



HAL
open science

Evènements moléculaires spécifiques au cours des adénocarcinomes pulmonaires lépidiques humains et animaux

Maryline Gomes

► **To cite this version:**

Maryline Gomes. Evènements moléculaires spécifiques au cours des adénocarcinomes pulmonaires lépidiques humains et animaux. Virologie. Université de Lyon, 2017. Français. NNT : 2017LYSE1101 . tel-01615814

HAL Id: tel-01615814

<https://theses.hal.science/tel-01615814>

Submitted on 12 Oct 2017

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.



N°d'ordre NNT : 2017LYSE1101

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON
opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale ED 341
Evolution Ecosystème Microbiologie Modélisation

Spécialité de doctorat : Biologie

Soutenue publiquement le 07/07/2017, par :
Maryline Gomes

**Evènements moléculaires spécifiques au cours
des adénocarcinomes pulmonaires lépidiques
humains et animaux**

Devant le jury composé de :

De Las Heras, Marcelo ; Professeur - Facultad de Veterinaria, Zaragoza
Gazzeri, Sylvie ; DR2 - INSERM
Meyer, Gilles ; Professeur – DMV Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Cottin Vincent ; PU/PH - Université Claude Bernard Lyon 1
Legras-Lachuer Catherine ; MCU – Université Claude Bernard Lyon 1
Leroux, Caroline DR2 – INRA

Rapporteur
Rapporteuse
Rapporteur
Examineur
Examinatrice
Directrice de thèse

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Président du Conseil Académique

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire

Vice-président de la Commission Recherche

Directrice Générale des Services

M. le Professeur Frédéric FLEURY

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Didier REVEL

M. le Professeur Philippe CHEVALIER

M. Fabrice VALLÉE

Mme Dominique MARCHAND

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Faculté d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur G.RODE

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Directeur : M. X. PERROT

Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Département Biologie

Département Chimie Biochimie

Département GEP

Département Informatique

Département Mathématiques

Département Mécanique

Département Physique

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Polytech Lyon

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. F. DE MARCHI

Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD

Directeur : Mme C. FELIX

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Directeur : M. le Professeur J-C PLENET

Directeur : M. Y. VANPOULLE

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Directeur : M. le Professeur E.PERRIN

Directeur : M. G. PIGNAULT

Directeur : M. le Professeur C. VITON

Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Directeur : M. N. LEBOISNE

REMERCIEMENTS

Premièrement, je tiens à remercier les membres de mon jury pour avoir jugé et évalué mon travail ainsi que pour leurs précieux conseils et leurs questions pertinentes lors de ma soutenance de thèse. Merci au **Professeur Vincent Cottin** pour avoir accepté de présider le jury. Merci au **Professeur Marcelo de las Heras**, au **Docteur Sylvie Gazzeri** et au **Professeur Gilles Meyer** pour la lecture de mon manuscrit et pour leur analyse critique et constructive. Merci au **Docteur Catherine Legras-Lachuer** pour son investissement dans le projet et pour son accompagnement pendant ces années dans mon comité de suivi de thèse.

De nombreux changements se sont produits au sein de l'unité depuis mon arrivée avec de grosses modifications dans les équipes mais tout ceci n'a jamais rien changé quant à la bonne humeur qui est présente tous les jours au sein de l'**UMR754** ! Pour cela et encore pour plein d'autres raisons, je tiens à remercier tous les membres actuels et passés de l'unité sans qui, ma thèse n'aurait pas été aussi agréable.

Tout d'abord, je tiens à remercier chaque personne composant et ayant composé l'**Axe 1** :

A **Caroline**, merci de m'avoir accueilli dans ton équipe et de m'avoir encadrée pendant ces quatre années. Merci pour tes conseils, pour ton écoute et pour tes corrections aussi bien le long de la thèse que lors de la dernière étape de rédaction du manuscrit et de préparation de l'oral. Tout ceci a fait de ma thèse une expérience très constructive qui m'a permis d'apprendre beaucoup sur le travail de chercheur mais également sur moi-même. Merci d'avoir partagé ton expérience scientifique et ta rigueur dans l'organisation de l'équipe. Cette dernière ne me quittera plus !

A **Fabienne**, merci de ton soutien pendant ces années de thèse. Merci pour ta bonne humeur tous les jours et pour ta disponibilité. Je n'oublierai jamais ton aide précieuse à la fin de ma thèse. Le temps que tu m'as laissé pour terminer la rédaction de mon manuscrit et la préparation de mon oral a été d'un grand secours. Les exosomes nous tendent maintenant les bras !!!

A **Alexandra**, merci d'être une amie pour moi ! Merci de m'écouter me plaindre, râler, pester (beaucoup trop souvent, je m'en excuse^^) et te raconter ma vie ! Merci pour ta gentillesse, pour ton calme, pour les heures de rigolades, pour les discussions interminables sur nos week end, nos soirées, nos concerts, nos vacances ! J'espère que nous continuerons à aimer les mêmes groupes de musiques (non, on aime pas du tout Shaka Ponk, c'est pas vrai !), à aimer Quotidien et Yann Barthès (Bonne soirée aaaaahhhh) et à travailler ensemble dans l'harmonie et la sérénité d'un travail de recherche sur les exosomes et autres microvésicules (ahahahah...elle est bonne hein, ma blague hein qu'elle est bonne !! :p). Nous monterons notre temple avec encens et petit bouddha spécial Western blot et un jour, nous les aurons ces manip qu'on n'arrive pas à répéter, nous les aurons !!!!!!! Pour tout ça et pour encore pleins d'autres choses, merci !

A **Barbara**, merci pour ta bonne humeur et ton sourire dans le laboratoire. C'est toi qui m'as formée aux manip lors de mon passage pour mon stage de Master 1 et lors de mon arrivée en thèse, je savais que je

pouvais compter sur toi et te demander n'importe quoi ! Tu fais partie des personnes qui sont l'âme de ce laboratoire. Merci aussi de m'avoir fait découvrir les serpents, les grenouilles, les pogonas et tous autres bêtes ! Merci de m'avoir fait faire la connaissance de Michat, une super minette gentille et pot de colle ! Tu peux toujours compter sur moi pour être sa nounou !

A **Christine**, merci pour tes précieux conseils surtout en ce qui concerne la biomol. Les PCR n'ont pas de secrets pour toi et grâce à toi, certains m'ont été dévoilés ! Merci également pour ta gentillesse et pour nos discussions sur tout et rien dans le bureau ! J'espère que nous en aurons encore de nombreuses !

A **Jean-Michel** ou Jean-Mimi, merci de m'avoir emmené voir ton travail à l'hôpital, merci d'avoir pris le temps de m'expliquer et me montrer de tonnes de choses toujours plus passionnantes les unes que les autres sur ton métier de chirurgien. Ta présence au labo, bien que trop courte dans la semaine, est toujours un plaisir. Que seraient nos mercredis et jeudis sans, comme tu te définis, le « boulet »? Bien triste, pour sûr !

A **Claire**, merci pour ta bonne humeur et pour ton sourire ! Merci pour nos conversations du midi et pour m'avoir fait découvrir qu'il y a beaucoup d'autres destinations dans le monde qui méritent qu'on s'y intéresse. Je te souhaite plein de bonnes choses dans ta carrière !

Les personnes citées ici-bas ne sont plus actuellement dans l'axe mais ont un petit peu fait de celui-ci ce qu'il est aujourd'hui.

A **Margaux**, merci pour tout ! Tu as été avec moi pendant les trois années de ma thèse ! Ensemble nous avons franchis tous les obstacles: les Western, les PCR, les comptes rendus mensuels, les comités de pilotage et j'en passe ! Ta présence sur le bureau d'à côté, nos fou rires, nos discussions, nos révolutions scientifiques qui n'ont jamais été plus loin que l'intérieur de nos têtes, nos litres de thé, nos jouets, nos gâteaux/bonbons et autres sucreries sont gravés dans ma mémoire. Ils m'ont permis de passer à travers tous mes petits soucis de doctorante. Depuis que tu as quitté le labo, ton bureau reste ton bureau à mes yeux et je me mets parfois à espérer que tu es encore là, que tu es juste partie te geler les pieds au Platim ! Je ne peux que te souhaiter le meilleur pour tes projets à venir, je sais qu'ils seront couronnés de succès car tu es forte et l'agrégation de tend déjà les bras !

A **Pierre, Nader et Gabrielle**, chacune de vos années passées dans le laboratoire a été enrichissante. Pierre, merci pour nos repas ensemble les vendredis midi, nos discussions sur la PCR et sur plein d'autres choses ! Nader, merci pour ta bonne humeur et pour ta gentillesse. Merci à tous les deux pour votre humour ! Vos blagues me manquent encore aujourd'hui ! A tous les trois, je vous souhaite le meilleur aussi bien dans votre vie professionnelle que personnelle. Je suis ravie d'avoir pu partager ces années avec chacun d'entre vous.

Aux autres membres de l'UMR754

A **Sylvie**, merci d'être présente. Merci pour ta patience et pour ton écoute. Ton efficacité m'a souvent tiré de soucis de commandes et autres ! Tu es indispensable à ce labo et je te remercie grandement pour tout ce que tu fais tous les jours pour nous tous !

A **Marie-Pierre, Sophie, Céline, Kathy, Catherine, Barbara, Saw see** et **Carine**, merci pour vos sourires, pour votre soutien. J'ai apprécié chacun des moments que nous avons partagés ensemble et j'espère que nous en partagerons encore bien d'autres. Je vous souhaite le meilleur.

Aux doctorants, que notre cohésion ne cesse jamais. Merci pour les pauses goûter, thé, glace, les mots fléchés, les séminaires étudiants et les nombreuses soirées que nous avons faits et faisons encore aujourd'hui. A **Wilhelm**, comme tu le dis si bien, nous sommes arrivés quasiment en même temps au laboratoire. Nous avons fait notre visite hygiène et sécurité tous les deux et nous n'avons pas échangé un mot ce jour-là. Depuis, que de choses se sont passées ! Tu es devenu doctorant et là, on s'est dit que peut être ça vaudrait le coup d'écouter ce que tu avais à dire...et quelle erreur ! Que de jeux de mots et de blagues à deux balles ! Mais que serait ce labo sans Wilou ?!?!? Un labo morose sans « Bonsoir » dès la matinée ! Merci Wilou pour tes blagues qui me font mourir de rire souvent de façon coupable tellement elles sont nulles ! Merci pour ton soutien pendant ma thèse. Merci pour ton soutien en dehors de la thèse. Merci pour nos soirées les jeudis, pour nos randonnées, pour nos escapades et pour tous les moments que nous avons passés ensemble ! J'espère qu'ils dureront encore longtemps ! Je te souhaite le meilleur en commençant par une thèse qui déchire ! A **Lucie** et **Marie**, les deux chinoises du labo : « Ni hao » !! Merci **Lulu** pour ta bienveillance, pour ta gentillesse à toute épreuve, pour ta bonne humeur et ton sourire ! Tu es l'une des plus belles personnes que j'ai eu la chance de rencontrer dans l'unité, surtout ne change pas ! A **Marie**, merci pour ta gentillesse et ton humour. Merci aussi pour tes maladresses et pour avoir renversé ton thé ou ton eau à chaque fois que ta main l'a décidé ! Merci pour ta bonne humeur que rien ne peut entacher. J'espère que nous continuerons, toutes les trois, à voir toujours plus de films au cinéma ! A **Marlène** et **Margot**, merci pour votre présence et pour nos discussions. Je vous souhaite le meilleur.

Bien que partis, les étudiants et Claire, ont bercé le début de ma thèse et ont permis mon intégration dans le laboratoire. Pour cela, je leur en serais toujours reconnaissante.

A **Claire**, je ne saurais même pas par où commencer et ce paragraphe ne fait pas honneur à ma gratitude. Merci d'avoir été mon amie lorsque nous étions toutes les deux dans le labo et plus que tout merci d'être restée mon amie après ton départ. Sans toi, mon intégration au laboratoire aurait été bien plus difficile et sans toi, les soirées auraient été beaucoup moins sympas ! Ta présence est très importante pour moi. Merci pour ta gentillesse, pour ton écoute, pour ta joie, pour nos fou rires, pour nos discussions, pour nos soirées, pour nos sorties en tout genre ! Merci pour tes cookies, tes muffins et toutes autre gâteaux ou repas que tu nous as préparé, ils sont toujours excellents et je ne m'en lasserais jamais ! Plus que tout, merci d'avoir été à mes côtés lors des moments importants de ma vie et d'avoir été un soutien à toute épreuve. Je te souhaite le meilleur Claire, tu le mérites.

A **Emma**, Ouech tranquille ? Bien ? Merci pour tous nos délires qui ont rendu mes journées de manip tellement plus drôles ! Merci pour ta gentillesse et ta bienveillance. Merci de m'avoir fait découvrir des séries et de m'avoir montré que j'étais loin d'atteindre ton niveau de connaissance de Friends. Nous avons formé le groupe des AA Forever avec Claire et Franck et quel plaisir de se retrouver ensemble les jeudis soirs ! Je te souhaite plein de bonnes choses pour la suite et pour la fin de ta thèse. J'espère que tous tes désirs se réaliseront au plus vite.

A **Julien** ou Pedro l'enfant tapir, nous avons passé des heures à partir dans des délires toujours plus fou ! Mon nain qui fait du Data Mining ne me quittera pas ! Merci d'être resté aussi longtemps le soir rendant nos soirées passées au labo d'une qualité exceptionnelle ! Merci pour les courses de fauteuil dans le couloir, merci pour les falcons, merci de m'avoir raccompagné un nombre incalculable de fois jusqu'à chez moi ! Merci de m'avoir fait découvrir Pamela Rose ! Merci d'aimer le poisson, le petit poisson !!!!! Je suis ravie que tout se passe bien pour toi en Ecosse mais j'ai toujours un petit pincement au cœur en sachant que je ne peux plus chanter : « Pas du tout les lapins, les lapins c'est gentiiiiiiiiiii » en passant devant ton ancien bureau. Pour finir, merci de continuer à me raconter des bêtises encore aujourd'hui. J'espère que ça durera encore longtemps !

Aux anciens doctorants du laboratoire, **Franck, Najate, Cyrielle et View**. **Franck**, sans toi les AA Forever et les jeudis « Ninkasi » n'auraient pas existés, je te suis reconnaissante pour ça. Tu nous as montré le chemin de la bière et nous essayons de te faire honneur toutes les semaines depuis ton départ ! Merci pour ta gentillesse et pour ta disponibilité. J'ai toujours aimé discuter avec toi, aussi bien scientifiquement que sur les nombreuses séries et films que nous aimions tous les deux ! Il n'est pas toujours facile de pouvoir parler de Doctor Who sans paraître trop geek, grâce à toi, je pouvais le faire ! Tu as une connaissance impressionnante sur beaucoup de sujets, merci d'avoir partagé ces connaissances avec moi. **Najate et Cyrielle**, votre courage pendant vos thèses m'a impressionnée tous les jours. Vos étiez une inspiration pour la jeune doctorante que j'étais. En plus de ça, vous étiez toujours souriante et de bonne humeur ! Merci pour tout cela. **View**, thank you for your kindness and your smile. We spent very good moments together and I am happy that I had the opportunity of knowing you. I wish you the best in Thailand!

En dehors de l'UMR754, des personnes ont également été très importantes pendant mes quatre années de thèse. Je tiens également à les remercier, sans eux, je n'y serais peut-être pas arrivé.

A **Marie**, on se supporte depuis la seconde, qui aurait cru qu'on se supporte encore aujourd'hui 14 ans après ! Nous avons passé le lycée et la fac pour finalement nous retrouver voisine de laboratoire et d'appartement ! J'espère que ça continue comme ça, les inséparables ! Merci d'avoir été là et de m'avoir souvent écouté ronchonner. Merci de m'avoir soutenue pendant ma thèse et à d'autres moments de ma vie même si ce n'était pas le meilleur moment pour toi ! Je n'en ai jamais rien vu ! Merci pour tout, je n'aurais pas assez de place ici pour te montrer ma reconnaissance !

Aux **Nico**, sans qui les soirées ne seraient pas les mêmes ! **Nicolas B**, merci pour ta gentillesse et pour ton humour ! Merci d'aimer Kaamelott autant que moi et d'avoir une imitation de Perceval qui égale la prestation de Franck Pitiot! Merci pour les soirées chez toi où tu as du supporter un certain nombre de fois ma magnifique voix ! Tu auras été à tour de rôle mon fils, mon cousin et mon grand-père et je suis ravie d'avoir pu partager les trajets Clermont-Lyon ou inversement avec toi. Entre Auvergnat, on se soutient ! Merci de m'avoir fait découvrir les différents types de métal, de m'avoir fait écouter des musiques que je n'aurais jamais découvert si ce n'était pas toi ! Merci pour nos sorties ensemble et merci de m'avoir souvent écoutée. Tu fais également partie des belles personnes que j'ai eu la chance de rencontrer à Lyon et pour cela, je te souhaite beaucoup de bonnes choses dans ta vie professionnelle et personnelle. **Nicolas D**, sans toi, je serais restée ignare sur un nombre incalculable de chose ! Oserais-je les citer ici ? Jamais ! Merci de ton amour pour Jensen Ackles que tu me laisses partager ! Merci d'avoir été là quand parfois ce n'était pas trop la forme. Tu es quelqu'un qui a une capacité exceptionnelle pour réellement voir les gens. Merci pour ta bonne humeur des jeudis soirs. Je te souhaite le meilleur dans ta vie, tu le mérites.

A mes amis, **Mike** et **Laura**, **Tom** et **Alice**, **Johan** et **Eli**, **Benoit**, **Leslie**, **Jeremy** et **Lauren**, vous êtes là depuis mes premiers pas de scientifique...à tous MERCI !

A ma famille,

A mes parents, **Marguerite** et **Dominique**, merci de m'avoir accompagnée pendant ces 29 ans. Votre soutien sans faille m'a permis de me construire au jour le jour et m'a mener à ce que je suis aujourd'hui. Sans vous, je n'aurais pas eu la liberté de choisir ma voie, vous avez toujours été là pour moi, même quand vous n'étiez pas d'accord avec mes choix. Merci pour votre amour et merci d'être toujours à mes côtés. Je ferais tout mon possible pour être toujours aux vôtres.

A **David**, merci d'être à mes côtés tous les jours depuis bientôt 9 ans. Tu me soutiens et tu es toujours là même quand mon caractère de cochon prend le dessus. Merci de me faire découvrir de nouvelles choses. Merci pour ta gentillesse (même si je dis souvent que tu es méchant), merci de me faire rire tous les jours et merci d'avoir choisi de construire ta vie avec moi. Que notre futur soit tout aussi beau que les années que nous avons passées ensemble.

RESUME

Le cancer est l'une des principales causes de morbidité et de mortalité dans le monde avec environ 14 millions de nouveaux cas et 8,2 millions de décès liés aux cancers selon l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé). Le cancer du poumon est le premier cancer diagnostiqué chez l'homme et compte pour 20% du nombre de mort par cancer par an dans le monde. Parmi les cancers pulmonaires, on distingue les cancers à petites cellules et les cancers non à petites cellules. Ce travail a porté sur l'étude des adénocarcinomes pulmonaires lépidiques, un type de cancer non à petites cellules, chez l'homme et l'animal. Chez l'homme, il fait partie des tumeurs pulmonaires rares, pas ou peu lié au tabagisme. Il est similaire cliniquement, radiologiquement et histologiquement à l'adénocarcinome pulmonaire ovin, un cancer du poumon induit par le β -rétrovirus JSRV (Jaagsiekte Sheep RetroVirus) affectant les petits ruminants domestiques. JSRV transforme les cellules épithéliales du parenchyme *via* son enveloppe oncogénique. Ces tumeurs humaines et animales ne sont pas associées au développement de métastases extra-thoraciques ou pleurales. Le but de notre travail a été d'étudier les événements moléculaires spécifiques des adénocarcinomes lépidiques humains et animaux par i. l'analyse transcriptomique de l'expression des gènes dans ces deux cancers, ii. la caractérisation de l'adénocarcinome pulmonaire ovin par l'expression des mucines et iii. l'étude d'un rôle putatif des séquences rétrovirales endogènes dans l'induction de l'adénocarcinome lépidique humain.

Premièrement, notre étude a porté sur l'analyse en parallèle des mécanismes moléculaires spécifiques des adénocarcinomes lépidiques prédominants par l'analyse des profils d'expression des gènes impliqués dans les voies de signalisation BMI1, NOTCH, Hedgehog et WNT importantes dans le développement du poumon normal et au cours des cancers pulmonaires et dans la voie de l'angiogenèse, permettant la dissémination des cellules tumorales. L'augmentation de l'expression de CDH1 (E-cadherin), acteur crucial de la voie BMI1, et la diminution de l'expression des ligands et récepteurs activateurs de l'angiogenèse VEGF/VEGFR (Vascular Growth Factor), PDGF/PDGFR (Platelet-derived Growth Factor) et ANGPT/TIE (Angiopoietin/Tyrosine kinase with immunoglobulin like and EGF like domains) ont été observées dans ces deux cancers. Lors de l'analyse de l'expression des ARNm et des protéines, nous avons mis en évidence le blocage de la voie principale de l'angiogenèse dans les cancers lépidiques. En effet, l'absence d'expression du ligand VEGFA (Vascular Endothelial Growth Factor A) et de son récepteur VEGFR2 (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2) a été observée. Ce blocage n'était pas compensé par la surexpression de gènes impliqués dans les voies alternatives d'angiogenèse. Le blocage de la voie de l'angiogenèse explique l'absence de métastases extra-thoraciques dans les adénocarcinomes lépidiques chez l'homme et l'animal.

Deuxièmement, les adénocarcinomes pulmonaires lépidiques chez l'homme sont subdivisés en deux entités majoritaires : les adénocarcinomes lépidiques prédominants non mucineux et les adénocarcinomes mucineux invasifs. Dans le contexte des analogies entre ces cancers humains et l'adénocarcinome induit par le virus JSRV, nous avons analysé l'expression des mucines dans les cancers animaux. Nous avons montré que sur 37 cancers pulmonaires induits par JSRV, 62% étaient non mucineux, qu'ils sur exprimaient MUC1 (mucin 1, cell surface associated) et que 50% exprimaient MUC5B (mucin 5B, oligomeric mucus/gel-forming). Par ces résultats, nous avons montré que les adénocarcinomes pulmonaires ovins se rapprochaient principalement des adénocarcinomes lépidiques prédominants.

Mots clés : adénocarcinomes lépidiques, JSRV, rétrovirus, VEGF, angiogenèse, mucines

ABSTRACT

Cancer is the main cause of morbidity and mortality worldwide with 14 million new cases and approximately 8.2 million deaths according to the WHO (World Health Organization). Lung cancer is the most diagnosed cancer in men and account for 20% of cancer death in the world annually. Among lung cancers, there are small cell lung cancers and non-small cell lung cancers. My work focused on the lepidic adenocarcinoma, a subtype of non-small cell lung cancer, in humans and animals. In humans, it is a rare lung cancer and it is not or rarely linked to tobacco smoking. Lepidic adenocarcinomas share striking clinical, radiological and histopathological similarities with ovine pulmonary adenocarcinomas induced by the β -retrovirus JSRV (Jaagsiekte Sheep RetroVirus) affecting sheep and goats. JSRV transforms epithelial cells of the distal lung through its oncogenic envelope. These human and animal tumors are not associated with pleural or extra thoracic metastases. My work was to study specific molecular events in human and animal lepidic adenocarcinomas by i. a transcriptomic analysis of the gene expression in these two lung cancers, ii. ovine pulmonary adenocarcinoma characterization by mucin expression and iii. the study of a potential role for endogenous retroviral sequences in the induction of human lepidic adenocarcinomas.

First, my work focused on the parallel analysis of expression patterns in genes implicated in BMI1, NOTCH, Hedgehog and WNT pathways important for lung development and for lung cancer development and the angiogenesis pathway whose activation leads to cancer cell dissemination. CDH1 (E-cadherin) up regulation and the down regulation of main angiogenic ligand and receptors VEGF/VEGFR (Vascular Endothelial Growth Factor), PDGF/PDGFR (Platelet-derived Growth Factor) and ANGPT/TIE (Angiopoietin/Tyrosine kinase with immunoglobulin like and EGF like domains) were observed. Then, when analyzing lepidic adenocarcinomas mRNA and protein expression, we highlighted the blockade of the main angiogenesis pathway. Indeed, the VEGFA ligand and its receptor VEGFR2 were absent in lepidic adenocarcinomas. Moreover, this blockade was not compensated with angiogenic alternative pathways. These results correlate with the absence of extra thoracic metastases in human and animal lepidic adenocarcinomas.

Secondly, human lepidic predominant adenocarcinomas are divided in two groups, non-mucinous lepidic adenocarcinomas and invasive mucinous adenocarcinomas. To characterize ovine pulmonary adenocarcinomas and determine to which one of these two human lepidic adenocarcinomas they are close to, we analyzed mucine expression in animal lung cancer. On 37 JSRV-induced lung cancer, 62% were non-mucinous, 100% expressed MUC1 (mucin 1, cell surface associated) and 50% expressed MUC5B (mucin 5B, oligomeric mucus/gel-forming). These results highlighted that ovine pulmonary adenocarcinomas are closer to non-mucinous lepidic adenocarcinomas.

Keywords: lepidic adenocarcinoma, JSRV, retrovirus, VEGF, angiogenesis, mucin

LISTE DES ABREVIATIONS

ABIN-2: A20-Binding Inhibitor of NFκB2	CCBE1: Collagen and Calcium Binding EGF domains 1
Ab-MuLV: Abelson Murine Leukemia Virus	CCD: Coiled Coil Domain
ADAM10: A Desintegrin and Metalloproteinase 10	CDC42: Cell Division Cycle 42
ADAM17: A Desintegrin and Metalloproteinase 10	CDH1: Cadherin 1 ou E-Cadherin
ADAMTS3: ADAM metalloproteinase with Thrombospondin type 1 motif 3	CDH2: Cadherin 2
AECII: Alveolar Epithelial Type II Cell	CDH5: Cadherin 5 ou Vascular Endothelial Cadherin
AHV: Avian Hemangioma Retrovirus	CDH13: Cadherin 13
AIS: Adénocarcinome <i>in situ</i>	CDK4: Cyclin Dependant Kinase 4
AKT: AKT serine/threonine kinase	CDK6: Cyclin Dependant Kinase 6
AKT8: Murine Thymoma Virus	CDKN1C : Cyclin Dependant Kinase Inhibitor 1C
ALP: Adénocarcinome lépidique prédominant	CDKN2A: Cyclin Dependant Kinase Inhibitor 2A
ALV: Avian Leukosis Virus	CDO : Cell adhesion associated, oncogene regulated
AMI: Adénocarcinome mucineux invasif	Cellules NK: Cellules Natural Killer
AMIV: Adénocarcinome mini-invasif	CFLAR: CASP8 and FADD like Apoptosis Regulator
ANGPT1: Angiopoietin 1	CHEK2: Checkpoint Kinase 2
ANGPT2: Angiopoietin 2	CK1: Casein kinase 1
ANGPT3: Angiopoietin 3	CK20: Cytokératine 20
ANGPT4: Angiopoietin 4	CNPC: Cancer pulmonaire non à petites cellules
ANGPTL4: Angiopoietin-like 4	COL18A1: Collagen type XVIII alpha 1 chain
AP-1: Activator Protein 1	COX2: Cyclooxygenase 2
AP-2: Activator Protein 2	CPC: Cancer pulmonaire à petites cellules
APC: Adenomatosis Polycomb Complex	CRE: cAMP Responsive Element
APOBEC: Apolipoprotein B mRNA Editing enzyme Catalytic subunits	CREB: cAMP Responsive Element Binding Protein
ARE: AU Rich Elements	CRK: CRK proto-oncogen, adaptator protein
ASV16: Avian Sarcoma Virus 16	CRK1: CDC2 related kinase
ASV17: Avian Sarcoma Virus 17	CS1F: Colony Stimulating Factor 1
ATF4: Activating Transcription Factor 4	CSF1R: Colony Stimulating Factor 1 Receptor
ATLL: Adult T-cell Leukemia and Lymphoma	CT: Cytoplasmic Tail
AXL: AXL Receptor Tyrosine Kinase	CT10: Avian Sarcoma Virus CT10
BAD: BCL2 Associated Agonist of cell Death	CTNNB1: Catenin bêta 1/ β-caténine
BCL2: B-cell CLL/Lymphoma 2)	CXCL8: C-X-C motif chemokine Ligand 8
BLV: Bovine Leukemia Virus	CXCL12: C-X-C motif chemokine Ligand 12
BMI1: BMI1 proto-oncogene, polycomb ring finger	CXCR1: C-X-C motif chemokine Receptor 1
BMK1/ERK5: Big Mitogen-activated protein kinase 1/Extracellular signal regulated kinase 5	CXCR2: C-X-C motif chemokine Receptor 2
BMP4: Bone Morphogenic Protein 4	CXCR4: C-X-C motif chemokine Receptor 4
BMP7: Bone Morphogenic Protein 7	DAND5: DAN domain BMP antagonist family member 5
BMP9: Bone Morphogenic Protein 9	DHH: Desert Hedgehog
BOC: Brother of CDO	DISP: Dispatched
BPA: Bisphénol A	DKK1: Dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 1
BRCA1: BReast CAncer 1	DLL: Delta-like
BRCA2: BReast CAncer 2	DNMT1: DNA methyltransferase 1
C/EBPα: CCAAT/Enhancer Binding protein alpha	DSH: Dishevelled
C/EBPβ: CCAAT/Enhancer Binding protein bêta	dUTPase: DeoxyUridine Triphosphate
CA: Capside	E2F1: E2 transcription Factor 1
CA9: Carbonic Anhydrase 9	E6: HPV protein Early 6
CagA: Cytotoxin-associated gene A	E7: HPV protein Early 7
CARE: CA-Rich Element	eALV: endogenous Avian Leukosis Virus
CBL: Cbl proto-oncogen	
CC10: Clara Cell specific 10kD protein	

EAV-ES4: Erythroblastosis Avian Virus-ES4
EBNA1: Epstein Barr Virus Nuclear Antigen 1
EBV: Epstein-Barr Virus
EF-1δ: Eukaryotic Translation Elongation Factor 1 delta
EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor
eMLV: endogenous Murine Leukemia Virus
eMMTV: endogenous Mouse Mammary Tumor Virus
enJSRV: endogenous Jaagsiekte Sheep Retrovirus
ENTV: Enzootic Nasal Tumor Virus
EpoR: Erythropoietin Receptor
EREG: Epiregulin
ERK: Extracellular signal-Regulated Kinase
ERRB2: Erb-b2 Receptor Tyrosine Kinase 2
ERV: Endogenous RetroVirus
ESRRA: Estrogen Related Receptor alpha
ETS: E-26 Transformation Specific
ETV2: ETS variant 2
FAK: Focal Adhesion Kinase
FBJ-MSV: Finkel-Biskis-Jenkins Murine Sarcoma Virus
FeLV: Feline Leukemia Virus
FGF1: Fibroblast Growth Factor 1
FGF2: Fibroblast Growth Factor 2
FGF3: Fibroblast Growth Factor 3
FGFR1: Fibroblast Growth Factor Receptor 1
FGFR2: Fibroblast Growth Factor Receptor 2
FGFR3: Fibroblast Growth Factor Receptor 3
FGFR4: Fibroblast Growth Factor Receptor 4
FOXC2: Forkhead box C2
FOXF1: Forkhead box F1
FOXO1: Forkhead box O1
FRd: Fibrinogen-like Domain
FRS2: FGF-substrate 2
FZD: Frizzled
GAB1: GRB2 Associated binding protein
GALV: Gibbon Ape Leukemia Virus
GAP: GTPase Activating Protein
GAS6: Growth Arrest Specific Protein 6
GATA2: GATA binding protein 2
GLI: GLI family zinc finger
GPI: GlycosylPhosphatidylinositol
GRB2: Growth Factor Receptor Bound protein 2
GSK3β: Glycogen Synthase Kinase 3 beta
GTP: Guanosine Tri Phosphate
Ha-MuSV: Harvey Murin Sarcoma Virus
HBV: Hepatitis B Virus
HBx: Hepatitis B virus X protein
HBZ: HTLV-1 Basic Zipper protein
HCV: Hepatitis C Virus
HDAC2: Histone Deacetylase 2
HERV: Human Endogenous RetroVirus
HERV-E: Human Endogenous RetroVirus E
HERV-FRD: Human Endogenous RetroVirus FRD member
HERV-H: Human Endogenous RetroVirus H
HERV-K HML2: Human Endogenous RetroVirus K – Human MMTV-like 2
HERV-K: Human Endogenous RetroVirus K
HERV-L: Human Endogenous RetroVirus L
HERV-W: Human Endogenous RetroVirus W
HES: Hes family bHLH transcription factor
HHV8: Human Herpes Virus type 8
HIF1α: Hypoxia Inducible Factor 1 alpha subunit
HIP: Hedgehog interacting protein
HK1: Hexokinase 1
HK2: Hexokinase 2
HNF-3β: Hepatocyte Nuclear Factor 3 beta
HNRNDP: Heterogenous Nuclear Ribonucleoprotein D
HPV: Human Papilloma Virus
HRAS: HRAS, proto-oncogene, GTPase
HRE: Hypoxia Response Element
HSPA1A: Heat Shock Protein family member 1A
HSPG: Heparan Sulfate ProteoGlycan
hTERT: human Telomerase Reverse Transcriptase
HTLV-1: Human T lymphotropic Virus type 1
HTLV-2: Human T lymphotropic Virus type 2
HYAL-2: Hyaluronoglucosaminidase 2
IFNG: Interferon gamma
IGF1R: Insulin like Growth Factor 1 Receptor
IHH: Indian Hedgehog
Ik-2: Ikaros family zinc finger 2
IKK: IκB Kinase
IKKα: I-KappaB Kinase alpha
IL-6: Interleukine 6
IL-8: Interleukine 8
IL-10: Interleukine 10
IL-11 : Interleukine 11
IL1β: Interleukine 1 beta
IRF5: Interferon Regulatory Factor 5
ISHLT: International Society for Heart and Lung Transplantation
ITAM: Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif
ITGAM: Integrin alphaM
JAG: Jagged
JAK2: Janus Kinase 2
JNK1: c-JUN N-terminal kinase 1
JNK2: c-JUN N-terminal kinase 2
JSRV: Jaagsiekte Sheep Retrovirus
KIF7: Kinesin family member 7
Ki-MuSV: Kristen Murin Sarcoma Virus
KISS1: KiSS-1 metastatic suppressor 1
KORV-B: Koala Retrovirus B
KRAS: KRAS proto-oncogen, GTPase
LANA: Latency-Associated Nuclear Antigen
LHX2: LIM Homeobox 2

LMP1: Latent Membran Protein 1
LNx: Ligand of Numb Protein X
LOx: Lysyl Oxydase
LRP5/6: LDL receptor related protein 5/6
LSD1: Lysine Demethylase 1A
LTR: Long Terminal Repeat
LYVE-1: Lymphatic Vessel Endothelial hyaluronan receptor 1
MA: Matrice
MAD1: Mitotic spindle assembly checkpoint protein 1
MAML1: Mastermind-like transcriptional coactivator 1
MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase
MCPyV: Merkel Cell PolyomaVirus
MEK: MAPK Kinase
MERTK: MER proto-oncogen, Tyosine Kinase
MERV-L: Mouse Endogenous RetroVirus L
miRNA: microRNA
MLH1: MutL homolog 1
MMP2: Matrix Metallopeptidase 2
MMP7: Matrix Metallopeptidase 7
MMP9: Matrix Metallopeptidase 9
MMTV: Mouse Mammary Tumor Virus
Mo-MuLV: Moloney Murine Leukemia Virus
MTA1: Metastasis Associated 1
mTOR: mammalian Target of Rapamycin
MUC: Mucine
MuLV: Murine Leukemia Virus
MYC: v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog
NC: Nucléocapside
NCK1: NCK adaptator protein 1
NECD: NOTCH Extracellular Domain
NICD: NOTCH Intracellular Domain
NF-1: NeuroFibromin-1
NFκB: Nuclear Factor-kappa B
NM23-H1: Non Metastatic clone #23 H1
NM23-H2: Non Metastatic clone #23 H2
Np9: env-related Nuclear protein of 9kDa
NRP1: Neuropilin 1
NRP2: Neuropilin 2
NUMB: NUMB endocytic protein
NuRD: Nucleosome Remodeling Deacetylase
OMS: Organisation Mondiale de la Santé
P70S6K: ribosomal Protein S6 Kinase
PDGFA: Platelet Growth Factor A
PDGFB: Platelet Growth Factor B
PDGFC: Platelet Growth Factor C
PDGFD: Platelet Growth Factor D
PDGFR-α: Platelet Growth Factor Receptor alpha
PDGFR-β: Platelet Growth Factor Receptor bêta
PDK1: Pyruvate Dehydrogenase Kinase 1
PDL1: Programmed cell death ligand 1
PDL2: Programmed cell death ligand 2
PDPK1: 3-Phosphoinositide Dependent Protein Kinase 1
PGE2: Prostaglandine E2
PGK1: Phosphoglycerate kinase 1
PI3K: Phosphatidylinoditol-4,5-biphosphate 3-kinase
PIC: Pre integration Complex
PIM1: Pim-1 proto-oncogene serine/threonine kinase
PIP2: Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
PIP3: Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate
PKA: Protein Kinase A
PKC: Protein Kinase C
PLAU: Plasminogen Activator, Urokinase
PLAUR: Plasminogen Activator, Urokinase Receptor
PLCγ: Phospholypase C gamma
PIGF: Placenta Growth Factor
PLZF: Promyelocytic Leukemia Zinc Finger
PPRC1α: Peroxisome Proliferator Activated Receptor gamma, Coactivator 1 alpha
pRB: Retinoblastoma Protein
PROX1: Prospero Homeobox 1
PTB: PhosphoTyrosine Binding
PTCH1: Patched
PTEN: Phosphatase and Tensin homolog
PTGER1: Prostaglandin E Receptor 1
PTPN11: Protein Tyrosine Phosphatase, Non Receptor type 11
PXN: Paxillin
RALBP1: RaIA Binding Protein 1
RARα: Retinoic Acid Receptor alpha
RASSF1A: Ras Association domain Family member 1
RB1: RB transcriptional corepressor 1
RBPJκ: Recombination signal Binding Protein for immunoglobulin kappa J region
RCL: Reactive Center Loop
Rec: HIV rev or HTLV-1 rex like protein
RON: Récepteur d'Origine Nantais
ROS: Reactive Oxygen Species
RSV: Rous Sarcoma Virus
RT: Rétro-transcriptase
S100A8: S100 Calcium Binding Protein A8
S100A9: S100 Calcium Binding Protein A9
SAPK/JNK1, 2, 3: Stress Activated Protein kinase/c-Jun NH2-terminal kinase
SCD: Super-Clustering Domain
SERPINE1: Serpin family E member 1
SFFV: Friend Spleen Focus-Forming Virus
SH2: Src Homology 2
SHC: SH2 adaptator protein
SHH: Sonic Hedgehog
SMAD2: SMAD family member 2
SMAD3: SMAD family member 3

SMO: Smoothened
SNAI1: Snail Family Transcriptional Repressor 1
SNAI2: Snail Family Transcriptional Repressor 2
SNP: Single Nucleotide polymorphism
SOS: SOS Ras/Rac guanine nucleotide exchange factor
SOX2: SRY Box 2
SOX7: SRY-box 7
SOX9: SRY Box 9
SP-1: Specific Protein 1
SP-A: Surfactant Protein A
SP-B: Surfactant Protein B
SP-C : Surfactant Protein C
SP-D : Surfactant Protein D
SRC: SRC proto-oncogene, non-receptor tyrosine kinase
SRLV: Small Ruminant Lentivirus
SSV: Simian Sarcoma Virus
ST6GALNAC5: ST6 N-acetylgalactosaminide alpha-2,6-sialyltransferase 5
STAT3: Signal Transducer and Activator of Transcription 3
SUFU: SUFU negative regulator of Hedgehog signaling
Tax: Transactivator of pX
TGF- α : Transforming Growth Factor alpha
TGF- β : Transforming Growth Factor bêta
THBS1: Thrombospondin 1
TIE1: Tyrosine Kinase with Immunoglobulin-like and EGF-like domains 1
TIE2: Tyrosine Kinase with Immunoglobulin-like and EGF-like domains 2
TIMP1: TIMP metalloproteinase inhibitor 1
TLN: Talin
TLR4: Toll-like Receptor 4
TM: Transmembranaire
TNFSF10: Tumor Necrosis Factor Superfamily Member 10
TNF α : Tumor Necrosis Factor alpha
TP53: Tumor Protein 53
TPS/HAM: Tropical Spastic Paraparesis/HTLV-1 Associated Myelopathy
TRIM28: Tripartite Motif-containing 28
TRKB: Tyrosine Kinase Receptor B
TSAd: T-cell Specific Adaptator
TWIST: Twist Family bHLH transcription factor
TYRO3: TYRO3 Protein Tyrosine Kinase
TZFP: Testicular Zinc Finger Protein
USF1: Upstream Simulatory factor 1
USF2: Upstream Simulatory factor 2
VCAM: Vascular Cell Adhesion Protein 1
vCYC: viral Cyclin
VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFA: Vascular Endothelial Growth Factor A
VEGFB: Vascular Endothelial Growth Factor B
VEGFC: Vascular Endothelial Growth Factor C
VEGFD: Vascular Endothelial Growth Factor D
VEGFE: Vascular Endothelial Growth Factor E
VEGFF: Vascular Endothelial Growth Factor F
VEGFR: Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
VEGFR1: Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1
VEGFR2: Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2
VEGFR3: Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 3
vFLIP: viral CASP8 and FADD like apoptosis regulator
VIH: Virus d'Immunodéficience Humaine
VWC: von Willebrand Factor type C-like
WDSV: Walleye Dermal Sarcoma Virus
WEHV: Walleye Epidermal Hyperplasia Virus
WNT: Wingless type MMTV integration site family, member
WWOX: WW domain containing oxidoreductase
ZFP111: Zinc finger protein 111
ZFP36: Zinc Finger Protein 36
ZNF304: Zinc Finger Protein 304
ZO1: Zonula Occludens 1
 α -SMA: alpha Smooth Actin

TABLE DES MATIERES

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

INTRODUCTION	2
I. Induction du cancer	3
I.1. Les causes des cancers.....	4
I.2. Cancers et agents infectieux.....	6
I.3. Mécanismes moléculaires de la transformation cellulaire par les rétrovirus oncogènes.....	11
I.4. Rétrovirus endogènes et cancer	17
II. Bêta-rétrovirus et adénocarcinomes des voies respiratoires chez les petits ruminants.....	23
II.1. Cancers du poumon et de l'épithélium nasal	23
II.2. Les β -rétrovirus oncogènes chez les petits ruminants.....	27
II.3. JSRV et sa contrepartie endogène	33
II.4. Mécanismes de transformation des cellules par les enveloppes de JSRV et ENTV.....	35
III. L'adénocarcinome lépidique : un cancer similaire à l'adénocarcinome pulmonaire ovin	41
III.1. Adénocarcinomes mucineux invasifs et adénocarcinomes non mucineux.....	45
III.2. Adénocarcinome lépidique de présentation pneumonique	46
IV. Invasion tumorale et métastases.....	50
IV.1. La formation des métastases	50
IV.2. Angiogenèse et lymphangiogenèse.....	55
IV.3. Angiogenèse et cancers non métastatiques	82
V. Objectifs expérimentaux	85

RESULTATS EXPERIMENTAUX

CHAPITRE 1 : Analyse de l'expression des gènes des voies impliquées dans la dissémination des cellules tumorales :	87
Sous expression des gènes de l'angiogenèse dans les adénocarcinomes lépidiques humains et ovins.....	87
I. Etat de l'art.....	87
II. Matériels et méthodes	96

II.1.	Matériel biologique	96
II.2.	Analyse transcriptomique	97
III.	Résultats	98
III.1.	Profils d'expression des adénocarcinomes lépidiques humains et ovins	98
III.2.	Dérégulations des voies BMI1, Hedgehog, NOTCH, WNT et de l'angiogenèse	100
IV.	Discussion	114
	La voie VEGF/VEGFR impliquée dans l'angiogenèse est dérégulée dans les adénocarcinomes lépidiques humains et ovins	119
I.	Etat de l'art	119
II.	Article 1	121
III.	L'inducteur de VEGFA, HIF1 α , est surexprimé dans les adénocarcinomes pulmonaires ovins	144
IV.	Discussion	145
	CHAPITRE 2 : MUC1 et MUC5B sont exprimés dans les adénocarcinomes pulmonaires ovin induits par JSRV	150
I.	Etat de l'art	150
II.	Article 2 : Short note in preparation	152
III.	Discussion	163
	CONCLUSION	
	DISCUSSION GENERALE	166
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	171

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

INTRODUCTION

L'adénocarcinome pulmonaire ovin est un cancer pulmonaire spontané des petits ruminants induit par le bêta-rétrovirus JSRV (Jaagsiekte Sheep RetroVirus). Le virus se transmet par les voies aériennes, le lait, le colostrum et *in utero*. L'adénocarcinome pulmonaire ovin est un problème de santé animale. Il existe de façon sporadique et parfois enzootique dans les troupeaux ce qui induit des pertes économiques par une baisse de production de lait, la réforme et/ou la mort des animaux touchés.

L'adénocarcinome pulmonaire lépidique humain est un cancer pulmonaire rare. C'est un cancer pulmonaire non à petites cellules (CNPC) regroupant en plus des adénocarcinomes, les carcinomes épidermoïdes et les carcinomes à grandes cellules. L'épidémiologie des adénocarcinomes lépidiques est particulière et diffère de celle des autres CNPC puisqu'on observe un lien moins important avec le tabagisme et ils touchent plus de femmes et de patients plus jeunes que les autres CNPC. Au cours des deux dernières décennies, la classification des tumeurs pulmonaires de la plèvre, du thymus et cardiaque de l'OMS a pris en compte les connaissances acquises par les analyses génétiques, moléculaires et immuno-histochimiques. Dans ce cadre, l'adénocarcinome lépidique, avant défini comme cancer bronchioloalvéolaire a été redéfini en 2015 en deux entités : l'adénocarcinome lépidique prédominant et l'adénocarcinome mucineux invasif caractérisés par des différences de développement et de progression.

L'adénocarcinome lépidique et l'adénocarcinome pulmonaire ovin sont apparentés puisqu'ils sont cliniquement, radiologiquement et histologiquement similaires. Ils dérivent des deux mêmes types de cellules pulmonaires, les cellules épithéliales alvéolaires du type II (AECII) dans les alvéoles et les cellules Club, anciennement appelées cellules de Clara, dans les bronchioles. Les cellules transformées prolifèrent le long de la paroi alvéolaire tout en respectant l'architecture de l'alvéole définissant une progression lépidique. Les tumeurs sont de présentation pneumonique et sont caractérisées par l'absence d'invasion pleurale, stromale et vasculaire. Ces cancers ont une croissance lente et les métastases extra-thoraciques sont extrêmement rares chez l'homme comme chez l'animal. L'étiologie virale de l'adénocarcinome pulmonaire ovin interroge sur une origine infectieuse de l'adénocarcinome lépidique chez l'homme. Cette hypothèse a été étudiée depuis plusieurs décennies mais jusqu'à présent, les études ont donné des résultats controversés et la question reste ouverte.

