGF/SF autocrine pathway and ERK pathway activation.	Hu B <i>et al.</i> , 2007 [137]
	Pancreatic cancer cells	NRP1 interacts with c-met, promoting invasion through ERK and p38MAPK activation.	Matsushita <i>et al.</i> , 2007 [138]
NRP/TGFR	Stromal fibroblasts	NRP1 enhances Smad activation and induces a myofibroblast phenotype.	Cao <i>et al.</i> , 2010 [142]
	Breast cancer cells	NRP1 and NRP2 associate with TGFRI and TGFRII and enhance Smad2/3 phosphorylation.	Glinka <i>et al.</i> , 2010 [140]
	Colorectal cancer cells	NRP2 interacts with TGFRI and enhances Smad2/3 activation. NRP2 induces a TGF β 1-dependant Epithelial Mesenchymal Transition in colorectal cancer cells.	Grandclement <i>et al.</i> , 2010 [143]

4.2.2. Integrins

Integrins have important roles in cell attachment, survival, migration, invasion and angiogenesis, which are all critical for carcinogenesis. Many integrins have been implicated in cancer progression. Indeed, Fukasawa and colleagues show that NRP1 interacts with integrin- β 1 in pancreatic ductal adenocarcinoma and in this way promotes tumor cell growth, survival and invasion [134]. NRP1 was suggested to interact with α 5 β 1 integrin to regulate

angiogenesis in endothelial cells [135]. In lung cancer cells, anti-tumor effect of Sema3F is associated with loss of activated $\alpha 5\beta 3$ integrin [121]. However, some integrins can support opposite activities. For example, in breast tumor cells, Sema3A treatment reduces cell migration in increasing $\alpha 2\beta 1$ integrin level [127]. In endothelial cells, $\beta 3$ integrin inhibits VEGF-mediated angiogenesis by sequestering NRP1 and preventing it from interacting with VEGFR2 [136].

4.2.3. c-met

Because heparin growth factors FGF and HGF have been recently identified as NRPs ligands, they are believed to contribute to NRP-mediated angiogenesis too. Indeed, NRP1 potentiates HGF and FGF2 induced proliferation, survival, invasion in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC), glioma cells, pancreatic cancer cells [23,137,138]. It appears that NRPs can be a receptor for HGF but can also enhance c-met phosphorylation by activating the c-met receptor itself. Indeed, co-immunoprecipitation studies confirm that NRPs interact directly with c-met receptor [138] (Table 3). Sulpice *et al.* confirmed in 2008 that both NRPs participate to VEGF and HGF linked-angiogenic activity in endothelial cells through enhancing autocrine hepatocyte growth factor (HGF)/scatter factor (SF)/c-Met signaling [24,137]. NRPs generate activation of several signaling pathways through c-met interaction, including p38-mitogen-activated protein kinase (p38-MAPK), extracellular signal-regulated kinase (ERK), src, phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) [24,137,138] (Figure 4).

4.2.4. TGFs

More recently, a study suggested that NRP1 is a receptor for both active TGF β 1 and TGF β 1-LAP. In addition, NRP1-TGF β 1 interactions on T cells resulted in enhanced T regulator activity [139]. Then other reports confirmed that NRP1 promotes TGF β 1 signaling pathway. Indeed, in a recent study, Glinka *et al.* show that NRP1 associates with TGFRI and TGFRII to enhance TGF β 1 signaling in cancer cells [140] (Table 3). Moreover, NRP1 was shown to confer a myofibroblast phenotype by enhancing PDGF/TGF β 1 pathways in hepatic human cells [141] and in stromal fibroblasts [142]. Because NRPs are not tyrosine-kinase receptors, NRP1 was thought to cooperate with TGFs to transduce the signal [142]. A similar role was attributed to NRP2. Indeed, we noticed that NRP2 expression enhances TGF β 1 signaling leading to constitutive Smad2/3 phosphorylation in colorectal cancer cells [143]. Biacore analysis revealed that NRP2, like NRP1, is a receptor for active TGF β 1 [143]. Moreover, NRP2 conferred a fibroblastic-like shape to cancer cells, suggesting an involvement of neuropilin-2 in epithelial mesenchymal transition (EMT) [143] (Table 3). EMT is indeed characterized by a breakdown of cell junctions and the loss of epithelial characteristics and cell polarity, contributing to carcinoma progression. Besides the gain of mesenchymal markers, EMT endows cancer cells for migration, invasiveness and subsequent metastasis

formation [144]. Indeed, the presence of neuropilin-2 in colorectal carcinoma cell lines is correlated with loss of epithelial markers such as cytokeratin-20 and E-cadherin and with acquisition of mesenchymal molecules such as vimentin [143].

In view of its implication in multiple processes such as angiogenesis, lymphangiogenesis, EMT, and metastasis, NRP2 fulfills all the criteria of a therapeutic target to disrupt multiple oncogenic functions in solid tumors.

5. Neuropilins: A Surrogate Marker for Cancer Progression

Because NRP2 is implicated in multiple processes including angiogenesis, lymphangiogenesis and metastasis, it became rapidly apparent that NRP2 detection constitutes a novel diagnostic and prognostic tool in a great majority of tumors.

NRP2 expression is correlated with increased vascularity and poor prognosis in osteosarcomas [39] and non small cell lung carcinoma (NSCLC) [41]. Nrp2 was also detected in salivary adenoid cystic carcinomas (SACCs), and its expression level significantly correlated with microvessel density, tumor size, clinical stage, vascular invasion, and metastasis of SACCs [54]. In breast cancers, NRP2 expression is significantly correlated with lymph node metastasis, VEGF-C expression and cytoplasmic CXCR4 expression [50]. NRP2 expression is significantly upregulated in early and advanced stages of neuroblastomas [44]. Moreover, NRP2 is expressed by a vast majority of endocrines pancreatic tumors, suggesting that NRP2 can be used as a diagnostic marker for these tumors [47]. NRP2 was shown to be also a biomarker of potential clinical significance associated with bladder cancer progression [55].