Les similarités entre les deux cancers lépidiques chez l'homme et l'animal suggèrent des événements cellulaires identiques dans l'initiation et/ou la progression des tumeurs. L'étude en parallèle de ces deux tumeurs est indispensable pour comprendre les mécanismes de tumorigenèse et mieux caractériser ces deux cancers. C'était l'objectif de mon travail de thèse. Premièrement, l'absence de métastases extra-thoracique interroge sur les voies cellulaires permettant la dissémination de cellules en dehors du poumon telles que les voies BMI1, NOTCH, WNT, Hedgehog et la voie de l'angiogenèse. Pour cela, une analyse transcriptomique a été réalisée dans les cancers humains et animaux et nous a orientée vers une analyse plus approfondie de la

voie de l'angiogenèse avec comme hypothèse la non expression des gènes de la voie conduisant au caractère non métastatique. Deuxièmement, une analyse de l'expression des mucines dans l'adénocarcinome pulmonaire ovin a été réalisée afin de rapprocher ce cancer ovin vers l'adénocarcinome lépidique prédominant non mucineux ou vers l'adénocarcinome mucineux invasif.

I. Induction du cancer

Le cancer est l'une des principales cause de morbidité et de mortalité dans le monde avec les maladies cardiovasculaires et les maladies infectieuses; en 2012, on comptait approximativement 14 millions de nouveaux cas et 8,2 millions de décès liés aux cancers selon l'Organisation Mondiale de la Santé (377). Ils sont un grave problème de santé publique et l'OMS estime que le nombre de nouveaux cas devrait augmenter de 70% au cours des deux prochaines décennies. Les cancers les plus couramment diagnostiqués sont les cancers du poumon, de la prostate, du côlon et du rectum, de l'estomac et du foie chez l'homme et les cancers du sein, du côlon et du rectum, du col de l'utérus et de l'estomac chez la femme (378).

Les cancers peuvent toucher les divers organes du corps. Les leucémies sont des cancers des cellules souches du sang et proviennent soit de la transformation des cellules souches myéloïdes (leucocytes, granulocytes, monocytes) soit de la transformation des cellules souches lymphoïdes (lymphocytes B, T et cellules Natural Killer). Les leucémies représentent 2,5% des cancers dans le monde et sont les cancers pédiatriques les plus communs avec environ 3800 enfants diagnostiqués chaque année aux Etats-Unis (542). Les lymphomes sont des cancers du système lymphatique incluant les lymphocytes B, T, les cellules NK et les organes lymphoïdes (thymus, moelle osseuse, ganglions, rate et tissus lymphoïdes associés aux muqueuses). Les lymphomes sont classés en lymphomes Hodgkiniens, présentant un type cellulaire particulier, les cellules de Reed-Sternberg, et en lymphomes non Hodgkiniens représentant respectivement 0,5 et 2,7% des cancers dans le monde (378, 490).

Les cancers se développent également dans les organes à partir de cellules d'origine mésenchymateuse pour les sarcomes ou à partir des cellules épithéliales pour les carcinomes. Les sarcomes sont regroupés en deux catégories majeures : les sarcomes des tissus mous (assemblant les tissus adipeux, les muscles, les gaines nerveuses et les vaisseaux sanguins) et les sarcomes osseux. Les carcinomes sont les cancers solides les plus fréquents et touchent par exemple le poumon, le sein, l'appareil digestif et la prostate. Dans le monde, 13% et 12% des cancers humains diagnostiqués en 2012 étaient respectivement des carcinomes pulmonaires et mammaires. Dans le poumon, on distingue premièrement les cancers à petites cellules (CPC) et les cancers non à petites cellules (CNPC) et parmi ces derniers se trouvent, entre autres, les adénocarcinomes pulmonaires qui se développent à partir de l'épithélium glandulaire du poumon (507).

I.1. Les causes des cancers

Les cancers sont des maladies multi causales et sont la résultante de l'interaction entre des facteurs propres à la personne ou facteurs internes et des facteurs externes, environnementaux. Parmi les facteurs environnementaux se trouvent les infections par des agents infectieux oncogènes.

I.1.1. Facteurs internes

Parmi les facteurs internes, on distingue les mutations dans le génome pouvant être acquises ou héréditaires, les modifications épigénétiques et l'influence de l'âge. Des mutations sur des oncogènes ou des gènes suppresseurs de tumeurs vont être responsables de la transformation des cellules en cellules cancéreuses. Le gène suppresseur de tumeur *TP53* (Tumor Protein 53), impliqué dans la surveillance du cycle cellulaire au niveau du point de contrôle G1-S et dans l'induction de l'apoptose, est le plus fréquemment muté dans les cancers avec une présence de la mutation dans 95% des cancers ovariens et 52% des adénocarcinomes pulmonaires (246). Ces mutations sont dues à des dommages à l'ADN pouvant être induits lors de sa réparation ou par des dérivés réactifs de l'oxygène ou ROS (Reactive Oxygen Species), produits lors d'une augmentation du métabolisme cellulaire ou du dysfonctionnement des mitochondries. Les ROS ont la capacité d'activer les voies de signalisation MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) ou PI3K/AKT (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase/AKT serine/threonine kinase), essentielles pour la prolifération et la survie des cellules (pour revue (297)).

Outre les mutations acquises, il existe des facteurs génétiques familiaux entraînant une augmentation du risque de développer un cancer. C'est le cas par exemple pour le cancer du côlon héréditaire avec des mutations sur le gène *MLH1* (MutL homolog 1), pour le rétinoblastome avec le gène *RB1* (RB transcriptional corepressor 1) et pour le cancer du sein avec les gènes *BRCA1* et *BRCA2* (BReast CAncer 1 et 2). *BRCA1* et *BRCA2* sont deux gènes suppresseurs de tumeurs intervenant dans la réparation de l'ADN ; leur mutation compte pour environ 15% des cancers du sein héréditaires (462).

De nombreuses modifications épigénétiques sont présentes dans les cancers telles que la modification du statut de méthylation de l'ADN, des modifications des histones ou de l'expression des miRNAs (40). Des mutations ou des surexpressions de *DNMT1* (DNA methyltransferase 1) ont été observées dans les cancers colorectaux, pulmonaires et mammaires (40). L'hypométhylation de l'ADN est fréquente dans les cancers et induit une augmentation du taux de mutations et la réactivation de la transcription de régions répétées, d'éléments transposables et d'oncogènes ; l'hyperméthylation de l'ADN induit l'inhibition de la transcription de gènes suppresseurs de tumeurs (40). Des méthylations sur le promoteur des gènes *CDKN2A* (Cyclin Dependant Kinase Inhibitor 2A), *RASSF1A* (Ras association domain family member 1) et *CDH13* (Cadherin 13) ont été observées et sont associées à un risque plus élevé de récurrence chez des patients opérés de cancers pulmonaires non à petites cellules (65).

L'âge est un facteur de risque important pour le développement des cancers. Lors du vieillissement, les tissus perdent leur potentiel de régénération et ne peuvent plus éliminer ou remplacer les cellules endommagées à cause, entre autres, de la diminution du pool de cellules souches disponibles. Le génome des cellules vieillissantes devient instable et de nombreuses altérations génétiques et épigénétiques sont présentes, les extrémités des chromosomes raccourcissent, la communication entre cellule est altérée et les mitochondries ne fonctionnent plus augmentant la production de dérivés réactifs de l'oxygène (pour revue, (313)).

1.1.2. Facteurs externes (hors agents infectieux)

Les cancers peuvent être induits par des facteurs externes tels que les agressions de l'environnement ou des agents infectieux. Les radiations ionisantes provenant des rayons cosmiques, de la Terre ou générées par l'homme (radiographies, radiothérapies ou accidents nucléaires) sont des facteurs de risque d'induction de cancers. Une augmentation significative de nombreux cancers de la thyroïde chez des enfants et des adolescents exposés aux radiations ionisantes après l'accident de Tchernobyl a été rapportée (493). Les rayons UV provenant du soleil sont également cancérigènes et sont responsables de 65 à 90% des mélanomes (362). Ces deux types de rayonnements entraînent des modifications de l'ADN telles que des modifications chimiques des purines et des pyrimidines avec la formation de dimères de pyrimidine, des lésions doubles brins de l'ADN et une augmentation de ROS dans les cellules (427). Les UVBs induisent des mutations du gène *TP53* dans les cellules de la peau ; ces mutations sont associées à plus de 50% des cancers épidermoïdes et basocellulaires de la peau (47). Divers polluants présents dans l'air, l'eau et le sol provoquent des cancers. L'arsenic dans l'eau et la nourriture ou l'amiante ont été directement liés à l'induction de cancers dont les cancers du poumon (337). La pollution de l'air générée, entre autres, par les particules fines (résidus de soufre ou de nickel) produites par les voitures roulant au diesel ou par les industries est associée au développement de cancers pulmonaires (421). Des composés utilisés dans la manufacture d'objets du quotidien, dont le BPA (bisphénol A), sont de potentiels facteurs de risque des cancers. Le BPA a la capacité de se lier aux récepteurs à l'œstrogène et aux récepteurs couplés aux protéines G. Des analyses *in vivo* chez des modèles animaux (souris et rats) ont montré une modification des glandes mammaires et une augmentation de la susceptibilité aux cancers mammaires chez les animaux exposés au BPA (451).

Nos comportements individuels peuvent être source de composés toxiques physiques ou chimiques cancérigènes. Ainsi, le tabagisme actif et passif sont associés à une augmentation du risque de cancers du poumon, des voies aériennes supérieures, des reins, de la vessie, des ovaires et colorectaux (229). La fumée de cigarette contient de nombreux cancérigènes tels que le benzopyrène, les nitrosamines, le formaldéhyde, l'acroléine et le polonium (207). Ces composants passent dans la circulation sanguine par l'intermédiaire des voies aériennes supérieures et des poumons, atteignent les organes et y génèrent des dommages à l'ADN. La fumée de cigarette est riche en ROS (oxydant l'ADN) et en adduits à l'ADN (molécules se fixant à l'ADN telles que l'O⁶-methyldeoxyguanosin) et y introduit des mutations (82). Des mutations sur le gène *KRAS* (*KRAS*

proto-oncogène, GTPase), un proto-oncogène cellulaire impliqué dans l'activation de voies de prolifération cellulaire, sont retrouvées majoritairement dans les adénocarcinomes pulmonaires de fumeurs (505). Une consommation d'alcool excessive est associée à des cancers de la cavité buccale, du pharynx, du larynx, de l'œsophage, du foie, du colon et du sein (229). Les boissons alcoolisées contiennent des carcinogènes tels que l'éthanol, l'acétaldéhyde, les aflatoxines et l'éthylcarbamate. Dans des lignées cellulaires de cancers du sein triple négatif (MDA-MB-231 et 468), un type de cancer du sein non hormono-dépendant, l'alcool induit une augmentation de la production de ROS activant la signalisation induite par la voie MAPK et augmente la migration et l'invasion de ces cellules (574). Les traitements hormonaux utilisés lors de la ménopause, particulièrement ceux n'utilisant que des œstrogènes sont associés à une augmentation du risque de cancers du sein, des ovaires et de l'endomètre (230). Un lien entre ces cancers et les contraceptifs oraux a été mis en évidence il y a plusieurs années (436) mais des changements dans les dosages et la composition de ces contraceptifs nécessite des études afin de vérifier que ce lien existe toujours aujourd'hui (495).

L'alimentation joue un rôle important dans le développement de cancers. La consommation de viande rouge ou de charcuterie a été associée à une augmentation du risque de cancers du côlon et de l'estomac par la présence de molécules cancérigènes tels que les composés N-nitrosés (nitrosamides et nitrosamines) (pour revue (239)). Le surpoids et l'obésité sont un facteur de risque des cancers de l'œsophage, du pancréas, du colon, du sein et des reins (25). L'obésité s'accompagne d'une augmentation de la quantité de tissus adipeux induisant l'augmentation du stress du réticulum endoplasmique, des altérations de la matrice extracellulaire, la production d'hormones stéroïdes et une inflammation chronique (pour revue, (235)). Le manque d'activité physique est un facteur de risque du cancer majoritairement car il promeut la prise de poids et l'obésité (229).

I.2. Cancers et agents infectieux

Environ 16% des cancers sont induits par des agents infectieux : bactéries, parasites et virus (Tableau 1) avec une incidence plus élevée dans les pays en voie de développement (23,4%) par rapport aux pays développés (9,2%) (412). Les virus HBV et HCV (Hépatite B/C Virus), HPV (Human Papilloma Virus) et la bactérie *Helicobacter pylori* sont responsables de 2 millions de nouveaux cas de cancer par an dans le monde (412).

Agent infectieux	Taxonomie	Cancers associés	Mécanisme de carcinogénèse	% des nouveaux cas de cancers dus à des infections en 2012 dans le monde
EBV (Epstein-Barr Virus)	<i>Herpesviridae</i>	Lymphome, Carcinome nasopharyngé et gastrique	Directe	5,5
HBV (Hépatite B Virus)	<i>Hepadnaviridae</i>	Hépatocarcinome	Indirecte via inflammation chronique	27
HCV (Hépatite C Virus)	<i>Flaviviridae</i>	Hépatocarcinome, Lymphome non-hodgkinien		
Virus				
HPV (Human Papilloma Virus)	<i>Papillomaviridae</i>	Cancer de l'appareil génital et de la cavité orale	Directe	30
HHV8 (Human Herpes Virus type 8)	<i>Herpesviridae</i>	Sarcome de Kaposi et lymphome	Directe	2
HTLV-1 (Human T lymphotropic Virus type 1)	<i>Retroviridae</i>	Leucémie lymphoïde T	Directe	0,1
Bactérie <i>Helicobacter pylori</i>	<i>Helicobacteraceae</i>	Cancer de l'estomac, Lymphome Non Hodgkinien	Indirecte via inflammation chronique	35
Parasite <i>Clonorchis sinensis</i>	<i>Opisthorchiidae</i>			
<i>Opisthochis viverrini</i>	<i>Opisthorchiidae</i>	Cholangiocarcinome	Indirecte via inflammation chronique	0,1
<i>Schistosoma haematobium</i>	<i>Schistosomatidae</i>	Cancer de la vessie		0,3

Tableau 1 : Agents infectieux induisant des cancers chez l'homme (Adapté de (412)).

Helicobacter pylori est une bactérie gram-négative infectant 70% de la population des pays en voie de développement et 20 à 30% de la population dans les pays développés (413). L'infection par *Helicobacter pylori* est responsable de gastrite et lors d'infections chroniques, augmente le risque de cancers de l'estomac de 75% (413). Entre autres mécanismes, *Helicobacter pylori* induit la transition épithélio-mésenchymateuse, impliquée dans la progression de cancers et dans l'invasion par une augmentation de la production de ROS et par l'augmentation de l'expression de CTNNB1 ou β -caténine, un facteur de transcription des gènes impliqués dans la prolifération cellulaire (367, 413). *Helicobacter pylori* possède un îlot de pathogénicité, *cag* codant pour une protéine CAGA (Cytotoxin-associated gene A) induisant l'inhibition de l'apoptose, un réarrangement du cytosquelette et la perte de polarité cellulaire favorisant la transformation des cellules de l'estomac (413).

Deux parasites, *Clonorchis sinensis* et *Opisthochis viverrini* induisent une inflammation chronique favorisant les cancers des voies biliaires. *Opisthochis viverrini* est présent en Thaïlande et au Laos et *Clonorchis sinensis* dans le sud de la Chine, le Japon, la Corée et Taiwan (244). Ces deux parasites sont transmis par la consommation de poissons crus. Chez l'homme, les parasites se logent dans les parois biliaires et vont induire des changements morphologiques des cellules épithéliales, une inflammation, une production de radicaux libres et de nitrosamines qui induiront à leur tour des dommages à l'ADN (244). *Schistosoma haematobium*, un parasite présent en Afrique, induit une inflammation chronique favorisant les cancers de la vessie. La présence d'antigènes dirigés contre *Schistosoma haematobium*, la présence de protéines de l'inflammation et de métabolites proches des œstrogènes pourraient avoir un rôle dans la transformation de l'épithélium de la vessie (49, 63).

1.2.1. Les cancers viro-induits

Parmi les cancers induits par des agents infectieux, plus de 60% sont induits par des virus, principalement les *Herpesviridae*, les *Hepadnaviridae*, les *Papillomaviridae* et les *Retroviridae* (Tableau 1).

Les papillomavirus infectent les cellules de la peau et des muqueuses. Ils induisent des verrues qui sont des atteintes bénignes mais sont également responsables d'environ 600 000 cas de cancers du col de l'utérus, de la sphère oropharyngée, de l'anus, de la vulve et du pénis dans le monde (22, 35). Ils sont responsables de 22% des cancers chez la femme et 20% des cancers dans le monde (174). Il existe plus de 200 types de papillomavirus humains dont 15 sont associés aux cancers parmi lesquels les génotypes HPV16 et HPV18 responsables de 70% des cancers associés à HPV (379). Les HPV expriment les protéines virales E6 et E7 (Early 6 et 7) qui ont la capacité de faciliter l'immortalisation de kératinocytes humains primaires, d'inactiver les gènes suppresseurs de tumeurs *TP53* et *pRB* (Retinoblastoma protein) et de favoriser l'expression de la sous unité catalytique de la télomérase hTERT (human Telomerase Reverse Transcriptase) dans les cellules primaires épithéliales humaines transformées (pour revue (356)).

Le virus de l'hépatite B induit des infections aiguës et chroniques du foie. Quatre-vingt-quinze pour cent des adultes infectés guérissent de l'infection naturellement ; l'OMS estime cependant que 240 millions de

personnes sont infectées de façon chronique par ce virus et que, parmi celles-ci, 686 000 meurent de complications liées à l'infection. Entre 70 et 90% des infections par HBV induisent des hépatocarcinomes par une inflammation chronique du foie passant par des étapes de fibroses et cirrhoses hépatiques ; le reste des infections induisent des hépatocarcinomes directement (154, 457). Le *flavivirus* HCV (Hépatite C Virus) infecte entre 120 et 170 millions de personnes dans le monde et tue près de 500 000 personnes par an par cirrhoses pour 27% et par cancers hépatiques pour 25% des cas (28, 408).

L'herpesvirus EBV (Epstein-Barr Virus) est présent dans 80-90% de la population adulte mondiale et est responsable de la mononucléose infectieuse. Dans les pays industrialisés, il est associé au développement d'environ 30% des lymphomes de Burkitt et de 30% des lymphomes Hodgkinien et dans les pays en voies de développement, il est associé à plus de 60% des lymphomes Hodgkinien et de 100% des cas de lymphomes de Burkitt (97, 412). EBV est également responsable de plus de 90% des carcinomes nasopharyngés et de 5 à 10% des carcinomes gastriques. Des mutations sur le gène *PI3K*, une hyperméthylation importante du génome et l'amplification des gènes *JAK2* (Janus Kinase 2), *PDL1* et *PDL2* (Programmed cell death 1 ligand 1 and 2) ont été observés dans les cancers gastriques associés à l'infection par EBV. Une surexpression de *NFκB* (Nuclear Factor-kappa B) et une augmentation de la phosphorylation de *STAT3* (Signal Transducer and Activator of Transcription 3) ont été observées dans les lymphomes induits par EBV. Les modifications de l'expression de ces gènes sont responsables de la transformation des cellules dans les cancers gastriques et dans les lymphomes induits par EBV (266).

L'infection par HHV-8 (Human Herpes Virus type 8) est liée au sarcome de Kaposi, une tumeur cutanée grave. HHV-8, se développant dans les cellules endothéliales, provoque la transition endothélio-mésenchymateuse permettant la prolifération de ces cellules ce qui produit des plaques violacées ou brunâtres sur la peau (188). HHV8 agit sur le cycle cellulaire des cellules par l'intermédiaire de la protéine virale LANA (Latency-Associated Nuclear Antigen) qui interagit avec p53, RB1 et GSK3β (Glycogen Synthase Kinase 3 beta) afin de moduler la transition G1/S (188). LANA stabilise également l'oncogène *c-MYC* et promeut sa transcription (188). L'infection par HHV-8 chez des patients déjà infectés par le VIH (Virus d'Immunodéficience Humaine) est responsable de lymphomes et de la maladie de Castelman multicentrique, une maladie causant une inflammation perturbant le développement normal des ganglions et des tissus lymphatiques (176).

Le MCPyV (Merkel Cell Polyomavirus) a été identifié comme responsable du carcinome des cellules de Merkel, une tumeur neuro-endocrine cutanée rare et agressive (167). L'incidence annuelle de la maladie est de 0,6 pour 100 000 personnes ; ce cancer touche particulièrement les personnes âgées, l'âge médian au diagnostic étant de 76,2 ans pour les femmes et 73,6 ans pour les hommes (224).

1.2.2. Rétrovirus et cancers

La famille des *Retroviridae* comporte de nombreux virus oncogènes responsables de cancers chez l'homme ou l'animal (Tableau 2) (438). La famille de ces virus à ARN est subdivisée en sept genres, les alpha,

bêta, delta, gamma et epsilon rétrovirus. Le delta rétrovirus infectant l'homme HTLV-1 (Human T Lymphotropic Virus type 1) induit des leucémies lymphoïdes T de l'adulte ou ATLL (Adult T-cell Leukemia and Lymphoma) et des neuromyélopathies ou TSP/HAM (Tropical Spastic Paraparesis/HTLV-1 Associated Myelopathy) (Tableaux 1 et 2). HTLV-2 est associé de façon sporadique à des TSP/HAM. Cinq à dix millions d'individus sont infectés par HTLV-1 et le virus est endémique dans certaines régions subtropicales comme le sud du Japon, les Caraïbes, l'Afrique sub-saharienne ou l'Amérique du Sud (180). L'infection est majoritairement asymptomatique et seuls 1 à 2% des sujets infectés développent une maladie après une latence de plusieurs dizaines d'années. En 2012, 3000 cancers étaient attribués à une infection par HTLV-1, soit 0,1% des nouveaux cas de cancers dans le monde (412). Le cancer induit par HTLV-1 est très agressif, d'évolution rapide, majoritairement résistant à la chimiothérapie et aboutissant à la mort du malade en moins d'un an (328).

Genre	Hôte	Nom du virus	Tumeurs induites
Alpha	Poulet	ALV (Avian Leukosis Virus)	Leucose lymphoïde
		RSV (Rous Sarcoma Virus)	Sarcome
Bêta	Petits ruminants	JSRV (Jaagsiekte Sheep Retrovirus)	Adénocarcinome pulmonaire
	Souris	ENTV (Enzootic Nasal Tumor Virus)	Adénocarcinome de l'épithélium nasal
		MMTV (Mouse Mammary Tumor Virus)	Adénocarcinome mammaire
Delta	Bovin	BLV (Bovine Leukemia Virus)	Leucémie
	Homme	HTLV-1 (Human T cell Lymphotropic Virus)	Leucémie, Lymphome
Gamma	Chat	FeLV (Feline Leukemia Virus)	Leucémie
	Souris	MuLV (Murine Leukemia Virus)	Leucémie
	Koala	KORV-B (Koala Retrovirus B)	Leucémie, Lymphome
	Gibbon	GALV (Gibbon Ape Leukemia Virus)	Leucémie
Epsilon	Poisson	WDSV (Walleye Dermal Sarcoma Virus)	Sarcome cutané
		WEHV (Walleye Epidermal Hyperplasia Virus)	Hyperplasie de l'épiderme

Tableau 2 : Rétrovirus induisant des tumeurs chez l'homme et l'animal (d'après (349)).

De nombreux rétrovirus oncogènes sont présents chez les animaux (Tableau 2). ALV (Avian Leukosis Virus) et RSV sont deux alphasrétrovirus infectant les poulets et induisant respectivement des leucoses lymphoïdes et des sarcomes (404, 438). Les bêtarétrovirus infectent et induisent des cancers chez les souris et les petits ruminants ; MMTV induit des adénocarcinomes mammaires chez la souris (53), JSRV et ENTV, des adénocarcinomes pulmonaires et de l'épithélium nasal chez le mouton et la chèvre (122, 397). Le deltarétrovirus BLV induit des leucémies chez les bovins (342). Les epsilon-rétrovirus WDSV et WEHV provoquent des cancers cutanés chez les poissons.

Certains rétrovirus possèdent des contreparties endogènes, intégrées dans le génome de leurs hôtes, comme le gammarétrovirus KoRV (Koala Retrovirus) en cours d'endogénéisation chez les koalas. KoRV a été isolé de koalas sauvages et en captivité en Australie et dans les zoos d'autres pays dans le monde. KoRV est proche des gammarétrovirus FeLV et GaLV induisant respectivement de leucémies chez le chat et les gibbons. Cinq sous types KoRVs ont été décrit jusqu'à présent, KoRV-A, KoRV-B/J, KoRV-C, KoRV-D et KoRV-E qui diffèrent par la séquence du gène codant pour leur protéine d'enveloppe. KoRV-B/J est un virus exogène ;

moins d'une copie de ce virus par cellule a été détectée dans les tissus d'animaux infectés (496). A sa différence, plusieurs copies de KoRV-A ont été détectées dans le génome de toutes les cellules du koala y compris dans les gamètes males chez des animaux provenant du nord de l'Australie (496). La présence de ces nombreuses copies de KoRV-A, y compris dans le sperme indique que ce virus est endogène chez les koalas. De façon intéressante, KoRV-A n'est pas présent chez les koalas du sud de l'Australie indiquant que le processus d'endogénéisation est toujours en cours. Jusqu'à présent, aucun lien de causalité n'a été établi entre la présence de KoRV et l'induction de cancers mais sa proximité avec des rétrovirus oncogènes et l'augmentation des niveaux d'ARN KoRV chez des koalas atteints de leucémies lymphoïdes semble indiquer un lien entre virus et maladie (pour revue (264)).

I.3. Mécanismes moléculaires de la transformation cellulaire par les rétrovirus oncogènes

Parmi les rétro-oncogènes, on distingue : les rétrovirus à « oncogénèse aigüe » et les rétrovirus « à oncogénèse non-aigüe ».

I.3.1. Oncogénèse aigüe

Les rétrovirus à oncogénèse aigüe sont présents dans de nombreuses espèces dont les oiseaux, les souris et les primates (Tableau 3) (527). Ils induisent rapidement des tumeurs polyclonales dans la majorité des individus infectés. La plupart de ces rétrovirus ont la capacité de transformer les cellules *in vitro* leur conférant des capacités d'invasion, d'échappement aux inhibiteurs de croissance, de multiplication illimitée et d'échappement à la mort cellulaire (198). L'oncogénèse aigüe est due à la présence d'un oncogène viral d'origine cellulaire ou proto-oncogène c'est à dire des gènes cellulaires dont les fonctions sont entre autre, la stimulation de la croissance et de la différenciation cellulaire. Lorsqu'ils sont mutés ou amplifiés, les proto-oncogènes deviennent des oncogènes capables d'induire des cancers (527).

Virus	Oncoprotéines rétrovirales	Type de protéine
SSV (Simian Sarcoma Virus)	v-sis , homologue des PDGF (platelet-derived growth factor)	Facteur de croissance
EAV-ES4 (Erythroblastosis avian Virus-ES4)	v-erbA , homologue de THRA (Thyroid hormon receptor alpha) v-erbB , homologue de EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor)	Récepteur hormonal Récepteur tyrosine kinase
Ha-MuSV (Harvey Murin Sarcoma Virus)	hras , GTPase	Protéines G
Ki-MuSV (Kristen Murin Sarcoma Virus)	kras , GTPase	
CT10 (Avian Sarcoma Virus CT 10)	v-crk , modulateur de la transduction du signal	Protéine adaptatrice
RSV (Rous Sarcoma Virus)	v-src , protéine kinase transductrice du signal	Tyrosine Kinase
Ab-MuLV (Abelson Murine Leukemia Virus)	v-abl , protéine kinase transductrice du signal	
AKT8 (Murine Thymoma Virus)	v-akt , protéine kinase transductrice du signal	Sérine/Thréonine Kinase
Mo-MuLV (Moloney Murine Leukemia Virus)	v-mos , protéine kinase transductrice du signal	
ASV17 (Avian Sarcoma Virus 17)	v-jun , composant du complexe AP-1 (Activator protein 1)	Régulateurs transcriptionnels
FBJ-MSV (Finkel-Biskis-Jenkins Murine Sarcoma Virus)	v-fos , composant du complexe AP-1 (Activator protein 1)	
MC29, CM11, OK10, MH2 (Avian Myelocytomatosis Viruses)	v-myc , facteur de transcription	Protéine kinase
ASV16 (Avian Sarcoma Virus 16)	v-p3K , homologue de PI3K (Phosphatidylinositol 3-kinase)	

Tableau 3 : Rétrovirus à oncogenèse aigüe possédant des oncoprotéines rétrovirales dérivées de proto-oncogènes cellulaires (Adapté de (527)).

Lors de la capture d'un oncogène cellulaire par un rétrovirus, le génome viral s'intègre à côté d'un proto-oncogène cellulaire, qui, suite à une erreur de transcription, peut s'intégrer dans le génome viral. Les séquences codantes des oncogènes viraux sont altérées par rapport aux séquences des proto-oncogènes cellulaires par des substitutions ou des délétions de bases et/ou des fusions avec des séquences virales qui entraînent une activation constitutive de l'oncogène viral (Figure 1). La plupart des rétrovirus porteurs d'oncogènes sont non répliatifs et dépendants d'une co-infection avec un virus auxiliaire pour compléter leur réplication (527). Par exemple, le rétrovirus RSV (Rous Sarcoma Virus) contient l'oncogène viral *v-SRC* dérivé de proto-oncogène cellulaire *c-SRC*, protéine à activité tyrosine kinase impliquée dans la prolifération cellulaire (Figure 1) (288). L'oncogène *v-SRC* a une activité tyrosine kinase supérieure à celle du proto-oncogène liée à une délétion de la région C-terminale inhibitrice de l'activité tyrosine kinase de SRC et des mutations dans le domaine régulateur SH3 rendant *v-SRC* constitutivement actif (231, 527).

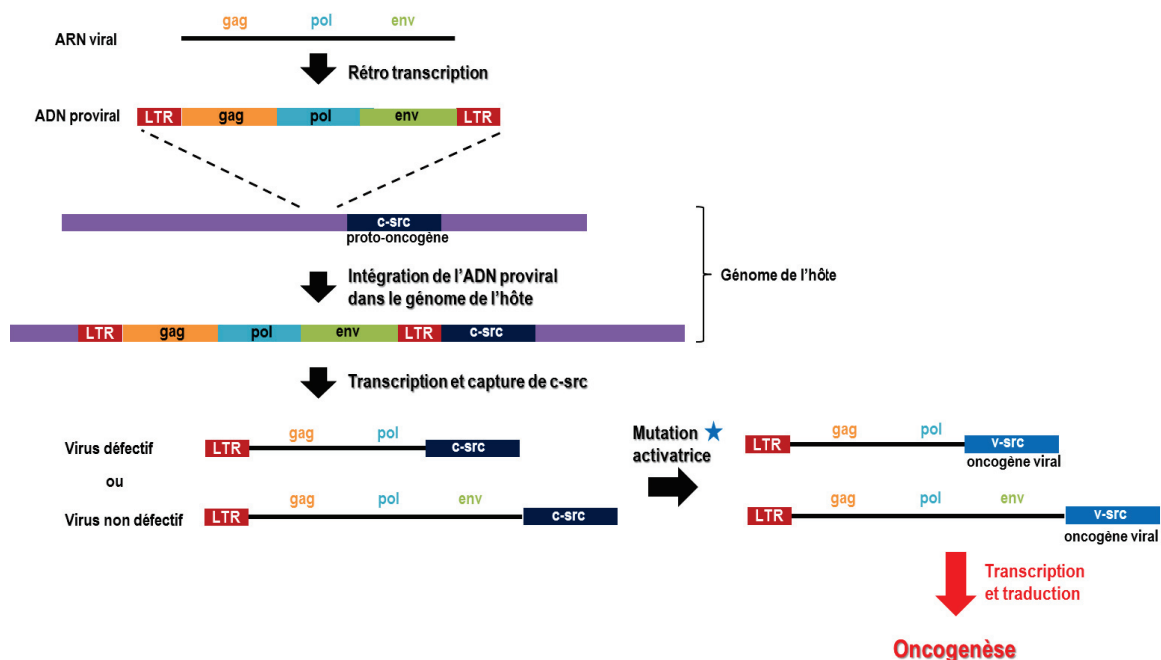


Figure 1 : Mécanisme d'oncogenèse aigüe induite par le rétrovirus RSV.

Les rétrovirus aviaires MC29, CMII, OK10 et MH2, induisant des tumeurs myéloïdes chez le poulet, ont intégré le proto-oncogène cellulaire *MYC*, un facteur de transcription responsable des lymphomes de Burkitt et de neuroblastomes chez l'homme (527). Ce sont les surexpressions et les amplifications induites par le contrôle de l'expression de *MYC* par un promoteur viral plus actif qui induisent la transformation cellulaire par *v-MYC* (112, 450).

Les rétrovirus murins Ha-MuSV (Harvey Murin Sarcoma Virus) et Ki-MuSV (Kristen Murin Sarcoma Virus) induisent des sarcomes et ont été à l'origine de la découverte du proto-oncogène cellulaire *RAS* qu'ils portent dans leur génome (*HRAS* chez Ha-MuSV et *KRAS* chez Ki-MuSV) (460). *RAS* est une GTPase activée par sa liaison à des GTP (Guanosine Tri-Phosphate) médiatrice de la voie PI3K/AKT et de l'oncogenèse. Le

potentiel oncogénique de RAS est lié à deux mutations ponctuelles (acides aminés 12 et 61) empêchant l'interaction entre RAS et les GAP (GTPase Activating Protein) induisant une diminution de l'hydrolyse de GTP et une augmentation de la forme active de RAS (lié au GTP) (448).

Le rétrovirus EAV-ES4 (Erythroblastosis avian Virus-ES4) porte les oncogènes *v-ERBA*, un récepteur hormonal et *v-ERBB*, un homologue du proto-oncogène cellulaire EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) membre de la famille des récepteurs à tyrosine kinase et impliqué dans la prolifération cellulaire (144, 189). L'oncogène *v-ERBB* est porteur de modifications par rapport à son homologue cellulaire : il est délété dans la région extracellulaire le rendant indépendant à la fixation du ligand EGF ; de plus, il est constitutivement activé en raison de mutations activatrices dans la région tyrosine kinase (144). Des mutations de l'*EGFR* sont fréquemment retrouvées dans les cancers : 50% des glioblastomes sont mutés sur le domaine extracellulaire d'*EGFR* et des mutations dans le domaine kinase (exon 18 à 21) induisent une activation constitutive du récepteur dans les cancers du poumon (203, 455). Les mutations *EGFR* dans les cancers pulmonaires sont des marqueurs essentiels permettant l'orientation du traitement des malades avec l'utilisation de traitements inhibant l'activité tyrosine kinase tels que le gefitinib, l'erlotinib et l'afatinib pour les tumeurs mutées pour *EGFR* (505).

Le rétrovirus ASV16 (Avian Sarcoma Virus 16) induisant des hémangiosarcomes chez le poulet a capturé le proto-oncogène *PI3K*. La sous unité catalytique de *PI3K* est fusionnée à l'extrémité N-term du gène *gag* induisant un changement conformationnel qui mime l'activation de PI3K. Le rétrovirus AKT8, induisant des lymphomes de cellules T chez la souris, possède le proto-oncogène *AKT*. La voie de signalisation PI3K/AKT est impliquée dans la régulation de la prolifération, de la survie, de la différenciation et de la mobilité cellulaire. Cette voie est activée par de nombreux récepteurs à tyrosine kinase présents à la membrane des cellules tels qu'*EGFR*, *ERBB2* (Erb-b2 Receptor Tyrosine Kinase 2) ou *VEGFR* (Vascular endothelial Growth Factor Receptor). Des altérations de cette voie (mutation/amplification de PI3K ou mutation d'AKT), sont impliquées dans de nombreux cancers dont les cancers du poumon (100).

1.3.2. Oncogenèse non-aigüe

L'oncogenèse rétrovirale non aigüe se caractérise par l'induction lente de cancers, l'absence de transformation cellulaire *in vitro* et l'absence d'oncogène cellulaire dans le génome viral (160). L'oncogenèse est de type insertionnelle, c'est à dire l'insertion du génome viral à proximité d'un oncogène cellulaire (Figure 2) ou transactivatrice *via* une protéine virale (Figure 3). A la différence des rétrovirus à oncogenèse aigüe, ils sont compétents pour la réplication (160).

Pendant la réplication rétrovirale, l'intégration du génome viral est aléatoire dans le génome de l'hôte mais dans certains cas, l'intégration peut se faire en amont d'un proto-oncogène cellulaire et induire sa surexpression (217). La surexpression peut découler d'une insertion promotrice, où le génome viral est intégré en amont du proto-oncogène dont la transcription est alors initiée par les LTRs viraux ou d'une insertion

amplificatrice où le génome proviral s'intègre en amont du proto-oncogène. Les LTRs viraux activent le promoteur du proto-oncogène induisant la surexpression de celui-ci (Figure 2) (205, 372).

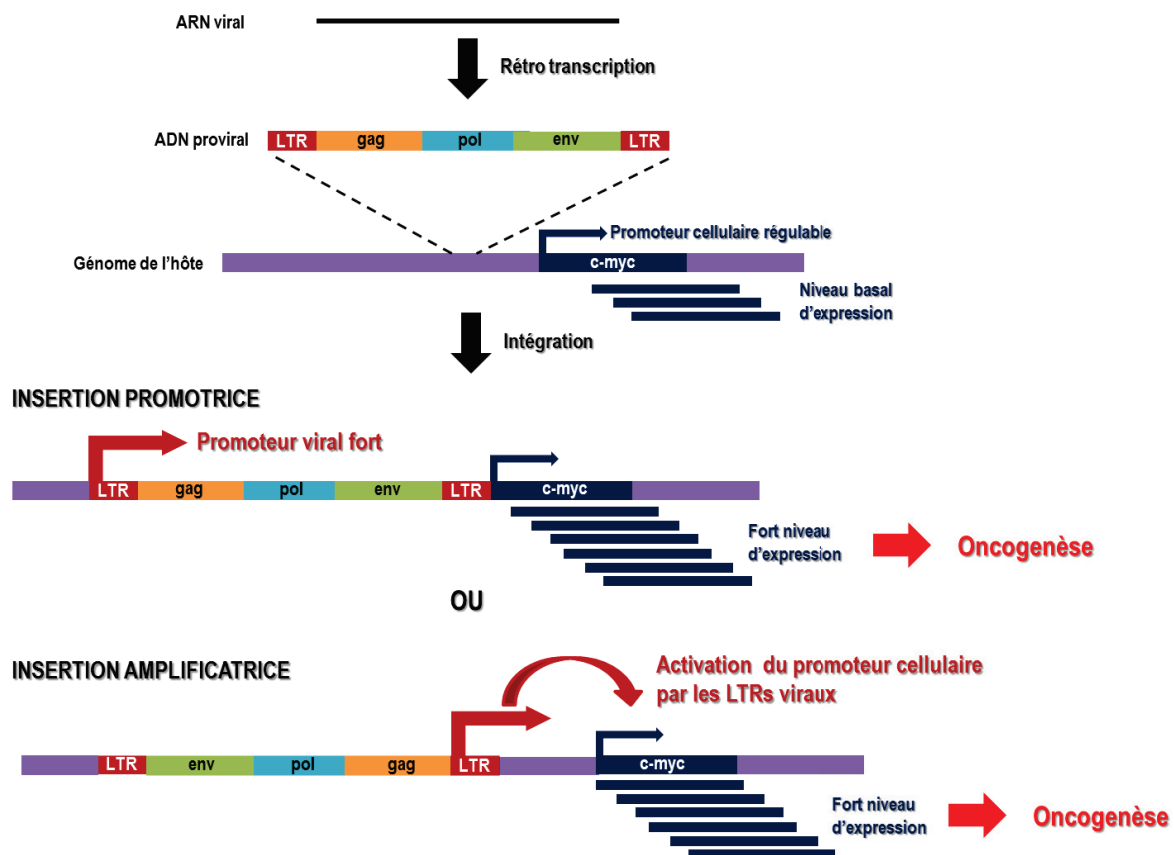


Figure 2 : Mécanisme d'oncogenèse non aigüe par mutation insertionnelle du virus ALV.

La découverte des mécanismes d'oncogenèse insertionnelle a été décrite par Hayward et al. en 1981 avec le rétrovirus ALV (Avian Leukosis Virus) induisant des lymphomes des cellules B chez le poulet (205). Les cellules de lymphomes contiennent le génome proviral d'ALV inséré en amont du proto-oncogène *c-MYC* et l'active par insertion promotrice ou amplificatrice (205, 404). M-MuLV (Moloney Murine Leukemia Virus), responsable de lymphomes des cellules T chez les souris, active le proto-oncogène *c-MYC* par insertion amplificatrice. Il peut également activer les proto-oncogènes *BMI1* (*BMI1* proto-oncogene, polycomb ring finger), *RAS* et le gène suppresseur de tumeur *p53* (160). MMTV s'intègre préférentiellement en amont des gènes *WNT1* (Wingless-type MMTV integration site family, member 1), *FGF3* (Fibroblast Growth Factor 3) et *NOTCH4*; trois gènes dont la surexpression induit divers cancers chez l'homme dont le cancer du poumon (160). Fe-LV (Feline Leukemia Virus) induit des lymphomes et des leucémies chez le chat. Il active principalement le proto-oncogène *c-MYC* et s'insère entre autres au niveau des proto-oncogènes *BMI1* et *PIM1* (*pim-1* proto-oncogene serine/threonine kinase) (199).

L'oncogène peut être porté par un oncogène viral sans analogue cellulaire (Figure 3). Les rétrovirus HTLV-1 et HTLV-2 expriment deux protéines non structurales : la protéine oncogène TAX (Transactivator of

pX), qui active ou réprime la transcription du génome de HTLV par sa fixation sur TxRE (Tax Responsive Element) et la protéine HBZ (HTLV-1 Basic Zipper protein) dont le rôle dans la réplication virale est encore incertain (183). TAX agit sur les voies de signalisation, le cycle cellulaire et induit une aneuploïdie en interagissant avec des protéines qui régulent la ségrégation des chromosomes pendant la mitose comme la protéine MAD1 (Mitotic spindle assembly checkpoint protein 1) (240). TAX induit l'accumulation des ROS provoquant des cassures double brin de l'ADN et inhibe la réparation de ces cassures en induisant la sous expression d'une enzyme cellulaire de la réparation ADN, la polymérase β et en inhibant les protéines de réparation BRCA1 et CHEK2 (Checkpoint kinase 2) (183). TAX augmente l'activité des kinases cycline-dépendante CDK4 et CDK6 (Cyclin Dependant Kinase 4 and 6) contrôlant l'entrée en phase G1 du cycle cellulaire (196). TAX active le facteur de transcription NF κ B de façon constitutive par son interaction directe avec son régulateur, IKK β (I κ B kinase) (484). NF κ B est un médiateur de l'inflammation par son activité activatrice de l'expression des interleukines et sa surexpression est connue pour être liée à de nombreux cancers dont les cancers pulmonaires, les lymphomes et les mélanomes (216, 365). TAX joue également un rôle dans l'activation de la protéine AP-1 (Activator Protein 1) et de la voie PI3K/AKT induisant la prolifération et la survie cellulaire (405). Finalement, elle réprime p53, facteur de transcription induisant l'apoptose (410). HBZ possède un rôle antagoniste de la protéine TAX, permet l'établissement d'une infection latente d'HTLV-1 et la persistance du rétrovirus dans les cellules infectées (183). HBZ joue également un rôle dans l'oncogenèse par HTLV. L'expression de HBZ dans les lymphocytes T CD4 positifs est corrélée à l'expression de certains oncomiRNAs (miR17 et miR21 par exemple) associés à des activités oncogéniques (520). HBZ active hTERT, cible RB1/E2F1 (E2 transcription factor 1) et active la transcription des gènes sous le contrôle de E2F1 critiques pour la réplication de l'ADN et la progression dans le cycle cellulaire (259).

Les protéines de structure des rétrovirus peuvent porter le pouvoir oncogène du virus (Figure 3). L'enveloppe des rétrovirus SFFV (Friend Spleen Focus-Forming Virus), MMTV et AHV (Avian Hemangioma Retrovirus) jouent un rôle dans la transformation cellulaire (10, 546). L'enveloppe de MMTV possède un motif ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif) associé avec l'activation de la prolifération, de la survie et de la différenciation cellulaire (254). La glycoprotéine d'enveloppe gp55 de SFFV stimule le récepteur à l'érythropoïétine EpoR (Erythropoietin Receptor) induisant la prolifération des érythroblastes (215). L'enveloppe d'AHV induit la prolifération des cellules NIH3T3 (10). Les bêta-rétrovirus JSRV et ENTV induisent la transformation cellulaire via le pouvoir oncogénique de leur protéine d'enveloppe (320, 349). Les rétrovirus JSRV et ENTV, leurs mécanismes d'oncogenèse et les cancers induits par ces virus chez les petits ruminants sont analysés dans le chapitre suivant.

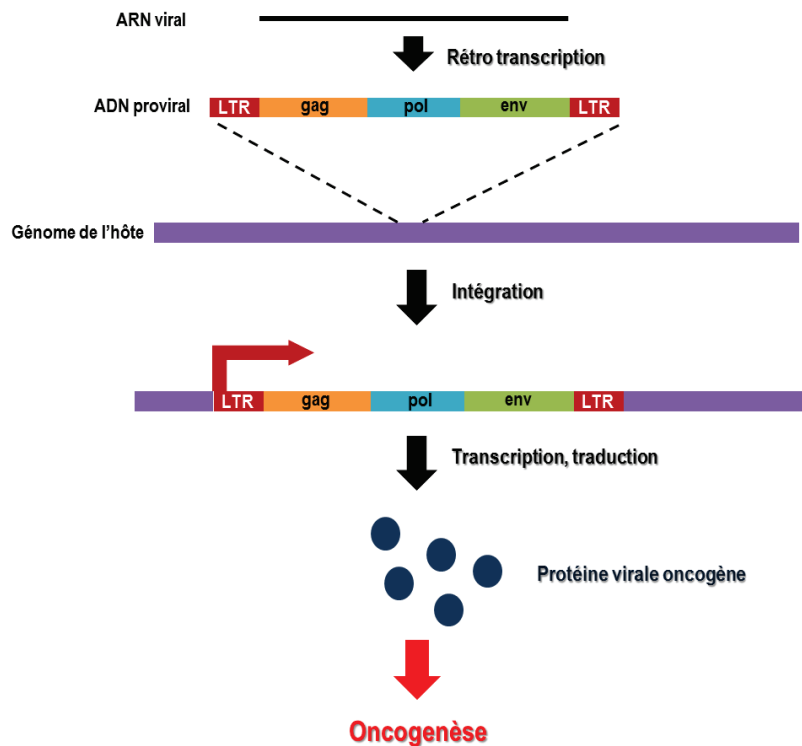


Figure 3 : Mécanisme d'oncogenèse non aiguë par des rétrovirus porteurs d'une protéine virale oncogène.

I.4. Rétrovirus endogènes et cancer

Les rétrovirus endogènes ou ERV (Endogenous RetroVirus) sont la trace d'intégration ancestrale de rétrovirus exogènes dans les génomes. Les rétrovirus endogènes dérivent de rétrovirus infectieux ayant infectés et s'étant intégrés dans les cellules germinales et sont transmis comme des gènes mendéliens (430). Environ 90 000 ERV ont été référencés lors de l'analyse de 65 génomes de vertébrés (204). Le premier ERV décrit est l'endogène du rétrovirus ALV. La protéine structurale Gag d'eALV a été détectée chez des oiseaux non infectés par le virus ; cette protéine virale était, en fait, codée par le génome des oiseaux (540). Depuis, de multiples rétrovirus endogènes ont été découverts chez l'homme et l'animal. Chez l'homme, environ 8% du génome est composé de séquences de rétrovirus endogènes et 1 à 2% d'entre eux codent pour des protéines (321).

Les rétrovirus endogènes ont été classés par l'analyse phylogénétique des régions conservées du gène *pol* définissant trois classes en fonction de leur homologie avec les gamma et epsilon rétrovirus pour les classes I, alpha et bêta rétrovirus pour les classes II et spumavirus pour les classes III (Tableau 4).