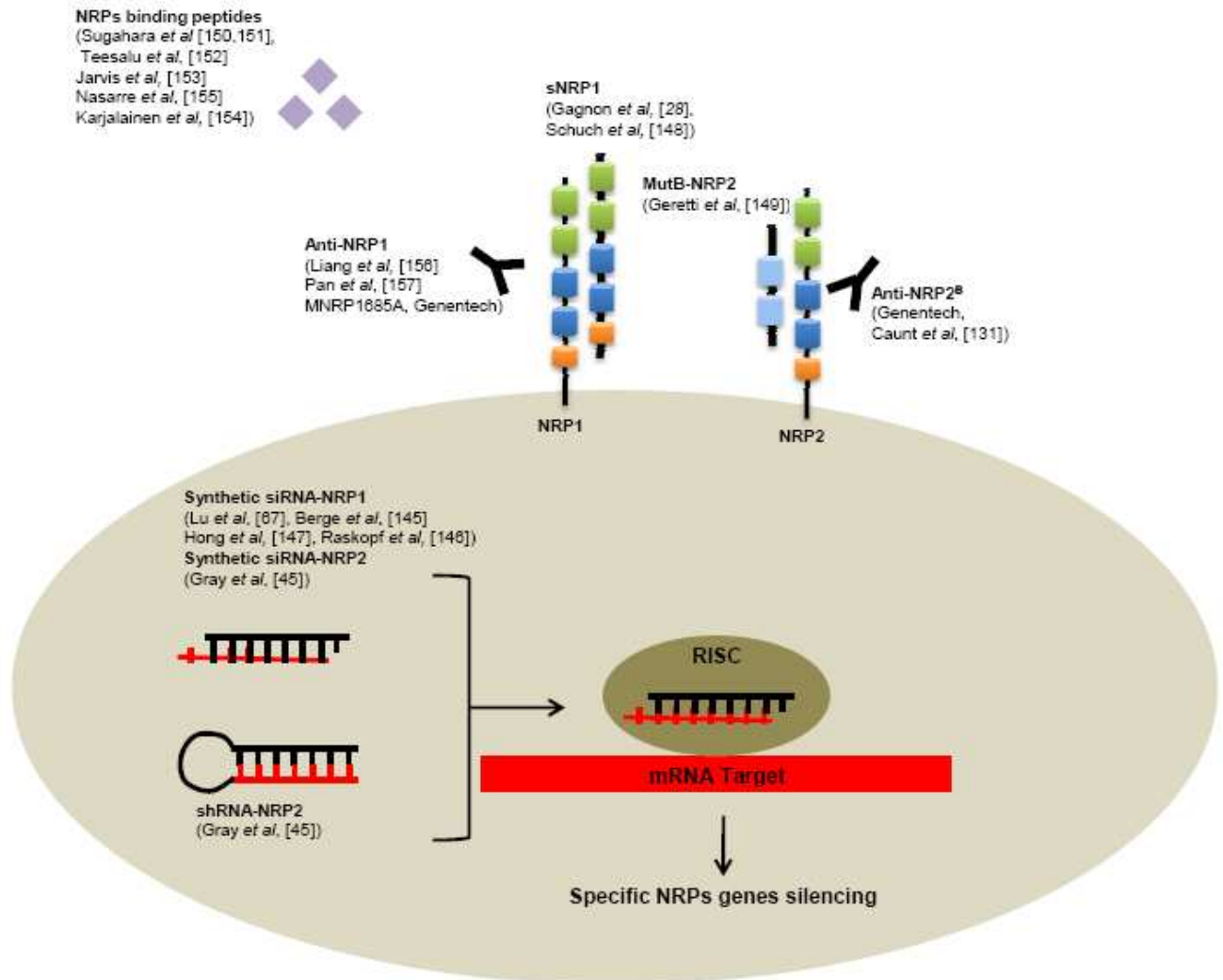
6. Neuropilins Targeting

Several tools have been developed to neutralize NRPs receptors, targeting NRPs genes like RNA interference or receptors using specific monoclonal antibodies or small peptides (Figure 5).

6.1. RNA Interference

Use of siRNA targeting NRP1 significantly reduces tumor growth, angiogenesis, metastasis formation in various human cancer models, such as hepatocellular carcinoma [145,146], acute myeloid leukemia [67], lung cancer [147]. Also reduction of NRP2 expression by shRNA in colorectal cancer cells induces smaller tumors, decreased number of metastases and enhanced apoptosis in comparison with control shRNA in a murine xenograft model [45]. In addition, intraperitoneally treatment of tumor bearing mice with liposomes containing NRP2 siRNA reduces tumor growth and metastasis [45].

Figure 5. Biotechnological tools developed to target NRPs. Preclinical studies demonstrated the potential interest of several strategies to inhibit oncogenic functions induced by NRPs including: small interfering RNA, peptides, soluble NRPs antagonists, monoclonal antibodies. (RISC: «RNA-Induced Silencing Complex»)



6.2. Small Molecules

As seen previously, alternative splicing generates naturally occurring soluble forms sNRP1 and sNRP2. These soluble sNRP are first described as inhibitory molecules, functioning as natural ligand trap, inhibiting their interaction with membrane receptors. Soluble neuropilins lack the transmembrane segment and intracellular domain. Gagnon *et al.* reported that overexpression of sNRP1 in Dunning rat prostate carcinoma cell lines AT2.1 and AT3.1 generates tumors with large and hemorrhagic center, with decreased proliferation and increased apoptosis in rats [28]. Moreover, sNRP1 inhibits the binding of VEGF₁₆₅ to full-length NRP1 [28].

Schuch *et al.* confirmed these findings in a murine sarcoma model using NMuMG/VEGF and NMuMG/sNRP-1 cells that have been engineered to produce high levels of recombinant VEGF and sNRP1 [148]. VEGF treatment resulted in tumor growth and vascularization, whereas treatment with soluble NRP-1 (sNRP-1) inhibited tumor angiogenesis and growth. Moreover, in a systemic leukemia model, survival of mice injected with adenovirus (Ad) encoding for Fc-sNRP-1 (sNRP-1 dimer) was significantly prolonged as compared with control mice [148].

Since naturally occurring soluble forms of neuropilins are described to inhibit tumor progression, researchers tend nowadays to develop soluble peptides preventing VEGF-binding on neuropilins. For this purpose, Geretti *et al.* described very recently a mutant of the B-domain of NRP2 (MutB-NRP2) with 8-fold increased affinity for VEGF compared to wild-type B domain of NRP2 [149]. This MutB-NRP2 significantly inhibits tumor growth in a xenograft model using melanoma cells, alone and in combination with bevacizumab [149].

Furthermore, screening of phage libraries expressing random peptides binding to various cancer cells has allowed the identification of amino acid sequences especially binding NRPs. Indeed, Sugahara and collaborators reported two tissue-penetrating peptides binding human integrins and NRP1 capable of penetrating into tumor tissue and cells [150,151]. Conjugation of these peptides to anti-tumor drugs or imaging agents might enhance tumor imaging and the activity of anti-tumor therapies [150-152]. Since then, another peptide targeting NRP1 has been described in various model of cancers cell *in vitro* [153-155].

6.3. Monoclonal Antibodies

Genentech has very recently developed monoclonal antibodies targeting NRP1. In particular, high-affinity monoclonal antibodies targeting either CUB domains (anti-NRP1^A) or coagulation factors V/VIII domains (anti-NRP1^B) of NRP1 have been first generated. [156] These anti-NRP1 antibodies induce reduction of VEGF-induced migration of HUVEC cells and inhibit tumor formation in animal models [156]. Later, anti-NRP1 monoclonal antibodies were shown to block VEGF-binding to NRP1 and to have an additive effect with anti-VEGF therapies to reduce tumor growth [157].

One of them, a full human antibody targeting NRP1, MNRP1685A is actually in phase-1 of development alone or in combination with bevacizumab with or without paclitaxel for treatment of advanced solid tumors [158].

Monoclonal antibodies targeting the b1/b2 domains of NRP2 have been recently developed. By blocking binding of VEGF and VEGFC to NRP2, these anti-NRP2^B monoclonal antibodies decrease the number of tumor-associated lymphatic vessels and metastasis in sentinel lymph node and in distant organs in mice xenograft experiments [131].

6.4. Semaphorins

NRPs role in tumorigenesis is more complex than initially thought and appears to depend on the nature of the ligand. In the context of cancer, it appears that semaphorins and VEGF are competing for NRPs binding, although they bind different NRPs sub-units. While semaphorins are responsible for inhibition of tumor growth, proliferation and even induction of apoptosis in cancer cells, VEGF tends to oppositely enhance angiogenesis and tumor growth. As described above, some semaphorins such as *Sema3B* and *Sema3F* are considered as TSG and are very often downregulated in cancer cells [102,104,120]. Overexpression of *Sema3* genes may represent a promising new type of therapy for preventing tumor angiogenesis, growth, and metastasis. Moreover, other semaphorins such as *Sema3E* or *Sema4D* function as pro-angiogenic and pro-oncogenic molecules [89,126,159,160]. Neutralization of these molecules or their relative receptors thus may represent a new therapeutic strategy for cancer treatment. In particular, one monoclonal antibody VX15/2503 binding to the *sema4D* is currently in phase-1 of development for the treatment of advanced solid tumors [161]. Therapeutic use of semaphorin pathway seems to represent one of the major therapeutic strategies considered, capable of antagonizing VEGF-mediated angiogenesis and tumor progression [88].

7. Conclusions

NRPs are multifunctional non-tyrosine kinase receptors for class-3 semaphorins and VEGF family members implicated in both physiological development and pathological situations. NRPs are expressed in endothelial cells and in many types of cancer cells. Through their direct interactions with plexins or growth factor receptors, NRPs have rapidly emerged as key regulators of angiogenesis, lymphangiogenesis, EMT and tumor progression. In many cancers, expression of one or both has been correlated with tumor progression and/or poor prognosis. As a consequence, several strategies have been used in pre-clinical studies to inhibit NRPs function, such as knockdown strategies with siRNAs, small peptide inhibitors, and blocking antibodies. However, the molecular mechanisms by which NRPs modulate cancer progression are still poorly understood. Understanding the interactions between VEGF, VEGFRs, semaphorins and NRPs should provide additional data for the rational development of novel anti-tumor strategies.

Acknowledgments

C.G. has received a fellowship from the “ANRT: Agence Nationale pour la Recherche Technologique”; This work has been supported by the “Ligue contre le cancer, comité du Doubs”, by the University Hospital of Besançon and by the Blood Transfusion Center of Besançon.