Classe	Genre d'appartenance	Nom du rétrovirus endogène	Espèce
I	gamma	eMLV (endogenous Murine Leukemia Virus)	Souris
		KoRV (Koala Retrovirus)	Koala
		PERV (Porcine Endogenous Retrovirus)	Porc
		HERV-H (Human ERV H)	Homme
		HERV-W (Human ERV W)	Homme
		HERV-E (Human ERV E)	Homme
II	beta	eMMTV (endogenous Mouse Mammary Tumor Virus)	Souris
		HERV-K (Human ERV K)	Homme
	alpha	enJSRV (endogenous Jaagsiekte Sheep Retrovirus)	Mouton
III	spuma	eALV (endogenous Avian Leukosis Virus)	Poulet
		MERV-L (Mouse ERV L)	Souris
		HERV-L (Human ERV L)	Homme

Tableau 4 : Classification des rétrovirus endogènes des vertébrés (adapté de (321)).

Peu de rétrovirus endogènes possèdent un génome rétroviral complet, c'est le cas des rétrovirus endogènes HERV-K HML2 (Human Endogenous Retrovirus K – Human MMTV-Like 2) chez l'homme (Figure 4) (220). Cependant, des mutations les rendent incompetents pour la répliation (284, 321). D'autres rétrovirus perdent une ou plusieurs séquences codantes pendant l'endogénisation, le plus souvent la séquence codant pour l'enveloppe (321). D'autres séquences ERV ne comprennent que deux LTRs et aucune autre séquence homologue à des rétrovirus (321). Finalement, des LTRs uniques se forment lors de recombinaisons homologues entre les LTR d'un même élément complet et sont 10 à 100 fois plus fréquents que les ERVs complets dans le génome (46).

1. Rétrovirus endogène complet



2. Rétrovirus endogène : perte d'une ou plusieurs séquences codantes



3. Rétrovirus endogène : LTR et séquence différente des ERV



4. Rétrovirus endogène : LTR unique



Figure 4 : Types de rétrovirus endogènes (d'après (252)).

Longtemps considérés comme des séquences sans intérêt, les ERV ont des rôles physiologiques et leur expression est dérégulée dans les cancers. Au cours de l'évolution, les séquences endogènes fixées dans le génome sont majoritairement retrouvées dans les zones intergéniques du génome ou sont intégrées en antisens par rapport au sens de transcription du gène limitant ainsi les perturbations du génome (513). Les hôtes ont des mécanismes permettant la restriction de l'expression des ERV ; par exemple, la méthylation des séquences ADN des ERV et l'expression de protéines cellulaires pouvant interagir avec les ERV et bloquer leur activité (280). La protéine TRIM28 (Tripartite motif-containing 28) induit des modifications des histones telles que des méthylations répressives de la transcription sur la lysine 9 de l'histone H3 (510). Des méthylations de l'ADN répriment également la transcription des séquences rétrovirales endogènes (510). Les protéines APOBEC (Apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic subunits) inhibent l'ARN des rétrovirus endogènes et bloquent leur traduction ; APOBEC3G induit des mutations inactivatrices des HERV-K (19). Certains rétrovirus endogènes porcins sont compétents pour la réplication, il a été montré que les porcs n'ont pas encore développé de systèmes entièrement efficaces pour l'inactivation de l'expression des PERV. A la différence des HERV-K, ils sont insensibles à la restriction par TRIM5 α (Tripartite motif-containing protein 5 α) par exemple (128).

Les ERV jouent des rôles importants dans la physiologie notamment au cours de la placentation des mammifères. Chez l'homme, les cytotrophoblastes expriment la syncytine-1 et la syncytine-2 codées par deux loci correspondant aux Env des rétrovirus endogènes HERV-W et HERV-FRD (310). Les enveloppes des rétrovirus exogènes ont des activités fusogènes et permettent la fusion entre la membrane du rétrovirus et la membrane de la cellule qu'il infecte. De façon analogue, les syncytines induisent la fusion entre les cytotrophoblastes et le syncytiotrophoblaste lors de la formation du placenta (310). Les syncytines sont également impliquées dans la tolérance immunitaire de la mère vis-à-vis de son fœtus par leur activité immunosuppressives (310). Les syncytines sont également retrouvées chez les rongeurs et y sont essentielles ; en effet, le KO de la syncytine A chez la souris est létal (127). Plus de 1500 HERV transcriptionnellement actifs ont été observés lors d'une analyse transcriptomique dans les poumons, les ovaires, le colon, les seins, les testicules et la prostate représentant 30% des séquences HERV (407). Un tropisme d'expression des HERV a été observé avec HERV-H plus souvent exprimés dans les testicules et HERV-E dans la prostate, l'utérus et les ovaires (407).

Les rétrovirus endogènes peuvent être impliqués dans le développement de cancers dans lesquels leur expression peut être dérégulée. Chez l'homme, des LTR uniques sont transcriptionnellement actifs et entraînent une expression anormale de certains oncogènes. Ainsi, dans le lymphome de Hodgkin, un LTR unique dérivant du HERV LOR1, est présent en amont du facteur de transcription *IRF5* (Interferon Regulatory Factor 5), activant son expression dans les cellules tumorales alors qu'il n'est pas exprimé dans les cellules normales (31). La famille HERV-K est composée de 11 sous-groupes HERV-K HML1 à HERV-K HML11. Chaque groupe est le résultat d'une intégration indépendante dans les cellules germinales (483). Parmi ces HERV-K, le sous-groupe HML2 possède peu de mutations et certaines de ses séquences permettent la

production de particules virales ou de protéines virales (220). Quatre-vingt-onze provirus HML-2 et 944 LTR uniques de HML2 sont présents dans le génome humain (143). Parmi ces provirus HML2, on distingue deux types principaux : le type I possédant une délétion de 292 paires de base entre les gènes *pol* et *env* et le groupe 2 ne possédant pas cette délétion. La délétion au niveau du type I induit un épissage alternatif produisant la protéine Np9 (env-related nuclear protein of 9kDa) alors que le type II produit la protéine Rec (HIV-rev or HLTV-1 rex like protein) (Figure 5). Ces deux protéines sont connues pour interagir avec les protéines cellulaires et affecter les voies de signalisation impliquées dans les cancers (143).

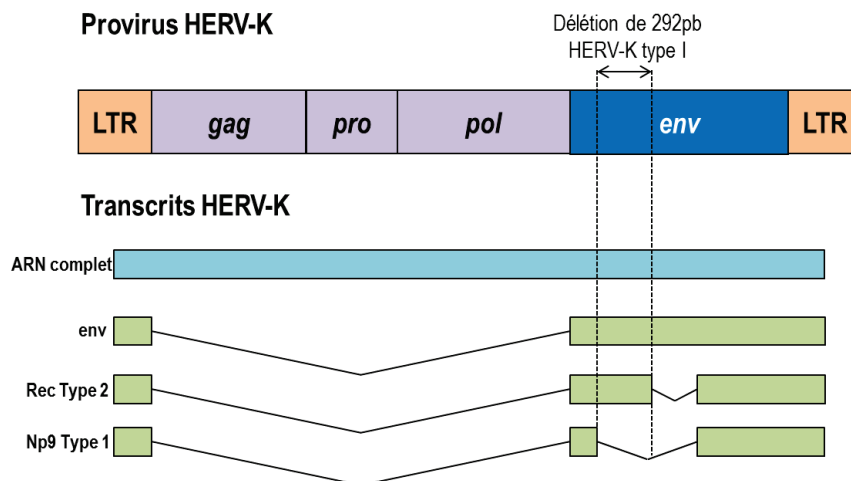


Figure 5 : Organisation des provirus HERV-K (adapté de (143)). Le génome proviral HERV-K contient les séquences rétrovirales *gag*, *pro*, *pol* et *env*. Plusieurs transcrits sont synthétisés à partir du génome proviral, un codant pour l'enveloppe et deux autres présentant ou non une délétion de 292pb. Les types I, ayant cette délétion codent pour la protéine Np9 et les types II, qui sont intacts codent pour la protéine Rec.

Plusieurs études ont montré une activation de HML-2 dans les cancers du sein (532), des ovaires (533), de la prostate (234), dans les mélanomes (269), les lymphomes (98), les leucémies (129) et les sarcomes (449) (Tableau 5).

Cancer	Activité des HERV-K (HML-2)	Références
Mélanome	Détection de particules rétrovirales Augmentation de l'expression de l'endogène Activité de rétro transcription Expression de Env, Np9 et Rec	(213, 269)
Cancer des testicules	Détection de particules rétrovirales	(54)
Cancer de l'ovaire	Expression d'Env et Gag Diminution de la méthylation de HERV-K	(233, 533)
Cancer du sein	Activité de rétro transcription Détection de particules virales Lymphocytes T cytotoxiques HERV-K spécifiques	(98, 532, 534)
Cancer de la prostate	Augmentation de l'expression de Gag	(234)
Lymphome	Activité de rétro transcription Détection de particules ressemblant aux virus	(98)

Tableau 5 : Cancers associés avec les HERV-K HML2 (D'après (220)).

In vitro, la stimulation de lignées cellulaires de cancer du sein par des hormones stéroïdes femelles augmente l'expression de HML-2, plus particulièrement des transcrits de son enveloppe (534). L'expression de l'enveloppe de HML-2 dans les tumeurs mammaires augmente le risque de métastases, est de mauvais pronostic pour les malades et la détection dans le sérum de patientes d'ARNm de HML-2 et de la protéine Rec sont des facteurs prédictifs de cancer du sein (532, 573). De hauts niveaux d'expression des ARNm de l'enveloppe de HML-2, des transcrits *rec* et *np9* et des protéines Env, possiblement dus à des altérations du niveau de méthylation des tumeurs, ont été détectés dans les cancers de l'ovaire (233, 533). Des particules de type rétroviral, des ARNm et protéines de HML-2 ont été mis en évidence dans les cancers de la prostate (234) et des ARNm de HML-2 ont été détectés dans le sang de patients souffrant de leucémies myéloïdes chroniques et aiguës et dans les cellules tumorales de mélanomes (143).

L'expression des protéines Env, Rec et Np9 de HERV-K HML2, souvent activée ou augmentée dans les cancers, pourrait être un mécanisme reliant les HERV au développement tumoral. L'enveloppe rétrovirale, de par ses activités fusogéniques, contribuerait à la progression tumorale et au développement de métastases comme cela a été montré dans les cellules A375, dérivées de mélanome (381). La protéine Env possède des activités immunosuppressives altérant l'expression des cytokines IL-6, IL-8 et IL-10 et qui supprime la prolifération des cellules mononucléées de sang périphérique *in vitro* (354). Les protéines Rec et Np9 produites par les HERV-K se fixent sur deux sites différents du répresseur transcriptionnel de l'oncogène *c-MYC*, PLZF (Promyelocytic Leukemia Zinc Finger) activant l'expression de *c-MYC* (126). Rec interagit également avec le répresseur transcriptionnel des récepteurs aux androgènes, TZFP (Testicular Zinc Finger Protein) dans les cancers de la prostate (255). Np9 est un co-activateur putatif de protéines impliquées dans les cancers telles que la β -caténine, ERK (Extracellular signal-Regulated Kinase), AKT et les protéines la voie NOTCH (92). Np9

s'associe avec LNX (Ligand of Numb Protein X), une ubiquitine ligase qui ubiquitine la protéine NUMB (NUMB endocytic adaptor protein), un inhibiteur de NOTCH et l'envoie vers la dégradation (20).

II. Bêta-rétrovirus et adénocarcinomes des voies respiratoires chez les petits ruminants

II.1. Cancers du poumon et de l'épithélium nasal

Les petits ruminants sont infectés par des rétrovirus de type lentivirus et bêta-rétrovirus. Les SRLV (Small Ruminant Lentivirus) sont des lentivirus non-oncogéniques. Ils infectent les monocytes et les macrophages et induisent des maladies d'évolution lente inflammatoires et/ou dégénératives du poumon, des articulations, des glandes mammaires et du système nerveux central (pour revue, (343)). Les bêta-rétrovirus regroupent les rétrovirus JSRV et ENTV (Tableau 2) qui possèdent une protéine d'enveloppe oncogénique capable d'induire la transformation des cellules de l'épithélium pulmonaire ou nasal.

II.1.1. L'adénocarcinome pulmonaire ovin induit par JSRV

L'adénocarcinome pulmonaire ovin est une tumeur de l'épithélium pulmonaire affectant les petits ruminants domestiques induit par le bêta-rétrovirus JSRV (397). Cette maladie a été décrite au XIX^{ème} siècle en Afrique du Sud. Son nom « Jaagsiekte » provient des mots afrikaners « jaag » et « siekte » décrivant l'effet de l'effort physique sur les signes respiratoires lors des rassemblements d'animaux. La maladie est présente sur tous les continents à l'exception de la Nouvelle-Zélande, de l'Australie et de l'Islande (191, 469). Au Royaume-Uni, entre 0,2 et 0,65% des moutons autopsiés entre 1975 et 2008 présentaient des lésions pulmonaires cancéreuses (191). En France, la maladie est majoritairement sporadique mais peut également être retrouvée sous forme enzootique dans les zones géographiques d'élevage laitier ovin. Le nombre d'adénocarcinomes pulmonaires ovins est sous-estimé car les animaux destinés à la consommation sont envoyés aux abattoirs avant que les signes cliniques ne se déclenchent (72). Il n'existe pas de test sérologique pour la détection de JSRV car le virus n'induit pas de réponse immune spécifique chez les moutons infectés (383). Le diagnostic de la maladie avant présence de signe clinique est basé sur la détection de l'ADN viral de JSRV par PCR semi nichée dans des échantillons sanguins (leucocytes) ou les lavages bronchoalvéolaires. Lors d'une étude sur 11 moutons, la sensibilité de la PCR était plus faible chez les moutons infectés par JSRV n'ayant pas de signes cliniques d'adénocarcinomes (n=6) par rapport à ceux qui présentaient des signes cliniques (n=5) (123). Une même analyse sur 125 troupeaux en Ecosse a montré que la sensibilité de la PCR était basse dû à une faible quantité d'ADN de JSRV dans le sang des moutons testés et qu'il n'était donc pas possible d'utiliser cette technique en diagnostic de routine (290). Dans les cas cliniques avancés, le diagnostic est établi par l'observation des signes cliniques et l'analyse histologique *post mortem* des lésions d'adénocarcinome (123). Les éleveurs de moutons dans les régions d'élevage laitier sont très demandeurs d'un test diagnostic de routine fiable pour la détection de l'infection dans ses stades précoces qui permettrait de limiter les pertes économiques engendrées par la maladie.

Le cancer pulmonaire induit par JSRV est associé à des symptômes cliniques peu spécifiques tels que des crépitements, une toux, un essoufflement et une perte de poids. Dans de nombreux cas, il est associé à un écoulement par les naseaux de sécrétions pulmonaires. Sur un scanner thoracique, des opacités parenchymateuses diffuses indiquent la présence de lésions tumorales (Figure 6A). A l'autopsie, les poumons sont plus gros et plus lourds. Au niveau macroscopique, les lésions tumorales correspondent à des nodules grisâtres et granuleux de 1 à 30 mm. A un stade plus évolué, les lésions peuvent être diffuses, multifocales et extensives (191, 285). Histopathologiquement, les adénocarcinomes pulmonaires ovins sont définis comme des adénocarcinomes mixtes avec une prédominance de lésions lépidiques caractérisées par la prolifération des cellules épithéliales le long des parois alvéolaires, sans désorganisation des alvéoles pulmonaires et sans invasion stromale, pleurale ou vasculaire (Figure 6B) (353). La maladie se présente sous forme pneumonique et les métastases extra-thoraciques sont extrêmement rares.

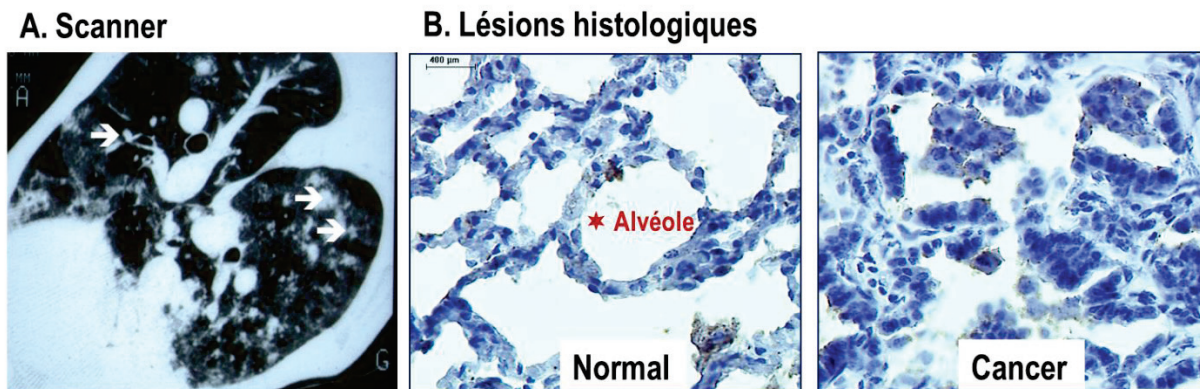


Figure 6 : Aspect radiologique et microscopique des lésions tumorales au cours de l'adénocarcinome pulmonaire ovin induit par JSRV. A. Scanner thoracique d'une brebis atteinte d'adénocarcinome pulmonaire ovin (353). Opacité parenchymateuse diffuse indiquant les lésions tumorales (flèches blanches). **B.** Aspect histologique typique d'un poumon normal (gauche) et tumoral (droite). Immunodétection des AECII par marquage de SP-A (protéine A du surfactant) (285).

JSRV transforme principalement les cellules épithéliales du poumon profond, les cellules Club dans les bronchioles (7% des cellules transformées) et les cellules épithéliales alvéolaires de type II ou AECII (Alveolar Epithelial Type II Cells) dans les alvéoles (82% des cellules transformées) (391, 411). Les AECII sont des cellules épithéliales cuboïdales responsables de la sécrétion du surfactant pulmonaire, un fluide tensio-actif composé des phospholipides et des protéines SP-A, SP-B, SP-C et SP-D (surfactant protein A, B, C et D) (166). Le surfactant est un agent tensio-actif qui permet le maintien des alvéoles ouvertes lors de la respiration, la protection des cellules contre la dessiccation ou des effets délétères de l'oxygène et a des propriétés antimicrobiennes (518). Les cellules épithéliales alvéolaires de type II sont également capables de se différencier en cellules épithéliales alvéolaires de type I et permettent la régénération de l'épithélium pulmonaire (433). Les cellules Club dans les bronchioles sont des cellules sécrétrices non ciliées. Ces cellules interviennent dans les processus de détoxification du poumon profond, la régénération de l'épithélium

bronchiolaire et dans le transport d'ions et de fluides dans les voies aériennes distales (435). Elles secrètent les protéines SP-A, pro-SPB et SP-D du surfactant (435).

II.1.2. L'adénocarcinome enzootique nasal induit par ENTV

Le β -rétrovirus ENTV (Enzootic Nasal Tumor Virus) induit la transformation des cellules épithéliales sécrétoires des glandes nasales chez les moutons et les chèvres ; ENTV-1 infecte les moutons et ENTV-2 les chèvres. Le premier cas d'un cancer nasal chez la chèvre a été rapporté en Allemagne en 1939 (369) puis d'autres cas ont été rapportés les années suivantes chez la chèvre et le mouton en France (71), Pologne (440) et Canada (333). La prévalence de la maladie est variable, de 0,3 à 15% selon les pays (pour revue, (122)).

Les signes cliniques associent un crépitement au niveau des sinus, des déformations de la face, la présence de sécrétion provenant des nasaux et causant une abrasion du derme, une toux, des éternuements, des mouvements anormaux de la tête et des difficultés respiratoires. La tumeur s'étend dans toutes les directions, pouvant aller en dehors des naseaux vers les sinus frontaux et nasaux et pouvant comprimer les os du crâne (Figures 7A et B). Cette compression peut induire des fistules cutanées par lesquelles les sécrétions peuvent sortir et des exophtalmies sont observées lorsque la tumeur atteint les orbites. Des complications telles que des infections bactériennes peuvent survenir et tuer les animaux avant que le cancer lui-même ne les tue (117). Les animaux infectés naturellement meurent quelques semaines à quelques mois après l'apparition des premiers signes cliniques (124, 526). Au niveau macroscopique, les adénocarcinomes nasaux sont caractérisés par des structures polypoïdes souples, blanchâtres ou grisâtres et couvertes de mucus envahissant complètement les zones respiratoires et olfactives. Des zones nécrotiques et purulentes associées à des infections bactériennes secondaires sont fréquemment observées. Les lésions microscopiques sont de type acinaire, tubulaire ou papillaire (Figure 7C). Les tumeurs sont localisées dans les cavités nasales et n'ont jamais été détectées dans les ganglions lymphatiques ou dans d'autres organes (120).

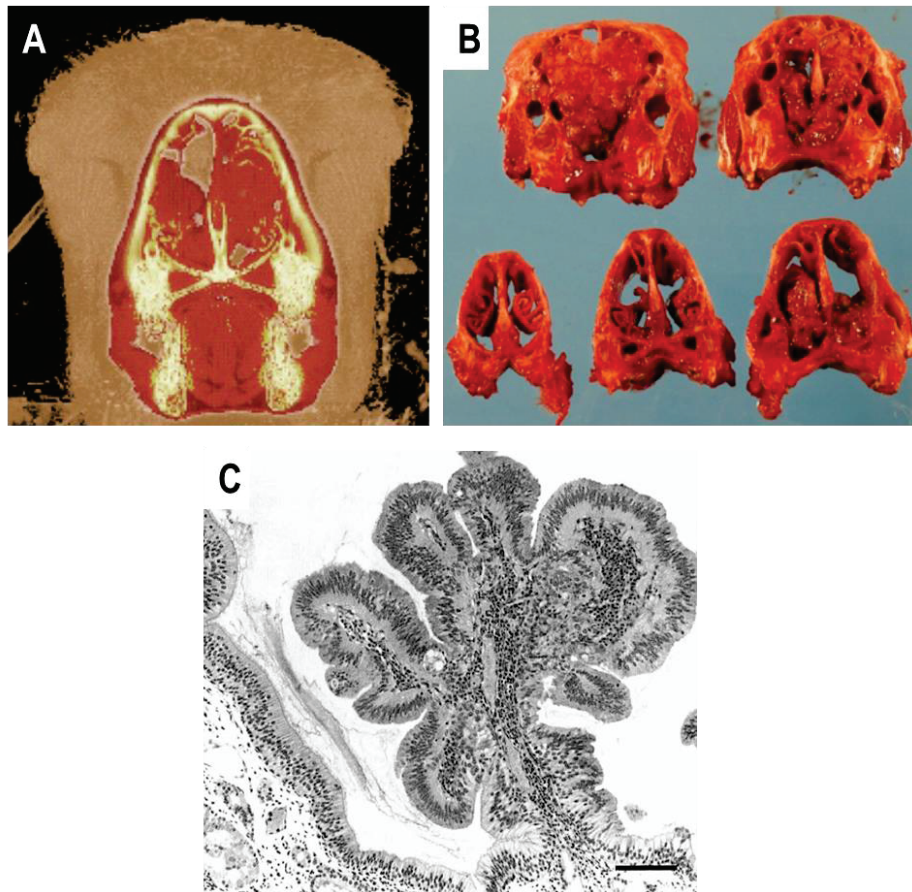


Figure 7 : Aspect radiologique, macroscopique et microscopique des lésions tumorales au cours de l'adénocarcinome enzootique nasal induit par ENTV. A. Scanner et **B.** sections en séries de la cavité nasale d'un mouton infecté expérimentalement par ENTV. Les tumeurs sont associées à des sinusites et une accumulation de fluide dans la cavité nasale et dans les sinus. Les tumeurs causent la destruction des cartilages et occupent environ 50% de la cavité nasale. Au niveau macroscopique, les tumeurs présentent des nodules de surfaces (531). **C.** Aspect histologique d'une tumeur nasale chez la chèvre, observation d'une lésion papillaire (120).

II.1.3. JSRV, ENTV et induction de cancer

Le caractère infectieux de l'adénocarcinome pulmonaire ovin a été révélé par des observations épidémiologiques montrant la propagation de la maladie entre troupeaux ou pays lors de déplacements d'animaux apparemment sains (482). L'origine infectieuse du cancer du poumon chez les petits ruminants a été confirmée par la mise en évidence de particules virales et d'activité rétro-transcriptase dans les sécrétions pulmonaires de moutons malades, de présence d'ARN et d'antigènes rétroviraux dans des tumeurs ainsi que par le séquençage du premier génome complet de JSRV à partir d'un isolat d'Afrique du Sud (208, 406, 563). Des reproductions expérimentales de la maladie ont été réalisées par inoculation intratrachéale de particules virales possédant une activité rétro-transcriptase détectable (327), de fractions cytoplasmiques de cellules tumorales contenant une activité rétro-transcriptase détectable et des virions (521, 522) ou après inoculation, chez l'agneau, de virus produit *in vitro* à partir d'un clone moléculaire (397).

La production de sécrétions au niveau pulmonaire par les animaux malades est une source importante de transmission de JSRV dans les élevages et est utilisée lors de transmission expérimentale (72, 444). La charge virale est importante avec 10^7 à 10^{10} copies d'ARN de JSRV par millilitre de sécrétion (110). Expérimentalement, le virus se transmet lors de la mise en contact d'animaux infectés et non infectés même en absence de signes cliniques (72, 110, 147). JSRV se transmet de la mère à l'agneau *in utero* ou périnatalement *via* le colostrum et le lait (72). Des cellules semblables à des lymphocytes et des macrophages infectés par JSRV ont été observées dans les plaques de Peyer du petit intestin et dans les ganglions mésentériques de jeunes agneaux infectés naturellement par du lait ou du colostrum (56). L'adénocarcinome pulmonaire ovin touche les moutons de 2 mois à 11 ans, les cas cliniques apparaissent autour d'un âge de 2 à 4 ans (456). Les lésions cancéreuses apparaissent plus rapidement chez les jeunes animaux et ceux infectés expérimentalement (444). Des signes histologiques de cancers apparaissent entre trois et six semaines chez de jeunes agneaux infectés expérimentalement par inoculation de broyats tumoraux (397). L'évolution rapide des tumeurs chez le jeune animal suggère une susceptibilité accrue du poumon en cours de développement (72).

La première évidence d'une étiologie virale de l'adénocarcinome nasal a été l'identification d'une activité rétro-transcriptase dans les tumeurs nasales (562). Le lien de causalité entre l'adénocarcinome nasal et ENTV a été établi par inoculations intrasinusales et intranasales d'exsudats nasaux provenant de chèvres malades à des chevreaux nouveau-nés (119) et par nébulisation d'homogénats acellulaires provenant de tumeurs nasales sur de jeunes agneaux (531).

II.2. Les β -rétrovirus oncogènes chez les petits ruminants

JSRV et ENTV sont des β -rétrovirus, genre auquel appartient également MMTV. Brièvement, les rétrovirus sont des virus enveloppés dont le génome se compose de deux brins d'ARN à polarité positive. Leur réplication est dépendante de la RT, une ADN polymérase ARN dépendante. L'ADN viral s'intègre de façon définitive dans le génome de la cellule lors des étapes précoces de l'infection.

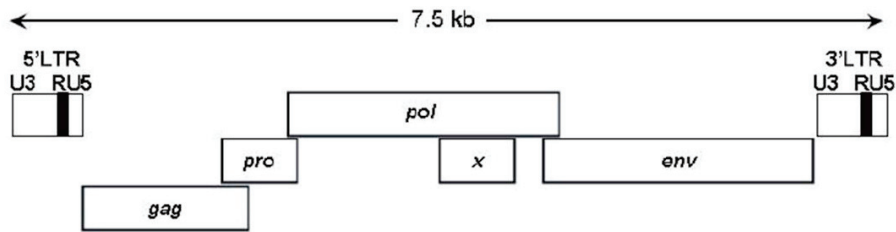
II.2.1. Organisation génomique

Le génome de JSRV est composé des gènes *gag*, *pro*, *pol*, *env* et du cadre de lecture supplémentaire « x » (Figure 8A). Le gène *gag* code pour les protéines de structure de la matrice (MA), la capside (CA) et la nucléocapside (NC). Le gène *pol* code pour les enzymes nécessaires à la réplication virale. La RT est une ADN polymérase ARN dépendante commune à tous les rétrovirus. Elle comprend un domaine RNaseH qui permet la dégradation de l'ARN génomique viral une fois celui-ci copié en ADN. Le gène *pro* code pour la protéase qui permet le clivage des polyprotéines virales. Un cadre de lecture chevauchant *gag* et *pro* code pour une dUTPase (DeoxyUridine Triphosphate) qui permet d'éviter l'incorporation de dUTP mutagènes par la RT dans l'ADN néosynthétisé (214). Le cadre de lecture « x » chevauchant *pol* code pour une protéine putative de 166 acides aminés dont la fonction est inconnue et dont la séquence en acides aminés est très hydrophobe (191).

Le cadre de lecture « x » est conservé dans différents isolats de JSRV (396, 437). Des similarités de séquences entre « x » et le récepteur à l'adénosine 3A, jouant un rôle dans des maladies inflammatoires et certains cancers, ont été observées mais aucun rôle similaire à celui de l'adénosine 3A ne lui a été attribué (33, 262, 428). Il a été montré que « x » n'est pas indispensable pour la transformation des cellules *in vitro* (320) ni pour l'oncogenèse *in vivo* (73, 108, 548). Le gène *env* code pour les glycoprotéines de l'enveloppe virale sous forme d'une polyprotéine glycosylée de 615 acides aminés clivée lors de la maturation par une furine cellulaire en glycoprotéine de surface (SU) et transmembranaire (TM) liées entre elles par des ponts disulfures. La glycoprotéine SU permet l'interaction du virus avec son récepteur cellulaire et est située à la surface des particules virales ; TM assure l'ancrage de SU à la bicouche lipidique. L'enveloppe de la particule virale est composée des glycoprotéines d'enveloppe et de protéines de la bicouche lipidique cellulaire récupérées lors du bourgeonnement des virions à la surface cellulaire. JSRV code pour Rej, protéine régulatrice additionnelle, nécessaire à la synthèse de la polyprotéine codée par *gag* (219). Les protéines Rej contiennent des signaux de localisation nucléaire, des motifs riches en arginine et des signaux d'export nucléaire (217). Dans les cellules embryonnaires de rein humain HEK293T, Rej augmente l'export de l'ARN viral du noyau vers le cytoplasme et dans d'autres lignées cellulaires telles que les fibroblastes de rat 208F et les cellules du plexus choroïde ovin CP-1, Rej est essentiel pour l'efficacité de la traduction de l'ARN viral (219). Le génome proviral de JSRV intégré au génome de l'hôte est encadré par des séquences LTR (Long Terminal Repeat) impliquées dans l'intégration virale et dans le contrôle de la transcription. Les LTR sont constitués de séquences non codantes en 5' (U5) et 3' (U3) encadrant de courtes séquences répétées (R). La région U3 contient des éléments important pour la transcription et le tropisme viral.

JSRV code pour un ARN viral non épissé de 7,5 kb permettant l'expression de *gag*, *pro*, *pol* et pour un ARN mono-épissé de 2,4kb permettant l'expression de *env*. JSRV possède en plus un transcrit de 3,2kb qui pourrait correspondre à *env* plus le cadre de lecture « x » (Figure 8B).

A. Organisation du génome proviral



B. Transcription virale

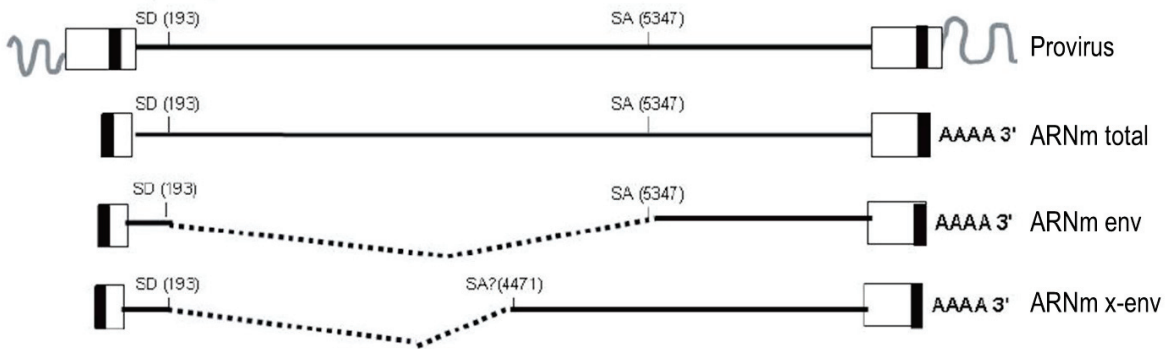


Figure 8 : Organisation (A) et transcription virale (B) du provirus JSRV (D'après (285)). Les gènes *gag*, *pro*, *pol* et *env* codent respectivement pour les protéines composant la capsid, la protéase, les enzymes et les glycoprotéines d'enveloppe. Le cadre de lecture « x » code pour une protéine putative dont le rôle est inconnu. LTR : long terminal repeat, SA : site accepteur d'épissage, SD : site donneur d'épissage.

Le séquençage complet d'ENTV-1 à partir de sécrétions nasales de mouton a permis de comparer les séquences de JSRV et ENTV (109). Ces deux génomes viraux partagent plus de 95% de similarité en acides aminés. Les différences se trouvent majoritairement au niveau de la région 3' de l'enveloppe, de la région U3 des LTR et ENTV-1, à la différence de JSRV, possède deux codons stop sur le cadre de lecture « x ». Dans la région 3' de l'enveloppe, ENTV-1 et JSRV partagent 96% d'identité en acides aminés dans la région SU et 93% dans la région TM (98% de similarité dans la partie externe, 81% dans la partie transmembranaire et 75% dans la partie intracytoplasmique) (109). La plupart des différences observées au sein de ces régions de l'enveloppe sont des substitutions conservatives, ce qui suggère des contraintes fonctionnelles pour cette protéine (109). ENTV-1 et JSRV partagent 75,7% de similarité au niveau de leurs LTR (Figure 9).

```

ENTV-1 TCGGGGGGACAACCTGCGGAGGGTTAAGTCTGGGAGCTCCTTGGCAAAATGCCAAGGC- 59
ENTV-2 TCGGGGGGACAACCCGTGAAGGGTTAAGTCTGGGACCTCCTTGGCAAAATGCCAGGACC 60
JSRV21 TCGGGGGGACGACCCGTGAAGGGTTAAGTCTGGGAGCTCCTTGGCAGAA-GCCAAAGCC 59
*****
NF-kBa USF1/2bc EtsI NF-I
*****

ENTV-1 TTAGGCAAGTACCTAAGCTCCCTGTCCCGCCACCCTCAGGAAGTCTTAAGAGCTTTTGGGA 119
ENTV-2 TTGGGAAGTACCTAACTCCCTGTCCCGCCACCCTCAGGAAGTCTTAAAAGCTCTTACG 120
JSRV21 TAGGACAAGTACCTAAGCTCCCTGTCCCGCCACCCTCAAGAATTTTAAAAGCTCTTAAG 119
* * *****
Ef-Iδc Ik-2c SP-Iac *c *c
*****

ENTV-1 GCTCAAATG---TGTTTTGGTTTTTGCAACATGGCTTAAAAAGCAGGAAATCTGATTATGT 176
ENTV-2 GCTCAAATGATCGGTGTTGGCATAACTTCATAGA--AAAGAGCAGGAAATCTGATTACAT 178
JSRV21 GCTCGGATGTTTGCTTTTGGCACTGCTTCATAG---AAATACCAGGAAATCTGATTATAT 176
*****
HNF-3βabc NF-Ibc EtsIc
*****

ENTV-1 AAGAAACCAGTAATTATGT-----AAGTAAATGATCTCAAGTACTTAA 220
ENTV-2 AAGGATCCGGTGATTGTATTCTGA-----AAATAAGCAGATAAGATCAAGTCACGTAT 231
JSRV21 AAGAATCCGGTGATTGTGTAAGAATCCGGTGGGTGTAGTGAATAATGAATAACAAGTTA 236
*****
EtsI C/EBPαabc AP-2c OctIc HNF-3βbc
*****

ENTV-1 CTTGCT-TATATATACTGCTGCACAATAAA 249
ENTV-2 AATACTCTATATATACTATGACACAATAAA 261
JSRV21 TGTACTTTATAAATATAGCATTGTAATAAA 266
* * * * *
OctI

```

Figure 9 : Alignement des séquences U3 des LTRs de JSRV₂₁, ENTV-1 et ENTV-2 (D'après (330)). Les sites de fixation des facteurs de transcription sont positionnés sur les alignements. Les * indiquent les nucléotides conservés entre séquences et les – indiquent les délétions.

Une étude des séquences des LTR de JSRV et ENTV-1 a montré la présence de SNPs (single nucleotide polymorphisms) dans la région U3 entre JSRV et ENTV (152). Une différence de taille de 66 pb a également été observée entre les deux génomes viraux au niveau du site de fixation d'un facteur de transcription spécifique du poumon (152). Ces différences au sein des LTR pourraient expliquer le tropisme différent des deux virus. ENTV-1 d'origine ovine et ENTV-2 d'origine caprine partagent plus de 93% d'identité dans les régions *gag*, *pro*, *pol* et *env* et 71% au niveau du cadre de lecture « x » (382). Les régions TM d'ENTV-1 et ENTV-2 partagent 86% d'identité en acides aminés mais seulement 49% dans le domaine intracytoplasmique suggérant qu'ENTV-1 et 2 sont deux virus distincts (382). La région U3 des LTR possède 76% d'identité en acides aminés entre ENTV-1 et 2 (330).

II.2.2. Cycle viral

La première étape du cycle viral pour JSRV et ENTV est la fixation des glycoprotéines de surface sur leur récepteur (Figure 10). HYAL-2 (Hyaluronoglucosaminidase 2) est le récepteur cellulaire de JSRV et ENTV. Cette protéine de surface appartient à la famille des hyaluronidases qui permettent la dégradation des hyaluronanes, polysaccharides composant la matrice extracellulaire, et sont impliquées dans divers processus cellulaires dont le développement et la transformation des cellules (pour revue, (329)). HYAL-2 est ancrée dans la membrane plasmique par un groupement GPI (glycosylphosphatidylinositol) et ne présente qu'une faible

activité hyaluronidase par rapport aux autres protéines de la même famille (524). L'entrée de JSRV et d'ENTV dans les cellules est indépendante de l'activité hyaluronidase de HYAL-2 (523).

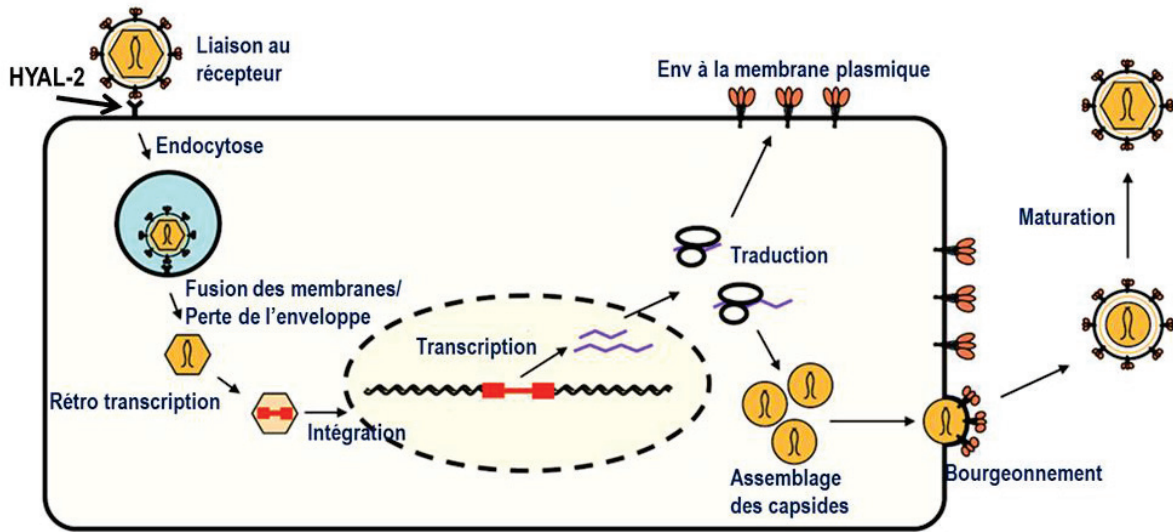


Figure 10 : Cycle de JSRV et ENTV. Adapté de (191).

La nécessité d'un pH acide a permis d'établir que l'entrée de JSRV et ENTV dans la cellule se faisait par endocytose (52, 102). L'activation de la fusion des membranes par ENTV-1 nécessite un pH plus acide ($\text{pH} < 4,5$) que celle de JSRV ($\text{pH} < 6,3$) ; un changement leucine-valine en position 501 de l'*env* de ces deux rétrovirus est responsable de la différence de pH requis pour leur entrée (104). Malgré leur homologie de séquences, la fusogénicité d'ENTV-1 est plus faible que celle de JSRV. Ceci est expliqué par la présence des résidus N191 (Asparagine en position 191) et S195 (Sérine en position 195) sur la SU de l'*env* d'ENTV-1 (103). La fusion des membranes permet le relargage de la capside du virus dans le cytoplasme de la cellule. La première étape de réplication est la rétro transcription de l'ARN viral par la RT puis la dégradation de l'ARN viral matrice par l'activité du domaine RNaseH de la RT. Pendant ce processus, les régions U3 et U5 sont dupliquées pour produire les LTRs (U3/R/U5) de même orientation à chaque extrémité de l'ADN viral (Figure 8B). L'ADN viral forme le PIC (PreIntegration Complex) contenant l'intégrase et des protéines cellulaires. Le PIC entre dans le noyau après la mitose cellulaire. L'ADN proviral est intégré au niveau de sites multiples dans le génome de l'hôte grâce à l'action de l'intégrase virale (107). L'ADN viral est répliqué par l'ADN polymérase cellulaire et les ARN transcrit par l'ARN polymérase II. Les transcrits ARN sont alors épissés et traduits ou ne sont pas épissés et sont incorporés dans les nouveaux virions. Ces nouveaux virions sont assemblés au sein d'un compartiment périnucléaire puis vont migrer encapsidé à la membrane plasmique pour bourgeonner (392). Une fois à l'extérieur de la cellule hôte, la protéase virale clive les précurseurs polyprotéiques et permet la maturation de la particule virale.

II.2.3. Tropisme

Le récepteur HYAL-2, ubiquitaire ; permet à JSRV d'infecter les cellules épithéliales dans le poumon (391, 411), les monocytes et les lymphocytes B et T. Dans les cellules sanguines, JSRV se réplique à un niveau très faible, les protéines de JSRV n'ayant été que rarement détectées (221). L'infection des cellules sanguines précède l'infection des cellules épithéliales pulmonaires et le développement des tumeurs dans les cellules épithéliales du poumon profond (17, 391, 411, 444). Les cellules épithéliales alvéolaires de type II dérivées de tumeurs contiennent le génome de JSRV. Lorsque ces cellules sont mises en culture tridimensionnelle, elles forment des sphères et produisent des particules virales (16). *Ex vivo*, il a été montré que JSRV pouvait infecter et transformer les cellules épithéliales sur des coupes de tissus de poumons ovins (106). ENTV peut entrer dans plusieurs types cellulaires *in vitro* tels que les cellules SSF (Sheep Skin Fibroblast) et les cellules HEK293 mais avec des titres plus faibles que JSRV (136). *In vivo*, ENTV infecte et transforme les cellules épithéliales de la cavité nasale (122).

JSRV et ENTV se répliquent dans un nombre restreint de types cellulaires *in vivo*. Cette restriction de leur expression est déterminée par les sites de liaisons de facteurs de transcription présents dans les LTR viraux. Les LTR de JSRV sont transcriptionnellement actifs dans les lignées cellulaires de souris dérivées de cellules épithéliales pulmonaires, telles que les cellules MLE-15 (Mouse Lung Epithelial cells) et les cellules mtCC1-2 (Mouse Lung Club Cells) (390) et possèdent plusieurs sites de fixation pour des facteurs de transcription (Figure 9). Les sites USF1/2 (Upstream Stimulatory factor 1 and 2), EF-1 δ (Eukaryotic Translation Elongation Factor 1 delta) et Ik-2 (Ikaros family zinc finger 2) ne sont pas importants pour la réplication virale dans les AECII puisque leur mutation n'entraîne pas de réduction de l'activité transcriptionnelle des LTRs à la différence des mutations des sites NF- κ B (Nuclear Factor kappa B) et SP-1 (Specific protein 1) ; une diminution allant jusqu'à 50% de l'activité transcriptionnelle ayant été observée pour des mutations sur les sites NF- κ B (390). Les facteurs de transcription HNF-3 β (Hepatocyte Nuclear Factor 3 β) et C/EBP α / β (CCAAT/Enhancer binding protein) sont critiques pour l'activité transcriptionnelle des LTR de JSRV. Ceux-ci contiennent deux éléments de liaison à HNF-3 β et la mutation de l'élément en amont réduit de 75% l'activité transcriptionnelle des LTR de JSRV dans les cellules MLE-15 (332). De façon similaire, l'activité transcriptionnelle de JSRV est diminuée de 70% lors de la mutation du site C/EBP α / β (331). Le site de fixation à C/EBP α / β est conservé dans les LTR de JSRV et ENTV suggérant son importance (Tableau 6) (330). Des différences dans les régions U3 des LTR de JSRV et ENTV ont été observées et influencent leur spécificité de réplication dans les cellules. Le site de fixation de HFN-3 β est absent des LTR d'ENTV-1 et ENTV-2 (330). Ce facteur de transcription est fortement exprimé dans les cellules épithéliales alvéolaires de type II et dans les cellules Club et régule la transcription de gènes spécifiques du poumon tels que SP-B et CC10 (Clara Cell specific 10kD protein) (96, 447). L'absence de ce site de liaison pourrait expliquer pourquoi ENTV ne se réplique pas efficacement dans les cellules pulmonaires (330). Les LTR de ENTV-2 diffèrent de ENTV-1 par la présence de site de fixation d'USF1/2 et NF-1 (NeuroFibromin-1) (330).

Virus	NF-κB	USF1/2	EF-1δ	Ik-2	SP-1	HNF-3β	NF-1	C/EBP
JSRV ₂₁	X	X	X	X	X	X	X	X
ENTV-1	X		X	X	X			X
ENTV-2	X	X	X	X	X		X	X

Tableau 6 : Conservation des sites de liaison aux activateurs de la transcription entre JSRV, ENTV-1 et ENTV-2 (Adapté de (330)). X indique la conservation dans les LTRs des différents virus.

II.3. JSRV et sa contrepartie endogène

Dix-huit pourcent du génome des animaux d'élevage composant le bétail possèdent des rétrovirus endogènes (5). Le génome des petits ruminants domestiques et sauvages contient un rétrovirus endogène proche de JSRV, enJSRV (endogenous JSRV) (206) qui n'est pas présent chez les bovins indiquant une intégration dans le génome des petits ruminants il y a environ 5 à 7 millions d'années avant la spéciation ovin/caprin (24). Le processus d'endogénéisation est encore en cours actuellement ; certains endogènes intégrés il y a environ 3 millions d'années, sont présents chez les ovins et le loci enJSRV26, se serait intégré dans le génome ovin il y a moins de 200 ans (24). Le génome du mouton contient vingt-sept copies d'enJSRV et les séquences d'enJSRV ont été détectées sur 15 des 28 chromosomes ovins ; le plus grand nombre de copies ayant été retrouvé sur les chromosomes 6 et 9 (76, 206). Les séquences déduites des enJSRV sont hautement similaires à celles de JSRV avec un pourcentage d'identité de 90 à 98%, les régions les plus variables étant les régions codant pour l'enveloppe et les LTR (330, 393). Ces divergences au sein de l'enveloppe et des LTR a permis la mise au point de PCR permettant la discrimination entre rétrovirus exogène et rétrovirus endogène (389). Parmi les différences de séquences entre enJSRV et JSRV au sein des LTR, un changement d'un nucléotide sur le site de fixation à HNF-3β et une différence de 15 nucléotides sur le site C/EBPα/β empêchent ces facteurs de transcription de s'y fixer (330). La faible expression d'enJSRV dans les cellules épithéliales bronchiques est probablement due à ces différences (330). L'expression des enJSRV a été détectée dans de nombreux tissus de l'appareil reproducteur des brebis, dans les plaques de Peyer au niveau de l'intestin, dans le thymus et à de faibles niveaux dans l'épithélium bronchique (393).