References

1. Takagi, S.; Tsuji, T.; Amagai, T.; Takamatsu, T.; Fujisawa, H. Specific cell surface labels in the visual centers of *Xenopus laevis* tadpole identified using monoclonal antibodies. *Dev. Biol.* **1987**, *122*, 90-100.
2. Takagi, S.; Kasuya, Y.; Shimizu, M.; Matsuura, T.; Tsuboi, M.; Kawakami, A.H.F. Expression of a cell adhesion molecule, neuropilin, in the developing chick nervous system. *Dev. Biol.* **1995**, *170*, 207-222.
3. Yamagata, M.; Herman, J.P.; Sanes, J.R. Lamina-specific expression of adhesion molecules in developing chick optic tectum. *J. Neurosci.* **1995**, *15*, 4556-4571.
4. Kawakami, A.; Kitsukawa, T.; Takagi, S.H.F. Developmentally regulated expression of a cell surface protein, neuropilin, in the mouse nervous system. *J. Neurobiol.* **1996**, *29*, 1-17.
5. Kolodkin, A.; Levengood, D.; Rowe, E.; Tai, Yu-Tzu.; Giger, R.; Ginty, D. Neuropilin is a Semaphorin III receptor. *Cell* **1997**, *90*, 753-762.
6. He, Z.; Tessier-Lavigne, M. Neuropilin is a receptor for the axonal chemorepellent Semaphorin III. *Cell* **1997**, *90*, 739-751.
7. Chen, H.; Chedotal, A.; He, Z.; Goodman, C.S.; Tessier-Lavigne, M. Neuropilin-2, a novel member of the neuropilin family, is a high affinity receptor for the semaphorins Sema E and Sema IV but not Sema III. *Neuron* **1997**, *19*, 547-559.
8. Giger, R.J.; Urquhart, E.R.; Gillespie, S.K.; Levengood, D.V.; Ginty, D.D.; Kolodkin, A.L. Neuropilin-2 is a receptor for semaphorin IV: Insight into the structural basis of receptor function and specificity. *Neuron* **1998** *21*, 1079-1092.
9. Giger, R.J.; Cloutier, J.F.; Sahay, A.; Prinjha, R.K.; Levengood, D.V.; Moore, S.E.; Pickering, S.; Simmons, D.; Rastan, S.; Walsh, F.S.; *et al.* Neuropilin-2 is required *in vivo* for selective axon guidance responses to secreted semaphorins. *Neuron* **2000**, *25*, 29-41.
10. Kitsukawa, T.; Shimizu, M.; Sanbo, M.; Hirata, T.; Taniguchi, M.; Bekku, Y.; Yagi, T.; Fujisawa, H. Neuropilin-semaphorin III/D-mediated chemorepulsive signals play a crucial role in peripheral nerve projection in mice. *Neuron* **1997**, *19*, 995-1005.
11. Chen, H.; Bagri, A.; Zupicich, J.A. Neuropilin-2 regulates the development of selective cranial and sensory nerves and hippocampal mossy fiber projections. *Neuron* **2000**, *25*, 43-56.
12. Kitsukawa, T.; Shimono, A.; Kawakami, A.; Kondoh, H.; Fujisawa, H. Overexpression of a membrane protein, neuropilin, in chimeric mice causes anomalies in the cardiovascular system, nervous system and limbs. *Development* **1995**, *121*, 4309-4318.
13. Kawasaki, T.; Kitsukawa, T.; Bekku, Y.; Matsuda, Y.; Sanbo, M.; Yagi, T.; Fujisawa, H. A requirement for neuropilin-1 in embryonic vessel formation. *Development* **1999**, *126*, 4895-4902.

14. Takashima, S.; Kitakaze, M.; Asakura, M.; Asanuma, H.; Sanada, S.; Tashiro, F.; Niwa, H.; Miyazaki Ji, J.; Hirota, S.; Kitamura, Y.; *et al.* Targeting of both mouse neuropilin-1 and neuropilin-2 genes severely impairs developmental yolk sac and embryonic angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 3657-3662.
15. Yuan, L.; Moyon, D.; Pardanaud, L.; Breant, C.; Karkkainen, M.J.; Alitalo, K.; Eichmann, A. Abnormal lymphatic vessel development in neuropilin 2 mutant mice. *Development* **2002**, *129*, 4797-4806.
16. Mäkinen, T.; Olofsson, B.; Karpanen, T.; Hellman, U.; Soker, S.; Klagsbrun, M.; Eriksson, U.; Alitalo, K. Differential binding of vascular endothelial growth factor B splice and proteolytic isoforms to neuropilin-1. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 21217-21222.
17. Migdal, M.; Huppertz, B.; Tessler, S.; Comforti, A.; Shibuya, M.; Reich, R.; Baumann, H.; Neufeld, G. Neuropilin-1 is a placenta growth factor-2 receptor. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 22272-22278.
18. Gluzman-Poltorak, Z.; Cohen, T.; Herzog, Y.; Neufeld, G. Neuropilin-2 and neuropilin-1 are receptors for the 165-amino acid form of vascular endothelial growth factor (VEGF) and of placenta growth factor-2, but only neuropilin-2 functions as a receptor for the 145-amino acid form of VEGF. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 18040-18045.
19. Fuh, G.; Garcia, K.C.; de Vos, A.M. The interaction of neuropilin-1 with vascular endothelial growth factor and its receptor flt-1. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 26690-26695.
20. Kärpänen, T.; Heckman, C.A.; Keskitalo, S.; Jeltsch, M.; Ollila, H.; Neufeld, G.; Tamagnone, L.; Alitalo, K. Functional interaction of VEGF-C and VEGF-D with neuropilin receptors. *FASEB J.* **2006**, *20*, 1462-1472.
21. Soker, S.; Takashima, S.; Miao, H.Q.; Neufeld, G.; Klagsbrun, M. Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell* **1998**, *92*, 735-745.
22. Karkkainen, M.J.; Saaristo, A.; Jussila, L.; Karila, K.A.; Lawrence, E.C.; Pajusola, K.; Bueler, H.; Eichmann, A.; Kauppinen, R.; Kettunen, M.I.; *et al.* A model for gene therapy of human hereditary lymphedema. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 12677-12682.
23. West, D.C.; Rees, C.G.; Duchesne, L.; Patey, S.J.; Terry, C.J.; Turnbull, J.E.; Delehedde, M.; Heegaard, C.W.; Allain, F.; Vanpouille, C.; *et al.* Interactions of multiple heparin binding growth factors with neuropilin-1 and potentiation of the activity of fibroblast growth factor-2. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 13457-13464.
24. Sulpice, E.; Plouët, J.; Bergé, M.; Allanic, D.; Tobelem, G.; Merkulova-Rainon, T. Neuropilin-1 and neuropilin-2 act as coreceptors, potentiating proangiogenic activity. *Blood* **2008**, *111*, 2036-2045.