Parmi les loci enJSRV, au moins cinq copies ont des génomes entiers (Figure 11) (24).

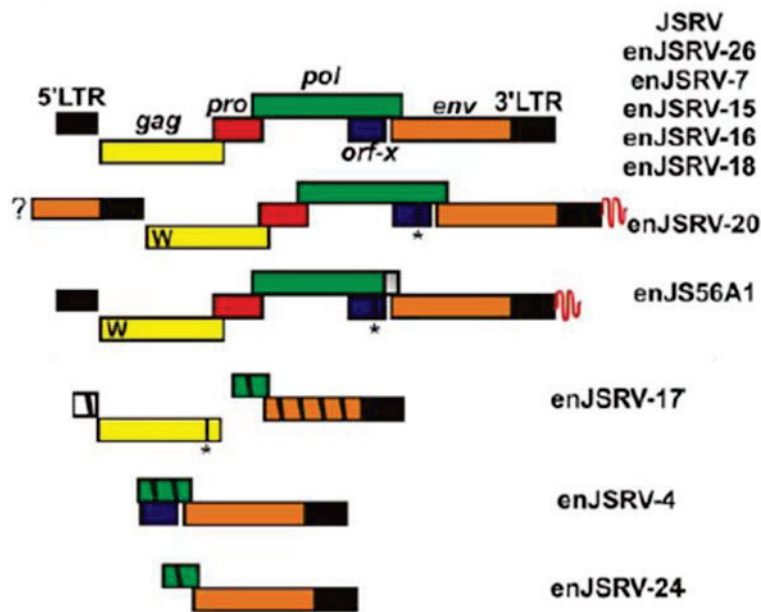


Figure 11 : Organisation génomique des enJSRV (Adapté de (24)). Cinq provirus contiennent une organisation génomique intacte et similaire à celle de JSRV et d'autres contiennent plusieurs modifications. Le W pour enJSRV20 et enJS56A1 représente la substitution R21W. enJSRV20 possède une partie d'*env* en 5'. Les codons stop sont indiqués par les *. Les grandes délétions sont représentées par des hachures.

Certaines copies, comme enJS56A1, sont encore fonctionnelles et produisent des protéines virales dont Env permettant une résistance vis-à-vis de JSRV exogène (21). Cette interférence virale s'explique par la capacité du récepteur HYAL-2 à fixer les enveloppes de JSRV et de sa contrepartie endogène (473). Les copies enJS56A1 et enJSRV20 possèdent un changement d'acide aminé en position 21 (R21W de Gag) et produisent une protéine endogène Gag transdominante négative qui bloque l'assemblage et le relargage des virions exogènes aux stades tardifs de l'infection (24, 358). Les dimères de Gag endogène/exogène sont dégradés par la cellule (358). La quantification de cette mutation au sein d'une dizaine de races de mouton a mis en évidence que le variant Gag W21 était présent dans le génome de nombreuses races ovines, que le nombre de copies variait significativement d'une race à l'autre et que l'expression en ARNm de Gag W21 était nulle ou très faible dans les tissus tumoraux ou les cellules épithéliales alvéolaires de type II dérivées de cancers (525). Néanmoins, l'implication des enJS56A1 et enJSRV20 dans le développement du cancer n'est pas formellement montrée. De plus, aucun polymorphisme d'enJSRV ne montre de corrélation avec une sensibilité ou une résistance au cancer pulmonaire chez l'ovine (466).

Comme les HERV-W et HERV-FRD sont importants pour la placentation chez l'homme, les enJSRVs sont essentiels pour le développement du placenta chez les brebis (148). Ils sont exprimés dans l'épithélium de l'appareil génital de la brebis et leur expression est plus importante dans l'endomètre utérin au cours du cycle menstruel et de la gestation (395). Chez les ovins, les enveloppes d'enJSRV ont des propriétés fusogéniques permettant la formation du syncytium, l'adhésion de l'embryon à la paroi utérine et plus tard les échanges entre

le sang maternel et foetal (395). L'inhibition de la transcription de *env* d'enJSRV par des oligonucléotides antisens entraîne un arrêt précoce de la gestation (149).

II.4. Mécanismes de transformation des cellules par les enveloppes de JSRV et ENTV

Le pouvoir transformant de JSRV et ENTV est associé à leur protéine d'enveloppe dont l'expression est nécessaire et suffisante pour induire la transformation *in vivo* et *in vitro* (pour revue (349)). Le rôle transformant des enveloppes de JSRV et d'ENTV a été montré *in vitro* dans des cellules épithéliales bronchiques humaines BEAS-2B (114), des cellules épithéliales de rein de chien MDKC (306) et dans des fibroblastes de souris NIH3T3 et de rat 208F (8, 320, 394). *In vivo*, les souris immunodéficientes ou non et les moutons infectés soit par un virus JSRV incompetent pour la réplication exprimant la protéine d'enveloppe sous le contrôle des LTR de JSRV, soit par des vecteurs adénoviraux également incompetents pour la réplication mais exprimant l'enveloppe de JSRV développent des tumeurs (73, 548). Les souris infectées avec des vecteurs adénoviraux exprimant l'enveloppe d'ENTV développent aussi des tumeurs (547).

Le domaine transmembranaire des enveloppes de JSRV et ENTV possèdent un domaine intracytoplasmique ou CT (Cytoplasmic Tail) d'environ 44 acides aminés, essentiel pour la transformation comme cela a été montré par des expériences de délétions ou de mutations conduisant à une abolition de la transformation (8, 218, 225). Le domaine CT contient un motif YXXM (Y pour la tyrosine en position 590, X pour n'importe quel acide aminé et M pour la méthionine en position 593) non conservé dans les enveloppes des enJSRV (Figure 12) (393).

	579	↔	606
JSRV ₂₁	LKMRVEMLHMK	YRNML	LQHQLMELLKKNK
enJS56A1	LHMRV-LIH---	KNML	LQHQLMELLKKNK
ENTV	LQMRIELIHMKY	RYML	LQYQKLMDFVKKR

Figure 12 : Domaine intracytoplasmique des JSRV exogènes (JSRV21), endogènes (enJS56A1) et d'ENTV (D'après (390)). Motif YXXM (en rouge). - : délétion.

Le motif YXXM phosphorylé sur la tyrosine est connu comme étant un site de fixation pour la sous unité régulatrice p85 de PI3K, une kinase activatrice de la voie PI3K/AKT/mTOR (Phosphatidylinositol 3 Kinase/*v*-AKT murine thymoma viral oncogene homolog/mammalian Target of Rapamycin) essentielle pour la régulation de la prolifération et de la survie cellulaire. Des substitutions de la tyrosine en position 590 (Y590) en phénylalanine, acide aspartique ou cystéine ou de la méthionine en position 593 (M593) en thréonine sont suffisantes pour inhiber la transformation des cellules murines NIH3T3 (394). D'autres études avec des conditions de cultures cellulaires différentes (durée de culture plus longue par exemple) ont montrées que, bien que mutées au niveau du domaine YXXM, certaines enveloppes transformaient avec une efficacité moindre, les cellules NIH3T3, les fibroblastes de rat 208F, les cellules épithéliales de rein de chien MDCK et les fibroblastes

aviaires DF-1 (11, 305, 306). Les résultats suggèrent que ces rétrovirus peuvent activer la voie PI3K/AKT indépendamment du domaine YXXM. En effet, cette voie est activée même en présence d'un domaine YXXM muté et sa phosphorylation sur la tyrosine nécessaire pour l'interaction avec PI3K n'a jamais été mise en évidence dans les cellules transformées (305). De façon intéressante, la mutation de Y590 en acide aspartique a pour effet d'inhiber la réplication virale et la transformation des cellules pulmonaires chez de jeunes agneaux soulignant l'importance de ce motif pour la formation de tumeur *in vivo* (108).

Bien que le domaine transmembranaire des enveloppes de JSRV et ENTV soit essentiel à la transformation des cellules, la glycoprotéine de surface SU joue également un rôle. La transformation cellulaire des cellules NIH3T3 et 208F induite par l'enveloppe de JSRV est abolie par des délétions ou des insertions dans la région codante de SU (218). L'insertion de SU du JSRV endogène non transformant dans le génome du JSRV exogène inhibe la transformation des fibroblastes NIH3T3 (394). Des mutations du domaine SU pourraient inhiber la transformation médiée par le TM car SU modifie la conformation du domaine TM (218). Le domaine SU joue également un rôle dans la transformation *via* son interaction avec le récepteur cellulaire HYAL-2 comme cela a été montré dans les cellules BEAS-2B (114). Dans ces cellules, HYAL-2 séquestre le récepteur tyrosine kinase RON (Récepteur d'Origine Nantais) ; la fixation de SU sur HYAL-2 provoque la libération de RON qui active à son tour les voies de prolifération cellulaire PI3K/AKT et MAPK (114). Le rôle de HYAL-2 dans la transformation est peu clair. En effet, SU peut transformer les NIH3T3 alors qu'il n'interagit pas avec l'homologue de HYAL-2 chez les souris (304).

Les voies PI3K/AKT et MAPK sont impliquées dans la transformation cellulaire induite par JSRV et ENTV (Figure 13). Suite à un stimulus membranaire, tel que l'activation de l'EGFR, PI3K est recrutée à la membrane, est phosphorylée et convertie en seconds messagers PIP2 (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate), PIP3 (Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate) et PDK1 (Pyruvate Dehydrogenase Kinase 1) induisant la phosphorylation d'AKT. AKT phosphorylée active mTOR et p70S6K induisant la transformation, la croissance et la survie des cellules. PI3K est impliquée dans la transformation des cellules par les enveloppes de JSRV et ENTV ; l'ajout de l'inhibiteur de PI3K LY294002 empêche la transformation des fibroblastes 208F par Env-JSRV (305). Cependant, une activation d'AKT indépendante de PI3K lors de la transformation par l'Env de JSRV a été montrée dans les cellules NIH3T3 déficientes pour la sous unité régulatrice p85 de PI3K indiquant des mécanismes dépendants du type cellulaire (319). AKT est activée dans plusieurs cellules transformées par l'enveloppe de JSRV et ENTV telles que les NIH3T3, les 208F et les MDCK (8, 305, 350, 394). *Ex vivo*, plus de 50% des cellules pulmonaires tumorales provenant de coupes de poumons mises en culture et infectées par JSRV expriment l'AKT phosphorylée (106). *In vivo*, AKT est phosphorylée dans 37% des tumeurs induites par JSRV (481). L'inhibition de mTOR par la Rapamycine inhibe partiellement la transformation des cellules NIH3T3 (318). Une augmentation de la phosphorylation de p70S6K a été observée dans les poumons tumoraux et dans les cellules AECII dérivées de poumons tumoraux par rapport aux échantillons normaux (350). Ces résultats montrent l'importance de la voie PI3K/AKT/mTOR dans la transformation des cellules par

l'Env de JSRV et ENTV mais ils mettent en évidence qu'elle n'est certainement pas la seule voie impliquée dans le processus complexe d'oncogenèse.

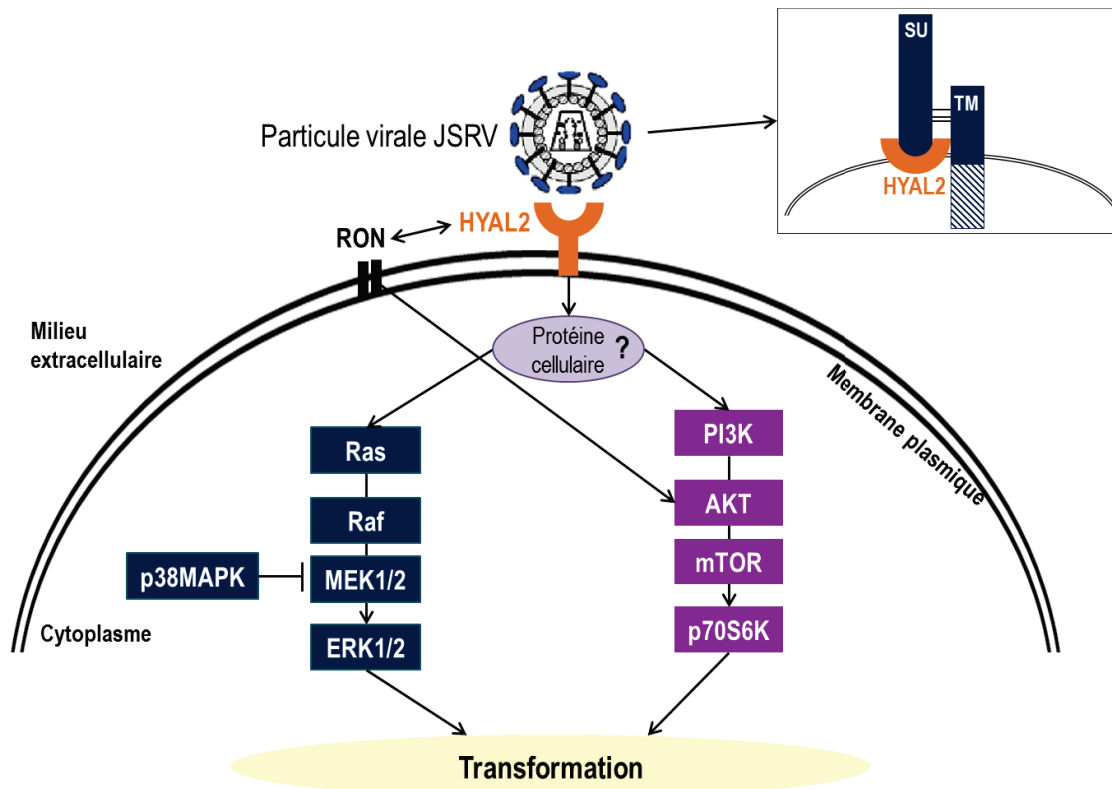


Figure 13 : Voies de signalisation impliquées dans la transformation des cellules par l'enveloppe de JSRV (D'après (285)). L'enveloppe de JSRV active plusieurs voies de signalisation impliquées dans la transformation et la prolifération cellulaire dont la voie MAPK et la voie PI3K/AKT.

La sénescence répliquative est induite par une diminution de l'extrémité des chromosomes, les télomères, au fur et à mesure des divisions cellulaires. Il s'agit d'un phénomène physiologique important pour le maintien de l'intégrité des tissus. Le raccourcissement des extrémités des chromosomes activent un signal de mort des cellules. La sénescence répliquative est régulée principalement par la télomérase, un complexe ribonucléoprotéique qui stabilise la longueur des télomères et inhibe la mort cellulaire (347). La télomérase est activée par la voie PI3K via sa phosphorylation par AKT (247). Une activation de la télomérase a été mise en évidence dans les cellules épithéliales alvéolaires de type II dérivées de tumeurs et dans les cancers induits par JSRV suggérant que l'inhibition de la sénescence cellulaire pourrait être impliquée dans le développement des tumeurs et dans l'accumulation de cellules tumorales au sein du poumon (Figure 14) (481).

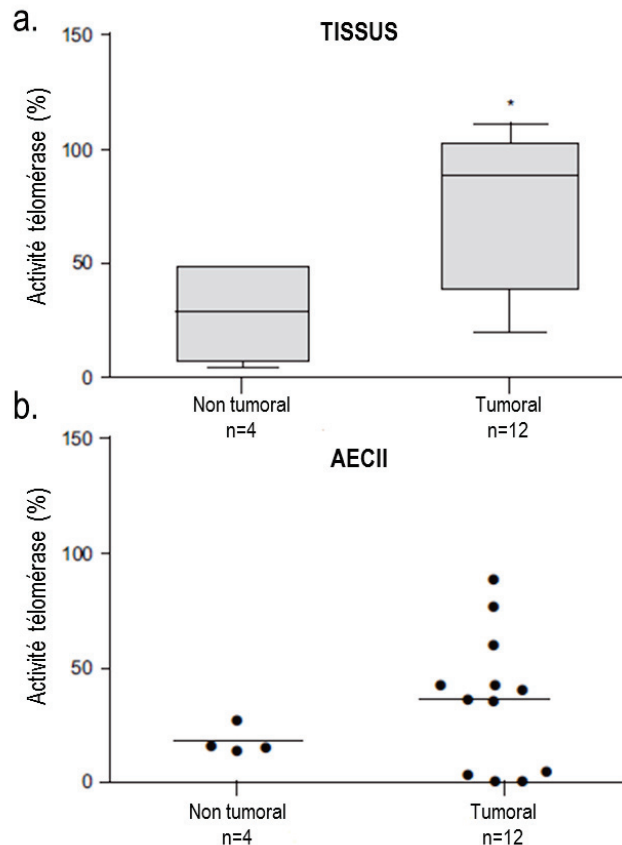


Figure 14 : L'activité de la télomérase est augmentée dans les tissus tumoraux (a) et dans les cellules épithéliales alvéolaires de type II dérivées de poumons tumoraux (b) (D'après (481)). * : $p < 0.05$

La voie RAS/MEK/MAPK est également impliquée dans la transformation induite par les enveloppes de JSRV et ENTV (Figure 13) (318). Cette voie est initiée par la protéine RAS qui induit une cascade de phosphorylation impliquant des sérines/thréonines kinases de quatre types : ERK1/2 (Extracellular signal-Regulated Kinase), SAPK/JNK1, 2 et 3 (Stress activated protein kinase/c-Jun NH2-terminal kinase), p38 MAPKs et BMK1/ERK5 (Big mitogen-activated protein kinase 1/Extracellular signal regulated kinase 5). L'activation de RAS stimule la phosphorylation des MAPKKK (MAPK kinase kinase), telles que RAF, qui phosphorylent à leur tour les MAPKK (MAPK kinase) telles que MEK1/2 qui phosphorylent les MAPK telles que ERK1/2 (3). Lorsque la voie MAPK est activée, il en résulte une translocation des MAPK dans le noyau où elles sont phosphorylées et où elles activent des facteurs de transcription cibles impliqués dans la prolifération, la différenciation et l'apoptose cellulaire (3). La voie RAS/MEK/MAPK est impliquée dans la transformation induite par JSRV *in vitro* dans les NIH3T3 et dans les cellules épithéliales de rein de rat RK3E (225, 318). L'activation de la voie MAPK peut être indépendante de l'activation par RAS car l'inhibiteur de RAS, le FTI-277 n'abolit pas complètement la transformation des RK3E (318). L'inhibition des MEK1/2 par leur inhibiteur PD98059, protéines en aval de RAS dans la voie de signalisation, inhibe la transformation des NIH3T3 et des RK3E (318). La phosphorylation d'ERK1/2 a été détectée *ex vivo* dans les cellules des coupes de poumons tumoraux et *in vivo* dans les tumeurs d'adénocarcinomes pulmonaires induites naturellement ou expérimentalement (106, 121).

Notre équipe a mis en évidence l'importance du complexe enveloppe de JSRV et RALBP1 (RalA Binding Protein 1), une protéine cellulaire impliquée dans la voie RAS par son domaine de fixation avec les RalGTPases RalA et RalB (251). L'identification des mécanismes initiaux de transformation et notamment des interactions de l'enveloppe avec les protéines cellulaires est essentielle pour comprendre la transformation viro-induite. Nous avons montré que l'expression de RALBP1 était diminuée dans les tumeurs pulmonaires et dans les cellules épithéliales alvéolaires de type II dérivées de cancers induits par JSRV (350). Le blocage de l'expression de RALBP1 par des siRNA *in vitro* dans des cellules épithéliales MDCK a permis de mettre en évidence la modulation de la voie mTOR/p70S6K par l'augmentation de l'expression de CDC42 (Cell division cycle 42) en présence de l'enveloppe de JSRV (Figure 15) (350). ZFP111 (Zinc finger protein 111), un potentiel répresseur transcriptionnel a également été identifié comme interagissant avec l'enveloppe de JSRV (222). Une inhibition de l'expression de ZFP111 induit une diminution de la transformation cellulaire médiée par l'enveloppe de JSRV et une augmentation de son expression augmente l'efficacité de la transformation cellulaire (222). ZFP111 interagit préférentiellement avec p70^{env}, une forme nucléaire de l'enveloppe de JSRV indiquant que la transformation par JSRV pourrait impliquer des interactions entre l'enveloppe de JSRV et des protéines nucléaires (222).

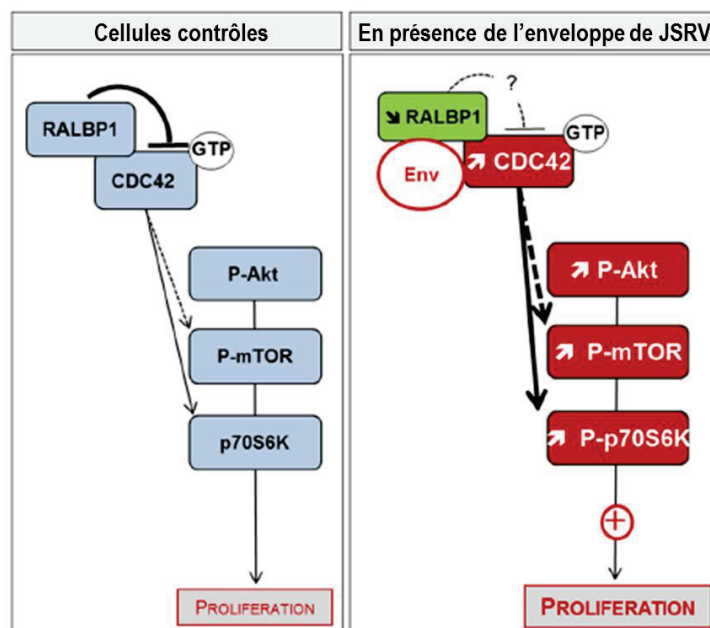


Figure 15 : Régulation putative de la voie de signalisation AKT/mTOR/p70S6K en présence de l'enveloppe de JSRV (D'après (350)). A gauche, la voie de signalisation dans les cellules contrôles/saines et à droite, dérégulation de la voie observée dans les cellules exprimant l'enveloppe de JSRV. Les protéines sur exprimées sont indiquées en rouge et celles sous exprimées sont indiquées en vert.

POINTS FORTS A RETENIR :

Bêta-rétrovirus et adénocarcinomes des voies respiratoires chez les petits ruminants

- ❖ JSRV et ENTV induisent respectivement des adénocarcinomes pulmonaires et nasaux
- ❖ L'adénocarcinome pulmonaire ovin est défini comme un adénocarcinome de type pneumonique avec une prédominance de lésions lépidiques
- ❖ L'adénocarcinome pulmonaire ne présente pas d'extensions extra-thoraciques
- ❖ JSRV et ENTV induisent la transformation des cellules des épithélia pulmonaires et nasaux par l'intermédiaire de leur protéine d'enveloppe
- ❖ L'enveloppe de JSRV permet l'activation des voies de prolifération cellulaire PI3K/AKT et MAPK

III. L'adénocarcinome lépidique : un cancer similaire à l'adénocarcinome pulmonaire ovin

Le cancer du poumon est la première cause de mortalité par cancer chez l'homme avec environ 20% du nombre de morts par cancers dans le monde et 1,5 million de morts par an devant les cancers de la prostate et du colon (377). Entre 2002 et 2012 en Europe, la mortalité due aux cancers pulmonaires a augmenté de 17,5% chez la femme s'expliquant par une augmentation du tabagisme chez les femmes (323).

Parmi les cancers pulmonaires, on distingue les cancers pulmonaires à petites cellules (CPC) et les cancers pulmonaires non à petites cellules (CNPC). Les CPC représentent 12% des nouveaux cas de cancer dans le monde et touchent majoritairement les voies aériennes supérieures. Les CNPC se subdivisent en carcinomes épidermoïdes, carcinomes à large cellules et adénocarcinomes. Les adénocarcinomes touchent principalement les zones périphériques du poumon. Ils représentent plus de 40% des CNPC dans le monde et sont en augmentation ces dernières années. Le changement des caractéristiques des cigarettes en paquet avec, entre autre, l'ajout de filtres qui augmentent le volume de bouffée de tabac aspirée et une inhalation de la fumée plus profonde dans les voies respiratoires sont les hypothèses pouvant expliquer cette augmentation (505). Les adénocarcinomes, comme d'autres cancers pulmonaires, se développent également chez des personnes n'ayant jamais fumé pointant d'autres facteurs de risque tels que le tabagisme passif, les radiations ionisantes, la pollution de l'air, certaines maladies chroniques pulmonaires (fibrose ou tuberculose) et l'histoire familiale (505). Des prédispositions génétiques aux adénocarcinomes pulmonaires ont été observées chez des familles ayant des mutations des oncogènes EGFR et ERBB2 (505).

Les adénocarcinomes pulmonaires se disséminent par les voies sanguines et lymphatiques vers les autres organes du corps ; les métastases pleurales sont un facteur de mauvais pronostic (505). Les tumeurs peuvent se reprendre dans le poumon par dissémination aérogène liée à la présence de cellules ou d'amas cellulaires tumoraux dans les voies aériennes permettant à ces cellules de former des lésions séparées de la tumeur primitive (505).

Les adénocarcinomes sont classés en fonction de leur profil histologique et de l'expression ou non de mucine (Tableau 7).

Sous types d'adénocarcinomes

- * Lépidique
- * Acinaire
- * Papillaire
- * Micropapillaire
- * Solide
- * Adénocarcinome mucineux invasif
 - Mixte mucineux et non mucineux
- * Colloïdes
- * Foetal
- * De type intestinal
- * Adénocarcinome avec invasion minimale
 - Non mucineux
 - Mucineux
- * Lésions pré-invasives
 - Hyperplasie adénomateuse atypique
 - Adénocarcinome *in situ*
 - Mucineux
 - Non mucineux

Tableau 7 : Classification des adénocarcinomes (D'après (507)).

Parmi les adénocarcinomes, on distingue les sous types acinaires, papillaires, micropapillaires, lépidiques et solides. Les adénocarcinomes pulmonaires acinaires se caractérisent par la formation de glandes avec une lumière entourée de cellules tumorales, d'acinis ou de massifs cribriformes (percés de nombreux trous) (Figure 16). Les adénocarcinomes pulmonaires papillaires se caractérisent par la formation des papilles remplaçant l'architecture pulmonaire et formant un axe fibro-vasculaire (Figure 16). Les cellules tumorales de ces deux sous types d'adénocarcinomes ont une morphologie cuboïdale ou cylindrique et peuvent être de type mucineux ou non mucineux (505). Les adénocarcinomes micropapillaires se caractérisent par la présence de cellules tumorales croissant en amas ou touffes sans axes fibrovasculaires rattachés ou non à la paroi alvéolaire (Figure 16). Les cellules tumorales sont petites, cubiques, possèdent un noyau atypique et peuvent former des structures en anneaux avec une lumière centrale flottant dans les lumières alvéolaires (505). L'invasion stromale et vasculaire est commune (505). Les adénocarcinomes solides sont composés de cellules tumorales ovalaires et polygonales formant des massifs sans architecture précise et sont mucineux (Figure 16).

Les adénocarcinomes lépidiques prédominants (ALP) sont le résultat de la prolifération des cellules épithéliales alvéolaires de type II et des cellules Club le long de la paroi alvéolaire en maintenant l'architecture pulmonaire et présentent un contingent invasif supérieur à 5 mm (507). Parmi les adénocarcinomes lépidiques prédominants, on distingue les adénocarcinomes *in situ* (AIS) correspondant à une tumeur isolée de taille inférieure à 3 cm à croissance lépidique pure et les adénocarcinomes mini-invasif (AMIV) correspondant à de

petites tumeurs solitaires (< 3 cm) avec une croissance l pидique prédominante associées à un contingent invasif inférieur à 5mm de sous type acinaire, papillaire, micropapillaire ou solide (Figure 16). Les AIS et les AMIV sont non mucineux dans la majorité des cas (507). La survie des patients atteints d'AIS ou d'AMIV sans rechute est de 100% à 5 ans après résection chirurgicale (507). Les adénocarcinomes mucineux invasifs (AMI) ont une croissance majoritairement l pидique mais peuvent également avoir une croissance acinaire, papillaire ou micropapillaire. Ils sont caractérisés par une abondante sécrétion de mucine de la part des cellules tumorales souvent calciformes ou en forme de colonne (Figure 16) (505). Ces tumeurs présentent également un contingent invasif (505).

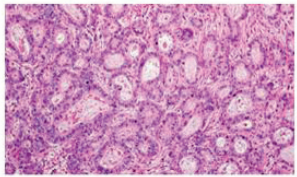
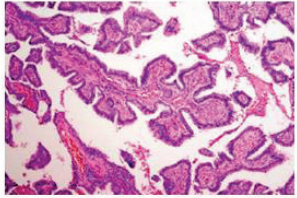
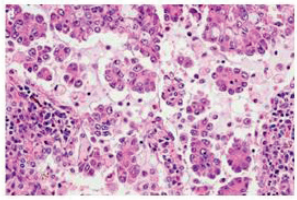
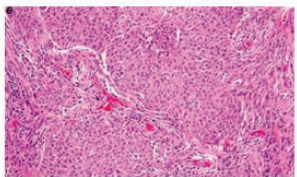
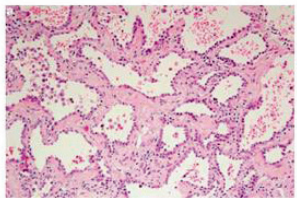
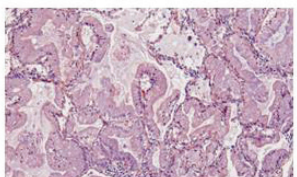
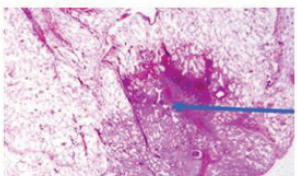
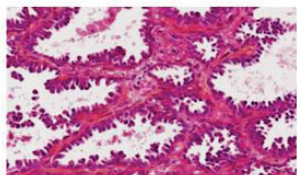
Sous-type	Description	Histologie	
Adénocarcinome acinaire	Présence de glandes, d'acini ou de massifs cribriformes Cellules cuboïdales ou cylindriques Mucineux ou non mucineux		
Adénocarcinome papillaire	Présence de papilles remplaçant l'architecture pulmonaire, suivant des axes fibro-vasculaires et pouvant être associées à des nécroses et de l'invasion tumorale Cellules cuboïdales ou cylindriques Mucineux ou non mucineux		
Adénocarcinome micropapillaire	Formation d'amas sans suivre les axes fibro-vasculaires pouvant être raccordés à la paroi alvéolaire ou détachés Cellule petites et cubiques Structure en anneaux avec une lumière centrale flottant dans les lumières alvéolaires		
Adénocarcinome solide	Cellules ovalaires ou polygonales formant des massifs sans architecture acinaire, papillaire, micropapillaire ou lépidique Mucineux		
Adénocarcinomes lépidiques	ALP (Adénocarcinome à prédominance lépidique)	Cellules tumorales proliférant le long de la paroi alvéolaire avec respect de l'architecture pulmonaire Prolifération lépidique > 3cm Contingent invasif > 5mm Non mucineux	
	AMI (Adénocarcinome mucineux invasif)	Variant de l'adénocarcinome à prédominance lépidique Prolifération lépidique Cellules en forme de colonne Contingent invasif Mucineux	
	AMIV (Adénocarcinome mini-invasif)	Prolifération lépidique <3cm Zone d'invasion <5mm Pas de lésion des structures lymphatiques, vasculaires ou pleurales Pas de nécrose tumorale Mucineux ou non mucineux (majoritaire)	
	AIS (Adénocarcinome in situ)	Prolifération lépidique pure <3cm Sans zone d'invasion Pas de lésion des structures lymphatiques, vasculaires ou pleurales Mucineux ou non mucineux (majoritaire)	

Figure 16 : Description et aspect histologique des principaux sous-types d'adénocarcinomes pulmonaires (D'après (507)).

III.1. Adénocarcinomes mucineux invasifs et adénocarcinomes non mucineux

Avant la classification des adénocarcinomes pulmonaires de 2011, les adénocarcinomes lépidiques prédominants étaient classés en cancers bronchioalvéolaires mucineux et non mucineux. La classification de 2015 a permis de redéfinir la classification des adénocarcinomes lépidiques : les cancers bronchioalvéolaires non-mucineux ont été redéfinis en adénocarcinomes lépidiques prédominants, adénocarcinomes *in situ*, et adénocarcinomes mini-invasifs et les cancers bronchioalvéolaires mucineux ont été redéfinis en adénocarcinomes mucineux invasifs (507) (Tableau 8). Les adénocarcinomes mucineux invasifs et les adénocarcinomes non mucineux sont différents par le génotype des tumeurs et par certains marqueurs immunohistochimiques. Les adénocarcinomes mucineux invasifs sont à 75% mutés pour l'oncogène *KRAS* et pour moins de 5% mutés pour l'oncogène *EGFR*. Différemment, 45% des adénocarcinomes lépidiques non mucineux sont mutés pour l'*EGFR* contre 15% pour *KRAS* (Tableau 8) (505). CK20 (Cytokératine 20), un marqueur des carcinomes, est exprimé dans 50% des adénocarcinomes mucineux invasifs et TTF1 (Thyroid transcription factor 1), un marqueur des cellules de l'unité respiratoire terminale, dans 15% des adénocarcinomes mucineux invasifs alors que CK20 est exprimé dans 5% et TTF1 dans 65% des adénocarcinomes lépidiques non mucineux (Tableau 8) (505).

	Adénocarcinome mucineux invasif* Cancer bronchioalvéolaire mucineux**	Adénocarcinome lépidique prédominant non mucineux* Cancer bronchioalvéolaire non mucineux**
Histopathologie	Cellules tumorales de grande taille sécrétrices de mucines	Cellules alvéolaires de type 2 et cellules Club
Marqueurs immunohistochimiques		
CK20	50%	5%
TTF1	15%	65%
Génotype		
Mutation <i>KRAS</i>	75%	15%
Mutation <i>EGFR</i>	<5%	45%

Tableau 8 : Différences entre les adénocarcinomes mucineux invasifs et les adénocarcinomes non mucineux (ALP, AMIV, AIS) (D'après (505)). * Classification de 2015, ** Classification de 2011.

Une autre différence importante entre les adénocarcinomes mucineux invasifs et les adénocarcinomes lépidiques prédominants non mucineux est la présence ou non de mucosécrétions. Les mucines sont des substances mucopolysaccharidiques présentes dans les liquides de sécrétion de l'estomac, du foie ou du système respiratoire. Les cellules épithéliales de ces organes se trouvent dans des environnements difficiles subissant des fluctuations importantes en termes de pH, de concentration en ions, d'hydratation ou encore d'oxygénation mais aussi exposées à des protéases, des glycosidases, des lipases, plusieurs toxines et des

agents infectieux tels que les bactéries ou les virus (44). Les mucines se caractérisent par la présence de répétitions en tandem riches en prolines, thréonines et sérines dans le domaine extracellulaire, dont les glycosylations sont essentielles pour leur structure et leurs fonctions. Les 18 mucines sont classées en mucines liées à la membrane cellulaire ou transmembranaires et en mucines sécrétées. On dénombre 11 mucines transmembranaires : MUC1, MUC3A, MUC3B, MUC4, MUC12, MUC13, MUC15, MUC16, MUC17, MUC20 et MUC21 et 7 mucines sécrétées : MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6, MUC7, MUC8 et MUC19. Dans le poumon, les mucines exprimées sont MUC1, MUC2, MUC4, MUC5AC, MUC5B, MUC6 et MUC7 (Tableau 9).

Il existe des différences du niveau d'expression des mucines dans les adénocarcinomes mucineux invasifs et lépidiques prédominants. L'analyse de l'expression des mucines lors d'une première étude a montré que les AMI exprimaient MUC5AC, MUC5B et MUC6 et que les ALP exprimaient à des niveaux plus faibles MUC5AC et MUC5B (101). Une étude récente sur plus de cinquante échantillons tumoraux a montré que les AMI exprimaient MUC5AC, MUC5B et MUC6 et étaient fréquemment mutés pour l'oncogène KRAS et que les ALP exprimaient MUC1 et étaient fréquemment mutés pour l'oncogène EGFR (Tableau 9) (150).

	Mucines	Expression dans l'appareil respiratoire normal	Expression dans les cancers pulmonaires	Différence d'expression entre les AMI et les ALP
Transmembranaires	MUC1	Epithélium bronchique, tubes collecteurs, glandes sous muqueuses, bronchioles	Adénocarcinomes, Epidermoïdes	ALP
	MUC4	Tubes collecteurs, cellules caliciformes, cellules alvéolaires	Adénocarcinomes, Epidermoïdes, A large cellules	ALP et AMI
Sécrétées	MUC2	Epithélium respiratoire, cellules caliciformes	Adénocarcinomes, Epidermoïdes	Non exprimé
	MUC5AC	Epithélium de la trachée et des grosses bronches, cellules caliciformes	Adénocarcinomes	AMI
	MUC5B	Tubes collecteurs, glandes sous muqueuses, cellules des bronchioles	Adénocarcinomes	AMI
	MUC6	Non exprimé	Adénocarcinomes	AMI
	MUC7	Cellules séreuses des glandes sous muqueuses	Epidermoïdes	Non exprimé

Tableau 9 : Expression des mucines dans l'appareil respiratoire normal et dans les cancers pulmonaires et différence d'expression des mucines entre les AMI et les ALP (d'après (150, 274)).

III.2. Adénocarcinome lépidique de présentation pneumonique

La description de l'aspect histologique seul ne suffit pas à décrire la maladie en elle-même. Il est important de prendre en compte les aspects cliniques et radiologiques. Les adénocarcinomes lépidiques sont retrouvés sous forme nodulaire isolée ou sous forme pneumonique (132). La forme nodulaire isolée correspond à un nodule périphérique unique bien limité avec un aspect en verre dépoli ou subsolide au scanner ; sur le plan histologique, ces nodules sont majoritairement des adénocarcinomes lépidiques prédominants, c'est-à-dire, les ALP, AMIV et les AIS (132). La forme pneumonique correspond à un véritable aspect de pneumonie

sur une radiographie ou un scanner avec des images de condensation alvéolaire dense et parfois le comblement de tout un lobe associé à des opacités en verre dépoli (Figure 17A) (132). Au niveau macroscopique, le poumon présente de nombreux nodules blanchâtres disséminés dans l'ensemble de l'organe (Figure 17B) (353). Sur le plan histologique, ces adénocarcinomes sont majoritairement des AMI avec 45% d'adénocarcinomes mucineux, 40% de non mucineux et 15% de mixtes (132).

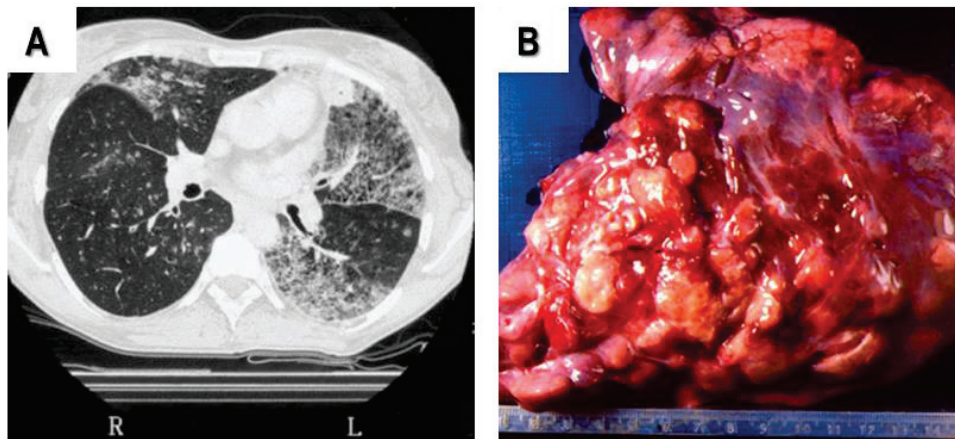


Figure 17: Aspect radiologique et macroscopique d'un adénocarcinome lépidique de type pneumonique (d'après (352)). A. Scanner d'un adénocarcinome lépidique humain avec des opacités parenchymateuses alvéolaires caractéristiques. **B.** Poumon atteint d'un adénocarcinome lépidique avec de volumineux nodules blanchâtres disséminés à l'ensemble du poumon.

Les adénocarcinomes lépidiques sont cliniquement associés à une toux hautement productive et à une insuffisance pulmonaire progressive bien que ces symptômes ne soient pas pathognomoniques de la maladie (353, 544). Ils ne sont pas associés à des métastases ganglionnaires ou systémiques (132). La première transplantation bipulmonaire a été réalisée en 1991 et le patient a survécu pendant 5 ans et demi sans rechute (157). En 2014, parmi les 15 patients atteints d'adénocarcinomes lépidiques transplantés reportés par l'ISHLT (International Society for Heart and Lung Transplantation), 50% ont eu une rechute de cancer au niveau du poumon transplanté avec une médiane d'apparition de 30,1 mois (30, 125, 177, 398). Des analyses des microsatellites sur les tumeurs ont mis en évidence une rechute à partir des cellules du receveur (177, 398). La chimiothérapie et plus précisément l'utilisation d'inhibiteur de l'activité tyrosine kinase de l'EGFR (ITK-EGFR) sont utilisées en traitements pour les patients avec un adénocarcinome lépidique prédominant en lien avec la fréquence de mutation activatrice de l'activité tyrosine kinase de l'EGFR (70). Les AMI, rarement mutés pour EGFR, ne répondent pas aux inhibiteurs de l'EGFR mais montrent une meilleure réponse aux chimiothérapies impliquant la carboplatine, le paclitaxel et le pemetrexed, bloquant la réplication des cellules tumorales, avec une survie globale augmentée de 13 à 20 mois (70). Malgré les avancées sur les traitements, le pronostic des malades atteints d'adénocarcinomes lépidiques de type pneumonique est encore mauvais avec une survie à 5 ans inférieure à 10%.

L'épidémiologie des adénocarcinomes lépidiques est différente des autres types d'adénocarcinomes avec un lien moins important avec le tabac et une fréquence augmentée chez les femmes et les patients jeunes

(317, 509). Notre équipe a conduit une étude multicentrique cas-témoin sur 44 patients atteints d'adénocarcinomes pulmonaires lépidiques et 132 individus contrôles (44 patients avec des adénocarcinomes lépidiques et 88 patients avec des cancers non à petites cellules d'autres types que des adénocarcinomes) pour déterminer si l'exposition chronique aux petits ruminants pouvait être un facteur de risque aux adénocarcinomes lépidiques par rapport aux autres types de cancers du poumon (317). Les données ont été collectées à partir d'un questionnaire de 356 questions demandant la fréquence, le type d'exposition (professionnelle ou loisir), la période de contact (enfance, adulte et âge) aux animaux domestiques et à quelle espèce d'animaux domestiques le patient a été exposé. L'utilisation d'une analyse multivariée a permis d'associer de façon significative les adénocarcinomes lépidiques avec les femmes, les patients jeunes, les non-fumeurs et l'exposition professionnelle aux chèvres avec un rapport de cote ou « odd-ratio » de 5,09 par rapport aux autres types de cancers du poumon (317). Cette étude épidémiologique met en évidence une augmentation du risque de développer un adénocarcinome lépidique en relation avec un contact professionnel aux chèvres.

Les analogies cliniques, radiologiques et histologiques entre l'adénocarcinome pulmonaire lépidique chez l'homme et l'adénocarcinome pulmonaire ovin induit par le bêta-rétrovirus JSRV interrogent depuis des années sur une potentielle étiologie virale de cette forme particulière de cancer du poumon chez l'homme. Plusieurs études suggèrent un rôle de JSRV ou d'un virus apparenté (145). HYAL-2, le récepteur de JSRV, est exprimé à la surface des cellules humaines et permet la transduction de vecteurs rétroviraux possédant l'enveloppe de JSRV (423). Une protéine reconnue par des anticorps dirigés contre la capsid de JSRV a été détectée dans 30% des cancers bronchioalvéolaires, 26% des adénocarcinomes pulmonaires et 29% des carcinomes à larges cellules (118). L'immunomarquage de l'enveloppe de JSRV a montré un marquage positif sur 21% des adénocarcinomes et des carcinomes épidermoïdes (296). Des séquences ADN virales *env* et *gag* ont été détectées dans les cancers pulmonaires mais à des niveaux très faibles et la séquence du cadre de lecture « x » de JSRV a été détectée par PCR dans le sang de patients Africain dont certains étaient séropositifs pour le VIH (296, 355). Une étude sur des cancers bronchioalvéolaires provenant de patients de deux populations italiennes de Sardaigne et de Campanie a montré la présence de séquence ADN de l'endogène de JSRV dans 91% des cancers bronchioalvéolaires, 25% des poumons normaux et 25% des foies provenant de patients de Sardaigne testés par PCR (432). A l'inverse, d'autres études ont mis en évidence l'absence de séquences JSRV endogènes ou exogènes dans des cancers bronchioalvéolaires et des adénocarcinomes pulmonaires (565). L'analyse par séquençage haut débit sur cinq adénocarcinomes lépidiques (2 LPA, 2 AMI et 1 adénocarcinome mixte) a montré l'absence de séquence virale proche de JSRV ou de quelques autres virus dans ces échantillons (50). L'utilisation d'un anticorps monoclonal dirigé contre l'enveloppe de JSRV sur des coupes de 53 cancers bronchioalvéolaires et 50 autres types de cancers pulmonaires n'a montré aucun marquage et ce, même dans des tumeurs provenant de Sardaigne et du Pérou où les habitants cohabitent avec des moutons souvent infectés par JSRV (340). De façon intéressante, une corrélation entre cancers bronchioalvéolaires et infections par HTLV-1 a été montrée dans une étude

japonaise sur 212 patients atteints de cancers pulmonaires (371). L'ensemble de ces données ne permet pas de conclure sur une potentielle implication de JSRV dans l'induction de l'adénocarcinome lépidique humain. La question d'une étiologie virale reste importante pour comprendre les adénocarcinomes lépidiques humains.

POINTS FORTS A RETENIR :

L'adénocarcinome lépidique humain : un cancer similaire à l'adénocarcinome pulmonaire ovin

- ❖ Adénocarcinomes : plus de 40% des cancers pulmonaires chez l'homme
- ❖ Plusieurs types histologiques d'adénocarcinomes : acinaire, lépidique, papillaire, micropapillaire et solide
- ❖ Les adénocarcinomes lépidiques se décomposent en :

1. Non mucineux : ALP/AMIV/AIS

Mutations *EGFR*

Expression *MUC1*

2. Mucineux : AMI

Mutations *KRAS*

Expression *MUC5AC, MUC5B*

IV. Invasion tumorale et métastases

Les métastases sont des foyers de cellules provenant d'une tumeur primaire localisée dans un organe et qui se disséminent vers des organes anatomiquement éloignés, s'y adaptent et s'y multiplient. Plus de 90% de la mortalité des cancers est due aux métastases et non aux tumeurs primaires à partir desquelles ces métastases se développent (512). De ce fait, de nombreux suppresseurs de métastases ont été mis en évidence comme cibles thérapeutiques potentielles ; parmi eux, des facteurs de communication intercellulaire tels que NM23-H1/H2 (Non Metastatic clone #23 H1 and H2), KISS1 (KiSS-1 metastatic-suppressor 1) ou RhoGD12 (protéine se liant aux Rho GTases), des récepteurs cellulaires tels que CD82 et des facteurs de transcription tels que LSD1 (Lysine Demethylase 1A) (pour revue (228)). Une surexpression de KISS-1, par exemple, diminue l'invasion des lignées cellulaires de cancers colorectaux par le blocage de la voie PI3K/AKT ; PI3K/AKT à leurs tours, diminuent l'expression de MMP9 (Matrix Metallopeptidase 9) (91).