25. Rossignol, M.; Gagnon, M.L.; Klagsbrun, M. Genomic organization of human neuropilin-1 and neuropilin-2 genes: identification and distribution of splice variants and soluble isoforms. *Genomics* **2000**, *70*, 211-222.
26. Takagi, S.; Hirata, T.; Agata, K.; Mochii, M.; Eguchi, G.; Fujisawa, H. The A5 antigen, a candidate for the neuronal recognition molecule, has homologies to complement components and coagulation factors. *Neuron* **1991**, *7*, 295-307.
27. Cackowski, F.C.; Xu, L.; Hu, B.; Cheng, S.Y. Identification of two novel alternatively spliced Neuropilin-1 isoforms. *Genomics* **2004**, *84*, 82-94.
28. Gagnon, M.L.; Bielenberg, D.R.; Gechtman, Z.; Miao, H.Q.; Takashima, S.; Soker, S.; Klagsbrun, M. Identification of a natural soluble neuropilin-1 that binds vascular endothelial growth factor: *In vivo* expression and antitumor activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 2573-2578.
29. Fujisawa, H.; Takagi, S.; Hirata, T. Growth-associated expression of a membrane protein, neuropilin, in Xenopus optic nerve fibers. *Dev. Neurosci.* **1995**, *17*, 343-349.
30. Tordjman, R.; Lepelletier, Y.; Lemarchandel, V.; Cambot, M.; Gaulard, P.; Hermine, O.; Roméo, P.H. A neuronal receptor, neuropilin-1, is essential for the initiation of the primary immune response. *Nat. Immunol.* **2002**, *3*, 477-482.
31. Bruder, D.; Probst-Kepper, M.; Westendorf, A.M.; Geffers, R.; Beissert, S.; Loser, K.; von Boehmer, H.; Buer, J.; Hansen, W. Neuropilin-1: a surface marker of regulatory T cells. *Eur. J. Immunol.* **2004**, *34*, 623-630.
32. Sarris, M.; Andersen, K.G.; Randow, F.; Mayr, L.; Betz, A.G. Neuropilin-1 expression on regulatory T cells enhances their interactions with dendritic cells during antigen recognition. *Immunity* **2008**, *28*, 402-413.
33. Milpied, P.; Renand, A.; Bruneau, J.; Mendes-da-Cruz, D.A.; Jacquelin, S.; Asnafi, V.; Rubio, M.T.; MacIntyre, E.; Lepelletier, Y.; Hermine, O. Neuropilin-1 is not a marker of human Foxp3+ Treg. *Eur. J. Immunol.* **2009**, *39*, 1466-1471.
34. Curreli, S.; Arany, Z.; Gerardy-Schahn, R.; Mann, D.; Stamatou, N.M. Polysialylated neuropilin-2 is expressed on the surface of human dendritic cells and modulates dendritic cell-T lymphocyte interactions. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 30346-30356.
35. Rey-Gallardo, A.; Delgado-Martín, C.; Gerardy-Schahn, R.; Rodríguez-Fernández, J.L.; Vega, M.A. Polysialic acid is required for Neuropilin-2a/b-mediated control of CCL21-driven chemotaxis of mature dendritic cells, and for their migration *in vivo*. *Glycobiology* **2011**,
doi: 10.1093/glycob/cwq216.
36. Rey-Gallardo, A.; Escribano, C.; Delgado-Martín, C.; Rodríguez-Fernández, J.L.; Gerardy-Schahn, R.; Rutishauser, U.; Corbi, A.L.; Vega, M.A. Polysialylated neuropilin-2 enhances human dendritic cell migration through the basic C-terminal region of CCL21. *Glycobiology* **2010**, *20*, 1139-1146.
37. Bielenberg, D.R.; Pettaway, C.A.; Takashima, S.; Klagsbrun, M. Neuropilins in neoplasms: Expression, regulation, and function. *Exp. Cell Res.* **2006**, *312*, 584-593.

38. Pellet-Many, C.; Frankel, P.; Jia, H.; Zachary, I. Neuropilins: Structure, function and role in disease. *Biochem. J.* **2008**, *411*, 211-226.
39. Handa, A.; Tokunaga, T.; Tsuchida, T.; Lee, Y.H.; Kijima, H.; Yamazaki, H.; Ueyama, Y.; Fukuda, H.; Nakamura, M. Neuropilin-2 expression affects the increased vascularization and is a prognostic factor in osteosarcoma. *Int. J. Oncol.* **2000**, *17*, 291-295.
40. Lacal, P.M.; Failla, C.M.; Pagani, E.; Odorisio, T.; Schietroma, C.; Falcinelli, S.; Zambruno, G.; D'Atri, S. Human melanoma cells secrete and respond to placenta growth factor and vascular endothelial growth factor. *J. Invest. Dermatol.* **2000**, *115*, 1000-1007.
41. Kawakami, T.; Tokunaga, T.; Hatanaka, H.; Kijima, H.; Yamazaki, H.; Abe, Y.; Osamura, Y.; Inoue, H.; Ueyama, Y.; Nakamura, M. Neuropilin 1 and neuropilin 2 co-expression is significantly correlated with increased vascularity and poor prognosis in nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer* **2002**, *95*, 2196-2201.
42. Tomizawa, Y.; Sekido, Y.; Kondo, M.; Gao, B.; Yokota, J.; Roche, J.; Drabkin, H.; Lerman, M.I.; Gazdar, A.F.; Minna, J.D. Inhibition of lung cancer cell growth and induction of apoptosis after reexpression of 3p21.3 candidate tumor suppressor gene SEMA3B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 13954-13959.
43. Rieger, J.; Wick, W.; Weller, M. Human malignant glioma cells express semaphorins and their receptors, neuropilins and plexins. *Glia* **2003**, *42*, 379-389.
44. Fakhari, M.; Pullirsch, D.; Abraham, D.; Paya, K.; Hofbauer, R.; Holzfeind, P.; Hofmann, M.; Aharinejad, S. Selective upregulation of vascular endothelial growth factor receptors neuropilin-1 and -2 in human neuroblastoma. *Cancer* **2002**, *94*, 258-263.
45. Gray, M.J.; Van Buren, G.; Dallas, N.A.; Xia, L.; Wang, X.; Yang, A.D.; Somcio, R.J.; Lin, Y.G.; Lim, S.; Fan, F.; *et al.* Therapeutic targeting of neuropilin-2 on colorectal carcinoma cells implanted in the murine liver. *J. Nat. Cancer Inst.* **2008**, *100* 109-120.
46. Dallas, N.A.; Gray, M.J.; Xia, L.; Fan, F.; van Buren, G., 2nd.; Gaur, P.; Samuel, S.; Lim, S.J.; Arumugam, T.; Ramachandran, V.; Wang, H.; Ellis, L.M. Neuropilin-2-mediated tumor growth and angiogenesis in pancreatic adenocarcinoma. *Clin. Cancer Res.* **2008**, *14*, 8052-8060.
47. Cohen, T.; Herzog, Y.; Brodzky, A.; Greenson, J.K.; Eldar, S.; Gluzman-Poltorak, Z.; Neufeld, G.; Resnick, M.B. Neuropilin-2 is a novel marker expressed in pancreatic islet cells and endocrine pancreatic tumours. *J. Pathol.* **2002**, *198*, 77-82.
48. Fukahi, K.; Fukasawa, M.; Neufeld, G.; Itakura, J.; Korc, M. Aberrant expression of neuropilin-1 and -2 in human pancreatic cancer cells. *Clin. Cancer Res.* **2004**, *10*, 581-590.
49. Li, M.; Yang, H.; Chai, H.; Fisher, W.E.; Wang, X.; Brunicardi, F.C.; Yao, Q.; Chen, C. Pancreatic carcinoma cells express neuropilins and vascular endothelial growth factor, but not vascular endothelial growth factor receptors. *Cancer* **2004**, *101*, 2341-2350.
50. Yasuoka, H.; Kodama, R.; Tsujimoto, M.; Yoshidome, K.; Akamatsu, H.; Nakahara, M.; Inagaki, M.; Sanke, T.; Nakamura, Y. Neuropilin-2 expression in breast cancer:

- Correlation with lymph node metastasis, poor prognosis, and regulation of CXCR4 expression. *BMC Cancer* **2009**, *7*, 220.
51. Vales, A.; Kondo, R.; Aichberger, K.J.; Mayerhofer, M.; Kainz, B.; Sperr, W.R.; Sillaber, C.; Jäger, U.; Valent, P. Myeloid leukemias express a broad spectrum of VEGF receptors including neuropilin-1 (NRP-1) and NRP-2. *Leuk. Lymphoma* **2007**, *48*, 1997-2007.
 52. Cai, Y.; Wang, R.; Zhao, Y.F.; Jia, J.; Sun, Z.J.; Chen, X.M. Expression of Neuropilin-2 in salivary adenoid cystic carcinoma: Its implication in tumor progression and angiogenesis. *Pathol. Res. Pract.* **2010**, *206*, 793-799.
 53. Calicchio, M.L.; Collins, T.; Kozakewich, H.P. Identification of signaling systems in proliferating and involuting phase infantile hemangiomas by genome-wide transcriptional profiling. *Am. J. Pathol.* **2009**, *174*, 1638-1649.
 54. Osada, R.; Horiuchi, A.; Kikuchi, N.; Ohira, S.; Ota, M.; Katsuyama, Y.; Konishi, I. Expression of semaphorins, vascular endothelial growth factor, and their common receptor neuropilins and allelic loss of semaphorin locus in epithelial ovarian neoplasms: Increased ratio of vascular endothelial growth factor to semaphorin is a poor prognostic factor in ovarian carcinomas. *Hum. Pathol.* **2006**, *37*, 1414-1425.
 55. Sanchez-Carbayo, M.; Socci, N.D.; Lozano, J.J.; Li, W.; Charytonowicz, E.; Belbin, T.J.; Prystowsky, M.B.; Ortiz, A.R.; Childs, G.; Cordon-Cardo, C. Gene discovery in bladder cancer progression using cDNA microarrays. *Am. J. Pathol.* **2003**, *163*, 505-516.
 56. Ding, H.; Wu, X.; Roncari, L.; Lau, N.; Shannon, P.; Nagy, A.; Guha, A. Expression and regulation of neuropilin-1 in human astrocytomas. *Int. J. Cancer* **2000**, *88*, 584-592.
 57. Broholm, H.; Laursen, H. Vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor neuropilin-1's distribution in astrocytic tumors. *APMIS* **2004**, *112*, 257-263.
 58. Onofri, C.; Theodoropoulou, M.; Losa, M.; Uhl, E.; Lange, M.; Arzt, E.; Stalla, G.K.; Renner, U. Localization of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptors in normal and adenomatous pituitaries: detection of a non-endothelial function of VEGF in pituitary tumours. *J. Endocrinol.* **2006**, *191*, 249-261.
 59. Parikh, A.A.; Liu, W.B.; Fan, F. Expression and regulation of the novel vascular endothelial growth factor receptor neuropilin-1 by epidermal growth factor in human pancreatic carcinoma. *Cancer* **2003**, *98*, 720-729.
 60. Feurino, L.W.; Zhang, Y.; Bharadwaj, U.; Zhang, R.; Li, F.; Fisher, W.E.; Brunicardi, F.C.; Chen, C.; Yao, Q.; Min, L. IL-6 stimulates Th2 type cytokine secretion and upregulates VEGF and NRP-1 expression in pancreatic cancer cells. *Cancer Biol. Ther.* **2007**, *6*, 1096-1100.
 61. Akagi, M.; Kawaguchi, M.; Liu, W.; McCarty, M.F.; Takeda, A.; Fan, F.; Stoeltzing, O.; Parikh, A.A.; Jung, Y.D.; Bucana, C.D.; *et al.* Induction of neuropilin-1 and vascular endothelial growth factor by epidermal growth factor in human gastric cancer cells. *Br. J. Cancer* **2003**, *88*, 796-802.

62. Hansel, D.E.; Wilentz, R.E.; Yeo, C.J.; Schulick, R.D.; Montgomery, E.; Maitra, A. Expression of neuropilin-1 in high-grade dysplasia, invasive cancer, and metastases of the human gastrointestinal tract. *Am. J. Surg. Pathol.* **2004**, *28*, 347-356.
63. Parikh, A.A.; Fan, F.; Liu, W.B. Neuropilin-1 in human colon cancer: Expression, regulation, and role in induction of angiogenesis. *Am. J. Path.* **2004**, *164*, 2139-2151.
64. Ochiuni, T.; Kitadai, Y.; Tanaka, S.; Akagi, M.; Yoshihara, M.; Chayama, K. Neuropilin-1 is involved in regulation of apoptosis and migration of human colon cancer. *Int. J. Oncol.* **2006**, *29*, 105-116.
65. Kreuter, M.; Woelke, K.; Bieker, R.; Schliemann, C.; Steins, M.; Buechner, T.; Berdel, W.E.; Mesters, R.M. Correlation of neuropilin-1 overexpression to survival in acute myeloid leukemia. *Leukemia* **2006**, *20*, 1950-1954.
66. Kreuter, M.; Steins, M.; Woelke, K.; Buechner, T.; Berdel, W.E.; Mesters, R.M. Downregulation of neuropilin-1 in patients with acute myeloid leukemia treated with thalidomide. *Eur. J. Haematol.* **2007**, *79*, 392-397.
67. Lu, L.; Zhang, L.; Xiao, Z.; Lu, S.; Yang, R.; Han, Z.C. Neuropilin-1 in acute myeloid leukemia: expression and role in proliferation and migration of leukemia cells. *Leuk. Lymphoma* **2008**, *49*, 331-338.
68. Nowakowski, G.S.; Mukhopadhyay, D.; Wu, X.; Kay, N.E. Neuropilin-1 is expressed by chronic lymphocytic leukemia B cells. *Leuk. Res.* **2008**, *32*, 1634-1636.
69. Stephenson, J.M.; Banerjee, S.; Saxena, N.K.; Cherian, R.; Banerjee, S.K. Neuropilin-1 is differentially expressed in myoepithelial cells and vascular smooth muscle cells in preneoplastic and neoplastic human breast: A possible marker for the progression of breast cancer. *Int. J. Cancer* **2002**, *101*, 409-414.
70. Ghosh, S.; Sullivan, C.A.; Zerkowski, M.P.; Molinaro, A.M.; Rimm, D.L.; Camp, R.L.; Chung, G.G. High levels of vascular endothelial growth factor and its receptors (VEGFR-1, VEGFR-2, neuropilin-1) are associated with worse outcome in breast cancer. *Hum. Pathol.* **2008**, *39*, 1835-1843.
71. Lantuéjoul, S.; Constantin, B.; Drabkin, H.; Brambilla, C.; Roche, J.; Brambilla, E. Expression of VEGF, semaphorin SEMA3F, and their common receptors neuropilins NP1 and NP2 in preinvasive bronchial lesions, lung tumours, and cell lines. *J. Pathol.* **2003**, *200*, 336-347.
72. Straume, O.; Akslen, L.A. Increased expression of VEGF-receptors (FLT-1, KDR, NRP-1) and thrombospondin-1 is associated with glomeruloid microvascular proliferation, an aggressive angiogenic phenotype, in malignant melanoma. *Angiogenesis* **2003**, *6*, 295-301.
73. Latil, A.; Bièche, I.; Pesche, S.; Valéri, A.; Fournier, G.; Cussenot, O.; Lidereau, R. VEGF overexpression in clinically localized prostate tumors and neuropilin-1 overexpression in metastatic forms. *Int. J. Cancer* **2000**, *89*, 167-171.

74. Vanveldhuizen, P.J.; Zulfiqar, M.; Banerjee, S.; Cherian, R.; Saxena, N.K.; Rabe, A.; Thrasher, J.B.; Banerjee, S.K. Differential expression of neuropilin-1 in malignant and benign prostatic stromal tissue. *Oncol. Rep.* **2003**, *10*, 1067-1071.
75. Zhang, S.; Kong, W. Expression of neuropilin-1 in human laryngeal carcinoma and cell lines. *Lin Chuang Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi* **2006**, *20*, 634-635.
76. Hall, G.H.; Turnbull, L.W.; Bedford, K.; Richmond, I.; Helboe, L.; Atkin, S.L. Neuropilin-1 and VEGF correlate with somatostatin expression and microvessel density in ovarian tumours. *Int. J. Oncol.* **2005**, *27*, 1283-1288.
77. Baba, T.; Kariya, M.; Higuchi, T.; Mandai, M.; Matsumura, N.; Kondoh, E.; Miyanishi, M.; Fukuhara, K.; Takakura, K.; Fujii, S. Neuropilin-1 promotes unlimited growth of ovarian cancer by evading contact inhibition. *Gynecol. Oncol.* **2007**, *105*, 703-711.
78. Ottino, P.; Finley, J.; Rojo, E.; Otlecz, A.; Lambrou, G.N.; Bazan, H.E.; Bazan, N.G. Hypoxia activates matrix metalloproteinase expression and the VEGF system in monkey choroid-retinal endothelial cells: Involvement of cytosolic phospholipase A2 activity. *Mol. Vis.* **2004**, *10*, 341-350.
79. Brusselmans, K.; Bono, F.; Collen, D.; Herbert, J.M.; Carmeliet, P.; Dewerchin, M. A novel role for vascular endothelial growth factor as an autocrine survival factor for embryonic stem cells during hypoxia. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 3493-3499.
80. Jögi, A.; Vallon-Christersson, J.; Holmquist, L.; Axelson, H.; Borg, A.; Pålman, S. Human neuroblastoma cells exposed to hypoxia: induction of genes associated with growth, survival, and aggressive behavior. *Exp. Cell Res.* **2004**, *295*, 469-487.
81. Zhang, Z.G.; Tsang, W.; Zhang, L.; Powers, C.; Chopp, M. Up-regulation of neuropilin-1 in neovasculature after focal cerebral ischemia in the adult rat. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2001**, *21*, 541-549.
82. Beck, H.; Acker, T.; Püschel, A.W.; Fujisawa, H.; Carmeliet, P.; Plate, K.H. Cell type-specific expression of neuropilins in an MCA-occlusion model in mice suggests a potential role in post-ischemic brain remodeling. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **2002**, *61*, 339-350.
83. Li, M.; Zhang, Y.; Feurino, L.W.; Wang, H.; Fisher, W.E.; Brunnicardi, F.C.; Chen, C.; Yao, Q. Interleukin-8 increases vascular endothelial growth factor and neuropilin expression and stimulates ERK activation in human pancreatic cancer. *Cancer Sci.* **2008**, *99*, 733-737.
84. Giraud, E.; Primo, L.; Audero, E.; Gerber, H.P.; Koolwijk, P.; Soker, S.; Klagsbrun, M.; Ferrara, N.; Bussolino, F. Tumor necrosis factor-alpha regulates expression of vascular endothelial growth factor receptor-2 and of its co-receptor neuropilin-1 in human vascular endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 22128-22135.
85. Schramek, H.; Sarközi, R.; Lauterberg, C.; Kronbichler, A.; Pirklbauer, M.; Albrecht, R.; Noppert, S.J.; Perco, P.; Rudnicki, M.; Strutz, F.M.; Mayer, G. Neuropilin-1 and neuropilin-2 are differentially expressed in human proteinuric nephropathies and cytokine-stimulated proximal tubular cells. *Lab. Invest.* **2009**, *89*, 1304-1316.