Les métastases sont parfois détectées après une chirurgie, des chimiothérapies ou des radiothérapies de tumeurs ; elles proviennent de micro-métastases présentes avant les traitements mais non détectées, dérivent des résidus d'une tumeur primitive qui n'aurait pas été totalement éliminée ou peuvent être induites par le traitement lui-même (326). Par exemple, une augmentation de cellules tumorales circulantes, précurseurs des métastases, a été observée dans la veine pulmonaire de patients atteints de cancers pulmonaires non à petites cellules après un traitement chirurgical de la tumeur (201). Les cellules tumorales envahissent l'organisme par les voies sanguines et lymphatiques.

IV.1. La formation des métastases

En 1889, Paget a émis l'hypothèse que les métastases se formeraient par l'intermédiaire d'une communication entre les cellules cancéreuses, « les graines », et le microenvironnement tumoral, « le sol » (388). Le microenvironnement tumoral est une source de signaux de croissance et d'invasion pour les cellules tumorales générée par le stroma associé à la tumeur, les cellules immunitaires, les macrophages, les cellules dendritiques et les fibroblastes. Ces signaux sont responsables de l'invasion locale, c'est-à-dire de l'entrée des cellules des tumeurs primaires dans le stroma tumoral et dans le tissu normal adjacent (Figure 18). Par exemple, dans les cancers pulmonaires non à petites cellules, une augmentation de la production de l'IL-10 (Interleukine 10) par les macrophages associés à la tumeur est un facteur de mauvais pronostic, IL-10 stimulant la croissance et l'invasion tumorale (569). Une étape clé dans l'invasion locale est la conversion des cellules épithéliales en cellules mobiles, invasives et d'aspect mésenchymateux, la transition épithélio-mésenchymateuse ou EMT (Epithelial Mesenchymal Transition). Dans ce processus, les cellules épithéliales perdent l'adhésion cellule-cellule, l'adhésion cellule-matrice extracellulaire et leur polarité. L'expression des marqueurs de cellules épithéliales est diminuée voir inhibée, comme c'est le cas de CDH1 (Cadherin 1) au profit des marqueurs des cellules mésenchymateuses tels que la vimentine, la fibronectine, CDH2 (Cadherin 2), ou encore l' α -SMA (α -Smooth Actin) (551). L'EMT est induite par des facteurs produits par les cellules

tumorales et par les cellules du stroma : des facteurs de croissance tels que TGF- β (Transforming Growth Factor β) et l'IL1 β (Interleukine 1 β), des récepteurs tyrosine kinase tels que FGFR (Fibroblast Growth Factor Receptor) et par les protéines des voies WNT, NOTCH et Hedgehog (551). TGF- β active *via* ces récepteurs les facteurs de transcription SMAD2/3 (SMAD family member 2/3), SNAI1/2 (Snail family transcriptional repressor 1 and 2) et TWIST (Twist family bHLH transcription factor) qui répriment l'expression de CDH1, et active l'expression de l' α -SMA (551). Les cellules tumorales et les cellules du stroma sécrètent les métalloprotéinases MMP2, 7, 8 et 9 qui dégradent la matrice extracellulaire facilitant l'invasion. MMP7 dégrade les composants de la matrice extracellulaire tels que l'élastine, le collagène de type 4 et la fibronectine. Sa surexpression dans les cancers pulmonaires non à petites cellules corrèle avec la prolifération des cellules tumorales et un mauvais pronostic (298). Les MMP clivent d'autres protéines de la matrice extracellulaire qui ont des effets pro-invasifs. Dans des lignées de tumeurs mammaires humaines, la protéine MMP2 exprimée par les macrophages, clive la laminine 5, un composant de la membrane basale qui est un analogue du ligand EGF dans l'activation de l'EGFR et dans l'induction de l'invasion cellulaire (185).

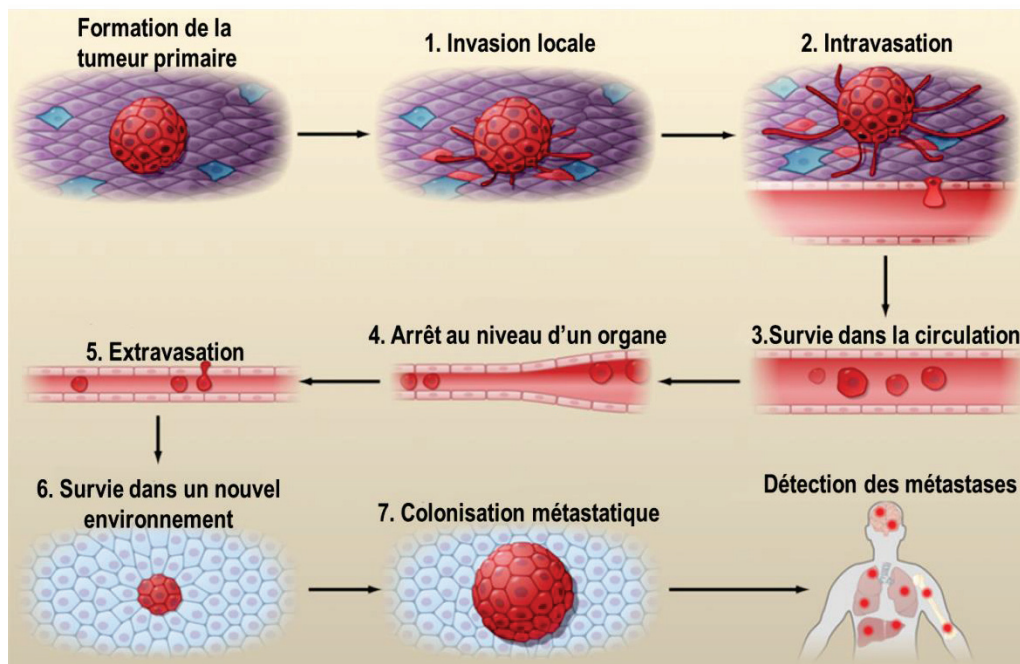


Figure 18 : Etapes de mise en place des métastases à partir d'une tumeur primaire (d'après (512)).

L'intravasation est l'entrée des cellules tumorales dans la lumière des vaisseaux sanguins ou lymphatiques (Figure 18). Les vaisseaux sanguins présents au sein des tumeurs possèdent moins de péricytes et sont plus perméables que les autres vaisseaux sanguins, ce qui facilite l'entrée des cellules tumorales dans la circulation sanguine (79). Le facteur de croissance TGF- β est impliqué dans l'augmentation de l'intravasation des cellules tumorales mammaires (184). Des facteurs en aval de l'activité de TGF- β , tels que CSF1R (Colony Stimulating factor 1 receptor) et LHX2 (LIM Homeobox 2) sont également impliqués dans ce processus. CSF1R stimule l'invasion et l'intravasation des cellules tumorales mammaires en inhibant l'expression des kératines et des claudines, deux protéines inhibitrices de l'invasion (400). L'expression de LHX2 augmente l'intravasation

des cellules épithéliales mammaires tumorales murines par l'intermédiaire du facteur de croissance PDGFB (Platelet Derived Growth Factor B) (272). L'EGFR a également un rôle important dans cette étape d'intravasation puisque sa surexpression augmente l'intravasation des cellules mammaires de rat MTLn3 et les métastases *in vivo* (302). Les macrophages et les cellules tumorales mettent en place une boucle de rétrocontrôle positif de sécrétion de l'EGF et de CSF1 permettant l'activation de leur récepteur (549).

Les mécanismes métastatiques sont peu efficaces. Chez des patientes atteintes de cancer du sein, seule une cellule métastatique sur soixante millions survie aux différentes étapes permettant la colonisation des organes distants de la tumeur primaire (105). Lorsqu'elles entrent dans la circulation sanguine, les cellules cancéreuses sont soumises à divers stress qui ne permettent pas leur survie tels que la perte d'adhésion cellulaire à la matrice extracellulaire, leur reconnaissance par les cellules immunitaires et leur exposition aux forces hémodynamiques (Figure 18). La perte d'adhésion cellulaire à la matrice extracellulaire induit l'anoikis, une forme de mort cellulaire. Les cellules cancéreuses circulantes sont résistantes à l'anoikis grâce à l'expression des FAK (Focal Adhesion Kinase) qui activées, se fixent aux intégrines présentes sur leurs endosomes et confèrent une résistance à l'anoikis (7). L'IGF1R (Insulin-like Growth Factor 1 Receptor), la claudin1, l'ATF4 (Activating transcription factor 4), le TRKB (Tyrosine receptor kinase B), la protéine WNT2 et ZNF304 (Zinc Finger Protein 304) confèrent également une résistance à l'anoikis des cellules cancéreuses circulantes (pour revue (241)). La capacité d'échappement des cellules cancéreuses circulantes aux cellules immunitaires est induite par l'expression de TGF- β . Ainsi, il a été montré que lors de l'activation de la transition épithélio-mésenchymateuse par TGF- β , les cellules cancéreuses pulmonaires sur expriment à leur surface CD59, un inhibiteur du complément, ce qui leur confère un mécanisme d'échappement au système immunitaire (187). Les cellules cancéreuses circulantes s'associent aux thrombocytes qui permettent leur arrêt au niveau de l'endothélium participant au développement de lésions secondaires (178). Les cellules cancéreuses peuvent migrer sous forme de cellules uniques ou d'un amas de cellules. Les amas de cellules sont composés d'un groupe de 2 à 100 cellules tumorales possédant une forte adhésion cellule-cellule (158). Les amas de cellules sont rares et fortement métastatiques ; dans un modèle murin de cancer mammaire, les amas ne représentent que 2 à 5% des cellules cancéreuses circulantes mais sont à l'origine de 50% des métastases (2). Dans les cancers pulmonaires, les amas sont associés aux adénocarcinomes acinaires et aux carcinomes épidermoïdes et les cellules uniques sont associées aux cancers à petites cellules (415).

En entrant dans la circulation sanguine, les cellules métastatiques ont le potentiel d'atteindre tous les organes mais les observations cliniques ont montré que ces cellules se localisent préférentiellement dans certains organes ou tissus (512) (Tableau 10). Les métastases des cancers pulmonaires se localisent préférentiellement dans les glandes surrénales, le foie, le cerveau et les os et les métastases des cancers mammaires se localisent préférentiellement dans le cerveau, les os, le foie et le poumon.

Type de tumeur primaire	Métastases
Sein	Cerveau, os, foie, poumon
Colon-Rectum	Foie, poumon
Rein	Glandes surrénales, os, cerveau, foie, poumon
Poumon	Glandes surrénales, foie, cerveau, os
Ovaires	Foie, poumon, peritoine
Pancréas	Foie, poumon, peritoine
Prostate	Glandes surrénales, os, foie, poumon
Estomac	Foie, poumon, peritoine
Foie	Poumon, os, cerveau
Col de l'utérus	Vessie, rectum, poumon, os
Vessie	Foie, poumon, os
Mélanome	Poumon, cerveau, peau, foie
Sarcome	Poumon

Tableau 10 : Localisation préférentielle des métastases (D'après (241))

Le déterminisme du site métastatique n'est pas complètement élucidé ; les cellules cancéreuses circulantes peuvent être arrêtées au niveau des capillaires des organes car le diamètre des cellules va dépasser celui de ces petits vaisseaux ou il existe des interactions ligands-récepteurs entre les cellules cancéreuses circulantes et les cellules endothéliales vasculaires de l'organe cible. La présence de protéines telles que la métadherine, exprimée à la surface des cellules cancéreuses mammaires va permettre l'établissement des métastases dans le poumon ; la production des molécules pro-inflammatoires telles que le TGF- α et l'IL1- β par les cellules cancéreuses pulmonaires ou colorectales facilite le développement des métastases dans le foie (27, 66). L'interaction entre l'intégrine $\alpha 3\beta 1$ des cellules cancéreuses circulantes mammaires et la laminine 5, un composant de la membrane basale des vaisseaux pulmonaires, permet l'arrêt des cellules cancéreuses et la formation de métastases pulmonaires (535).

Lorsque les cellules cancéreuses circulantes provenant de diverses tumeurs primaires atteignent l'organe où elles vont s'implanter, elles sortent de la circulation sanguine par extravasation (Figure 18). Ainsi, lorsque les cellules cancéreuses circulantes atteignent le poumon, elles doivent traverser la membrane basale soutenant les cellules épithéliales pulmonaires avant de pouvoir s'implanter. L'enzyme LOX (Lysyl Oxydase), sécrétée par les cellules tumorales, modifie la matrice extracellulaire et facilite le recrutement des cellules myéloïdes, produisant MMP2, au site pré-métastatique (156). Des molécules comme EREG (Epiregulin), COX2 (Cyclooxygénase 2), MMP1 et ANGPTL4 (Angiopoietin-like 4) produites par les cellules tumorales ont la capacité de faciliter l'extravasation en augmentant la perméabilité des vaisseaux sanguins pulmonaires (241). L'envahissement cérébral nécessite le passage de la barrière hémato-encéphalique comprenant une couche de cellules endothéliales très jointives et des astrocytes (1). L'enzyme ST6GALNAC5 (ST6 N-acetylgalactosaminide alpha-2,6-sialyltransferase 5) augmente l'adhésion des cellules tumorales mammaires aux cellules endothéliales cérébrales et favorise le passage à travers la barrière hémato-encéphalique (57). Une augmentation de l'expression d'ANGPT2 (Angiopoietine 2) par les cellules tumorales mammaires induit

des changements de distribution des protéines de jonction des cellules endothéliales ZO1 (Zonula Occludens 1) et claudin-5 rendant la barrière hémato-encéphalique plus lâche (29). D'autres molécules telles que l'IL-11, IL-6, TGF- β , FAK et NF κ B permettent l'arrêt des cellules cancéreuses circulantes dans les sites pré-métastatiques et l'extravasation (241). Des miRNA sont également impliqués dans l'induction de métastases et dans le mécanisme d'extravasation (pour revue (135)). Par exemple, miR-181c présent dans les microvésicules dérivées des cellules cancéreuses a la capacité de détruire la barrière hémato-encéphalique en induisant une localisation anormale de l'actine par la dérégulation de sa cible PDPK1 (3-Phosphoinositide Dependent Protein Kinase 1) (503).

Les environnements des sites primaires des tumeurs ou des sites métastatiques diffèrent par leur stroma, les constituants de la matrice extracellulaire, les facteurs de croissances, les cytokines et leur architecture auxquels les cellules circulantes doivent s'adapter. Divers facteurs cellulaires exprimés par les cellules tumorales tels que S100A8 et A9 (S100 calcium binding protein A8 et A9), MMP9, AKT et CXCL12 (C-X-C motif Chemokine Ligand 12) permettent l'adaptation des cellules tumorales à leur environnement (Figure 18). Les protéines S100A8 et S100A9 sont surexprimées dans les cancers du sein, colorectaux et de la prostate (474). Ces protéines de liaison au calcium forment des homo ou hétéro complexes importants pour les activités biologiques ; elles stimulent le chimiotactisme, la migration et l'adhésion cellulaire. Les protéines S100A8 et A9 sont exprimées par les cellules immunitaires infiltrantes de la tumeur et par les cellules tumorales (294). Leur expression par les cellules tumorales circulantes attire les cellules myéloïdes (monocytes et granulocytes) exprimant les ITGAM (intégrine α M) à leur surface au niveau de la niche métastatique pulmonaire. Des anticorps ciblant S100A8 et A9 bloquent l'infiltration de ces cellules myéloïdes ITGAM positive et réduisent les métastases pulmonaires de 80 à 90% (212). Les cellules myéloïdes ITGAM positives expriment également VEGFR1 (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1) à leur surface. Elles secrètent la métalloprotéase MMP9 permettant la libération du VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) présent dans la matrice extracellulaire sous forme libre et ce facteur de croissance favorise le pouvoir métastatique (211). Ainsi, l'inhibition de VEGFR1 des cellules myéloïdes empêche la formation des métastases (212). Les fibroblastes et les cellules mésenchymateuses exprimant CD45 et CD13 infiltrent les lésions et induisent une augmentation de l'expression de MMP9 par le tissu où se développent les métastases facilitant ainsi l'accrochage des cellules tumorales dans leur nouvel environnement (416). Les cellules métastatiques activent des voies de signalisation telles que la voie SRC et favorisent leur prolifération dans la niche pré-métastatique. Lorsque les cellules tumorales mammaires n'activent pas la voie SRC, elles n'ont pas la capacité de persister dans les tissus osseux mais peuvent toujours y migrer. SRC active la voie de prolifération cellulaire PI3K/AKT par l'intermédiaire de CXCL12 et CXCR4 (C-X-C motif Chemokine Receptor 4). SRC protège également les cellules tumorales mammaires de la mort cellulaire par ses effets inhibiteurs sur TNFSF10 (Tumor Necrosis Factor Superfamily Member 10), un facteur pro-apoptotique (571).

La formation de métastases n'est pas immédiate après l'infiltration des cellules tumorales circulantes dans les organes distants de la tumeur primaire. Un temps de latence plus ou moins long peut être observé

avant la formation de métastases (Figure 18). Les cancers du poumon, du pancréas et les mélanomes ont un temps de latence court. Les cancers pulmonaires non à petites cellules et les mélanomes forment des métastases très rapidement au cours de leur développement et ces métastases sont responsables des rechutes dans l'organe d'origine ou aux sites métastatiques préférentiels pour ces deux cancers (368). De façon différente, lorsque les cellules tumorales circulantes des cancers du sein, de la prostate et de la tête et du cou infiltrant les organes distants, elles entrent en dormance et ne prolifèrent plus (368). Cette dormance est induite par l'action de signaux d'inhibition provenant du stroma du tissu hôte. Lors de l'arrivée des cellules tumorales circulantes provenant de cancers de la tête et du cou vers les os, les facteurs de croissance TGF- β 2, BMP4 et 7 (Bone Morphogenic Protein 4 and 7) produits dans le tissu osseux activent la protéine p38 inhibitrice de la voie MAPK ainsi que les inhibiteurs des CDK (Cyclin Dependant Kinase) (58). Les cellules tumorales prostatiques en dormance dans le tissu osseux expriment les récepteurs à GAS6 (Growth Arrest-Specific protein 6), c'est à dire AXL (AXL receptor tyrosine kinase), TYRO3 (TYRO3 protein tyrosine kinase) et MERTK (MER proto-oncogen, Tyrosine Kinase). Lors de la fixation de GAS6 produit par les cellules osseuses, les cellules tumorales prostatiques en dormance arrêtent leur croissance et ne répondent plus aux signaux de prolifération induits par la fibronectine et les intégrines de la matrice extracellulaire des os (492). Les cellules cancéreuses dormantes doivent également faire face aux cellules immunitaires présentes au niveau du site pré-métastatique. Les cellules cancéreuses dormantes adoptent alors des caractéristiques de cellules souches par l'expression des facteurs de transcription spécifiques des cellules souches SOX2 et 9 (SRY Box 2 and 9) leur permettant d'échapper aux cellules immunitaires (324). L'expression de l'inhibiteur de la voie WNT, DKK1 (Dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 1), par les cellules cancéreuses dormantes permet le ralentissement de leur cycle cellulaire (324). Lorsque les cellules métastatiques sortent de leur dormance, elles expriment des inhibiteurs des BMP tels que DAND5 (DAN domain BMP antagonist family member 5), réactivent la signalisation par l'EGFR grâce aux protéines de la matrice extracellulaire telles que la fibronectine, les intégrines et VCAM1 (Vascular Cell Adhesion Protein 1) et la signalisation par le TGF- β . EGFR active alors les voies de prolifération cellulaire SRC et MAPK qui moduleront les cyclines D1 et D3, impliquées dans le cycle cellulaire (471).

L'un des mécanismes essentiel pour la formation de métastases est l'entrée des cellules tumorales dans les circulations sanguines et lymphatiques. Cette entrée est favorisée par la néo formation de vaisseaux sanguins (angiogénèse) et lymphatiques (lymphangiogénèse) permettant la dissémination des cellules tumorales.

IV.2. Angiogenèse et lymphangiogenèse

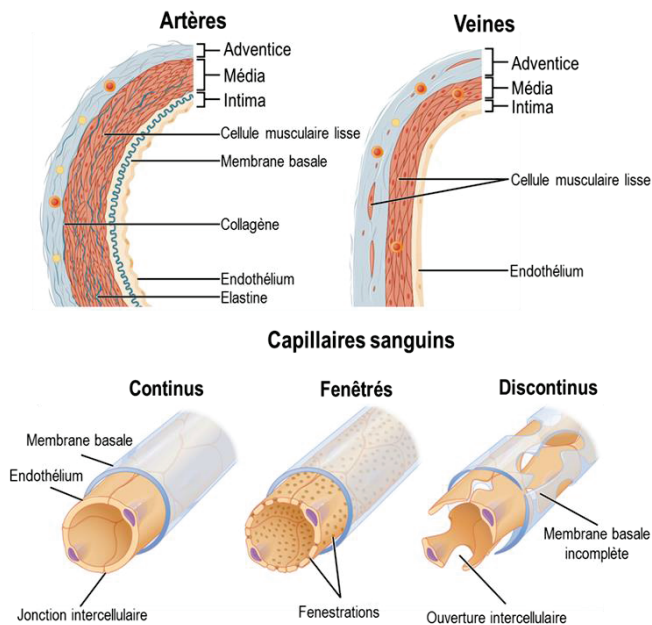
Au cours du développement embryonnaire, deux systèmes circulatoires distincts mais étroitement liés se forment : le système vasculaire sanguin et le système lymphatique. Le système vasculaire sanguin assure la distribution des nutriments et l'élimination des déchets du métabolisme *via* le sang. Il est composé des veines acheminant le sang des organes vers le cœur, des artères acheminant le sang du cœur vers les organes, et

des capillaires sanguins alimentant les organes. Le système lymphatique est composé d'un réseau de capillaires fins, de ganglions lymphatiques et des organes lymphoïdes permettant le drainage de la lymphe et l'activation de la réponse immunitaire lors d'une infection. Les cellules immunitaires (lymphocytes B et T, cellules présentatrices d'antigènes et macrophages) sont transportées par les vaisseaux lymphatiques à partir de la peau et des autres organes vers les ganglions lymphatiques où est initiée la réponse immunitaire (564). Le système lymphatique permet également le retour du plasma dans la circulation sanguine.

IV.2.1. Les systèmes vasculaires sanguins et lymphatiques:

La vasculogénèse, première étape du développement des systèmes vasculaires sanguins et lymphatiques, apparaît très tôt dans l'embryogénèse. Chez la souris, elle commence autour du 7^{ème} jour d'embryogénèse. Les hémangioblastes, cellules progénitrices des systèmes vasculaires sanguins et lymphatiques, donnent naissance aux cellules souches hématopoïétiques précurseurs des cellules sanguines circulantes et aux angioblastes formant les endothéliums vasculaires. Ces étapes initiales permettent la formation d'un réseau vasculaire primitif qui sera remodelé par l'angiogénèse en un réseau hautement organisé de vaisseaux sanguins comprenant les artères, les veines et les capillaires. Les artères et les veines sont composées de trois tuniques morphologiquement distinctes (Figure 19A). L'intima, bordant la lumière des vaisseaux, est composée de cellules endothéliales en contact direct avec le sang, et d'une membrane basale. La média, entourant l'intima, contient des cellules musculaires lisses et des constituants extracellulaires tels que l'élastine, le collagène et les protéoglycanes. L'adventice, la tunique la plus externe est composée de fibre de collagène et de fibroblastes. Les capillaires sont en contact direct avec les tissus. Ils sont composés d'une couche de cellules endothéliales entourées par une membrane basale et des péricytes. Les péricytes sont apparentés aux cellules musculaires lisses vasculaires et sont intégrés au sein de la membrane basale vasculaire leur permettant un contact direct avec l'endothélium (23). Il existe trois types de capillaires, les capillaires continus (cellules endothéliales jointives et lame basale continue) présents au niveau des muscles ou des poumons par exemple ; les capillaires fenêtrés (parois endothéliales perforées et membranes basales continues) permettant des échanges moléculaires plus importants et présents dans les intestins et les reins par exemple et les capillaires discontinus (cellules endothéliales irrégulièrement jointives présentant des pores et une membrane basale discontinue) ayant un diamètre plus important ralentissant le sang, facilitant les échanges sang/tissus et étant présents dans la rate et le foie par exemple.

A. Système vasculaire sanguin



B. Système lymphatique

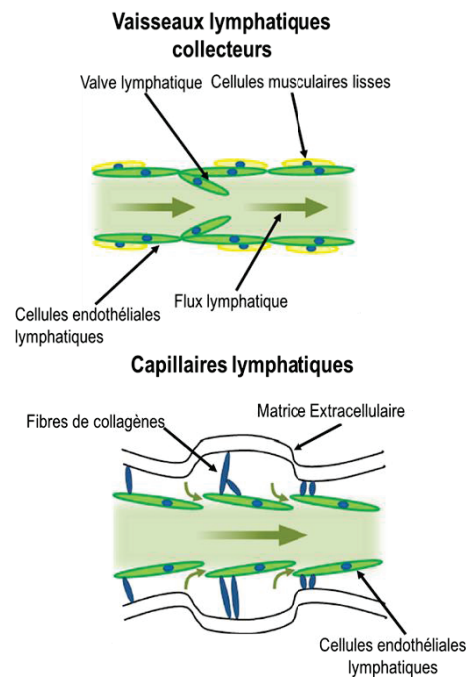


Figure 19 : Structure des vaisseaux sanguins (A) et lymphatiques (B).
D'après (380, 564).

Le système lymphatique se développe après le système sanguin ; chez les souris, il apparaît autour du 9^{ème} jour d'embryogenèse. Des cellules endothéliales veineuses se mettent à exprimer entre autres, LYVE-1 (Lymphatic Vessel Endothelial hyaluronan receptor 1) et PROX1 (Prospero Homeobox 1), deux marqueurs des cellules endothéliales lymphatiques et forment les sacs lymphatiques primaires. Ceux-ci sont remodelés et subissent une maturation formant le plexus lymphatique primaire puis un réseau hiérarchisé de capillaires et de vaisseaux lymphatiques. Les capillaires lymphatiques sont borgnes, composés d'une couche de cellules endothéliales lymphatiques interconnectées par des jonctions discontinues et ne possèdent pas de jonctions serrées et adhérentes (Figure 19B) (34). Une membrane basale entoure les capillaires lymphatiques, ils ne sont pas recouverts par des cellules musculaires lisses et sont ancrés à la matrice extracellulaire par des fibres de collagène (564). Les capillaires lymphatiques convergent en vaisseaux lymphatiques collecteurs et en troncs lymphatiques composés de cellules endothéliales lymphatiques entourées de cellules musculaires lisses. Les cellules endothéliales lymphatiques ont très peu de jonctions adhérentes et serrées, permettant leur perméabilité aux fluides interstitiels, aux protéines et facilitant la migration des cellules immunitaires. Les vaisseaux lymphatiques possèdent des valves assurant le transport unidirectionnel de la lymphe (564).

A l'âge adulte, les vaisseaux sanguins sont quiescents dans la plupart des organes et l'angiogenèse ne se déclenche que lors de conditions particulières telles que le cycle ovarien et au niveau placentaire pendant la grossesse (77). Les cellules endothéliales conservent cependant leur capacité à se diviser rapidement lors de stimuli externes tels que l'hypoxie pour les vaisseaux sanguins ou l'inflammation pour les vaisseaux

lymphatiques. L'angiogenèse et la lymphangiogenèse sont également réactivées lors de la réparation de blessures.

IV.2.2. Molécules régulant l'angiogenèse et la lymphangiogenèse

VEGF et leurs récepteurs : protéines clés de la vascularisation

De nombreuses molécules sont impliquées dans l'angiogenèse et la lymphangiogenèse dont le VEGFA (Vascular Endothelial Growth Factor A) découvert en 1983 par son implication dans la perméabilité vasculaire (452). Par la suite, d'autres facteurs VEGF ont été découverts : VEGFB, VEGFC, VEGFD, VEGFE, VEGFF et PlGF (Placenta Growth Factor). Les VEGF appartiennent à la superfamille des PDGF (Platelet Derived Growth Factor), des glycoprotéines sécrétées sous forme de dimères covalents liés par des ponts disulfures et possédant un domaine d'homologie aux VEGF composé de 8 résidus cystéines strictement conservés (Figure 20). Les VEGF sont des ligands se fixant sur les VEGFR (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor) exprimés à la surface des cellules endothéliales, sur les protéines transmembranaires NRP (Neuropilines) et sur les HSPG (Heparan Sulfate Proteoglycan) présents à la membrane plasmique ou dans la matrice extracellulaire.

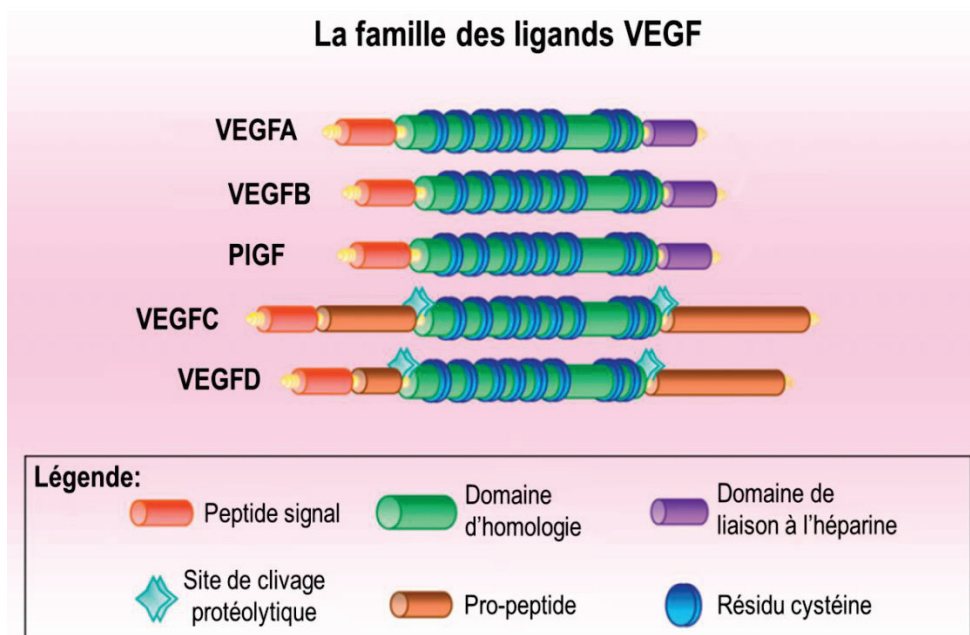


Figure 20 : Molécules de la famille des VEGF (Adapté de (293)).

Le gène VEGFA, activateur principal de l'angiogenèse, est composé de huit exons subissant un épissage alternatif pour coder plusieurs isoformes dont les plus importantes chez l'homme sont VEGFA₁₂₁, VEGFA₁₆₅, VEGFA₁₈₉ et VEGFA₂₀₆ correspondant au nombre d'acides aminés après clivage du peptide signal (519). L'expression de VEGFA est régulée au niveau transcriptionnel par la présence de HRE (Hypoxia Response Element) sur son promoteur ; le facteur de transcription HIF1 α (Hypoxia inducible factor 1, alpha

subunit), répondant à l'hypoxie, se fixe sur ces HRE et active l'expression de VEGFA. La stabilité des ARNm de VEGFA est induite par la présence de séquences ARE (AU Rich Elements) situées en 3' des ARNm où se fixent des protéines conduisant les ARNm vers la dégradation ou la traduction. HSPA1A (Heat Shock Protein family A member 1A) se fixe et stabilise les ARNm de VEGFA ; à l'inverse, les protéines HNRNDP (Heterogenous Nuclear Ribonucleoprotein D) et ZFP36 (Zinc Finger Protein 36) induisent leur dégradation (265, 553). Des miRNAs sont impliqués dans la régulation traductionnelle de VEGFA ; parmi eux, les miR-297, miR-299, miR-567 et miR-609 ciblent la séquence CARE (CA-Rich Element) en 3' UTR de l'ARNm et inhibent fortement la synthèse protéique sans aucune dégradation de l'ARNm (237). L'expression de VEGFA est induite par HIF1 α lors d'une hypoxie cellulaire, par des facteurs de croissance tels que TGF α , TGF β , des cytokines tels qu'IL-6 ou lors de l'activation de l'oncogène RAS (168, 325). Le gène VEGFB est composé de sept exons et par épissage alternatif de l'exon 6 produit deux isoformes VEGFB₁₆₇, une forme soluble et VEGFB₁₈₆, une forme liée à la matrice extracellulaire (375). Son expression est induite par la voie Hedgehog et récemment, il a été montré que PPRC1 α (Peroxisome Proliferator Activated Receptor γ , Coactivator 1 α), un régulateur du métabolisme des mitochondries et ESRRA (Estrogen Related Receptor α) régulaient l'expression de VEGFB (281, 335). Le gène PIGF est composé de sept exons et produit quatre isoformes par épissage alternatif, PIGF1 à PIGF4 (133). L'expression de PIGF est augmentée par le TGF- α , l'IFNG (Interferon γ) et est diminuée par TLR4 (Toll Like Receptor 4) dans des cellules primaires trophoblastiques (253). VEGFC et VEGFD sont exprimés sous forme de précurseurs comportant deux pro-peptides en N et C-term et clivés, par une protéine furine-like, en protéines actives (537). L'expression de VEGFC est activée par des facteurs de croissance tels que TGF- α dans les vaisseaux de l'œil, par l'enzyme COX2 et le récepteur RAR α (Retinoic acid Receptor α) dans des lignées cellulaires pulmonaires (138, 301). L'expression de VEGFD est également activée par RAR α dans le poumon (245).

Les récepteurs VEGFR1, VEGFR2 et VEGFR3 sont exprimés à la surface des cellules endothéliales vasculaires ; VEGFR2 et VEGFR3 sont également exprimés à la surface des cellules endothéliales lymphatiques (465). Ce sont des récepteurs à activité tyrosine kinase avec une partie extracellulaire permettant la fixation des ligands, une partie transmembranaire et une partie intracellulaire avec un domaine tyrosine kinase (Figure 21). La partie extracellulaire des VEGFR possède sept domaines « immunoglobulin-like », sauf VEGFR3 qui subit un clivage protéolytique au niveau du sixième domaine, les deux parties restant liées par un pont disulfure. Ce sont les deuxième et troisième domaines qui permettent la fixation des ligands VEGF. VEGFR1 fixe VEGFA, B et PIGF, VEGFR2 fixe VEGFA, VEGFC et VEGFD après clivage protéolytique ; VEGFR3 fixe VEGFC et D (Figure 21) (465). Au contact de leurs ligands, les récepteurs s'homodimérisent ; VEGFR2 pouvant également se dimériser avec VEGFR1 et VEGFR3 (458). Suite à la dimérisation, les domaines tyrosine kinase s'autophosphorylent induisant une cascade de signalisation aboutissant à la prolifération et à la survie des cellules endothéliales. Des formes solubles de VEGFR1 et VEGFR2, sVEGFR1 et sVEGFR2, ont été observées et peuvent également lier les ligands VEGF. L'expression des VEGFR est contrôlée par des séquences introniques fixant des facteurs de transcription de type ETS (E-26 Transformation

Specific). Les motifs CRE (cAMP Responsive Element) et ETS4 sont importants pour l'expression de VEGFR1 par la fixation de CREBP (cAMP Responsive Element Binding Protein) (530). L'expression de VEGFR1 est augmentée par l'hypoxie médiée par HIF1 α (179). Les ETS contrôlant l'expression de VEGFR2 sont ETV2 (ETS variant 2), GATA2 (GATA binding protein 2), SOX7 (SRY-box 7), FOXC2 (Forkhead box C2) et RBPJk (Recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa J region). Les protéines de la voie FGF permettent l'activation de l'expression de VEGFR2 par l'intermédiaire de la fixation du facteur de transcription FOXC2 et les protéines de la voie NOTCH par l'intermédiaire de la fixation du facteur RBPJk (43). En plus des séquences reconnues par les facteurs de transcription ETS, VEGFR2 contient des séquences promotrices permettant la fixation des facteurs de transcription AP-2 (Activator protein 2), SP-1 (Specificity Protein 1) et NF κ B, ce dernier contrôlant également l'expression de VEGFR3 (401). ETV2 agit en collaboration avec PROX1 pour activer l'expression de VEGFR3 ; TGF- β et BMP9 (Bone Morphogenic protein 9) inhibent l'expression de VEGFR3 (564).

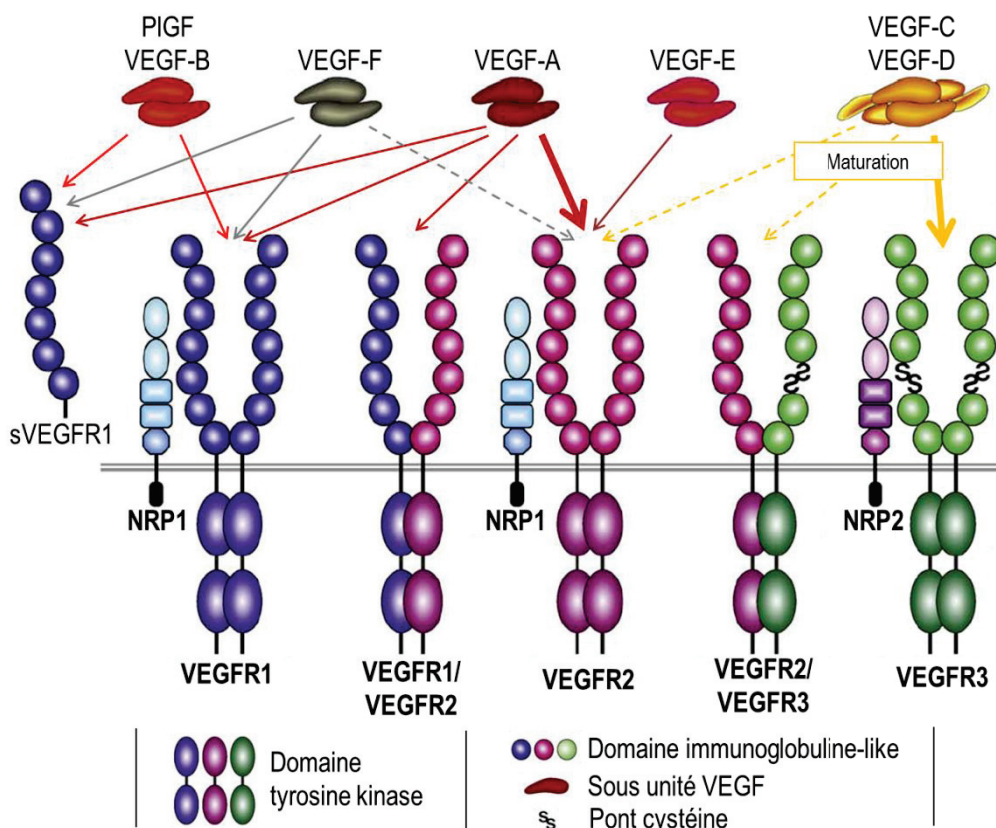


Figure 21 : Ligands et récepteurs de la voie VEGF (D'après (309)). Les ligands VEGF se lient à leurs récepteurs, présents à la surface des cellules endothéliales, avec des spécificités différentes indiquées par les flèches. VEGFC et D subissent des maturations, clivage des pro-peptides, leur permettant de se lier à VEGFR2 et VEGFR3.

Les NRP1 et NRP2 (Neuropilin 1 and 2) sont deux protéines transmembranaires possédant une partie extracellulaire composée de deux domaines a1 et a2 liant les sémaphorines (glycoprotéines sécrétées impliquées dans le guidage des axones pendant le développement embryonnaire), deux domaines b1 et b2

liant les ligands VEGF et un domaine c permettant la dimérisation des NRP, une partie transmembranaire et une partie cytoplasmique permettant la transduction du signal (Figure 21). NRP1 et NRP2 sont exprimés sous forme d'homodimères ou d'hétérodimères NRP1/NRP2 (209). NRP1 et NRP2 sont des co-récepteurs des VEGFR en facilitant l'interaction entre les ligands VEGF et leurs récepteurs VEGFR.

FGF, PDGF, ANGPT et leurs récepteurs : voies alternatives de la vascularisation

Les voies FGF/FGFR, PDGF/PDGFR et ANGPT/TIE (Angiopoietin/Tyrosine Kinase with Immunoglobulin-like and EGF-like domains) sont des alternatives à l'activation de l'angiogenèse et de la lymphangiogenèse. La famille FGF comporte 22 protéines sécrétées agissant comme des facteurs paracrines, autocrines et endocrines. Les protéines FGF1 et FGF2 sont impliquées dans l'angiogenèse par leur fixation sur les récepteurs FGFR1 à FGFR4 (181). Les récepteurs FGFR sont composés d'une partie extracellulaire composé de trois domaines « immunoglobulin-like » (D1 à D3) indispensables pour la liaison des FGF sur leurs récepteurs, d'une partie transmembranaire et d'une partie cytoplasmique contenant l'activité tyrosine kinase (Figure 22A) (181). Les protéines PDGFA à PDGFD sont, comme les VEGF, des glycoprotéines sécrétées sous forme de dimères covalents liés par des ponts disulfures qui activent des voies de signalisation cellulaire par l'intermédiaire des récepteurs, PDGFR α et PDGFR β . PDGFA et PDGFC se fixent et activent PDGFR α et PDGFB et PDGFD se fixent et activent PDGFR β (55). Les récepteurs aux PDGF sont composés de cinq domaines « immunoglobulin-like » extracellulaires, d'un domaine transmembranaire et d'un domaine intracytoplasmique à activité tyrosine kinase permettant la transduction du signal (Figure 22B) (55). La fixation des ligands FGF ou PDGF sur leur récepteur induit leur dimérisation et la trans-phosphorylation de leur domaine tyrosine kinase. Les ANGPT (Angiopoietines) sont, quant à elles, des glycoprotéines composées des domaines SCD (Super-Clustering Domain) permettant leur multimérisation, CCD (Coiled Coil Domain) permettant l'homo-oligomérisation des ligands et FReD (Fibrinogen-like Domain) permettant leur fixation sur les récepteurs TIE2 (159). Les ANGPT1 et ANGPT2 sont conservées entre les espèces de vertébrés, ANGPT3 et ANGPT4 sont des gènes orthologues présents respectivement chez la souris et l'homme. Les récepteurs TIE1 et TIE2 sont composés d'une partie extracellulaire avec trois domaines « immunoglobulin-like », trois domaines d'homologie aux EGF et trois domaines « Fibronectin type III-like », d'une partie transmembranaire et d'une partie intracellulaire avec une activité tyrosine kinase (Figure 22C) (159). Les angiopoïétines se fixent sur le récepteur TIE2 sous forme de multimères et induisent la multimérisation, l'autophosphorylation du domaine tyrosine kinase du récepteur et induisent la transduction du signal dans les cellules endothéliales. TIE1 est un récepteur orphelin mais il s'hétérodimérise avec TIE2 et régule son activité (159).

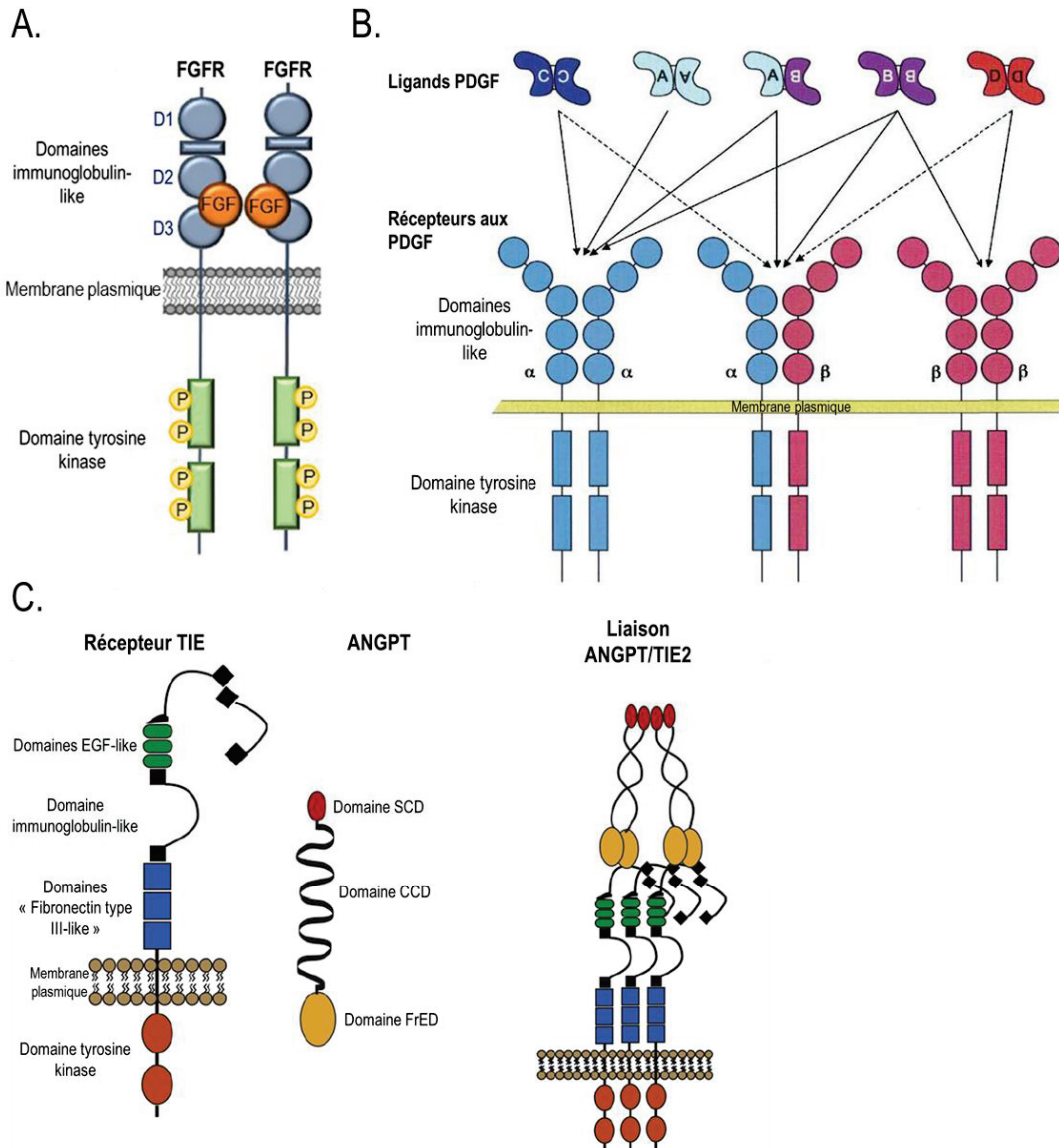


Figure 22 : Structure des ligands et récepteurs des voies FGF/FGFR (A), PDGF/PDGFR (B) et ANGPT/TIE (C) (D'après (12, 159, 181)).

Activateurs et suppresseurs de l'angiogenèse

La chemokine CXCL8 (C-X-C motif chemokine ligand 8) ou IL-8 (Interleukine-8) de 99 acides aminés est clivée en deux isoformes : une de 77 acides aminés présente dans les cellules épithéliales, endothéliales et musculaires lisses et une de 72 acides aminés présente dans les monocytes et les macrophages (303). CXCL8 est un activateur de l'angiogenèse par son interaction avec les récepteurs CXCR1 et CXCR2 (C-X-C motif chemokine receptor 1 and 2) (303).