86. Neufeld, G.; Kessler, O. The semaphorins: Versatile regulators of tumour progression and tumour angiogenesis. *Nat. Rev. Cancer* **2008**, *8*, 632-645.
87. Gherardi, E.; Love, C.A.; Esnouf, R.M.; Jones, E.Y. The sema domain. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2004**, *14*, 669-678.
88. Capparuccia, L.; Tamagnone, L. Semaphorin signaling in cancer cells and in cells of the tumor microenvironment—two sides of a coin. *J. Cell Sci.* **2009**, *122*, 1723-1736.
89. Basile, J.R.; Holmbeck, K.; Bugge, T.H.; Gutkind, J.S. MT1-MMP controls tumor-induced angiogenesis through the release of semaphorin 4D. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 6899-6905.
90. Winberg, M.L.; Noordermeer, J.N.; Tamagnone, L.; Comoglio, P.M.; Spriggs, M.K.; Tessier-Lavigne, M.; Goodman, C.S. Plexin A is a neuronal semaphorin receptor that controls axon guidance. *Cell* **1998**, *95*, 903-916.
91. Takahashi, T.; Fournier, A.; Nakamura, F.; Wang, L.H.; Murakami, Y.; Kalb, R.G.; Fujisawa, H.; Strittmatter, S.M. Plexin-neuropilin-1 complexes form functional semaphorin-3A receptors. *Cell* **1999**, *99*, 59-69.
92. Rohm, B.; Ottemeyer, A.; Lohrum, M.; Püschel, A.W. Plexin/neuropilin complexes mediate repulsion by the axonal guidance signal semaphorin 3A. *Mech. Dev.* **2000**, *93*, 95-104.
93. Fazzari, P.; Penachioni, J.; Gianola, S.; Rossi, F.; Eickholt, B.J.; Maina, F.; Alexopoulou, L.; Sottile, A.; Comoglio, P.M.; Flavell, R.A.; Tamagnone, L. Plexin-B1 plays a redundant role during mouse development and in tumour angiogenesis. *BMC Dev. Biol.* **2007**, *7*, 55.
94. Rieger, J.; Wick, W.; Weller, M. Human malignant glioma cells express semaphorins and their receptors, neuropilins and plexins. *Glia* **2003**, *42*, 379-389.
95. Rohm, B.; Rahim, B.; Kleiber, B.; Hovatta, I.; Püschel, A.W. The semaphorin 3A receptor may directly regulate the activity of small GTPases. *FEBS Lett.* **2000**, *486*, 68-72.
96. Vikis, H.G.; Li, W.; He, Z.; Guan, K.L. The semaphorin receptor plexin-B1 specifically interacts with active Rac in a ligand-dependent manner. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 12457-12462.
97. Driessens, M.H.; Hu, H.; Nobes, C.D.; Self, A.; Jordens, I.; Goodman, C.S.; Hall, A. Plexin-B semaphorin receptors interact directly with active Rac and regulate the actin cytoskeleton by activating Rho. *Curr. Biol.* **2001**, *11*, 339-344.
98. Aurandt, J.; Vikis, H.G.; Gutkind, J.S.; Ahn, N.; Guan, K.L. The semaphorin receptor plexin-B1 signals through a direct interaction with the Rho-specific nucleotide exchange factor, LARG. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 12085-12090.
99. Perrot, V.; Vázquez-Prado, J.; Gutkind, J.S.; Plexin B regulates Rho through the guanine nucleotide exchange factors leukemia-associated Rho GEF (LARG) and PDZ-RhoGEF. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 43115-43120.

100. Swiercz, J.M.; Kuner, R.; Behrens, J.; Offermanns, S. Plexin-B1 directly interacts with PDZ-RhoGEF/LARG to regulate RhoA and growth cone morphology. *Neuron* **2002**, *35*, 51-63.
101. Cai, H.B.; Reed, R.R. Cloning and characterization of neuropilin-1 interacting protein: A PSD-95/Dlg/ZO-1 domain-containing protein that interacts with the cytoplasmic domain of neuropilin-1. *J. Neurosci.* **1999**, *19*, 6519-6527.
102. Roche, J.; Boldog, F.; Robinson, M.; Robinson, L.; Varella-Garcia, M.; Swanton, B.; Waggoner, B.; Fishel, R.; Franklin, W.; Gemmill, R.; Drabkin, H. Distinct 3p21.3 deletions in lung cancer, analysis of deleted genes and identification of a new human semaphorin. *Oncogene* **1996**, *12*, 1289-1297.
103. Xiang, R.H.; Hensel, C.H.; Garcia, D.K.; Carlson, H.C.; Kok, K.; Daly, M.C.; Kerbacher, K.; van den Berg, A.; Veldhuis, P.; Buys, C.H.; Naylor, S.L. Isolation of the human semaphorin III/F gene (SEMA3F) at chromosome 3p21, a region deleted in lung cancer. *Genomics* **1996**, *32*, 39-48.
104. Joseph, D.; Ho, S.M.; Syed, V. Hormonal regulation and distinct functions of semaphorin-3B and semaphorin-3F in ovarian cancer. *Mol. Cancer Ther.* **2010**, *9*, 499-509.
105. Burbee, D.G.; Forgacs, E.; Zöchbauer-Müller, S.; Shivakumar, L.; Fong, K.; Gao, B.; Randle, D.; Kondo, M.; Virmani, A.; Bader, S.; *et al.* Epigenetic inactivation of RASSF1A in lung and breast cancers and malignant phenotype suppression. *J. Nat. Cancer Inst.* **2001**, *93*, 691-699.
106. Dammann, R.; Li, C.; Yoon, J.H.; Chin, P.L.; Bates, S.; Pfeifer, G.P. Epigenetic inactivation of a RAS association domain family protein from the lung tumour suppressor locus 3p21.3. *Nat. Genet.* **2000**, *25*, 315-319.
107. Kuroki, T.; Trapasso, F.; Yendamuri, S.; Matsuyama, A.; Alder, H.; Williams, N.N.; Kaiser, L.R.; Croce, C.M. Allelic loss on chromosome 3p21.3 and promoter hypermethylation of semaphorin 3B in non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* **2003**, *63*, 3352-3355.
108. Ito, M.; Ito, G.; Kondo, M.; Uchiyama, M.; Fukui, T.; Mori, S.; Yoshioka, H.; Ueda, Y.; Shimokata, K.; Sekido, Y. Frequent inactivation of RASSF1A, BLU, and SEMA3B on 3p21.3 by promoter hypermethylation and allele loss in non-small cell lung cancer. *Cancer Lett.* **2005**, *225*, 131-139.
109. Bagnard, D.; Vaillant, C.; Khuth, S.T.; Dufay, N.; Lohrum, M.; Puschel, A.W.; Belin, M.F.; Bolz, J.; Thomasset, N. Semaphorin 3A-vascular endothelial growth factor-165 balance mediates migration and apoptosis of neural progenitor cells by the recruitment of shared receptor. *J. Neurosci.* **2001**, *21*, 3332-3341.
110. Guttman-Raviv, N.; Shraga-Heled, N.; Varshavsky, A.; Guimaraes-Sternberg, C.; Kessler, O.; Neufeld, G. Semaphorin-3A and semaphorin-3F work together to repel