Les protéines COL18A1 (Collagen type XVIII alpha 1 chain) et THBS1 (Thrombospondin 1) sont des inhibiteurs de l'angiogenèse. COL18A1 code pour une protéine de la matrice extracellulaire de type « Heparan sulfate proteoglycane », possédant de multiples domaines « collagènes » en triple hélice interrompus par des domaines non collagènes. Le clivage de son précurseur en C-term génère l'endostatine, inhibiteur de

l'angiogénèse (373). THBS1 est une glycoprotéine sécrétée composée d'un domaine d'oligomérisation, d'un domaine VWC (von Willebrand Factor type C-like), de trois domaines spécifiques des thrombospondines, de trois domaines « EGF-like », d'un domaine liant le calcium et un domaine « lectin-like ». C'est le domaine VWC qui possède l'activité inhibitrice de l'angiogénèse (75).

MMP et dégradation de la matrice extracellulaire

Les MMP (Matrix MetalloPeptidase) sont une famille d'une vingtaine d'endopeptidases permettant la croissance des vaisseaux par la dégradation de la matrice extracellulaire. MMP2 et MMP9, impliquées dans l'angiogénèse, sont également connues sous le terme de gélatinases car elles dégradent la gélatine, un dérivé du collagène. Les gélatinases comportent un peptide signal, un pro-peptide permettant de garder le site catalytique inactif, un site catalytique avec un ion zinc contenant trois domaines semblables à la fibronectine de type II facilitant la dégradation de la gélatine, du collagène et de la laminine et un domaine similaire à l'hémopexine régulant la liaison au substrat, la liaison à leurs inhibiteurs TIMP (Tissue Inhibitor of Metallopeptidase Inhibitor) et facilitant leur liaison à la surface des cellules (Figure 23) (164).

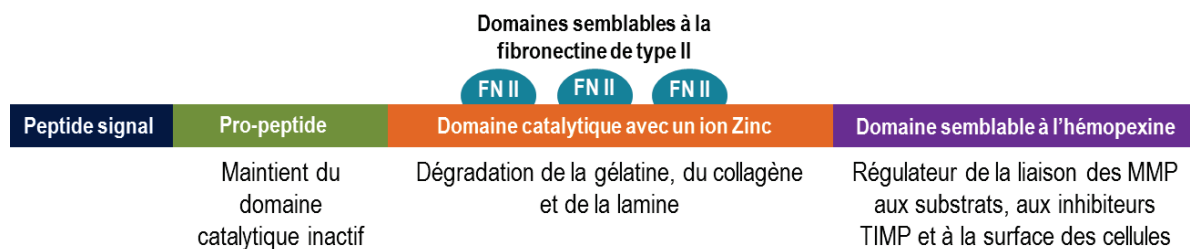


Figure 23 : Structure des gélatinases MMP2 et MMP9.

L'expression des MMP est régulée transcriptionnellement par la fixation de facteurs de transcription tels que AP-1, AP-2, ETV4, SP-1, CTNNB1 et NFκB sur leur promoteur. MMP2 est activée principalement par les facteurs de transcription de la famille des AP-1, son expression est très peu régulée par les facteurs de croissance et les cytokines (84). La transcription de MMP9 est activée par l'EGF, le TNFα (Tumor Necrosis Factor α) et l'IL1β par l'intermédiaire du facteur de transcription AP-1. Les MMP peuvent également être régulées par des mécanismes épigénétiques. Ainsi, la protéine MTA1 (Metastasis Associated 1), un composant du complexe de répression transcriptionnel NuRD (Nucleosome Remodeling Deacetylase), se fixe au promoteur de MMP9, recrute HDAC2 (Histone Deacetylase 2) et diminue les niveaux d'acétylation des histones H3 et H4 induisant une diminution de l'accessibilité au gène codant pour MMP9 (560). L'expression de MMP2 est augmentée par le miRNA-21 qui supprime l'expression d'un des inhibiteurs de l'expression de MMP2, PTEN (Phosphatase and Tensin homolog) (439). Les MMP sont synthétisées sous forme de pro-peptides et ne sont activées qu'après clivage des ponts peptidiques entre leurs prodomaines. MMP2 est activée par MMP14 ou MT1-MMP, une métalloprotéase transmembranaire et non par les protéinases à sérine, comme de nombreuses autres MMP (478).

Les TIMP (TIMP metallopeptidase inhibitor) sont des protéines sécrétées d'environ 21kDa possédant un domaine N-Term de 125 acides aminés et un domaine C-Term de 65 acides aminés avec trois ponts disulfures conservés. Le domaine N-Term a la capacité d'inhiber les MMP alors que le domaine C-Term est essentiel pour la liaison des TIMP au domaine semblable à l'hémopexine des MMP (236). TIMP1, TIMP2, TIMP3 et TIMP4 inhibent toutes les MMP mais avec des affinités différentes. Ainsi, TIMP1 inhibe faiblement MMP14 mais fortement MMP3 et MMP7 (236). TIMP1 et TIMP3 sont régulées par le TGF- β et ont des sites de liaison aux facteurs de transcription SP-1, AP-1 et ETV4 (360). La protéine TIMP2, elle, est constitutivement exprimée (236).

Le plasminogène est activé par l'intermédiaire de PLAU (Plasminogen Activator, Urokinase), une protéase à sérine, qui le convertit en plasmine pouvant dégrader la plupart des protéines de la matrice extracellulaire. La protéine PLAU est produite sous forme d'un précurseur pro-PLAU et est clivée en PLAU mature, composé de deux chaînes polypeptidiques liées entre elles par deux ponts disulfures. PLAU se fixe sur son récepteur PLAU-R (Plasminogen Activator, Urokinase Receptor) (61). La SERPINE1 (Serpine family E member 1) est composé d'un peptide signal de 23 acides aminés et d'une protéine mature de 379 acides aminés possédant un domaine RCL (Reactive Center Loop) permettant l'inhibition de PLAU (420). TGF- β active l'expression de la SERPINE1 par le recrutement du complexe p53/Smad au niveau promoteur de SERPINE1 (258).

Les molécules impliquées dans l'angiogenèse et la lymphangiogenèse interagissent entre elles et permettent la prolifération et la survie des cellules endothéliales, essentielles à la formation de nouveaux vaisseaux. Ces voies de signalisation sont activées pendant l'embryogenèse mais également chez l'adulte lors de situations normales ou pathologiques tels que les cancers.

IV.2.3. Néo vascularisation et développement

La voie principale VEGF/VEGFR

Les voies de signalisation impliquées dans l'angiogenèse et la lymphangiogenèse consistent en l'interaction entre les ligands (VEGF, FGF, PDGF et ANGPT), sécrétés par de nombreux types cellulaires, et leur récepteur (VEGFR, FGFR, PDGFR et TIE) exprimés à la surface des cellules endothéliales. Pour permettre la croissance des vaisseaux néoformés, des protéines permettant la dégradation de la matrice extracellulaire sont exprimées par les cellules nécessitant par exemple un apport d'oxygène et de nutriments (Figure 24).

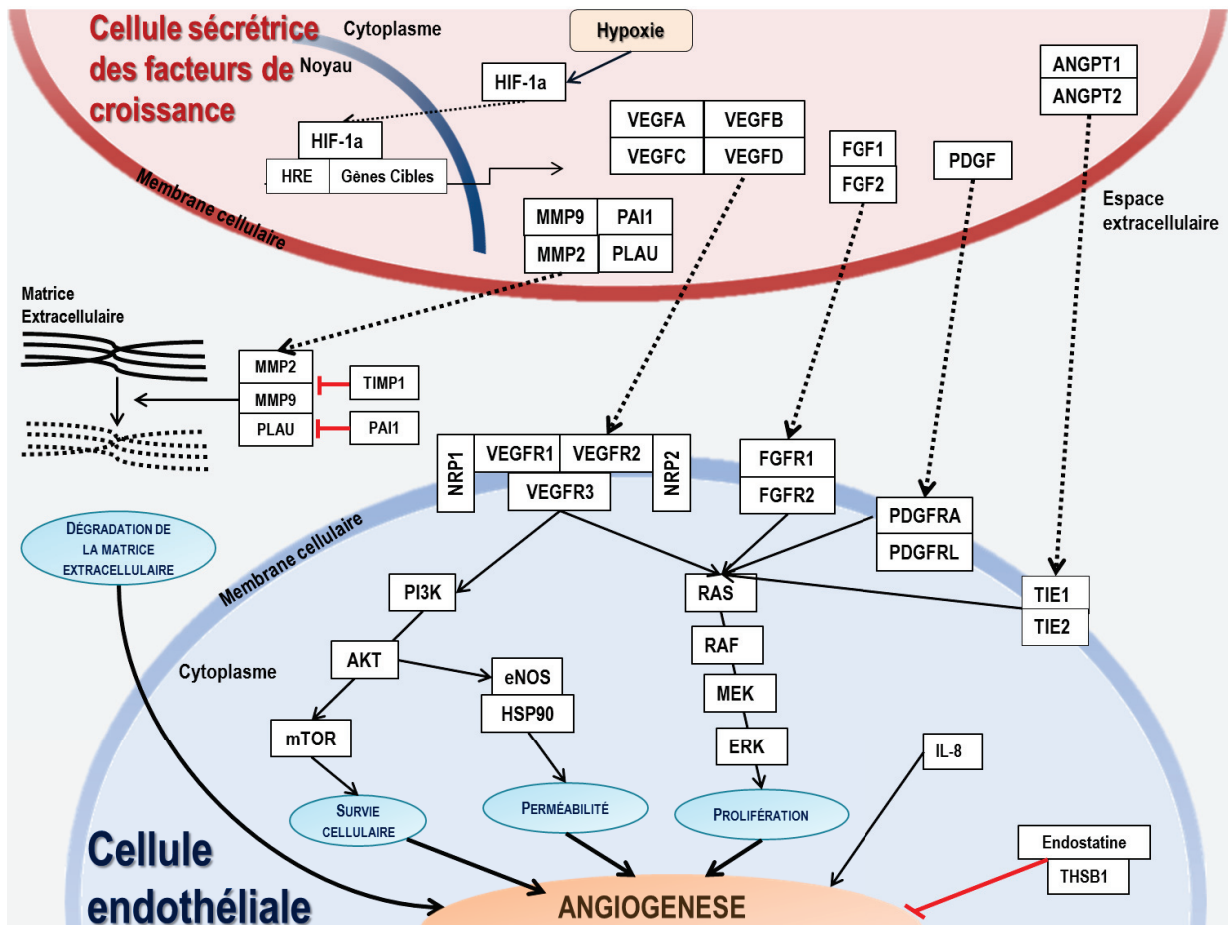


Figure 24 : Représentation schématique de la voie de l'angiogenèse.
 → activation ; † répression.

L'angiogenèse et la lymphangiogenèse sont contrôlées par les couples ligands/récepteurs VEGF/VEGFR (Tableau 11). L'angiogenèse est contrôlée par la fixation des ligands VEGFA, VEGFB et PIGF sur les récepteurs VEGFR1 et VEGFR2 alors que la lymphangiogenèse est contrôlée par la fixation des ligands VEGFC et VEGFD sur le récepteur VEGFR3. Le couple VEGFA/VEGFR2 est essentiel pour l'angiogenèse comme le montre le phénotype létal de la délétion d'un allèle ou la surexpression de VEGFA ; de même, la délétion de VEGFR2 induit la mort des souris *in utero* entre 8,5 et 9,5 jours par défaut de vascularisation (78, 344, 453). VEGFR2 est fortement exprimé dans les angioblastes pendant l'embryogenèse puis son expression diminue au cours du développement (339). VEGFB et PIGF ne sont pas essentiels au développement des vaisseaux pendant l'embryogenèse et leur inactivation n'entraîne pas la mort des souris et n'a aucun impact sur la formation du système vasculaire, bien qu'un développement anormal du cœur ait été observé chez des souris déficientes pour VEGFB (133, 293). VEGFB est impliqué dans le transport des acides gras (293). Le récepteur VEGFR1 joue un double rôle dans l'angiogenèse : activateur et inhibiteur. La délétion du récepteur VEGFR1 chez des souris « KO » entraîne une mortalité par surcroissance des vaisseaux sanguins (173). L'inhibition de l'angiogenèse par le récepteur VEGFR1 ne nécessite pas l'activité tyrosine kinase de ce récepteur ; ainsi, la forme soluble de VEGFR1, ne possédant pas le domaine tyrosine kinase est également

impliqué dans l'inhibition de la croissance des vaisseaux sanguins (210). VEGFA a une affinité plus importante pour VEGFR1 que pour VEGFR2 mais l'activité tyrosine kinase de VEGFR1 est dix fois plus faible que celle de VEGFR2 ; ainsi en fixant VEGFA, VEGFR1 régule l'activation de l'angiogenèse par le couple VEGFA/VEGFR2 (458). La forme soluble de VEGFR1 joue un rôle de dominant négatif en fixant VEGFA et limite la disponibilité de ce ligand pour le récepteur VEGFR2 (458). VEGFR1 est indispensable pour la migration des monocytes et des macrophages. Lorsqu'il est activé par VEGFA et PlGF à la surface des monocytes, VEGFR1 induit l'activation des voies PI3K/AKT et MAPK qui sont cruciales pour le chimiotaxisme de ces cellules (498).

	Expression	Rôles		Références	
		Embryogenèse	Adulte		
Ligands	VEGFA	+++ : Tissu adipeux, poumon, rétine, ovaire ++ : Rein, cœur, muscle squelettique, glandes surrénales + : Foie, cerveau, sein	<i>vegfa</i> ^{-/-} : létalité embryonnaire défaut vascularisation	Réparation tissulaire Angiogenèse dans l'ovaire Perméabilité cellulaire pulmonaire, rénale et cardiaque Inflammation	(78, 322, 344, 519, 550)
	VEGFB	+++ : Cœur, muscle squelettique ++ : Cellules musculaires lisses, tissu adipeux brun, cerveau, rein, estomac, cellules endothéliales	<i>vegfb</i> ^{-/-} : viable, défaut cardiaque	Facteur de survie cellulaire Inhibiteur de l'angiogenèse lors d'une croissance vasculaire anormale	(45, 293)
	PlGF	+++ : Placenta ++ : Cœur, poumon, muscle squelettique	<i>plgf</i> ^{-/-} : viable, angiogenèse normale	PlGF n'a pas de rôle primordial dans l'homéostasie chez l'adulte	(81, 133)
	VEGFC	+++ : Cœur, placenta, ovaire, intestin, rein, poumon macrophages, lymphocytes T Dans l'embryon: sacs lymphatiques primitifs	<i>vegfc</i> ^{-/-} : létalité embryonnaire absence de vaisseaux lymphatiques	Maintien de l'endothélium lymphatique	(249, 292)
	VEGFD	+++ : Poumon, cœur, muscle squelettique, colon et intestin Dans l'embryon: poumon en développement	<i>vegfd</i> ^{-/-} : lymphangiogenèse normale	Maintien de l'endothélium lymphatique	(26, 267, 292)
Récepteurs	VEGFR1	Cellules endothéliales, monocytes, macrophages, cellules dendritiques, ostéoclastes, péricytes, trophoblastes, cellules neuronales	<i>vegfr1</i> ^{-/-} : létalité embryonnaire, surcroissance des vaisseaux sanguins <i>vegfr1</i> TK ^{-/-} : aucun défaut de vascularisation	Neurogenèse du bulbe olfactif et migration des cellules neuronales Chimiotaxie des monocytes et macrophages Inhibiteur de l'angiogenèse	(173, 459, 465, 545)
	VEGFR2	Cellules endothéliales vasculaires et lymphatiques, angioblastes, cellules neuronales, ostéoblastes, cellules souches de la rétine	<i>vegfr2</i> ^{-/-} : létalité embryonnaire défaut vascularisation	Migration des cellules endothéliales	(453, 465)
	VEGFR3	Cellules endothéliales vasculaires et lymphatiques	<i>vegfr3</i> ^{-/-} : létalité embryonnaire défaut vascularisation	Maintien de l'endothélium lymphatique	(146, 465)

Tableau 11 : Ligands et récepteurs de la voie VEGF, expression et rôles pendant l'embryogenèse et chez l'adulte. +++ : expression forte, ++ : expression moyenne, + : expression faible

VEGFC est essentiel pour la lymphangiogenèse ; sa délétion entraîne une absence complète de vaisseaux lymphatiques et une létalité embryonnaire chez les souris (249). Pendant l'embryogenèse, c'est l'expression de VEGFC par les cellules mésenchymateuses et sa fixation sur les cellules endothéliales exprimant VEGFR3 qui permet la migration et la différenciation des cellules endothéliales en cellules endothéliales lymphatiques et la formation des sacs lymphatiques primaires (Figure 25) (564). VEGFD, à

l'inverse de VEGFC, n'est pas indispensable au développement du système lymphatique mais les souris déficientes pour VEGFD ont des vaisseaux lymphatiques primitifs plus petits avec une fonction réduite (267). VEGFD peut également compenser la perte de VEGFC pour le développement des vaisseaux lymphatiques (26). Le clivage protéolytique de VEGFC et VEGFD permet une meilleure affinité de ces ligands pour leur récepteur et leur permet de se lier au récepteur VEGFR2, leur suggérant un rôle dans la croissance des vaisseaux sanguins (115). Un clivage différent entre VEGFC et VEGFD induit deux rôles distincts pour ces deux ligands. Lorsque VEGFC est clivé par les protéines ADAMTS3 (ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif 3) et CCBE1 (collagen and calcium binding EGF domains 1), il est impliqué dans le développement des vaisseaux lymphatiques. VEGFD n'est pas clivé par ces protéines et est stimulé pendant la croissance des vaisseaux lymphatiques induite par l'inflammation (69). VEGFR3 est impliqué dans la formation des vaisseaux sanguins et lymphatiques ; pendant l'embryogenèse, sa délétion chez des souris entraîne un mauvais remodelage du réseau vasculaire primitif causant leur mort (564). VEGFR3 est un facteur de survie de cellules endothéliales lymphatiques. A l'âge adulte, l'expression de VEGFR3 est restreinte aux cellules endothéliales lymphatiques.

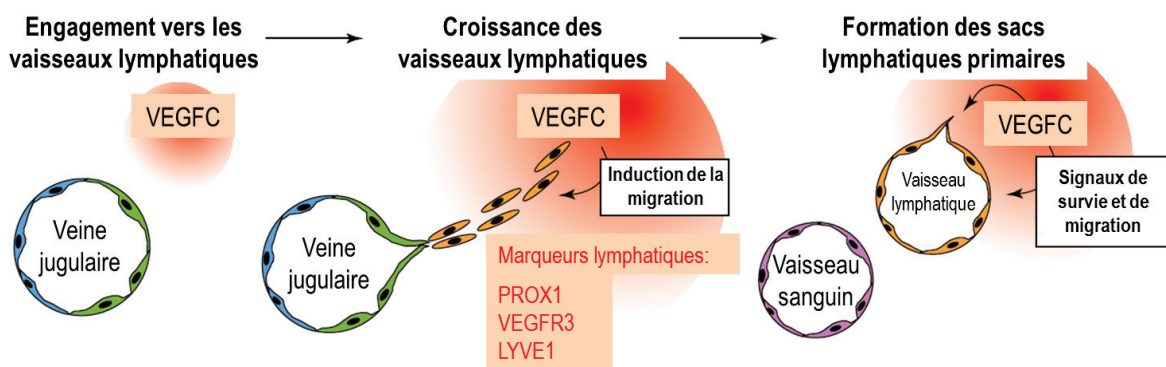


Figure 25 : Origine veineuse des vaisseaux lymphatiques (D'après (441)).

Les effets de la fixation des ligands sur VEGFR1 sont médiés par la phosphorylation des résidus tyrosines présents au niveau du domaine tyrosine kinase (Y) du récepteur. Ces phosphorylations permettent la formation d'un site de liaison pour des protéines contenant des domaines SH2 (Src Homology 2) et PTB (Phosphotyrosine Binding). La phosphorylation de Y1169 est importante pour l'interaction de VEGFR1 avec PLC γ (Phospholipase C γ), la phosphorylation de Y1213 est importante pour l'interaction avec PI3K, PTPN11 (Protein Tyrosine Phosphatase, Non receptor type 11), GRB2 (Growth factor Receptor Bound protein 2) et PLC γ et la phosphorylation de la Y1333 est importante pour l'interaction avec les protéines CBL (Cbl proto-oncogene), NCK1 (NCK adaptator protein 1) et CRK (CRK proto-oncogen, adaptator protein) (348). Les protéines interagissant avec le domaine tyrosine kinase de VEGFR1 permettent la transduction du signal par les voies AKT et MAPK.

La signalisation *via* le récepteur VEGFR2 passe essentiellement par la phosphorylation des résidus tyrosine 1175 et 951 (Figure 26). La tyrosine 1175 phosphorylée est le site d'ancrage de la PLC γ activatrice de

la PKC (Protein Kinase C), activatrice elle-même des ERK1, ERK2 et de FAK aboutissant à la prolifération des cellules endothéliales (442). La phosphorylation de VEGFR2 active les kinases de la famille SRC induisant directement ou indirectement la phosphorylation de CDH5 ou VE-Cadherin (Vascular Endothelial Cadherin), protéine de jonction des cellules endothéliales et des protéines du cytosquelette TLN (Talin) et PXN (Paxillin) permettant l'augmentation de la perméabilité vasculaire (94). La tyrosine 951 de VEGFR2 phosphorylée sert de site de liaison pour la protéine adaptatrice TSAAd (T-cell Specific Adaptator) qui, se liant aux protéines SRC, induit la perméabilité vasculaire et la migration des cellules endothéliales (94). Les deux sites de phosphorylation 1175 et 951 activent tous deux la voie PI3K/AKT, importante pour la survie des cellules endothéliales par l'activation de facteurs de transcription régulateurs de l'apoptose tels que BAD (BCL2 Associated Agonist of cell Death), FOXO1 (Forkhead box O1), IKK α (I-KappaB Kinase α) et CFLAR (CASP8 and FADD like apoptosis regulator) (461).

La signalisation *via* le récepteur VEGFR3 est médiée par la phosphorylation des tyrosines Y1337, Y1063 et Y1230/1231 (Figure 26). Les phosphorylations de Y1337 et Y1230/1231 permettent le recrutement de GRB2 activant les voies de signalisation cellulaire AKT et MAPK alors que la phosphorylation de la tyrosine Y1063 induit le recrutement de CRK1 (Cdc2 related kinase) et l'activation de la voie JNK1/2 (c-JUN N-terminal kinase 1/2) (443, 564).

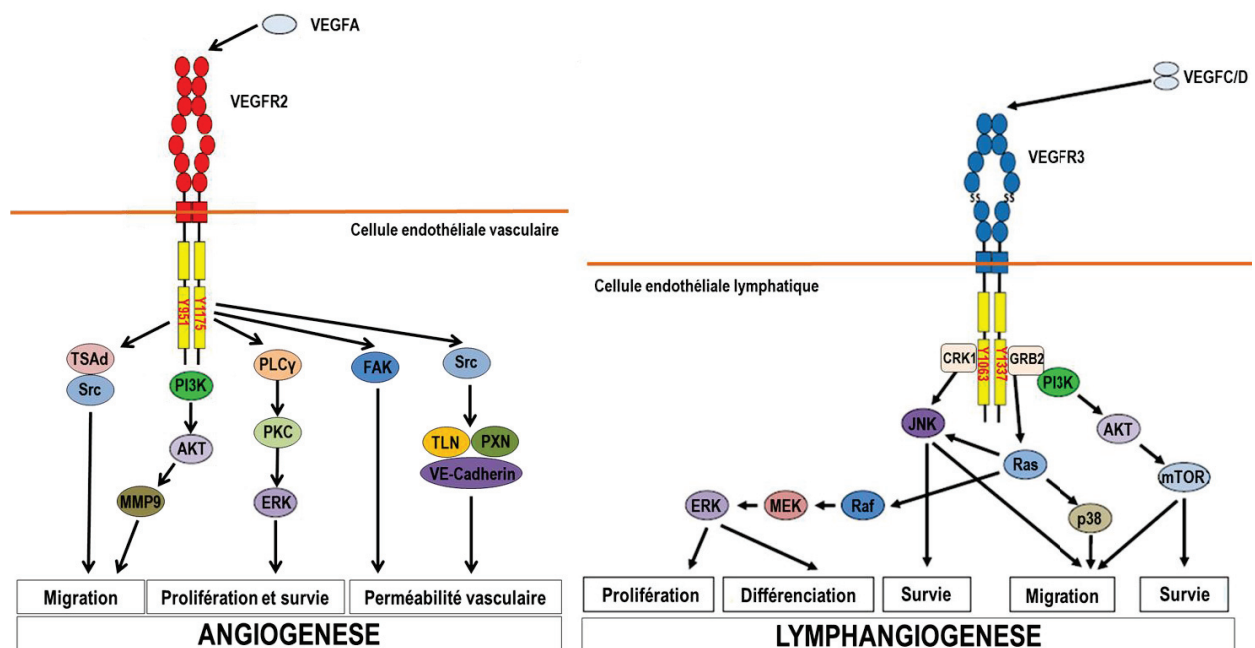


Figure 26 : Signalisation cellulaire par VEGFR2 (gauche) et VEGFR3 (droite) (Adapté de (564)). La fixation des ligands sur leur récepteur, ici VEGFA sur VEGFR2 à gauche et VEGFC/D sur VEGFR3 à droite, entraîne une dimérisation et une autophosphorylation des récepteurs. Les tyrosines (Y) phosphorylées activent une cascade de signalisation aboutissant à l'angiogenèse et la lymphangiogenèse.

NRP1 et NRP2, deux corécepteurs des VEGFR, sont exprimés à la surface des cellules du système nerveux, des cellules endothéliales et des péricytes au sein de nombreux organes tels que les poumons, le foie ou les ovaires (243). NRP1 et NRP2 régulent respectivement la croissance des vaisseaux sanguins et

lymphatiques pendant la vasculogénèse : NRP1 *via* son interaction avec VEGFR2 et NRP2 *via* son interaction avec VEGFR3 (242, 243). Les souris déficientes pour NRP1 meurent à environ 12 jours d'un défaut cardiaque et d'anomalies du développement vasculaire et des souris transgéniques sur exprimant NRP1 ont une augmentation excessive du nombre de vaisseaux sanguins, des vaisseaux sanguins plus dilatés et des malformations cardiaques (243). A l'inverse, la délétion de NRP2 n'est pas létale chez les souris ; elles ont des vaisseaux et des capillaires lymphatiques plus petits mais les gros vaisseaux lymphatiques ne sont pas affectés (567). Des souris délétées pour NRP1 et NRP2 meurent *in utero* au bout de 8,5 jours (494). Plus tard pendant le développement, NRP1 est restreint aux artères et NRP2 aux veines et aux vaisseaux lymphatiques (567). NRP1 peut lier VEGFA, VEGFB et PlGF. La fixation de VEGFB à NRP1 est importante pour le transport des acides gras contrôlée par VEGFB (194). L'expression de NRP1 augmente la liaison de VEGFA à son récepteur VEGFR2, la signalisation par VEGFR2 et la migration des cellules endothéliales (257, 468). NRP1 régule les effets de VEGFA sur la perméabilité des vaisseaux sanguins (42). Des souris exprimant une forme de NRP1 dépourvue de domaine intracytoplasmique ont une vasculogénèse et une angiogénèse normales indiquant que cette partie du récepteur n'est pas indispensable ; un léger défaut dans l'organisation des vaisseaux de la rétine est cependant observé (163). NRP2 peut lier les ligands VEGFA, VEGFC et VEGFD. Un blocage de l'expression de NRP2 diminue la migration des cellules endothéliales humaines HMVEC (Human microvascular endothelial cells) induite par les ligands VEGFA et VEGFC (165). Le blocage de la formation du complexe VEGFC, VEGFR3 et NRP2 par des anticorps monoclonaux empêche la croissance des vaisseaux lymphatiques. Les souris doubles hétérozygotes *nrp2^{+/-}-vegfr3^{+/-}* ont une réduction de la croissance des vaisseaux lymphatiques et ont un nombre d'embranchement moins élevé entre les vaisseaux lymphatiques des organes adultes (558).

Outre la voie VEGF/VEGFR, les voies FGF/FGFR, ANGPT/TIE et PDGF/PDGFR sont impliquées dans le développement des vaisseaux sanguins. Lors de la fixation des ligands sur leurs récepteurs, les récepteurs se dimérisent et s'autophosphorylent, induisant l'activation des voies de signalisation PI3K/AKT et MAPK clé pour la prolifération et la survie des cellules endothéliales.

FGF/FGFR au cours du développement

La voie FGF/FGFR est très impliquée dans le développement embryonnaire lors de l'organogénèse et la morphogénèse. FGF1 et FGF2 ont des rôles redondants avec d'autres ligands de la famille FGF rendant difficile l'identification d'un rôle biologique spécifique. La délétion de FGF2 et la double délétion de FGF1 et FGF2 chez les souris n'induisent aucun défaut majeur de développement. Ces souris n'ont qu'un léger défaut dans leur capacité de réparation des blessures (341). Les ligands FGF1 et FGF2 sont exprimés dans les cellules pulmonaires et sont impliqués dans la réparation au cours de la fibrose pulmonaire ou après contact avec des naphthalènes entraînant des lésions de l'épithélium pulmonaire (155, 193). FGFR1 est le récepteur le plus exprimé dans les cellules endothéliales alors que FGFR2 et FGFR3 sont présents à des niveaux plus faibles (14). Des souris déficientes pour FGFR1 et FGFR2 ne présentent pas de défaut dans la formation des

vaisseaux sanguins pendant le développement et n'ont pas de défaut de perméabilité vasculaire à l'âge adulte (181). Par contre, des souris délétées pour les récepteurs FGFR1 et FGFR2 ont des défauts de réparation des blessures (374). La phosphorylation du domaine tyrosine kinase des FGFR entraîne l'activation de FRS2 (FGF-substrate-2) et de PLC γ . FRS2 recrute alors la protéine adaptatrice GRB2 (Growth factor receptor band protein 2) accompagnée des protéines SOS (SOS Ras/Rac guanine nucleotide exchange factor) et GAB1 (GRB2 associated binding protein). SOS active RAS et la voie des MAPK et GAB1 la voie de signalisation PI3K/AKT. La PLC γ active la protéine PKC, activatrice également des voies MAPK et PI3K/AKT (181).

PDGF/PDGFR au cours du développement

PDGFB est exprimé dans les cellules endothéliales, les mégacaryocytes et les neurones, PDGFA et PDGFC dans les cellules épithéliales, les cellules musculaires et les neuroblastes et PDGFD dans les cellules musculaires lisses (12). Les récepteurs PDGFR sont exprimés, pendant l'embryogenèse, dans les cellules mésenchymateuses du poumon, de la peau et des intestins pour PDGFR α et à la surface des péricytes et des cellules musculaires lisses vasculaires pour PDGFR β (38). La phosphorylation des domaines tyrosine kinase induit l'activation des voies de signalisation PI3K/AKT et MAPK par le recrutement des protéines GRB2 et SHC (SH2 adaptator protein) induisant principalement la prolifération, la survie et la migration des péricytes vers les vaisseaux en néoformation (489). La double inactivation PDGFB/PDGFR β chez la souris induit une carence en cellules musculaires lisses vasculaires et en péricytes particulièrement prononcée dans le système nerveux central après 10 jours de développement (295). Entre 16 et 19 jours de développement, ces souris meurent d'hémorragies et d'œdèmes montrant l'importance de PDGFB/PDGFR β dans la formation du système vasculaire (287).

ANGPT/TIE au cours du développement

Les gènes des récepteurs TIE1 et TIE2 sont essentiels pour la maturation de vaisseaux sanguins. Chez les embryons de souris déficientes pour TIE1, l'angiogenèse n'est pas perturbée mais les vaisseaux perdent leur intégrité induisant des œdèmes, des hémorragies et la mort des souris avant la naissance (417). Les souris délétées pour le récepteur TIE2 meurent entre 9,5 et 12,5 jours par un défaut de développement des vaisseaux sanguins au-delà du réseau vasculaire primitif, de l'altération de l'hématopoïèse et de l'endocarde cardiaque (487). Les récepteurs TIE1 et TIE2 ne sont pas requis pour la différenciation des angioblastes dans les étapes précoces de la vasculogenèse mais sont importants dans la prolifération des cellules endothéliales (159). Des souris déficientes pour le ligand ANGPT1 meurent entre 11,5 et 12,5 jours avec un phénotype similaire à celui des souris déficientes pour le récepteur TIE2 (159). Une surexpression d'ANGPT1 dans la peau induit une augmentation du diamètre des vaisseaux principalement au niveau des capillaires avec un nombre plus important de cellules endothéliales et de péricytes (487, 501). A l'inverse, des souris déficientes pour ANGPT2 ne meurent pas *in utero* mais développent des ascites, dues à une accumulation anormale de liquide dans l'abdomen, entraînant leur mort quelques jours après leur naissance (175). ANGPT1 est majoritairement exprimé dans les péricytes, les cellules musculaires lisses et les fibroblastes et son expression

est induite par l'hypoxie et les ligands VEGFA et PDGFB (159). Lors de la fixation d'ANGPT1 sur son récepteur TIE2, celui-ci s'autophosphoryle et active les voies PI3K/AKT et MAPK induisant la survie des cellules endothéliales (159). L'activation de TIE2 recrute la protéine ABIN-2 (A20-Binding Inhibitor of NFκB2) qui inhibe le facteur de transcription NFκB et protège les cellules endothéliales de l'apoptose (491). A l'inverse, ANGPT2, exprimé par les cellules endothéliales, est connu comme étant principalement un inhibiteur de la signalisation par TIE2 en empêchant la fixation d'ANGPT1 sur ce récepteur (566). ANGPT2 est aussi un agoniste de TIE2 par l'activation de la voie PI3K/AKT (260).

Activateurs et suppresseurs de l'angiogenèse et développement

La chémokine CXCL8, activateur de l'angiogenèse est quasiment indétectable en condition physiologique et est produite par les cellules lors d'une infection ou d'une inflammation (303). Son expression est activée par la production de TNFα et d'IL1β. Elle permet le recrutement et l'activation des neutrophiles et des granulocytes au niveau du site de l'inflammation par sa fixation sur les récepteurs CXCR1 et CXCR2 présents à la surface de ces cellules (303). La fixation de CXCL8 sur ses récepteurs induit les voies de signalisation PI3K/AKT et MAPK (303).

Le collagène 18 est un constituant principal des membranes basales des épithéliums et des endothéliums (414). Les souris déficientes pour COL18A1 ont des défauts de développement et de vascularisation oculaire (227). COL18A1 est également un anti-angiogénique, un antischlérotyque, il est impliqué dans l'ischémie rénale et joue un rôle dans la formation du tissu adipeux (414). Le collagène 18 bloque l'angiogenèse par l'inhibition des métalloprotéases MMP2 et MMP9 et par sa fixation à VEGFR2, empêchant la fixation et l'activation de ce récepteur par VEGFA (414).

Dans les embryons de souris, THBS1 est principalement exprimé dans le cœur, les poumons, l'intestin, les muscles squelettiques et le système nerveux central (4). A l'âge adulte, son expression est restreinte aux endothéliums, aux cellules de la peau après blessure et aux cellules musculaires lisses (4). THBS1 inhibe l'angiogenèse par l'activation de l'apoptose des cellules endothéliales. THBS1 permet la migration et la prolifération des cellules musculaires lisses lors de la réparation des blessures vasculaires (4).

Protéases et développement

Les métalloprotéases sont importantes pour le remodelage tissulaire et vasculaire lors du développement embryonnaire et à l'âge adulte pour la réparation tissulaire et l'inflammation. Les souris déficientes pour MMP2 sont plus petites, ont une néovascularisation diminuée et un développement pulmonaire réduit ; les souris déficientes pour MMP9 ont des défauts de développement des os, une diminution de leur efficacité de réparation après fractures, des anomalies de remyélinisation des cellules neuronales après blessures au niveau nerveux ainsi que des altérations du remodelage vasculaire et de l'angiogenèse (387). Les métalloprotéases MMP2 et MMP9 ont la capacité de cliver des molécules de la matrice extracellulaire (les collagènes I, IV, V, VII, X, IX, l'élastine et la fibronectine) et deux activateurs de l'angiogenèse : TGFβ et

CXCL8 (162). La dégradation des composants de la matrice extracellulaire par les MMP facilite la migration des cellules endothéliales à travers le tissu. Les MMP peuvent libérer les facteurs pro-angiogéniques séquestrés dans la matrice extracellulaire comme le ligand VEGFA. Les MMP sont inhibées par les TIMP au moment de la maturation des vaisseaux néoformés afin d'assurer la formation de la membrane basale et la différenciation des cellules endothéliales (387). A l'âge adulte, MMP2 et MMP9 sont exprimées de façon constitutive dans certains types cellulaires : les fibroblastes, les kératinocytes, les cellules endothéliales, les chondrocytes et les monocytes pour MMP2 et les cellules endothéliales, les macrophages alvéolaires, les leucocytes et les ostéoclastes pour MMP9 (162). Cependant, MMP2 et MMP9 ne sont pas activées en conditions normales et le sont principalement afin de rétablir l'homéostasie tissulaire (162). L'inhibition des TIMP chez la souris montre que ces protéines ne semblent pas avoir de rôle dans la formation des vaisseaux sanguins ; cependant, les souris déficientes pour TIMP1 ont des défauts d'apprentissage et de mémoire, un cycle cellulaire des cellules hépatiques accéléré et une accélération du développement des glandes utérines. Les souris déficientes pour TIMP2 ont des problèmes de motricité et des souris déficientes pour TIMP3 ont une augmentation de l'apoptose des cellules épithéliales mammaires (387). Aucun phénotype particulier n'a été reporté lors d'une déficience en TIMP4.

Le système PLAU/PLAUR contrôle la disponibilité des facteurs pro-angiogéniques tels que VEGFA et FGF2 présents dans la matrice extracellulaire, la dégradation de la matrice extracellulaire et l'activation de certaines MMP telles que MMP2 et MMP9 (36). Le récepteur PLAUR est exprimé à la surface des cellules endothéliales et la fixation de PLAU sur son récepteur induit l'activation de la kinase FAK, de SRC, de RAS et de la voie MAPK (351). Des souris déficientes pour PLAU, PLAUR ou la SERPINE1, l'inhibiteur de PLAU sont viables, ont un développement et une reproduction normale montrant que indépendamment, ces protéines cellulaires ne sont pas indispensables à l'angiogenèse embryonnaire (270). Cependant, des souris mutées pour l'activité protéolytique de PLAU montrent une réduction de la réparation des vaisseaux sanguins après blessure et une augmentation des thromboses (80). Des souris déficientes pour SERPINE1 ont une meilleure réparation des vaisseaux sanguins après blessures liée à une augmentation de la migration des cellules musculaires lisses n'exprimant pas la *SERPINE1* (80). A l'âge adulte, l'endothélium quiescent n'exprime plus PLAU, PLAUR et la SERPINE1 (270).

Ces voies de signalisation contrôlées à l'âge adulte sont activées lors de pathologies telles que les cancers. Leur étude est importante pour la compréhension des mécanismes d'angiogenèse et de lymphangiogenèse en contexte tumoral aboutissant à la dissémination des cellules cancéreuses d'un organe primaire au reste de l'organisme.

IV.2.4. Néo-vascularisation et cancer

L'apport de nutriments, d'O₂ ou l'élimination des déchets sont indispensables au sein des tumeurs et ces mécanismes sont possibles grâce à la néo-vascularisation permettant l'augmentation du nombre de vaisseaux. Les cellules tumorales vont pouvoir entrer dans la circulation générale via les vaisseaux néoformés

(198). Lors de la progression tumorale, on distingue la phase pré-vasculaire et vasculaire. La phase pré-vasculaire, pouvant durer plusieurs années, présente une croissance tumorale limitée et des cellules tumorales alimentées par les vaisseaux sanguins préexistants (172). Un équilibre entre prolifération et apoptose se forme et sera perdu lors du « switch angiogénique », c'est-à-dire la stimulation excessive des molécules impliquées dans l'angiogenèse telles que les VEGF au détriment des inhibiteurs tels que les thrombospondines (198). Ce déséquilibre s'observe dans les cancers mais également dans d'autres pathologies telles que l'obésité, l'asthme ou le diabète. A la suite du « switch angiogénique », la phase vasculaire se met en place avec la croissance de nouveaux vaisseaux généralement dilatés, irréguliers, perméables et désorganisés autour de la tumeur (Figure 27) (464). Leur perméabilité est accrue car les cellules endothéliales perdent leur jonction cellules-cellules facilitant la dissémination des cellules tumorales *via* la circulation générale vers d'autres tissus (464). De façon similaire, les nouveaux vaisseaux lymphatiques sont dilatés, perméables et discontinus (286, 386).

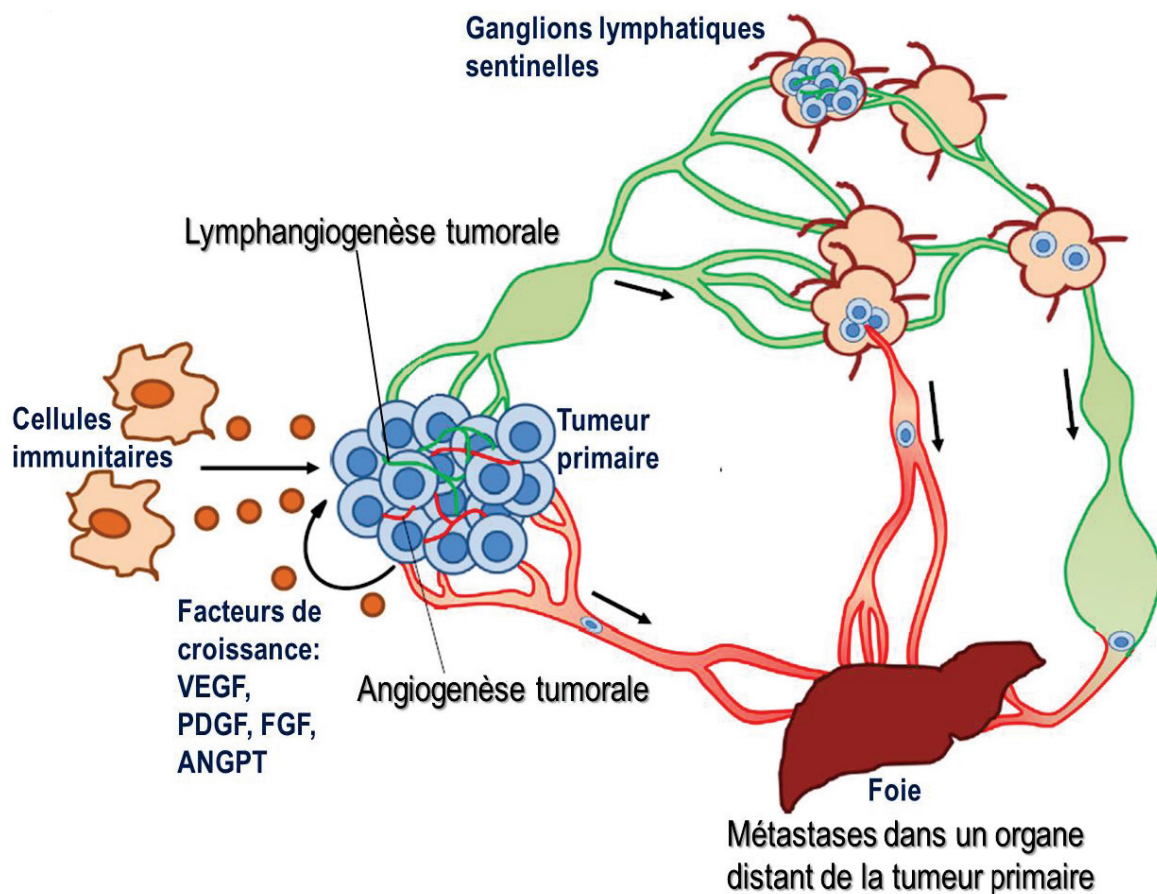


Figure 27 : Dissémination des cellules tumorales dans l'organisme par l'activation de l'angiogenèse et de la lymphangiogenèse (D'après (564)). La tumeur primaire et les cellules immunitaires produisent des facteurs de croissance permettant la croissance de nouveaux vaisseaux sanguins et lymphatiques. Les cellules tumorales peuvent infiltrer ces vaisseaux et envahir de nouveaux organes (ici, le foie). Les ganglions lymphatiques sont les premiers à être envahis par les cellules tumorales.

La stimulation des activateurs de l'angiogenèse lors de cancers peut être due à des facteurs environnementaux tels que l'hypoxie, à des mutations génétiques sur les oncogènes ou les gènes

suppresseurs de tumeurs, à la présence de facteurs de croissance ou lors d'infections virales. Des mutations sur l'oncogène RAS augmentent l'expression de VEGFA dans des cellules épithéliales intestinales transformées chez le rat et une association entre la présence de la mutation *KRAS* et une augmentation du niveau d'expression de *VEGFA* a été observée dans des cancers du poumon non à petites cellules (268, 426). Dans les cancers du poumon non à petites cellules, des mutations sur le gène *EGFR* augmente également l'expression de *VEGFA* (226). Certains virus ont la capacité d'activer l'angiogenèse par l'intermédiaire des protéines virales (Tableau 12). La protéine LMP1 (Latent Membran Protein 1) du virus EBV a des propriétés pro-angiogéniques avec l'augmentation de l'activité de HIF1 α induisant l'expression de *VEGFA* et l'augmentation de l'expression de *FGF2* induite par NF κ B (486). La protéine EBNA1 (Epstein Barr Virus Nuclear Antigen 1) augmente l'angiogenèse *in vitro* par l'activation du facteur de transcription AP-1 agissant sur l'expression de *HIF1 α* , *VEGFA* et *CXCL8* (528). Les protéines virales E6 et E7 d'HPV ont des propriétés pro-angiogéniques : E6 augmente l'expression de *CXCL8* qui induit à son tour l'expression de MMP2 et MMP9 ; E6 et E7 augmentent l'expression de *VEGFA* en inhibant p53, inhibiteur d'HIF1 α et E7 active la MMP14 qui active à son tour MMP2 (116). La bactérie *Bartonella bacilliformis*, n'induit pas de cancers mais à la capacité d'augmenter l'expression de *VEGFA* et d'*ANGPT2* dans les lésions cutanées qu'elle induit (83).

Virus	Protéines virales à propriété angiogénique	Facteurs pro-angiogéniques activés par les protéines virales	Voies de signalisation impliquées dans l'angiogenèse	Références
EBV	LMP1 (<i>Latent membrane protein 1</i>) EBNA1 (<i>Epstein Barr Virus Nuclear Antigen 1</i>)	HIF1 α , VEGFA, FGF2, CXCL8, MMP9	MAPK, NF κ B	(486)
HPV	E6 E7	HIF1 α , VEGFA, FGF2, CXCL8, MMP2, MMP9	MAPK, PI3K	(116)
HBV	HBx (<i>Hepatitis B virus X protein</i>)	HIF1 α , VEGFA, ANGPT2, FGF8	MAPK	(300, 497)
HCV	Core	VEGFA	MAPK	(202)
HHV8	LANA (<i>Latency-Associated Nuclear Antigen</i>) vCYC (<i>viral Cyclin</i>) vFLIP (<i>viral CASP8 and FADD like apoptosis regulator</i>) K15	HIF1 α , VEGFA, FGF2, MMP2, MMP9	PI3K/AKT, MAPK	(418)
HTLV1	Tax	VEGFA, FGF2, MMP2, MMP9	-	(41)

Tableau 12 : Virus impliqués dans l'activation de l'angiogenèse.