- endothelial cells and to inhibit their survival by induction of apoptosis. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 26294-26305.
111. Moretti, S.; Procopio, A.; Lazzarini, R.; Rippo, M.R.; Testa, R.; Marra, M.; Tamagnone, L.; Catalano, A. Semaphorin3A signaling controls Fas (CD95)-mediated apoptosis by promoting Fas translocation into lipid rafts. *Blood* **2008**, *111*, 2290-2299.
112. Kigel, B.; Varshavsky, A.; Kessler, O.; Neufeld, G. Successful inhibition of tumor development by specific class-3 semaphorins is associated with expression of appropriate semaphorin receptors by tumor cells. *PLoS One* **2008**, *3*, e3287.
113. Maione, F.; Molla, F.; Meda, C.; Latini, R.; Zentilin, L.; Giacca, M.; Seano, G.; Serini, G.; Bussolino, F.; Giraudo, E. Semaphorin 3A is an endogenous angiogenesis inhibitor that blocks tumor growth and normalizes tumor vasculature in transgenic mouse models. *J. Clin. Invest.* **2009**, *119*, 3356-3372.
114. Casazza, A.; Fu, X.; Johansson, I.; Capparuccia, L.; Andersson, F.; Giustacchini, A.; Squadrito, M.L.; Venneri, M.A.; Mazzone, M.; Larsson, E.; *et al.* Systemic and targeted delivery of semaphorin 3A inhibits tumor angiogenesis and progression in mouse tumor models. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2011**, doi: 10.1161/ATVBAHA.110.211920.
115. Tse, C.; Xiang, R.H.; Bracht, T.; Naylor, S.L. Human Semaphorin 3B (SEMA3B) located at chromosome 3p21.3 suppresses tumor formation in an adenocarcinoma cell line. *Cancer Res.* **2002**, *62*, 542-546.
116. Castro-Rivera, E.; Ran, S.; Thorpe, P.; Minna, J.D. Semaphorin 3B (SEMA3B) induces apoptosis in lung and breast cancer, whereas VEGF165 antagonizes this effect. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 11432-11437.
117. Castro-Rivera, E.; Ran, S.; Brekken, R.A.; Minna, J.D. Semaphorin 3B inhibits the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway through neuropilin-1 in lung and breast cancer cells. *Cancer Res.* **2008**, *68*, 8295-8303.
118. Rolny, C.; Capparuccia, L.; Casazza, A.; Mazzone, M.; Vallario, A.; Cignetti, A.; Medico, E.; Carmeliet, P.; Comoglio, P.M.; Tamagnone, L. The tumor suppressor semaphorin 3B triggers a prometastatic program mediated by interleukin 8 and the tumor microenvironment. *J. Exp. Med.* **2008**, *205*, 1155-1171.
119. Brambilla, E.; Constantin, B.; Drabkin, H.; Roche, J. Semaphorin SEMA3F localization in malignant human lung and cell lines: A suggested role in cell adhesion and cell migration. *Am. J. Pathol.* **2000**, *156*, 939-950.
120. Xiang, R.; Davalos, A.R.; Hensel, C.H.; Zhou, X.J.; Tse, C.; Naylor, S.L. Semaphorin 3F gene from human 3p21.3 suppresses tumor formation in nude mice. *Cancer Res.* **2002**, *62*, 2637-2643.
121. Kusy, S.; Nasarre, P.; Chan, D.; Potiron, V.; Meyronet, D.; Gemmill, R.M.; Constantin, B.; Drabkin, H.A.; Roche, J. Selective suppression of *in vivo* tumorigenicity by semaphorin SEMA3F in lung cancer cells. *Neoplasia* **2005**, *7*, 457-465.
122. Kessler, O.; Shraga-Heled, N.; Lange, T. Semaphorin-3F is an inhibitor of tumor angiogenesis. *Cancer Res.* **2004**, *64*, 1008-1015.

123. Bielenberg, D.R.; Hida, Y.; Shimizu, A.; Kaipainen, A.; Kreuter, M.; Choi, K.C.; Klagsbrun, M. Semaphorin 3F, a chemorepellent for endothelial cells, induces a poorly vascularized, encapsulated, nonmetastatic tumor phenotype. *J. Clin. Invest.* **2004**, *114*, 1260-1268.
124. Chabbert-de Ponnat, I.; Buffard, V.; Leroy, K.; Bagot, M.; Bensussan, A.; Wolkenstein, P.; Marie-Cardine, A. Antiproliferative effect of semaphorin 3F on human melanoma cell lines. *J. Invest. Dermatol.* **2006**, *126*, 2343-2345.
125. Nasarre, P.; Kusy, S.; Constantin, B. Semaphorin SEMA3F has a repulsing activity on breast cancer cells and inhibits E-cadherin-mediated cell adhesion. *Neoplasia* **2005**, *7*, 180-189.
126. Christensen, C.; Ambartsumian, N.; Gilestro, G.; Thomsen, B.; Comoglio, P.; Tamagnone, L.; Guldberg, P.; Lukanidin, E. Proteolytic processing converts the repelling signal Sema3E into an inducer of invasive growth and lung metastasis. *Cancer Res.* **2005**, *65*, 6167-6177.
127. Pan, H.; Wanami, L.S.; Dissanayake, T.R.; Bachelder, R.E. Autocrine semaphorin3A stimulates alpha2 beta1 integrin expression/function in breast tumor cells. *Breast Cancer Res. Treat.* **2009**, *118*, 197-205.
128. Nasarre, P.; Constantin, B.; Rouhaud, L. Semaphorin SEMA3F and VEGF have opposing effects on cell attachment and spreading. *Neoplasia* **2003**, *5*, 83-92.
129. Gluzman-Poltorak, Z.; Cohen, T.; Shibuya, M.; Neufeld, G. Vascular endothelial growth factor receptor-1 and neuropilin-2 form complexes. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 18688-18694.
130. Favier, B.; Alam, A.; Barron, P.; Bonnin, J.; Laboudie, P.; Fons, P.; Mandron, M.; Herault, J.P.; Neufeld, G.; Savi, P. Neuropilin-2 interacts with VEGFR-2 and VEGFR-3 and promotes human endothelial cell survival and migration. *Blood* **2006**, *108*, 1243-1250.
131. Caunt, M.; Mak, J.; Liang, W.C.; Stawicki, S.; Pan, Q.; Tong, R.K.; Kowalski, J.; Ho, C.; Reslan, H.B.; Ross, J.; *et al.* Blocking neuropilin-2 function inhibits tumor cell metastasis. *Cancer Cell* **2008**, *13*, 331-342.
132. Xu, Y.; Yuan, L.; Mak, J.; Pardanaud, L.; Caunt, M.; Kasman, I.; Larrivée, B.; Del Toro, R.; Suchting, S.; Medvinsky, A.; *et al.* Neuropilin-2 mediates VEGF-C-induced lymphatic sprouting together with VEGFR3. *J. Cell. Biol.* **2010**, *188*, 115-130.
133. Tang, X.L.; Sun, J.F.; Wang, X.Y.; Du, L.L.; Liu, P. Blocking neuropilin-2 enhances corneal allograft survival by selectively inhibiting lymphangiogenesis on vascularized beds. *Mol. Vis.* **2010**, *16*, 2354-2361.
134. Fukasawa, M.; Matsushita, A.; Korc, M. Neuropilin-1 interacts with integrin beta1 and modulates pancreatic cancer cell growth, survival and invasion. *Cancer Biol. Ther.* **2007**, *6*, 1173-1180.