Certains virus induisent l'angiogenèse par l'intermédiaire de l'activation du facteur de transcription HIF1 α (Tableau 12). Ce dernier, activé également lors de l'hypoxie cellulaire, permet aux cellules de procéder à des changements métaboliques, tels que l'activation de gènes du métabolisme anaérobie comme *HK1*

(Hexokinase 1), *HK2* (Hexokinase 2) ou *PGK1* (Phosphoglycerate Kinase 1) (325). HIF1 α a la capacité de promouvoir la transition épithélio-mésenchymateuse en augmentant l'expression des facteurs SNAI1, SNAI2, TWIST qui à leur tour vont bloquer la transcription de CDH1, importante pour l'adhésion cellule-cellule (325). HIF1 α est également un régulateur de l'angiogenèse par son activité de facteur de transcription de VEGFA, PIGF, PDGFB, ANGPT1 et ANGPT2 et par l'activation de MMP2, PLAU et de son récepteur PLAUR (325).

Le ligand *VEGFA* est surexprimé dans la plupart des cancers ; son expression est associée à une évolution rapide de la tumeur et est un facteur de mauvais pronostic pour les patients. Les malades atteints des tumeurs pulmonaires non à petites cellules ayant un fort niveau d'expression de VEGFA ont une survie à 5 ans diminuée par rapport aux malades avec des tumeurs pulmonaires ayant un faible niveau d'expression de VEGFA (446). L'expression de VEGFA dans les cancers a pour effet d'augmenter la survie, la prolifération et la migration des cellules endothéliales, d'augmenter la perméabilité vasculaire, d'augmenter le recrutement des cellules progénitrices, des cellules endothéliales et l'accumulation des monocytes et des macrophages au sein de la tumeur par l'activation de la production de chémokines telles que CXCL12 (9). Cet environnement inflammatoire favorise la croissance des tumeurs. Par exemple, une expression importante de COX2 dans les cancers pulmonaires non à petites cellules induit l'activation du facteur de croissance EGFR par l'intermédiaire de PGE2 (Prostaglandine E2) (9). L'effet pro-angiogénique de VEGFA dans les cancers passe par l'activation de VEGFR2 à la surface des cellules endothéliales tumorales. Les cellules tumorales des cancers pulmonaires non à petites cellules peuvent également exprimer le récepteur VEGFR2 ; sa surexpression est un facteur de mauvais pronostic (134). L'expression de VEGFA et VEGFR2 dans les cellules tumorales de cancers pulmonaires non à petites cellules induit une boucle de rétrocontrôle positive qui active l'angiogenèse dans ces tumeurs pulmonaires (88).

Les niveaux d'expression en ARNm et protéine de PIGF corrént avec le stade de la tumeur, l'invasion, les rechutes tumorales et une forte expression de PIGF est de mauvais pronostic (570). Dans les cancers, PIGF stimule la croissance des vaisseaux, leur maturation, le recrutement et l'activation des macrophages vers la tumeur et permet la croissance et la migration des cellules tumorales. Dans certaines conditions, PIGF est un facteur contribuant à l'acquisition de résistance aux traitements anti-VEGF et anti-VEGFR ; cela a été montré chez des souris porteuses de xénogreffes de mélanomes humains résistantes aux traitements anti-VEGF (32).

Le rôle de VEGFB est controversé dans les cancers. Son expression est augmentée dans les méningiomes, les cancers colorectaux, pulmonaires et mammaires et est corrélée avec un stade plus avancé pour le neuroblastome (169). Le ligand VEGFB peut également agir comme un suppresseur de la migration des cellules endothéliales pulmonaires induite par le ligand VEGFA (445). Chez les patients ayant un cancer pulmonaire non à petites cellules, un faible niveau d'expression de VEGFB est corrélé à un taux de survie à 5 ans diminué (446).

Le récepteur VEGFR1 n'est inhibiteur de l'angiogenèse que pendant l'embryogenèse. VEGFR1 est surexprimé au cours des maladies inflammatoires et ischémiques et dans les cancers pulmonaires, prostatiques, mammaires et colorectaux (169). La présence de VEGFR1 dans les cancers mammaires et les cancers pulmonaires non à petites cellules est un facteur de mauvais pronostic, de rechute et de formation de métastases (169). La forme soluble de VEGFR1, sVEGFR1, est un inhibiteur de l'angiogenèse aussi bien pendant l'embryogenèse que dans les cancers. L'expression de sVEGFR1 dans des cellules de fibrosarcomes humains inhibe l'implantation et la croissance de ces cellules dans les poumons de souris (186). sVEGFR1 est capable d'induire la mort des cellules tumorales colorectales et ovariennes *in vitro* et a un effet anti-tumoral *in vivo* dans les tumeurs ovariennes murines (346).

Les couples ligands/récepteurs VEGFC ou VEGFD/VEGFR3 sont impliqués dans le développement de la lymphangiogenèse tumorale. Une augmentation de l'expression de VEGFC a été observée dans les cancers de la vessie, de l'estomac, du colon, de la prostate et du col de l'utérus alors que l'expression de VEGFD est augmentée dans les cancers colorectaux, prostatiques, mammaires, et endométriaux (429). VEGFC et VEGFD sont exprimés par les cellules tumorales des tumeurs primaires et par leur stroma (475). L'expression de VEGFC dans les tumeurs peut être régulée par COX2 et les prostaglandines et augmente la lymphangiogenèse tumorale et les métastases (475). *In vitro*, COX2 augmente l'expression de VEGFC, par l'intermédiaire des voies activées par les récepteurs PTGER1 (Prostaglandin E receptor 1) et ERBB2 (Erb-b2 Receptor Tyrosine Kinase 2) ; le niveau d'expression de COX2 corrèle avec une augmentation du nombre de vaisseaux lymphatiques et une augmentation du nombre de métastases ganglionnaires chez des patients atteints d'adénocarcinomes pulmonaires (479). Une forte expression de COX2 et de VEGFC est un facteur de mauvais pronostic dans les adénocarcinomes pulmonaires (479). Une augmentation de l'expression de VEGFR3 a été observée entre autres, dans les cancers colorectaux, mammaires et pulmonaires (480). L'expression en ARNm et en protéine de VEGFR3 dans les cellules endothéliales présentes au sein de tumeurs pulmonaires est associée à la présence de métastases ganglionnaires (291).

De nombreuses tumeurs, dont les cancers pancréatiques et pulmonaires, expriment les co-récepteurs des VEGFR, NRP1 et NRP2, (543). Les cellules des cancers de l'estomac et de l'œsophage expriment uniquement NRP1 alors que les cancers de la thyroïde n'expriment que NRP2 (543). Au cours du cancer pulmonaire, une augmentation progressive de l'expression de NRP1 et NRP2 est observée de l'hyperplasie cellulaire bronchique bénigne au cancer pulmonaire invasif (276). Des niveaux élevés d'expression de NRP1 sont corrélés avec une diminution du taux de survie et des niveaux d'expression élevés de NRP1 et NRP2 sont associés à un mauvais pronostic dans les cancers pulmonaires (256). Dans les cancers pulmonaires non à petites cellules, l'expression de NRP1 est corrélée avec une résistance aux radiothérapies (137). miR-148a, ciblant NRP1, permet la suppression de métastases dans les cancers mammaires triple négatifs et inhibe l'invasion et la tumorigénicité des médulloblastomes indiquant un rôle important de NRP1 dans l'invasion tumorale dans des modèles de souris (557, 561). Les cellules des tumeurs pulmonaires exprimant NRP2 n'expriment pas CDH1 et sont des tumeurs de hauts grades (363).

Des dérégulations dans les voies FGF/FGFR, PDGF/PDGFR et ANGPT/TIE sont aussi impliquées dans l'angiogenèse tumorale. Les couples ligands/récepteurs FGF/FGFR sont impliqués dans la transformation des cellules tumorales (181). Des mutations activatrices de l'activité tyrosine kinase de FGFR3, notamment le changement Ser249Cys, sont retrouvées dans les cancers de la vessie et du col de l'utérus (74). Des surexpressions de FGFR1 ont été observées dans les cancers du poumon, dans 3% des adénocarcinomes et 21% des carcinomes épidermoïdes (181). Une surexpression de ligands, tels que FGF2, par les cellules inflammatoires du stroma et par les cellules endothéliales induit la survie des cellules tumorales et l'activation de l'angiogenèse (181). Dans les cancers pulmonaires non à petites cellules, une forte expression de FGF2 est un facteur de mauvais pronostic (366).

La voie PDGF/PDGFR est impliquée dans l'angiogenèse tumorale par son effet sur le recrutement des péricytes au niveau des vaisseaux présents au sein de la tumeur lui permettant une meilleure perfusion (402). Une forte expression de PDGFR β dans les tumeurs mammaires, prostatiques et ou gastro-intestinales est un facteur de mauvais pronostic (402). Dans les cancers mammaires, TGF β induit la transition épithélio-mésenchymateuse par l'intermédiaire d'une boucle autocrine impliquant l'activation des voies PI3K/AKT et JAK/STAT par les récepteurs PDGFR protégeant les cellules tumorales mammaires de l'apoptose pendant la transition épithélio-mésenchymateuse (238). Dans les cancers pulmonaires non à petites cellules, une forte expression de PDGFB et de PDGFR α est un facteur de mauvais pronostic (140). Enfin, la sécrétion de PDGFA et PDGFC par les cellules tumorales pulmonaires induit l'expression de VEGFA par les cellules stromales activant l'angiogenèse tumorale (139).

Les couples ANGPT/TIE sont impliqués dans l'angiogenèse tumorale. ANGPT1 est surexprimé dans de nombreux cancers mais son expression n'est pas forcément corrélée à la progression tumorale (159). Dans les modèles tumoraux de gliomes chez les rats, l'expression d'ANGPT1 augmente la croissance tumorale alors qu'elle la diminue dans les modèles de cancers colorectaux chez la souris (477). L'expression d'ANGPT2 est augmentée dans les endothéliums associés aux tumeurs, par exemple au sein des gliomes (500). ANGPT2 est également détectable dans les cellules tumorales de cancers du côlon, de la vessie, du poumon et de l'estomac (500). ANGPT2 agit sur l'angiogenèse tumorale par le recrutement des péricytes et la maturation des vaisseaux sanguins dans les tumeurs (159). Dans les cancers pulmonaires non à petites cellules, l'expression d'ANGPT2 est augmentée; cette surexpression corrèle avec un stade tumoral plus élevé, l'augmentation de la présence de vaisseaux lymphatiques au sein de la tumeur et un taux de survie plus faible (559). La présence d'ANGPT4 et TIE2 dans les glioblastomes augmente la croissance tumorale et l'angiogenèse dans ces tumeurs du cerveau chez l'homme (67). TIE2 est aussi exprimé par les monocytes recrutés au niveau des tumeurs ; l'interaction entre ANGPT2 et TIE2 au niveau de ces cellules permet l'activation de l'angiogenèse tumorale (289).

CXCL8 est impliqué dans le développement des tumeurs et de l'angiogenèse tumorale. Cette chémokine est surexprimée dans les cancers pulmonaires, principalement dans les cancers pulmonaires non à petites cellules (303). *In vitro*, CXCL8 induit la prolifération des lignées tumorales épithéliales A549 et NCI-H292

de façon dose-dépendante par sa fixation au récepteur CXCR1 ou via la transactivation de l'EGFR (316). La présence de CXCL8 et de VEGFA induit la transition épithélio-mésenchymateuse et l'invasion par la voie p38 MAPK/JNK dans les cellules A549 (131). Une étude cas/témoin conduite par le National Cancer Institute a montré que la présence de CXCL8 dans le sang circulant augmentait le risque de cancer du poumon, de l'ovaire, de la prostate et du colon de 45 à 86% (273). De plus, de hauts niveaux d'ARNm de CXCL8 dans les cancers pulmonaires non à petites cellules sont associés à des stades de maladies plus avancés, à la présence de métastases ganglionnaires, à un taux de survie plus faible et à un risque de rechute plus élevé (485).

Le collagène 18 participe à l'inhibition de l'angiogenèse tumorale par ces effets anti-angiogéniques mais est également impliqué dans la progression tumorale des cancers de l'intestin et du pancréas (414). Une surexpression de COL18A1 dans les cancers pulmonaires non à petites cellules est un facteur de mauvais pronostic pour les patients (232). Dans des modèles murins, une sous expression de la thrombospondine 1 par l'oncogène RAS et le TGF β a été observée et permet la promotion de l'angiogenèse (4). L'augmentation de l'expression de THBS1 par BMP4 (Bone Morphogenic protein 4) inhibe l'angiogenèse tumorale et supprime la croissance tumorale dans les cellules HeLa (lignée cellulaire de cancer du col de l'utérus), les HCl-H460-LNM35 (lignée de cellules cancéreuses pulmonaires hautement métastatique) et les B16 (lignée cellulaire de mélanome de souris) (508). Une faible expression de THBS1 dans les cancers pulmonaires non à petites cellules est corrélée avec une diminution de la survie à 15 mois chez les patients (171).

L'activation du « switch angiogenic » est déterminante pour l'angiogenèse tumorale et est dépendante de MMP9. Cette métalloprotéase est produite par les cellules inflammatoires et par les cellules endothéliales au sein de la tumeur et est cruciale pour le développement des vaisseaux dans des modèles souris de cancers ovariens, pancréatiques et de la peau (164). MMP9 permet la libération de facteurs pro-angiogéniques VEGFA et FGF2 (164). La surexpression de MMP2 et MMP9 est observée dans les cancers pulmonaires et est un facteur de mauvais pronostic (153, 454). Dans la lignée cellulaire A549, une inhibition par siRNA de MMP2 réduit de façon significative l'expression de VEGFA induite par PI3K/AKT (93). TIMP1 est un inhibiteur des MMP et de l'angiogenèse. Pourtant, plus de 35 études cliniques ont montré une association entre une forte expression de TIMP1 et un mauvais pronostic dans les cancers du poumon, de la prostate, du sein et du colon (236). Cette augmentation de l'expression de TIMP1 est soit due à l'activité excessive des protéases dans le microenvironnement des tumeurs soit TIMP1 a des fonctions pro-angiogéniques indépendantes de son activité inhibitrice sur les protéases (236). TIMP1 inhibe l'apoptose en stimulant les voies PI3K/AKT et MAPK dans les cancers mammaires et agit sur la prolifération cellulaire (307). TIMP1 est plus exprimé dans les lignées cellulaires pulmonaires invasives telles que les CL1-5 que dans des lignées cellulaires pulmonaires faiblement invasives telles que CL1-0. L'inhibition de TIMP1 par des siRNA dans les CL1-5 inhibe les métastases lors de l'induction de tumeurs pulmonaires *in vivo* (87). L'expression de *PLAU*, *PLAUR* et de la *SERPINE1* est réactivée lors de l'angiogenèse tumorale ; ces trois gènes sont exprimés dans les cellules endothéliales et dans les cellules stromales pour *SERPINE1* (270). Le système *PLAU/PLAUR* joue un rôle dans la progression tumorale par la dégradation de la membrane basale et de la matrice extracellulaire, par l'activation de la

transition épithélio-mésenchymateuse, par l'activation de la voie de signalisation MAPK et par la libération de VEGFA présent dans la matrice extracellulaire (336). PLAU, PLAUR et SERPINE1 sont fortement exprimés et l'expression de PLAUR et de la SERPINE1 est un facteur de mauvais pronostic dans les cancers pulmonaires non à petites cellules (336, 541). La combinaison de l'expression de PLAU et de PLAUR dans le sérum de patients présentant des tumeurs pulmonaires diminue significativement leur médiane de survie (90).

IV.2.5. Traitements anti-angiogéniques dans les cancers

De multiples protéines cellulaires sont impliquées dans l'angiogenèse tumorale et sont de potentielles cibles thérapeutiques visant à ralentir la croissance tumorale ou le développement de métastases. Les traitements utilisés ciblent principalement VEGF/VEGFR et l'inhibition des activités tyrosine kinase des récepteurs (Tableau 13).

Type d'agent thérapeutique	Cibles	Stade de développement
Traitements anti-VEGF		
Bevacizumab (Avastin®)	Anticorps monoclonal de type IgG1	Autorisé (FDA et ANSM)
VEGF-Trap (Aflibercept®)	Molécule composée du domaine extracellulaire des VEGFR et du fragment Fc d'IgG1	Autorisé (FDA et ANSM)
Traitements anti-récepteurs à tyrosine kinase		
Ramucirumab (Cyramza®)	Domaine extracellulaire de VEGFR2, blocage de la liaison entre VEGFA et VEGFR2	Autorisé (FDA et ANSM)
Sutent (Sunitinib®)	VEGFR1, VEGFR2, c-Kit, PDGFRα, PDGFRβ, FLT3	Autorisé (FDA et ANSM)
Nexavar (Sorafenib®)	VEGFR2, VEGFR3, PDGFR, FLT3, c-Kit, c-Raf, B-Raf	Autorisé (FDA et ANSM)
Vatalanib	Molécule inhibitrice de l'activité tyrosine kinase	Phase III
AMG-706 (Motesanib)	tyrosine kinase	Phase III
Zacifima, Vandetanib (ZD-6474)	VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, PDGFR	Autorisé (FDA)
Axitinib (AG-013736)	VEGFR, EGFR	Autorisé (FDA)
Traitements anti-métalloprotéases		
BMS-275291	VEGFR2, VEGFR3, PDGFRβ	Autorisé (FDA)
Tanomastat (BAY-129566)	MMP	Phase III
Marimastat (BB-2516)	MMP	
Traitements utilisant des inhibiteurs de l'angiogenèse naturellement produits		
ABT-510	Analogue de T HSB1	Phase II
Endostar®	Analogue de COL18A1	Autorisé en Chine

Tableau 13 : Exemples d'agents thérapeutiques inhibiteurs de l'angiogenèse (D'après (504)). FDA : Food and Drug Administration ; ANSM : Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé.

Le Bevacizumab, approuvé pour la première fois en 2004 pour le traitement des cancers colorectaux, est utilisé depuis 2006 dans les traitements des cancers pulmonaires non à petites cellules. Cet inhibiteur de VEGFA, utilisé avec la chimiothérapie conventionnelle associant la carboplatin et le paclitaxel, augmente le taux de réponse au traitement et le temps de progression par rapport à l'utilisation de la chimiothérapie seule (577). Les VEGF-Trap ont montré des résultats prometteurs dans un modèle murin de cancer pulmonaire (578). Le Ramucirumab, un anticorps monoclonal induisant le blocage de la liaison entre VEGFA et son récepteur VEGFR2, a été approuvé par la FDA (Food and Drug Administration) aux Etats Unis en 2014 et par l'ANSM en France en 2015. Comme le Bevacizumab, il est donné en complément de la chimiothérapie aux patients atteints de cancers pulmonaires et gastriques (278). De nombreuses molécules inhibitrices de l'activité tyrosine kinase des VEGFR et PDGFR ont été testées dans le traitement de cancer non à petites cellules. Lors d'un essai clinique, le Sutent a montré une stabilisation de la maladie et une réponse au traitement dans les cancer non à petites cellules mais d'autres essais où il a été donné en complément de chimiothérapies n'ont pas montré de bénéfices lors de l'ajout de cette molécule au traitement (192). Les molécules ciblant les MMP n'ont pas donné de résultats concluants dans les différents essais cliniques où ils ont été testés, remettant en cause leur utilisation dans les traitements anti-cancéreux (164). L'utilisation d'un analogue de COL18A1, l'Endostar en complément de la chimiothérapie chez des malades atteints de cancer non à petites cellules a montré des effets modérés quant à l'amélioration des taux de survie et du temps de progression de la maladie (314). Bien que de nombreux traitements anti-angiogéniques soient accessibles et améliorent la survie des patients atteints de cancers, ils peuvent avoir des effets secondaires pour les patients ; le Bevacizumab par exemple peut provoquer de l'hypertension artérielle, des atteintes rénales, des problèmes de thyroïdes, de la fatigue, des nausées et/ou des thromboses. Ces traitements peuvent également être peu efficaces et induire des résistances au sein des tumeurs. Il est donc important de trouver des traitements anti-angiogéniques alternatifs ; par exemple le ciblage du métabolisme des cellules endothéliales, des péricytes et des cellules musculaires lisses (345).

IV.3. Angiogenèse et cancers non métastatiques

La grande majorité des cancers sont métastatiques s'ils ne sont pas détectés à des stades précoces. Les mélanomes, les cancers du sein, du rein et du poumon sont les cancers ayant la plus forte fréquence de métastases (68). Les cancers du sein et du poumon présentent des phases de croissance tumorale pré-invasives localisées dans l'organe de la tumeur primitive ; ces phases vont de l'hyperplasie cellulaire au carcinome *in situ* et peuvent parfois durer plusieurs années (37, 507). La transformation de ces carcinomes *in situ* en carcinomes invasifs est caractérisée par une instabilité génomique et l'activation d'étapes clés pour le développement de métastases telles que l'activation d'oncogènes permettant la croissance tumorale (EGFR/RAS), l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs (p53), la résistance à l'apoptose (dérégulation de l'équilibre entre la protéine BAX activatrice de l'apoptose et BCL2, inhibitrice de l'apoptose), des altérations dans la réparation de l'ADN et l'immortalisation des cellules (activation de la télomérase) et l'activation de

l'angiogenèse (277). D'autres cancers, tels que les épithéliomes basocellulaires et certains cancers de la prostate ne développent pas de métastases (85, 315). Parmi les cancers pulmonaires, l'adénocarcinome lépidique n'est pas métastatique. Les cellules pulmonaires tumorales envahissent les deux poumons mais ne se propagent pas à d'autres organes (353).

L'angiogenèse jouant un rôle déterminant dans la progression des cancers, l'état d'activation de cette voie est intéressante pour comprendre le passage d'un adénocarcinome *in situ* à un carcinome invasif. Dans les cancers du poumon, des études ont montré une augmentation de l'expression de VEGFA, NRP1 et NRP2 entre les hyperplasies pulmonaires de bas grades et celles de hauts grades (276). Des activités angiogéniques sont retrouvées dans les lésions pré invasives des cancers mammaires. Dans les carcinomes *in situ* mammaires, une densité plus importante de vaisseaux et une augmentation de l'expression de VEGFA sont corrélées avec des grades histologiques plus élevés (424). Cependant, l'angiogenèse n'est pas indispensable à la croissance tumorale et à la formation de métastases. Dans les cancers pulmonaires, les cellules tumorales peuvent utiliser les vaisseaux déjà existant pour se nourrir et proliférer (399). Les tumeurs non-angiogéniques pulmonaires ont une signature d'expression génique particulière avec une expression différentielle des gènes touchant le métabolisme des mitochondries, la transcription, la synthèse protéique et le cycle cellulaire. Cette expression différentielle pourrait indiquer un changement de métabolisme par l'activation de l'expression des gènes cibles de HIF1 α tels que CA9 (Carbonic Anhydrase 9), impliquée dans la respiration cellulaire (6).

Ces données de la littérature indiquent que l'angiogenèse est activée dès les stades non-invasifs et elle peut être impliquée dans le passage aux stades invasifs (424). Un changement métabolique peut également permettre la croissance et la dissémination des cellules sans activation de l'angiogenèse (6). Les adénocarcinomes lépidiques de type pneumonique ovin et humain n'évoluent pas comme les autres cancers pulmonaires, de carcinomes *in situ* à carcinomes invasifs disséminés en dehors du poumon, puisqu'ils ne font pas de métastases. Ce sont des cancers pulmonaires non angiogéniques pour lesquels il est important d'analyser l'expression des gènes de la voie de l'angiogenèse afin de montrer un blocage éventuel de cette voie pouvant expliquer le phénotype observé.

POINTS FORTS A RETENIR :

Invasion tumorale et métastases

- ❖ Mécanismes principaux : Angiogenèse et lymphangiogenèse
- ❖ Voies de signalisation impliquées dans la régulation de ces deux mécanismes :
 - VEGF/VEGFR (Voie principale)
 - FGF/FGFR
 - PDGF/PDGFR
 - ANGPT/TIE
- ❖ Dérégulation de ces voies dans les cancers, une augmentation de l'expression de ces gènes est de mauvais pronostic pour les patients
- ❖ L'adénocarcinome lépidique de type pneumonique humain et l'adénocarcinome pulmonaire ovin sont deux cancers non métastatiques

V. Objectifs expérimentaux

L'adénocarcinome pulmonaire ovin et l'adénocarcinome lépidique sont similaires dans les aspects cliniques, radiologiques et histologiques. Le premier est induit par un rétrovirus et le second a une étiologie encore inconnue. L'objectif principal de ma thèse était de mieux connaître et caractériser ces deux cancers en partant de l'hypothèse suivante : des événements cellulaires identiques doivent être impliqués dans l'initiation et/ou la progression des tumeurs lépidiques ovines et humaines. Mon travail de thèse a porté sur deux des caractéristiques de ces deux cancers pulmonaires : la non-invasion des cancers en dehors des poumons et les différences d'expression des mucines dans l'adénocarcinome pulmonaire ovin.

Premièrement, l'absence de métastases de ces deux adénocarcinomes m'a interrogée sur l'état d'activation des voies permettant la dissémination des cellules tumorales au sein de ces deux cancers. Après l'étude de l'expression des gènes de plusieurs voies de signalisation impliquées dans la formation de métastases mais également dans le développement des cancers pulmonaires telles que les voies WNT et NOTCH par exemple, je me suis concentrée sur l'analyse plus approfondie de l'expression des gènes des voies de l'angiogenèse et de la lymphangiogenèse, deux mécanismes déterminants pour la dissémination des cellules tumorales. Un blocage dans l'expression des gènes et protéines impliqués dans l'activation de ces voies pourrait expliquer au moins partiellement l'absence d'invasion tumorale extra-thoracique. Pour cela, une analyse transcriptomique a été réalisée sur des tumeurs pulmonaires et des poumons sains ovins et humains et une comparaison de l'expression des gènes entre tumeur et tissus sains a été effectuée. La confirmation des dérégulations observées dans l'expression des gènes de la voie de l'angiogenèse et de la lymphangiogenèse a été apportée par une analyse par RT-qPCR et Western blot des gènes principaux de ces deux voies sur un pool d'échantillon ovin et humain plus important.

Deuxièmement, mon travail a porté plus précisément sur l'adénocarcinome pulmonaire ovin et sa caractérisation histologique et génétique. Pour les cancers humains, le travail effectué par le corps médical afin d'affiner la classification des cancers pulmonaires a permis d'adapter la prise en charge des patients et de mieux connaître leur pronostic. L'adénocarcinome pulmonaire ovin qui est proche du cancer bronchioloalvéolaire s'est vu rapprocher de l'adénocarcinome lépidique. Mais le cancer chez le mouton est-il effectivement plus proche de l'adénocarcinome lépidique prédominant ou peut-il également se rapprocher de l'adénocarcinome mucineux invasif ? Ces deux cancers chez l'homme sont distingués par l'analyse de l'expression des mucines. Mon travail essaie de montrer vers quel type de cancer l'adénocarcinome pulmonaire ovin s'oriente. Pour cela, j'ai analysé la présence ou non de mucine dans des coupes histologiques d'adénocarcinome pulmonaire ovin puis j'ai analysé l'expression des mucines 1, 5AC et 5B dans ces échantillons tumoraux et normaux. Cette caractérisation ouvre également la voie à l'étude du rôle que peuvent avoir les mucines dans la progression du cancer pulmonaire ovin.

RESULTATS EXPERIMENTAUX

CHAPITRE 1 : Analyse de l'expression des gènes des voies impliquées dans la dissémination des cellules tumorales :

Sous expression des gènes de l'angiogenèse dans les adénocarcinomes lépidiques humains et ovins

I. Etat de l'art

L'adénocarcinome pulmonaire ovin et l'adénocarcinome lépidique sont deux cancers non métastatiques. Plusieurs mécanismes interviennent dans l'envahissement des organes distants de la tumeur primitive par les cellules tumorales. Les voies BMI1, WNT, NOTCH et Hedgehog interviennent dans le développement du poumon. Elles sont également activées dans les cellules souches pulmonaires, sont dérégulées dans les cancers et ont un rôle dans l'induction des métastases.

Le facteur BMI1 (B cell-specific Moloney murine leukemia virus integration site 1) joue un rôle dans la transition épithélio-mésenchymateuse et dans l'invasion par l'inhibition du gène suppresseur de tumeur PTEN (Phosphatase and tensin homolog) et de WWOX (WW domain containing oxidoreductase) (Figure 28). PTEN et WWOX sont des inhibiteurs de la voie de signalisation PI3K/AKT. L'inhibition de cette voie empêche la stabilisation de SNAI1, qui à son tour ne peut déstabiliser la protéine CDH1 et les jonctions cellules-cellules assurées par cette cadhérine (Figure 28). Le facteur BMI1 est également un activateur de la protéine TWIST1 (Twist family bHLH transcription factor 1) qui coopère avec la protéine RAS pour déclencher la transition épithélio-mésenchymateuse et l'invasion (463). La protéine RAS joue un rôle dans l'inhibition de CDH1 par l'intermédiaire du répresseur transcriptionnel SNAI2 (Snail family transcriptional repressor 2) (463).

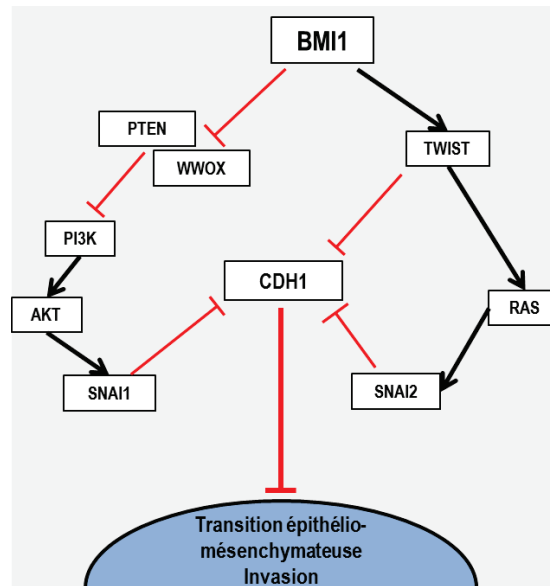


Figure 28 : Représentation schématique de la voie de signalisation BMI1 et son implication dans la transition épithélio-mésenchymateuse et l'invasion des cellules tumorales.

→ activation ; | répression.

En condition normale, BMI1 est un facteur de maintien des cellules souches. Il est impliqué dans la régulation de l'activité de prolifération des cellules souches, dans le cycle cellulaire, l'immortalisation des cellules et la senescence cellulaire par l'activation de la télomérase (463). Pendant le développement du poumon, BMI1 est important pour le renouvellement des cellules souches pulmonaires par la régulation des gènes suppresseurs de tumeurs impliqués dans le cycle cellulaire CDKN2A (Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A) et CDKN1C (Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1C) (568). BMI1 permet la prolifération et le maintien des cellules souches bronchioalvéolaires qui induisent le renouvellement des cellules épithéliales alvéolaires et bronchiolaires (142). Le rôle du facteur BMI1 dans les cancers est complexe. Il est surexprimé dans les cancers du côlon, du foie, du sein et du pancréas. Dans ces tumeurs, cette surexpression est corrélée à un mauvais pronostic et à la présence de métastases dans les ganglions lymphatiques (470). La surexpression de BMI1 a été observée dans une sous population de cellules souches tumorales exprimant la prominin-1 ou CD133 (51). Ces cellules souches tumorales CD133 positives étaient résistantes à un traitement à la cisplatine *in vitro* (51). Le même résultat a été observé *in vivo* après le traitement des souris à la cisplatine lors de l'injection de ces cellules CD133 positives (51). L'absence d'expression de BMI1 dans les tumeurs pulmonaires est un facteur de survie à 5 ans après chimiothérapie (529). L'inhibition de BMI1 par des shARN dans un modèle murin de cancers pulmonaires non à petites cellules inhibe la transition épithélio-mésenchymateuse par la restauration l'expression de PTEN. BMI1 active l'expression de VEGFA, l'absence de BMI1 empêche cette activation réduisant ainsi la migration cellulaire et l'induction de métastases (338). L'inhibition de l'expression de BMI1 dans les cellules souches bronchioalvéolaires mutées pour l'oncogène RAS empêche la prolifération de ces cellules par le blocage des protéines P16^{INK4A} et p19^{ARF}, deux protéines inhibitrices de la prolifération et activatrices de l'apoptose (142). Au contraire, des études ont mis en évidence un rôle inhibiteur de BMI1 dans le développement des tumeurs. La surexpression de BMI1 diminue l'invasion

de lignées de cellules épithéliales pulmonaires et de cellules de carcinomes pulmonaires à large cellules (554). La suppression de BMI1 dans les cellules A549 injectées dans des souris augmente le nombre de métastases *in vivo* (554).

La voie Hedgehog est une voie de signalisation ligands/récepteurs. L'activation de la voie par la fixation des ligands sur les récepteurs induit la libération et la translocation de facteurs de transcription activateurs de l'expression des gènes cibles de la voie. Les ligands Hedgehog, SHH (Sonic Hedgehog), DHH (Desert Hedgehog) et IHH (Indian Hedgehog) sont synthétisés et les protéines DISP (Dispatched) permettent leur sécrétion (Figure 29). La voie Hedgehog est initiée par la liaison entre les ligands, le récepteur PTCH1 (Patched) et les corécepteurs CDO (Cell adhesion associated, oncogene regulated) et BOC (Brother of CDO). Cette liaison entraîne la libération et l'accumulation de la protéine SMO (Smoothened) qui permet la libération des facteurs de transcription GLI1 (GLI family zinc finger 1) et GLI2 (GLI family zinc finger 2) de leurs inhibiteurs SUFU (SUFU negative regulator of Hedgehog signaling) et KIF7 (Kinesin family member 7). Après phosphorylation, GLI1 et GLI2 migrent vers le noyau et activent l'expression des gènes cibles de la voie Hedgehog tels que les cyclines D et E, MYC, HIP (Hedgehog interacting protein), BCL2 (B-cell CLL/lymphoma 2), CFLAR (CASP8 and FADD like apoptosis regulator) ou FOXF1 (Forkhead box F1). Lorsque la voie Hedgehog n'est pas activée, GLI3 est phosphorylé par les protéines PKA (Protein Kinase A), CK1 (Casein Kinase 1) ou GSK3 β (Glycogen Synthase Kinase 3 β) et sa migration dans le noyau bloque l'expression des gènes cibles (Figure 29) (64).

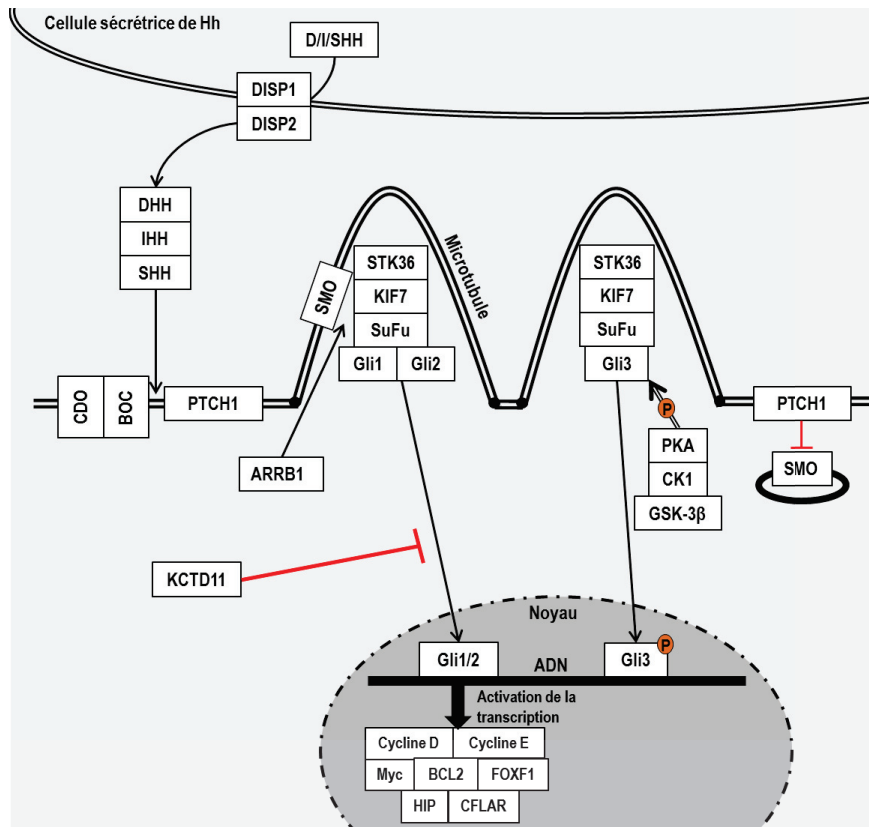


Figure 29 : Représentation schématique de la voie de signalisation Hedgehog.
 → activation ; † répression.

En condition normale, la voie Hedgehog est impliquée dans la régulation de la prolifération, de la migration et de la différenciation des cellules progénitrices (515). Elle est cruciale pendant l'embryogenèse et dans la réparation des tissus adultes. Des dérégulations de la voie Hedgehog sont impliquées dans les cancers des ovaires, de la prostate ou encore du poumon (Tableau 14). Les cancers pulmonaires à grandes cellules surexpriment les protéines SHH et GLI1 (538). L'inhibition *in vitro* de la voie Hedgehog par la cyclopamine, un inhibiteur de SMO, réduit la prolifération et la viabilité des cellules tumorales pulmonaires A549 et l'inhibition de GLI1 par des siRNA diminue la prolifération des A549 par la modulation de la cycline D (48). L'expression de HIP, un gène cible inhibiteur de la voie Hedgehog, est diminuée dans de nombreux cancers dont les cancers pulmonaires (376). Dans les cancers du pancréas, une inhibition du ligand SHH par la cyclopamine induit la diminution des métastases et dans les cancers hépatiques, une surexpression des gènes *SHH*, *PTCH1*, *SMO* et *GLI1* augmente l'invasion des cellules tumorales et les métastases par l'activation des métalloprotéases MMP2 et MMP9 via la voie de signalisation PI3K/AKT (89).

Expression	Cancers
▲ Hedgehog	Cerveau, peau, poumons, appareil digestif, ovaire et prostate
▼ Hedgehog	Pancréas, foie, prostate et poumons
∅ PTCH1	Cerveau, peau, tissus mous
▲ SMO	Peau, ovaires
▼ GLI	Peau, poumons, œsophage et l'intestin
∅ SUFU	Cerveau, tissus mous et prostate

Tableau 14 : Dérégulation de la voie de signalisation Hedgehog dans les cancers (d'après (517)).

▲ Augmentation de l'expression, ▼ Diminution de l'expression, ∅ pas d'expression.

La voie NOTCH est activée par la fixation de ligands sur les récepteurs NOTCH induisant le clivage des récepteurs NOTCH et permettant la translocation de la partie intracellulaire du récepteur dans le noyau de la cellule. Cette partie intracellulaire joue le rôle de facteur de transcription activateur des gènes cibles de la voie. Les récepteurs NOTCH (NOTCH1 à 4) sont des protéines transmembranaires composées d'un domaine NECD (NOTCH ExtraCellular Domain), d'un domaine TM (Transmembranaire) et d'un domaine NICD (NOTCH IntraCellular Domain) (Figure 30). Les ligands de la voie NOTCH sont les protéines DLL1, DLL2, DLL3 (Delta-like 1, 2 and 3) et les protéines JAG1 et JAG2 (Jagged 1 and 2). Lors de la liaison du ligand sur son récepteur, le domaine NECD est clivé par les métalloprotéases ADAM10 et 17 (A Desintegrin And Metalloproteinase 10 and 17) mais reste lié aux ligands et le complexe ligand/NECD est envoyé vers le recyclage (Figure 30). Le domaine NICD est libéré du domaine transmembranaire par le complexe γ -sécrétase permettant sa translocation dans le noyau. En absence du NICD, un complexe répresseur est présent sur l'ADN et empêche l'expression des gènes cibles. Lorsque le NICD entre dans le noyau, il se fixe à la protéine RBPJk (Recombination signal Binding Protein Kappa J region) permettant la conversion du complexe inhibiteur en un complexe activateur avec la présence de MAML1 (Mastermind like transcriptional coactivator 1) (Figure 30). Cette étape permet l'expression des gènes cibles de la voie NOTCH tels que les *HES* (Hes family BHLH transcription factor), la *Cycline D* et *c-MYC* (pour revue, (170)).

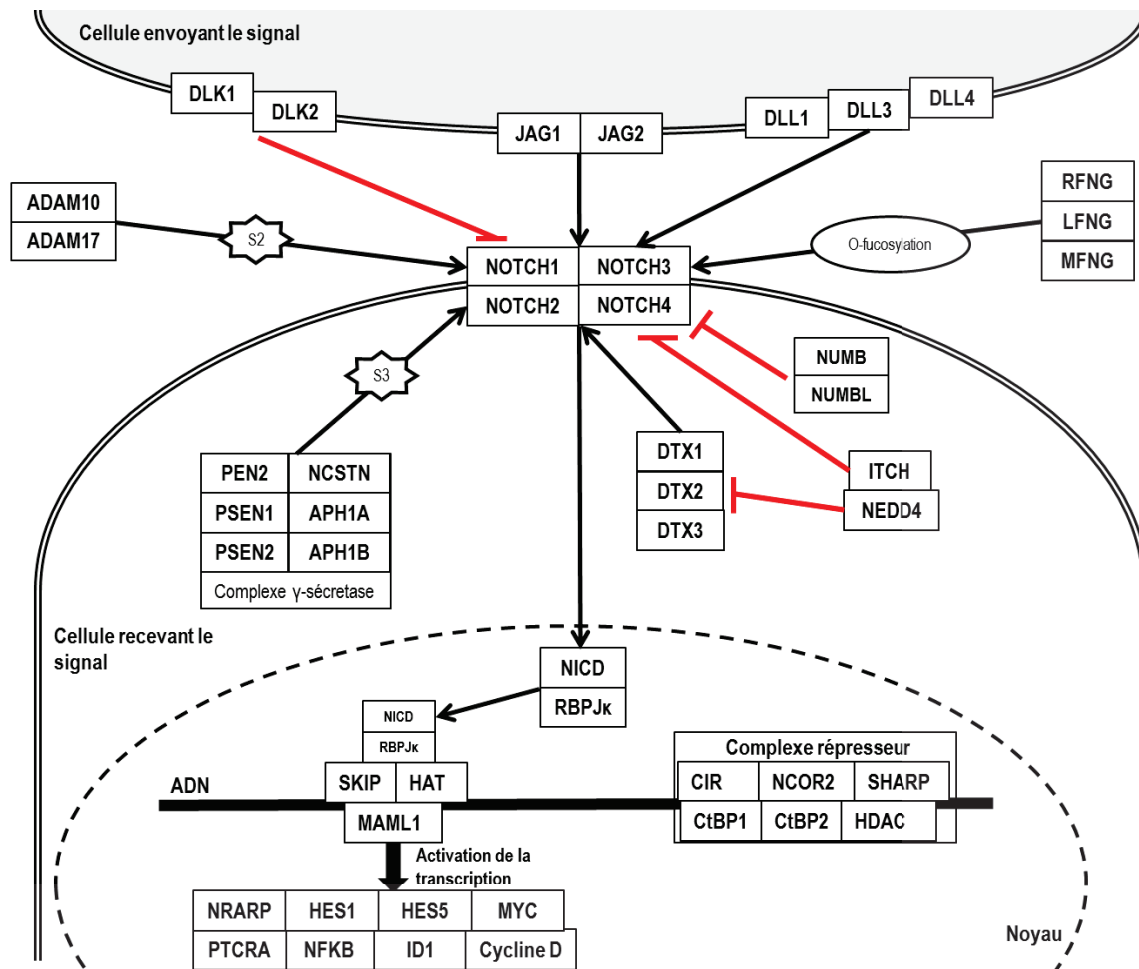


Figure 30 : Représentation schématique de la voie de signalisation NOTCH.
 → activation ; ⊥ répression.

La voie NOTCH est hautement conservée chez les mammifères comme voie de détermination du destin cellulaire pendant le développement embryonnaire (555). Au cours du développement pulmonaire, la voie NOTCH est importante pour le devenir des cellules et la mise en place des alvéoles. Chez l'adulte, elle est essentielle dans la réparation de blessures par le contrôle du maintien et de la différenciation des cellules souches pulmonaires (pour revue (555)). Par exemple, l'expression constitutive de NOTCH3 dans le poumon de souris inhibe la différenciation des cellules de l'épithélium pulmonaire distal et détruit complètement la morphologie pulmonaire en inhibant la différenciation des cellules épithéliales alvéolaires (113). Le récepteur NOTCH1 est impliqué dans la transition épithélio-mésenchymateuse et dans l'invasion des cellules tumorales. La surexpression de NOTCH1 dans les cellules endothéliales induit l'expression de SNAI1 et SNAI2 permettant la répression de la VE-cadhérine, la perte de l'inhibition de contact entre cellules et l'immortalisation des cellules endothéliales (502). La métalloprotéase ADAM17 permet l'activation de l'expression du proto-oncogène EGFR par son action sur NOTCH1 dans les cancers pulmonaires non à petites cellules (39). L'expression de NOTCH1 dans les cancers pulmonaires est un facteur de mauvais pronostic et de résistance aux traitements inhibant l'activité tyrosine kinase du récepteur EGFR (141, 552). L'activation constitutive de l'expression de NOTCH3 dans les cellules pulmonaires de souris transgéniques pour NOTCH3 induit des

métaplasies cellulaires dans les alvéoles (113). NOTCH3, comme NOTCH1, est impliqué dans la résistance aux inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase de l'EGFR et une diminution de la phosphorylation des MAPK est observée lors de son inhibition (200). Les ligands des récepteurs NOTCH sont impliqués dans les cancers. L'expression du ligand DLL4 dans les cancers pulmonaires non à petites cellules, par exemple, est un facteur de mauvais pronostic (141).

La voie WNT est composée des ligands WNT se fixant sur leurs récepteurs, FZD (Frizzled). Cette fixation permet la stabilisation de CTNNB1 (β -caténine) et sa translocation dans le noyau. CTNNB1 est le facteur de transcription permettant l'activation de l'expression des gènes de la voie et est impliquée dans l'adhésion cellule-cellule. Lorsque la voie WNT n'est pas activée, CTNNB1 est adressée au protéasome par l'intermédiaire du complexe APC (Adenomatosis Polycomb Complex)/Axine (Figure 31). Les ligands WNT sont une famille de 19 glycoprotéines sécrétées et les FZD sont composés de 10 récepteurs. Les ligands WNT se lient à un complexe FZD et LRP5/6 (LDL Receptor related Protein 5/6) et induisent un changement conformationnel des récepteurs suivi par la séparation du complexe APC/Axine/CTNNB1. L'axine se fixe sur le domaine cytoplasmique de LRP5/6, lui-même phosphorylé par les kinases GSK3 β et CK1. La protéine DSH (Dishevelled) interagit avec les récepteurs FZD et facilite l'interaction entre les protéines LRP et l'axine. CTNNB1 est libérée du complexe APC induisant sa dégradation, stabilisée et envoyée vers le noyau où elle va induire la transcription de gènes cibles tels que la cycline D, MYC, CD44 ou MMP7 (95).