135. Valdembri, D.; Caswell, P.T.; Anderson, K.I.; Schwarz, J.P.; König, I.; Astanina, E.; Caccavari, F.; Norman, J.C.; Humphries, M.J.; Bussolino, F.; Serini, G. Neuropilin-1/GIPC1 signaling regulates alpha5beta1 integrin traffic and function in endothelial cells. *PLoS Biol.* **2009**, *7*, e1000025.
136. Robinson, S.D.; Reynolds, L.E.; Kostourou, V.; Reynolds, A.R.; da Silva, R.G.; Tavora, B.; Baker, M.; Marshall, J.F.; Hodivala-Dilke, K.M. Alphas beta3 integrin limits the contribution of neuropilin-1 to vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 33966-33981.
137. Hu, B.; Guo, P.; Bar-Joseph, I.; Imanishi, Y.; Jarzynka, M.J.; Bogler, O.; Mikkelsen, T.; Hirose, T.; Nishikawa, R.; Cheng, S.Y. Neuropilin-1 promotes human glioma progression through potentiating the activity of the HGF/SF autocrine pathway. *Oncogene* **2007**, *26*, 5577-5586.
138. Matsushita, A.; Götze, T.; Korc, M. Hepatocyte growth factor-mediated cell invasion in pancreatic cancer cells is dependent on neuropilin-1. *Cancer Res.* **2007**, *67*, 10309-10316.
139. Glinka, Y.; Prud'homme, G.J. Neuropilin-1 is a receptor for transforming growth factor beta-1, activates its latent form, and promotes regulatory T cell activity. *J. Leukoc. Biol.* **2008**, *84*, 302-310.
140. Glinka, Y.; Stoilova, S.; Mohammed, N.; Prud'homme, G.J. Neuropilin-1 exerts coreceptor function for TGF-beta-1 on the membrane of cancer cells and enhances responses to both latent and active TGF-beta. *Carcinogenesis* **2010**, *32*, 613-621.
141. Cao, S.; Yaqoob, U.; Das, A.; Shergill, U.; Jagavelu, K.; Huebert, R.C.; Routray, C.; Abdelmoneim, S.; Vasdev, M.; Leof, E.; *et al.* Neuropilin-1 promotes cirrhosis of the rodent and human liver by enhancing PDGF/TGF-beta signaling in hepatic stellate cells. *J. Clin. Invest.* **2010**, *120*, 2379-2394.
142. Cao, Y.; Szabolcs, A.; Dutta, S.K.; Yaqoob, U.; Jagavelu, K.; Wang, L.; Leof, E.B.; Urrutia, R.A.; Shah, V.H.; Mukhopadhyay, D. Neuropilin-1 mediates divergent R-Smad signaling and the myofibroblast phenotype. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 31840-31848.
143. Grandclement, C.; Bedel, R.; Kantelip, B.; Bouard, A.; Mougey, V.; Klagsbrun, M.; Ferrand, C.; Tiberghien, P.; Pivot, X.B.; Borg, C. Neuropilin-2 and epithelial to mesenchymal transition in colorectal cancer cells. *J. Clin. Oncol.* **2010**, *28*, Abstract Number : 10628.
144. Guarino, M. Epithelial-mesenchymal transition and tumour invasion. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2007**, *39*, 2153-2160.
145. Bergé, M.; Bonnin, P.; Sulpice, E.; Vilar, J.; Allanic, D.; Silvestre, J.S.; Lévy, B.I.; Tucker, G.C.; Tobelem, G.; Merkulova-Rainon, T. Small interfering RNAs induce target-independent inhibition of tumor growth and vasculature remodeling in a mouse model of hepatocellular carcinoma. *Am. J. Pathol.* **2010**, *177*, 3192-3201.
146. Raskopf, E.; Vogt, A.; Standop, J.; Sauerbruch, T.; Schmitz, V. Inhibition of neuropilin-1 by RNA-interference and its angiostatic potential in the treatment of hepatocellular

carcinoma.

Z Gastroenterol **2010**, *48*, 21-27.

147. Hong, T.M.; Chen, Y.L.; Wu, Y.Y.; Yuan, A.; Chao, Y.C.; Chung, Y.C.; Wu, M.H.; Yang, S.C.; Pan, S.H.; Shih, J.Y.; Chan, W.K.; Yang, P.C. Targeting neuropilin 1 as an antitumor strategy in lung cancer. *Clin. Cancer Res.* **2007**, *13*, 4759-4768.
148. Schuch, G.; Machluf, M.; Bartsch, G., Jr.; Nomi, M.; Richard, H.; Atala, A.; Soker, S. *In vivo* administration of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its antagonist, soluble neuropilin-1, predicts a role of VEGF in the progression of acute myeloid leukemia *in vivo*. *Blood* **2002**, *100*, 4622-4628.
149. Geretti, E.; Van Meeteren, L.A.; Shimizu, A.; Dudley, A.C.; Claesson-Welsh, L.; Klagsbrun, M. A mutated soluble neuropilin-2 B domain antagonizes vascular endothelial growth factor bioactivity and inhibits tumor progression. *Mol. Cancer Res.* **2010**, *8*, 1063-1073.
150. Sugahara, K.N.; Teesalu, T.; Karmali, P.P.; Kotamraju, V.R.; Agemy, L.; Girard, O.M.; Hanahan, D.; Mattrey, R.F.; Ruoslahti, E. Tissue-penetrating delivery of compounds and nanoparticles into tumors. *Cancer Cell* **2009**, *16*, 510-520.
151. Sugahara, K.N.; Teesalu, T.; Karmali, P.P.; Kotamraju, V.R.; Agemy, L.; Greenwald, D.R.; Ruoslahti, E. Coadministration of a tumor-penetrating peptide enhances the efficacy of cancer drugs. *Science* **2010**, *328*, 1031-1035.
152. Teesalu, T.; Sugahara, K.N.; Kotamraju, V.R.; Ruoslahti, E. C-end rule peptides mediate neuropilin-1-dependent cell, vascular, and tissue penetration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 16157-16162.
153. Jarvis, A.; Allerston, C.K.; Jia, H.; Herzog, B.; Garza-Garcia, A.; Winfield, N.; Ellard, K.; Aqil, R.; Lynch, R.; Chapman, C.; *et al.* Small molecule inhibitors of the neuropilin-1 vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) interaction. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 2215-2226.
154. Karjalainen, K.; Jaalouk, D.E.; Bueso-Ramos, C.E.; Zurita, A.J.; Kuniyasu, A.; Eckhardt, B.L.; Marini, F.C.; Lichtiger, B.; O'Brien, S.; Kantarjian, H.M.; *et al.* Targeting neuropilin-1 in human leukemia and lymphoma. *Blood* **2011**, *117*, 920-927.
155. Nasarre, C.; Roth, M.; Jacob, L.; Roth, L.; Koncina, E.; Thien, A.; Labourdette, G.; Poulet, P.; Hubert, P.; Crémel, G.; Roussel, G.; Aunis, D.; Bagnard, D. Peptide-based interference of the transmembrane domain of neuropilin-1 inhibits glioma growth *in vivo*. *Oncogene* **2010**, *29*, 2381-2392.
156. Liang, W.C.; Dennis, M.S.; Stawicki, S.; Chanthery, Y.; Pan, Q.; Chen, Y.; Eigenbrot, C.; Yin, J.; Koch, A.W.; Wu, X.; *et al.* Function blocking antibodies to neuropilin-1 generated from a designed human synthetic antibody phage library. *J. Mol. Biol.* **2007**, *366*, 815-829.
157. Pan, Q.; Chanthery, Y.; Liang, W.C.; Stawicki, S.; Mak, J.; Rathore, N.; Tong, R.K.; Kowalski, J.; Yee, S.F.; Pacheco, G.; *et al.* Blocking neuropilin-1 function has an

additive

effect

with

anti-VEGF to inhibit tumor growth. *Cancer Cell* **2007**, *11*, 53-67.

158. [http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00747734?term=neuropilin&rank=1\(02/01/2011\)](http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00747734?term=neuropilin&rank=1(02/01/2011))

159. Basile, J.R.; Castilho, R.M.; Williams, V.P.; Gutkind, J.S. Semaphorin 4D provides a link between axon guidance processes and tumor-induced angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 9017-9022.

160. Conrotto, P.; Valdembri, D.; Corso, S.; Serini, G.; Tamagnone, L.; Comoglio, P.M.; Bussolino, F.; Giordano, S. Sema4D induces angiogenesis through Met recruitment by Plexin B1. *Blood* **2005**, *105*, 4321-4329.

161. [http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01313065?term=semaphorin&rank=1\(02/01/2011\)](http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01313065?term=semaphorin&rank=1(02/01/2011))

© 2011 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).