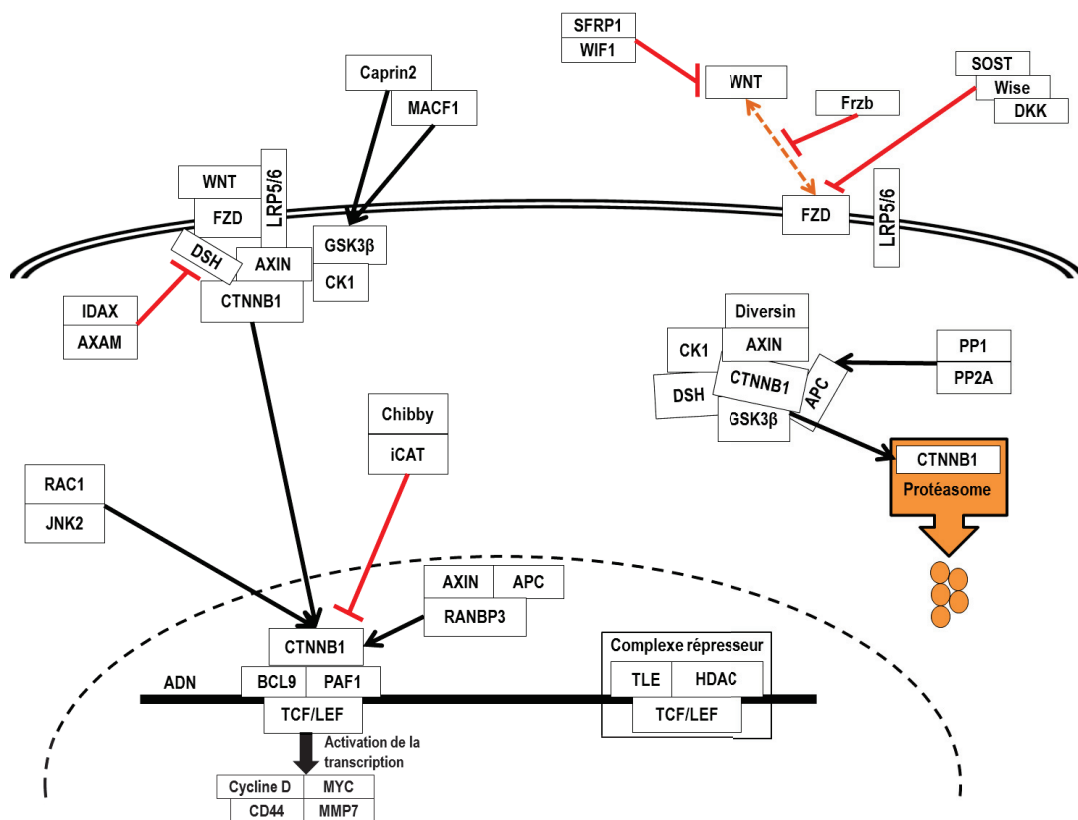


Figure 31 : Représentation schématique de la voie de signalisation WNT.
 → activation ; † répression.

De nombreuses dérégulations de la voie WNT ont été mises en évidence dans les cancers dont les cancers du poumon (Tableau 15). Le contact entre des cellules épithéliales bronchiques immortalisées et un condensé de fumée de cigarette augmente l'expression des gènes activateurs, tels que WNT5A, et diminue l'expression de certains inhibiteurs de la voie WNT tels que DKK1 (299). La surexpression des gènes de la voie WNT dans les tumeurs pulmonaires mutées pour l'oncogène *KRAS*, associé au tabagisme, est corrélée à des tumeurs pulmonaires plus agressives à cause de la perte d'expression de CDH1 (299, 385). Cinquante-trois pourcents des cancers pulmonaires non à petites cellules expriment WNT1 ; son expression est associée à une diminution de l'apoptose, une augmentation de l'expression de CTNNB1, de MYC, de la Cycline D1, de MMP7 et de VEGFA (223). Ils sont également associés à des surexpressions des ligands WNT2, WNT3, WNT5A et WNT11 (pour revue (476)). Une hyper méthylation, induite par la protéine DNMT1 (DNA Methyl Transferase 1), du promoteur du gène codant pour le ligand WNT7A induit sa sous expression et augmente la prolifération cellulaire dans les cancers pulmonaires non à petites cellules (499). FZD8 et DSH sont surexprimés aussi bien dans les lignées cellulaires pulmonaires que dans les échantillons de tumeurs pulmonaires et leur expression est associée à un mauvais pronostic (536, 539). L'expression de DSH1 et DSH3 *in vitro* augmente l'invasion des cellules tumorales épithéliales pulmonaires et augmente l'expression de CTNNB1 (539). Dans les cancers pulmonaires, l'expression des inhibiteurs peut être dérégulée. Des mutations du gène codant pour l'axine sont associées à un risque de développement des adénocarcinomes pulmonaires (248). La phosphorylation de GSK3 β par l'EGFR bloque sa fonction inhibitrice de la voie WNT ; la présence de cette forme phosphorylée de GSK3 β et de l'EGFR est associée à un mauvais pronostic dans les cancers pulmonaires (576). La méthylation du promoteur du gène codant la protéine sFRP2 (secreted Frizzled related protein 2), inhibitrice de la voie WNT, a été observée plus fréquemment chez les femmes, les non-fumeurs et dans les adénocarcinomes pulmonaire (488). CTNNB1, le facteur de transcription permettant l'activation de l'expression des gènes cibles de la voie WNT, est touché par des dérégulations de son expression dans les cancers. Par exemple, l'expression de CTNNB1 a été observée dans 68% des cancers pulmonaires épidermoïdes et dans 61% des adénocarcinomes (250). L'accumulation de CTNNB1 dans le noyau des cellules tumorales pulmonaires est associée à des résistances aux traitements ciblant l'activité tyrosine kinase de l'EGFR ; CTNNB1 pouvant activer l'EGFR et la voie de signalisation en aval de l'EGFR, la voie MAPK (161). Dans les lignées cellulaires de cancers pulmonaires, une inhibition de l'expression de CTNNB1 permet l'inhibition de la prolifération cellulaire par la sous expression de gènes cible de CTNNB1 tels que MYC, la cycline D1 et CDK4 (197). A l'inverse, une perte de l'expression de CTNNB1 dans les cancers pulmonaires est associée avec une augmentation de la croissance tumorale et du grade de la tumeur et sa surexpression dans les cancers n'est pas toujours de mauvais pronostic (476).

	Expression des gènes	Cancers
AUGMENTATION	WNT1	Poumon, prostate, tête et du cou, sein
	WNT2	Poumon, sein
	WNT7a	Côlon, l'estomac, l'endomètre
	DSH	Poumon, sein
	LRP5/6	Colon
	FZD2	Estomac
	FZD3	Leucémie
	FZD5	Rein
	FZD7	Foie
	FZD8	Estomac
	FZD9	Cerveau
	β -caténine	Poumon, ovaires, foie, rein
DIMINUTION	WNT5a	Côlon, du cerveau, de la thyroïde, du sein
	WNT7a	Poumon
	sFRP	Poumon, foie, sein, vessie, tête et du cou, colon
	APC	Estomac, intestins, sein, rein
	Axine	Foie, poumon

Tableau 15 : Dérégulation de la voie WNT dans les cancers (D'après (476)).

Les voies de signalisation BMI1, Hedgehog, NOTCH, WNT et de l'angiogenèse sont-elles dérégulées dans les adénocarcinomes pulmonaires lépidiques humain et ovin ?

Chez l'homme, les voies de signalisation BMI1, Hedgehog, NOTCH et WNT sont impliquées dans le développement du poumon et dans le développement des cancers pulmonaires. Leur rôle dans le maintien des cellules souches et des cellules souches tumorales peut être déterminant dans la dissémination du cancer. Très peu de choses sont connues quant à l'expression des gènes des voies BMI1, Hedgehog, NOTCH et WNT chez le mouton. Dans des tumeurs pulmonaires murines induites par l'enveloppe de JSRV, une augmentation de l'activation de la voie de signalisation WNT, par l'analyse de l'expression de CTNNB1, a été observée ; ces cellules présentaient un haut potentiel d'initiation tumorale (516). Notre équipe a également mis en évidence l'expression du gène BMI1 dans une population de cellules progénitrices bronchioloalvéolaires isolées à partir de poumon d'agneau sain (15). L'angiogenèse et la lymphangiogenèse sont importantes pour la prolifération des cellules tumorales vers d'autres organes. L'expression des facteurs de croissance de l'angiogenèse VEGFC, FGF2, PDGFC et du récepteur PDGFR α a été détectée par immunohistochimie dans des poumons de moutons atteints d'adénocarcinomes pulmonaires ovins (472).

L'étude des dérégulations de ces voies est importante pour la compréhension des mécanismes de transformation et de l'absence de métastases dans les deux adénocarcinomes lépidiques chez l'homme et le mouton. Pour cela, nous avons analysé les profils d'expression des gènes dans les cancers lépidiques.

II. Matériels et méthodes

II.1. Matériel biologique

Les tissus pulmonaires ont été collectés *post mortem* sur cinq moutons naturellement infectés par JSRV provenant de troupeaux du sud de la France avec des cancers pulmonaires (groupe « cancers ») et sur cinq moutons ne présentant aucun signe clinique provenant de l'abattoir de Corbas, Rhône-Alpes (groupe « normaux ») (Tableau 16). Une autorisation pour l'entrée sur le site de l'abattoir a été obtenue et l'accès a été supervisé par un vétérinaire. Aucun des animaux utilisés pour cette étude n'a participé à un protocole expérimental. Le statut clinique de ces animaux a été confirmé par la présence ou non de lésions cancéreuses macroscopiques et par la détection du génome de JSRV par PCR semi-nichée. Rapidement, l'ADN des poumons a été extrait par le Fast DNA® Kit, MPBIO selon les recommandations du fournisseur puis 100ng de celui-ci a été amplifié par PCR avec le « 1X KAPA2G Robust Hotstart Ready Mix 2X » (Clinisciences, France) et 0,2µM d'amorces. Les amorces utilisées ciblaient une région en 3' du génome de JSRV située entre l'enveloppe et le LTR de JSRV (JSRV98 : 5'-GAGTTGAAATGCTGCATATG-3', JSRV53 : 5'-GGATTCTTACACAATCACC-3' et JSRV52 : 5'-CACCGGATTCTTATATAATC-3'). Les étapes d'amplification étaient les suivantes : 2 min à 95°C suivies de 10 sec à 95°C, 10 sec à 55°C et 10 sec à 72°C pendant 35 cycles puis 5 min à 72°C.

Des cellules épithéliales alvéolaires de type II ou AECII ont été dérivées à partir de trois des poumons tumoraux et trois des poumons normaux collectés *post mortem*. Les AECII ont été caractérisées phénotypiquement pour l'expression de pro-SPC et de la cytokératine et ont été cultivées comme décrit précédemment (16).

	Animal	Sexe	Age (Mois)	Statut
POUMONS	892	F	24	Cancer
	987	M	60	
	1018	?	< 6	Normal
	1020	?	< 6	
AECII	1127	?	?	Cancer
	1167	F	60	
	1171	F	?	Normal
	1011	?	< 6	
	1213	?	< 6	
	1214	?	< 6	




Tableau 16 : Cancers et poumons normaux utilisés pour les analyses transcriptomiques.
F : Femelle ; M : Mâle ; ? : Inconnu.

Cinq adénocarcinomes lépidiques humains ont été obtenus par le centre de ressources biologiques Cardiobiotech (CRB-HCL Hospices Civils de Lyon BB-0033-00046) pour l'analyse de l'expression des gènes

sur puce transcriptomique (#03H0202 ; #04H11387 ; #04H2749 ; #05H2656 ; #06H5639). Les zones saines et tumorales ont été microdisséquées pour séparer les zones lépidiques (N=4) et papillaires (N=4).

II.2. Analyse transcriptomique

Une analyse transcriptomique a été réalisée sur des tissus et des cellules primaires pulmonaires ovines tumorales et non tumorales avec des puces transcriptomiques Gene Chip® Bovine Genome Array (Affymetrix), selon les recommandations du fournisseur (plateforme ProfileXpert, collaboration C. Legras Lachuer et C. Leroux). Ces puces étaient composées de 24072 jeux de sondes de 25-mer permettant la détection de plus de 23000 transcrits. La lecture des puces a été réalisée avec le scanner 3000 d’Affymetrix puis les intensités relatives d’expression ont été mesurées avec le logiciel MAS5.0 (Microarray Suite version 5.0, Affymetrix). Une normalisation permettant d’éviter tout biais technique a été réalisée. Cette étude a été réalisée sur deux cancers (#892 et 987), deux poumons normaux (#1018 et 1020) et sur des cellules épithéliales alvéolaires de type II dérivées de cancers (#1127, 1167 et 1171) ou de poumons normaux (#1011, 1213 et 1214) (Tableau 16). Une étude similaire a été réalisée sur cinq poumons humains normaux (#03H0202, 04H2749, 04H11387 05H2656 et 06H5639) et des cancers pulmonaires (#03H0202, 04H2749, 04H11387, 05H2656 et 06H5639) avec microdissection des zones définies histologiquement comme lépidiques ou papillaires. Les profils ARNm ont été analysés sur une puce CodeLink Human Whole Genome Bioarray, Applied microarray/GE Healthcare (plateforme ProfileXpert) composée de 55000 sondes de 30-mer représentant le génome humain annoté.

Les données brutes ont été analysées par l’équipe bio-informatique de la plateforme ProfileXpert. L’analyse de l’expression des gènes sur ces échantillons a été réalisée grâce au calcul d’un ratio du niveau d’expression des gènes dans les cancers par rapport aux poumons normaux ou FC (fold change). Un FC de 1,3 indique une différence d’expression significative correspondant à une p-value inférieure à 0,05. Le tableau récapitulatif des dérégulations des voies BMI1, Hedgehog, NOTCH, WNT et de la voie de l’angiogenèse/lymphangiogenèse a été réalisé lors de l’analyse des données de transcriptome. Un code a été établi pour une lecture rapide des niveaux d’expression des gènes de chaque voie :  lorsque le gène n’est pas retrouvé dans les données d’expression, = quand l’expression du gène est stable,  quand le gène est significativement sous exprimés (FC inférieur à -1,3) dans les cancers et  quand les gènes sont surexprimés (FC supérieur à 1,3) dans les cancers. Les voies de signalisation ont été reconstruites à partir des données de la littérature et la base de données KEGG PATHWAY (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, <http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>) avec un code couleur utilisant le blanc lorsque le gène n’est pas retrouvé dans les données d’expression, le gris lorsqu’il n’y a pas de régulation de l’expression entre cancer et poumon normal, le vert quand le gène est significativement sous exprimé dans les cancers et le rouge quand le gène est surexprimé dans les cancers.

III. Résultats

III.1. Profils d'expression des adénocarcinomes lépidiques humains et ovins

L'analyse globale des puces transcriptomiques ovines et humaines ont mis en évidence de nombreuses dérégulations dans l'expression des gènes entre les cancers et les poumons sains. Les différences d'expression des gènes ont permis de classer les échantillons par statuts normaux ou cancers aussi bien chez l'homme que chez le mouton (Figure 32). Chez l'homme, les différences d'expression des gènes n'ont pas permis de différencier les zones lépidiques des zones papillaires aussi, l'analyse a été concentrée sur les lésions lépidiques (Figure 32). Bien que les analyses aient été réalisées sur les zones papillaires, seules les données d'expression des zones lépidiques seront montrées dans les résultats. De façon similaire, chez le mouton, les analyses de l'expression des gènes ont été réalisées aussi bien dans les poumons que dans les cellules épithéliales alvéolaires de type II dérivées de poumons ovins mais seules les analyses des dérégulations entre poumons normaux et cancers seront montrées dans les analyses de l'expression des gènes des voies de signalisation. L'expression des gènes dans les AECII est cependant particulièrement intéressante afin de confirmer que les dérégulations observées dans les poumons sont spécifiques de ces cellules.

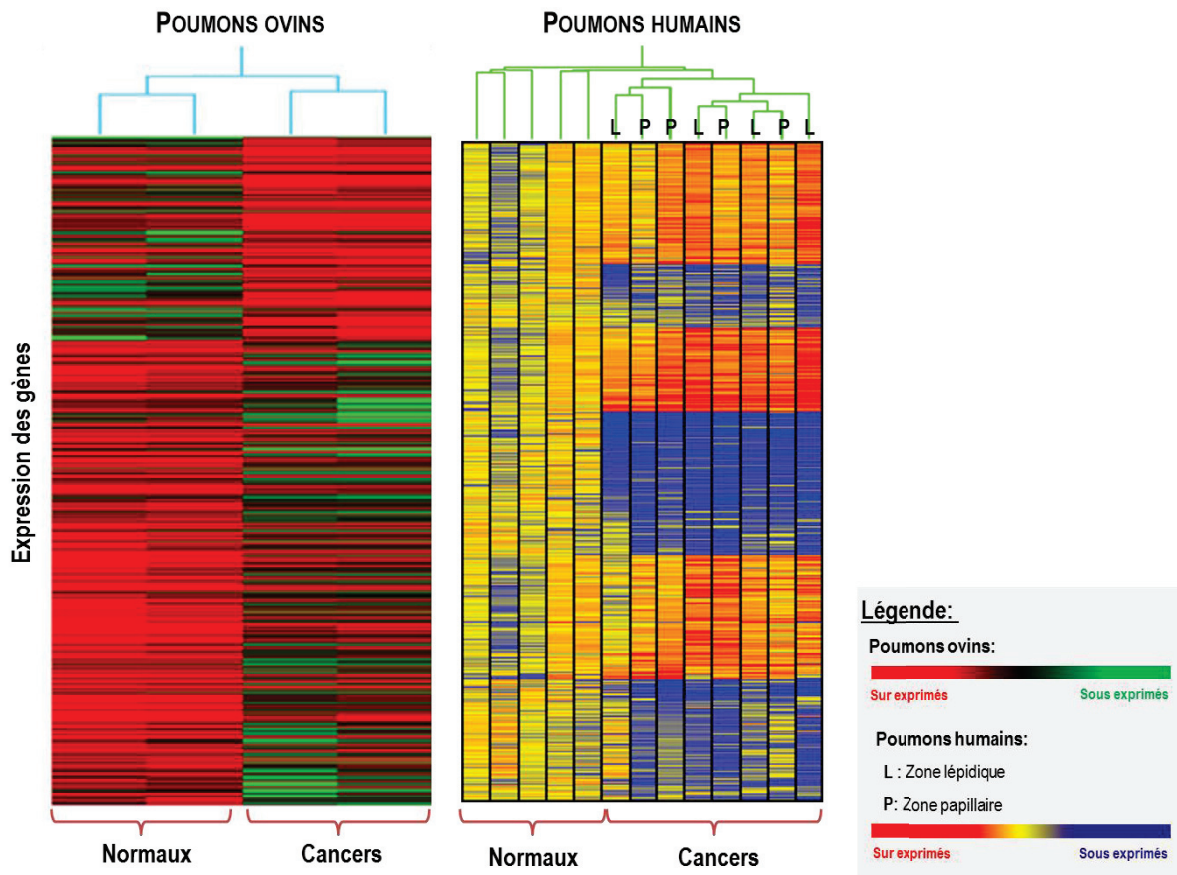


Figure 32 : Clusters des gènes différentiellement exprimés dans les adénocarcinomes lépidiques ovins et humains par rapport à des poumons normaux.

L'analyse des profils d'expression des adénocarcinomes ovins a montré la dérégulation de 622 gènes sur les 8638 gènes présents et annotés sur la puce. Parmi ces 622 gènes, 280 étaient sur exprimés et 342 étaient sous exprimés. L'ontologie des gènes sur et sous exprimés indiquait que 23% des gènes surexprimés étaient impliqués dans l'inflammation et 15% des gènes sous exprimés étaient impliqués dans l'adhésion cellulaire (Figure 33). Chez l'homme, les gènes dérégulés étaient majoritairement des gènes intervenant dans les mouvements cellulaires, le cancer, les interactions et la signalisation entre cellules (données non montrées).

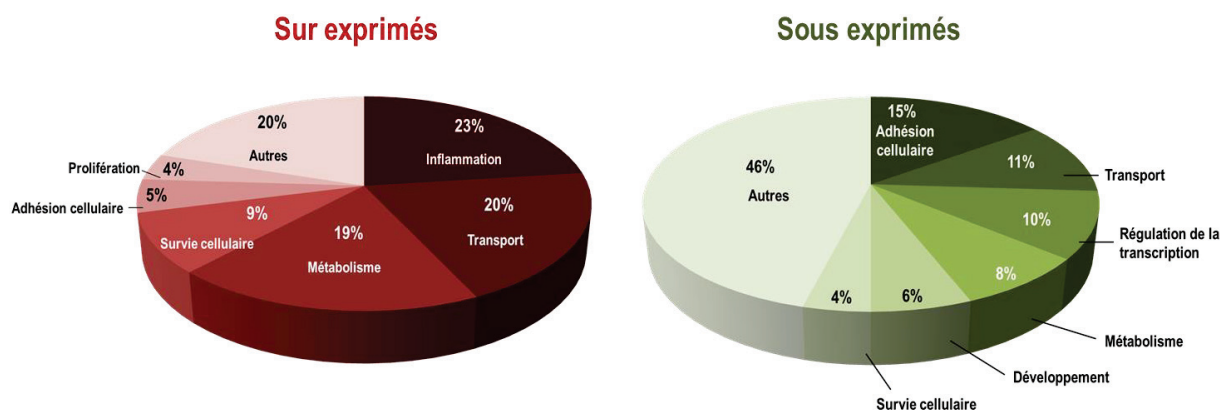


Figure 33 : Ontologie des gènes dérégulés dans l'adénocarcinome pulmonaire ovin.

Bien que ces voies soient majoritairement dérégulées dans les adénocarcinomes lépidiques humains et ovins, des gènes appartenant à d'autres voies de signalisation étaient également dérégulés. Plus spécifiquement, nous avons voulu analyser les voies BMI1, Hedgehog, NOTCH, WNT pour leur importance dans le développement du poumon et dans les cancers.

III.2. Dérégulations des voies BMI1, Hedgehog, NOTCH, WNT et de l'angiogenèse

III.2.1. BMI1

Les profils d'expression des ARNm établis par l'analyse des puces transcriptomiques ont montré une dérégulation de la voie BMI1 dans les adénocarcinomes lépidiques ovins et humains. Le niveau d'expression de 11 gènes essentiels dans la voie BMI1 a été analysé montrant que 4 d'entre eux étaient dérégulés dans les adénocarcinomes ovins et 5 étaient dérégulés dans les adénocarcinomes humains (Tableau 17). Le niveau d'expression de trois gènes n'a pas été retrouvé dans les données ovines. Ainsi, sur les 8 gènes dont l'expression était connue chez le mouton, 5 gènes avaient une expression identique entre les adénocarcinomes lépidiques ovins et humains : *AKT*, *SNAI1*, *CDH1*, *RAS* et *SNAI2* (Tableau 17). Chez le mouton, *BMI1* et *SNAI2* étaient sous exprimés, *CDH1* et *WWOX* étaient surexprimés (Figure 34, Tableau 17). La sous expression de *SNAI2* et la surexpression de *WWOX* étaient également retrouvées dans les AECII dérivés de poumons tumoraux. Dans les adénocarcinomes pulmonaires lépidiques humains, *CDH1* était surexprimé alors que *TWIST1* et *TWIST2* et *SNAI2* étaient sous exprimé (Figure 34, Tableau 17).

	Mouton	Homme
<i>BMI1</i>	↘	=
<i>PTEN</i>	∅	=
<i>WWOX</i>	↗	=
<i>PI3K</i>	=	↘
<i>AKT</i>	=	=
<i>SNAI1</i>	=	=
<i>TWIST1</i>	∅	↘
<i>TWIST2</i>	∅	↘
<i>CDH1</i>	↗	↗
<i>RAS</i>	=	=
<i>SNAI2</i>	↘	↘

Tableau 17 : Expression des gènes de la voie BMI1 dans les adénocarcinomes pulmonaires ovins et humains. Les niveaux d'expression sont déterminés en référence au poumon normal. ↗ surexprimé, ↘ sous exprimé, = stable et ∅ non trouvé.

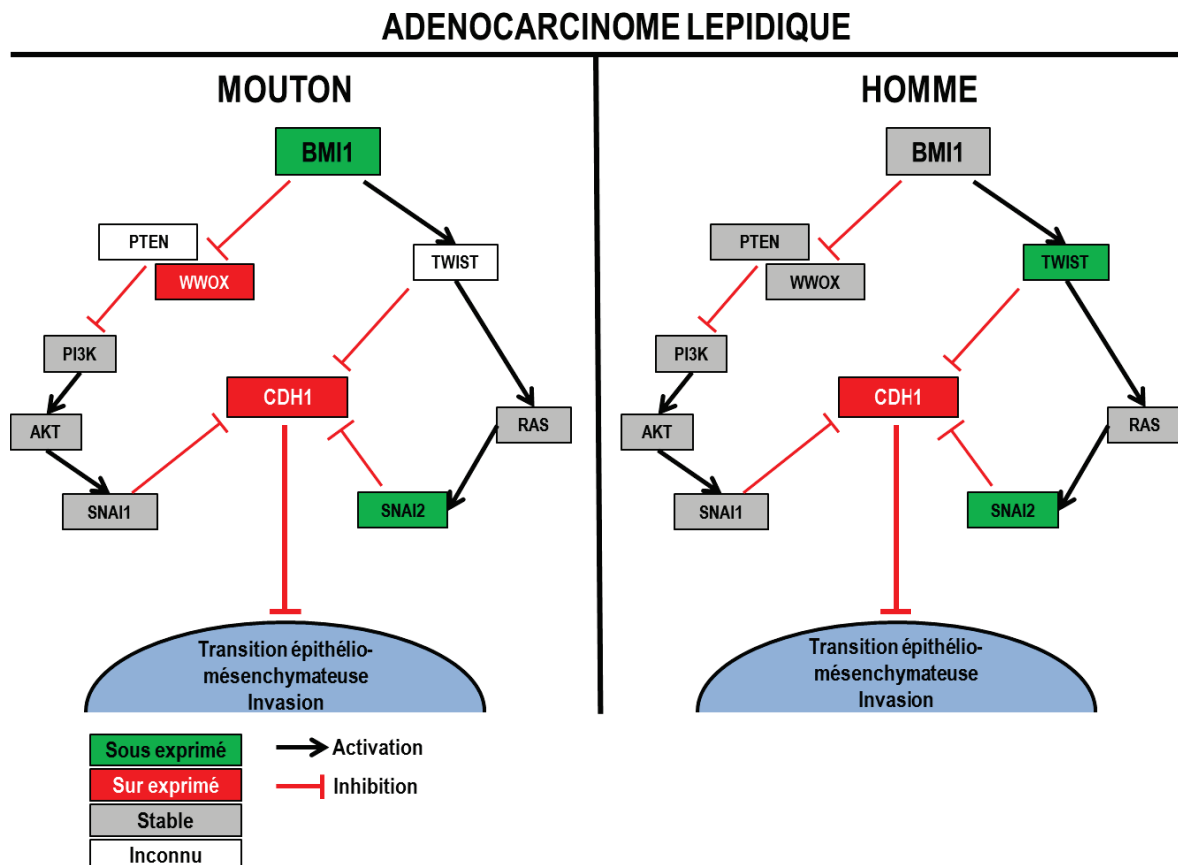


Figure 34 : Dérégulation de la voie de signalisation BMI1 dans les adénocarcinomes lépidiques ovins et humains.

III.2.2. Hedgehog

Nous avons analysé l'expression de 29 gènes principaux de la voie Hedgehog ; 12 étaient dérégulés dans les adénocarcinomes ovins et 15 étaient dérégulés dans les adénocarcinomes lépidiques humains (Tableau 18). Chez le mouton, le ligand principal de la voie *SHH*, le corécepteur *BOC*, la protéine activatrice *SMO*, le répresseur transcriptionnel *GLI3* étaient sous exprimés et le récepteur principal de la voie *PTCH1* était surexprimé (Tableau 18, Figure 35). Toutes ces dérégulations étaient identiques dans les cellules épithéliales alvéolaires dérivées de cancers. Chez l'homme, les ligands *DHH* et *IHH*, le récepteur *PTCH2*, l'activateur transcriptionnel *GLI2* et l'inhibiteur *KCTD11* étaient surexprimés et *SMO* et *GLI3* étaient sous exprimés (Tableau 18, Figure 35). L'expression des gènes était très proche dans les échantillons lépidiques et papillaires.

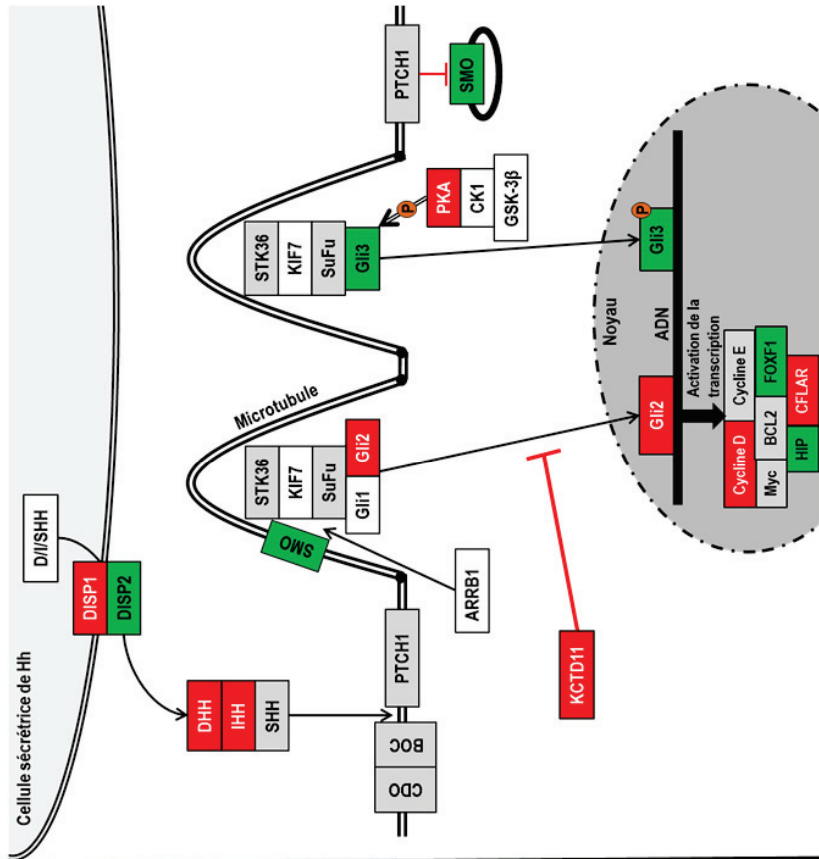
De façon intéressante, trois gènes avaient une expression similaire entre les adénocarcinomes lépidiques humains et ovins : les gènes *SMO*, *GLI3* et *FOXF1* (gène cible de la voie Hedgehog) étaient sous exprimés (Tableau 18).

	Mouton	Homme
<i>DISP1</i>	=	↗
<i>DISP2</i>	∅	↘
<i>SHH</i>	↘	=
<i>DHH</i>	∅	↗
<i>IHH</i>	=	↗
<i>CDO</i>	∅	=
<i>BOC</i>	↘	=
<i>PTCH1</i>	↗	=
<i>PTCH2</i>	∅	↗
<i>SMO</i>	↘	↘
<i>KIF7</i>	∅	∅
<i>STK36</i>	=	=
<i>SuFu</i>	∅	=
<i>Gli1</i>	∅	∅
<i>Gli2</i>	∅	↗
<i>Gli3</i>	↘	↘
<i>ARRB1</i>	↗	↘
<i>ARRB2</i>	↘	=
<i>PKA</i>	∅	↗
<i>CK1</i>	=	=
<i>GSK3b</i>	=	=
<i>KCTD11</i>	=	↗
<i>Cycline D</i>	↘	↗
<i>Cycline E</i>	↗	=
<i>Myc</i>	↗	=
<i>HIP</i>	↗	↘
<i>BCL2</i>	=	=
<i>CFLAR</i>	=	↗
<i>FOXF1</i>	↘	↘

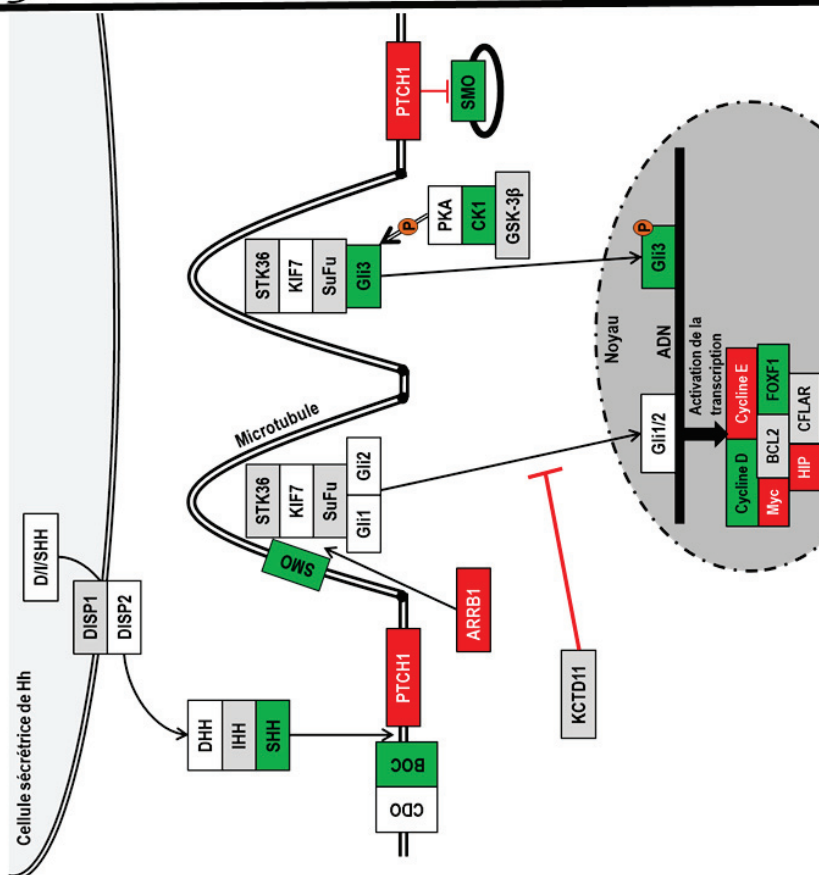
Tableau 18 : Expression des gènes de la voie Hedgehog dans les adénocarcinomes pulmonaires ovins et humains.

ADENOCARCINOME LEPIDIQUE

HOMME



MOUTON



Sous exprimé
Sur exprimé
Stable
Inconnu

→ Activation
⊥ Inhibition

Figure 35 : Dérégulation de la voie de signalisation Hedgehog dans les adénocarcinomes lépidiques ovins et humains.

III.2.3. NOTCH

L'analyse de l'expression des gènes de la voie NOTCH portait sur 55 gènes principaux de la voie. Parmi ces gènes, 22 étaient dérégulés dans les adénocarcinomes pulmonaires ovins et 24 étaient dérégulés dans les adénocarcinomes lépidiques humains (Tableau 19). Chez le mouton, les gènes de la voie semblaient majoritairement sous exprimés. En effet, les ligands *DLL4*, *JAG1* et *JAG2*, les récepteurs *NOTCH1*, *NOTCH3* et *NOTCH4* étaient sous exprimés dans les cancers pulmonaires ovins alors qu'un des inhibiteurs de la voie, *DLK1* était surexprimé (Tableau 19, Figure 36). Au niveau des gènes cibles de la voie, *HES1*, gène dont la transcription dépend majoritairement de la voie NOTCH était sous exprimés dans les cancers pulmonaires ovins. La sous expression de *JAG1*, *JAG2*, *NOTCH1* et *HES1* était également retrouvée dans les AECII dérivées de poumons ovins tumoraux. L'effecteur permettant l'activation de la transcription des gènes cibles *RBPJK* était, lui, surexprimé dans les cancers pulmonaires ovins. Chez l'homme, il ne semblait pas y avoir une sous expression aussi nette des gènes activateurs de la voie NOTCH. En effet, le ligand *DLL3* et le récepteur *NOTCH3* étaient surexprimés alors que l'inhibiteur *DLK1* était sous exprimé (Tableau 19, Figure 36). Au niveau des gènes cibles, *HES1* était surexprimé et *HES5* était sous exprimé dans les adénocarcinomes lépidiques humains. Peu de différences d'expression ont été observées entre les échantillons lépidiques et les échantillons papillaires.

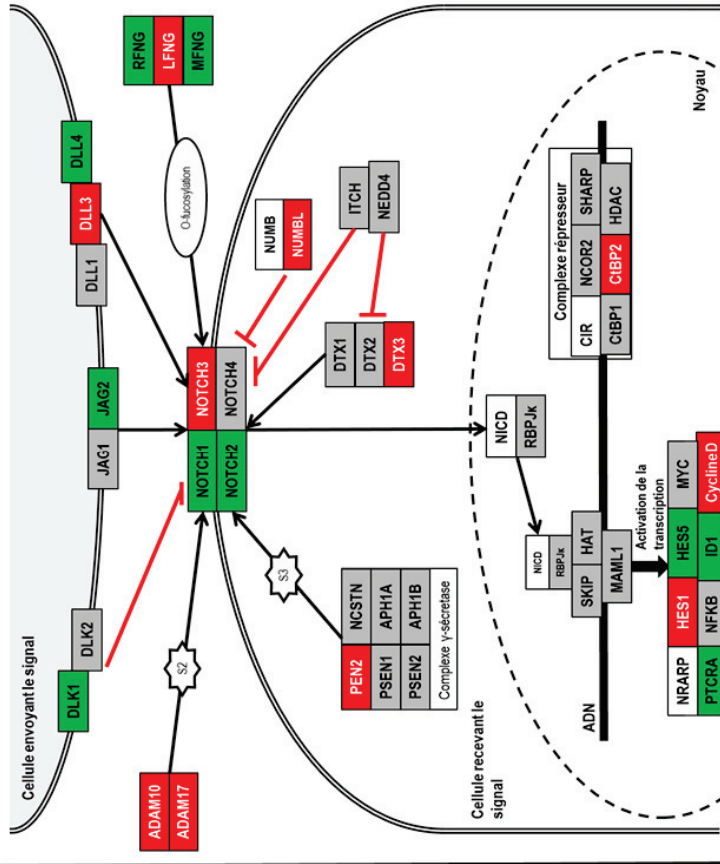
De façon intéressante, cinq gènes avaient une régulation identique entre les cancers lépidiques ovins et humains. Il s'agissait des deux ligands *DLL4* et *JAG2*, du récepteur *NOTCH1* et des gènes codant pour Fringe, *LFNG* et *MFNG*, induisant une O-fucosylation de NOTCH ce qui facilite la fixation des ligands sur le récepteur. *DLL4*, *JAG2*, *NOTCH1* et *MFNG* étaient sous exprimés et *LFNG* était surexprimé.

	Mouton	Homme		Mouton	Homme
<i>DLL1</i>	∅	=	<i>NCOR2</i>	∅	=
<i>DLL3</i>	∅	↗	<i>CtBP1</i>	∅	=
<i>DLL4</i>	↘	↘	<i>CtBP2</i>	=	↗
<i>JAG1</i>	↘	=	<i>CIR</i>	↗	∅
<i>JAG2</i>	↘	↘	<i>SHARP</i>	=	=
<i>DLK1</i>	↗	↘	<i>HDAC1</i>	=	=
<i>DLK2</i>	=	=	<i>HDAC2</i>	=	↗
<i>NOTCH1</i>	↘	↘	<i>HDAC3</i>	↗	=
<i>NOTCH2</i>	=	↘	<i>HDAC5</i>	=	=
<i>NOTCH3</i>	↘	↗	<i>HDAC7A</i>	↘	↘
<i>NOTCH4</i>	↘	=	<i>HDAC8</i>	=	↘
<i>NUMB</i>	=	=	<i>HDAC10</i>	=	=
<i>NUMBL</i>	↘	↗	<i>HES1</i>	↘	↗
<i>DTX1</i>	=	=	<i>HES5</i>	∅	↘
<i>DTX2</i>	↗	=	<i>Myc</i>	↗	=
<i>DTX3</i>	∅	↗	<i>Cycline D</i>	↘	↗
<i>ITCH</i>	↘	=	<i>ID1</i>	=	↘
<i>NEDD4</i>	↘	=	<i>NRARP</i>	↘	∅
<i>MFNG</i>	↘	↘	<i>NFKB</i>	=	=
<i>LFNG</i>	↗	↗	<i>PTCRA</i>	∅	↘
<i>RFNG</i>	=	↘			
<i>ADAM10</i>	=	↗			
<i>ADAM17</i>	∅	↗			
<i>PEN2</i>	=	↗			
<i>PSEN1</i>	=	=			
<i>PSEN2</i>	∅	=			
<i>NCSTN</i>	=	=			
<i>APH1A</i>	=	=			
<i>APH1B</i>	∅	=			
<i>RBPJk</i>	↗	=			
<i>MAML1</i>	=	=			
<i>MAML2</i>	=	=			
<i>MAML3</i>	∅	=			
<i>SKIP</i>	∅	=			
<i>HAT</i>	↗	=			

Tableau 19 : Expression des gènes de la voie NOTCH dans les adénocarcinomes pulmonaires ovins et humains.

ADENOCARCINOME LEPIDIQUE

HOMME



MOUTON

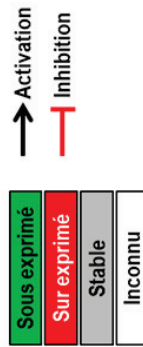
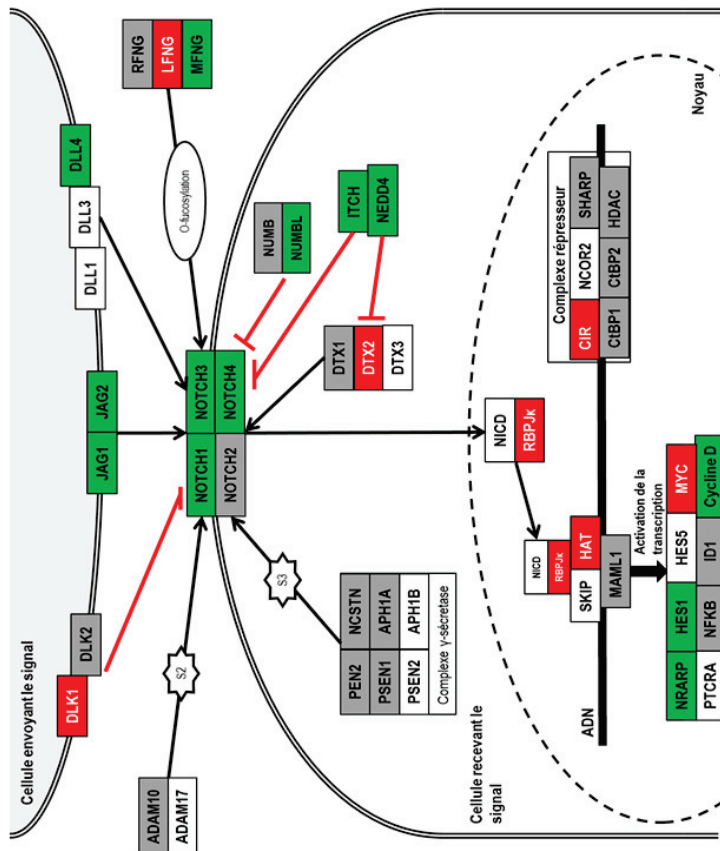


Figure 36 : Dérégulation de la voie de signalisation NOTCH dans les adénocarcinomes lépidiques ovins et humains.

III.2.4. WNT

Sur les 84 gènes impliqués dans la voie WNT, 33 étaient dérégulés chez le mouton et 40 chez l'homme (Tableau 20).

Dans les adénocarcinomes pulmonaires ovins, sur les 62 gènes dont la régulation de l'expression était connue, 14 gènes étaient surexprimés et 19 gènes étaient sous exprimés (Tableau 20 ; Figure 37). Les ligands *WNT2B*, les récepteurs *FZD1*, *4*, *7*, *9* et *10*, le corécepteur *LRP5*, les inhibiteurs *DKK2*, *3* et *4*, *SFRP2*, *WISE* et le gène codant pour la protéine impliquée dans le complexe de dégradation de l'effecteur de la voie *CTNNB1*, la *Diversin*, faisaient partie des gènes sous exprimés. Au contraire, *WNT6*, *FZD2*, *CTNNB1*, *SFRP1*, *SFRP4*, et les gènes cibles *MYC*, *MMP7* et *CD44* étaient surexprimés. De façon intéressante, la sous expression de *WNT2B*, *FZD1*, *FZD7*, *FZD10*, *DKK3*, *DKK4*, *SFRP2* et de la *Diversin* ainsi que la surexpression de *MMP7* et *CD44* étaient retrouvées dans les cellules épithéliales alvéolaires de type II dérivées de cancers. Chez l'homme, la régulation de l'expression de tous les ligands WNT et des récepteurs FZD était connue (Tableau 20). Sur les 18 ligands WNT, 6 étaient sous exprimés dont *WNT2*, *WNT5A* et *WNT7A* et 3 étaient surexprimés dont *WNT2* et sur les 10 récepteurs FZD, seul *FZD7* était sous exprimé et *FZD3* et *FZD5* étaient surexprimés. L'effecteur de la voie *CTNNB1* était surexprimé. Dans les échantillons papillaires, 48 gènes sur 84 analysés avaient une expression similaire aux échantillons lépidiques.

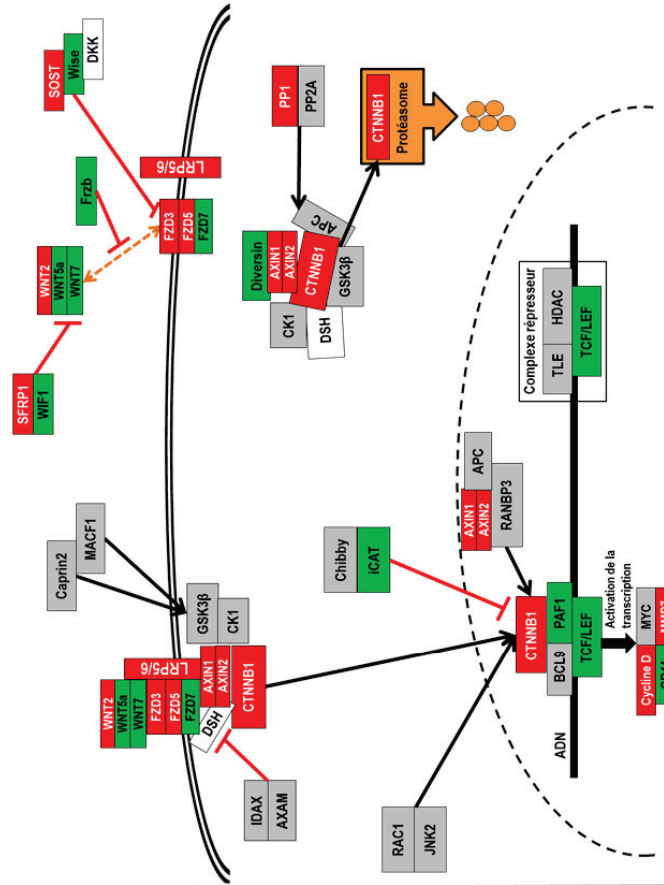
De façon intéressante, de nombreux gènes de la voie WNT avaient un niveau d'expression identique entre cancers lépidiques ovins et humains (Tableau 20) : *FZD7* et *CTNNB1* étaient respectivement sous et surexprimés dans ces deux cancers. D'autres gènes tels que les inhibiteurs *DKK3*, *SFRP1*, *SFRP2* et *SFRP4*, la *Diversin* et le gène cible de la voie *MMP7* avaient également la même régulation dans les adénocarcinomes lépidiques humains et ovins.

	Mouton	Homme		Mouton	Homme
WNT1	∅	=	AXAM	=	=
WNT2	∅	↗	NKD1	=	∅
WNT2B/13	↘	=	DKK1	=	↗
WNT3	∅	=	DKK2	↘	=
WNT3A	∅	=	DKK3	↘	↘
WNT4	∅	↗	DKK4	↘	=
WNT5A	∅	↘	WIF1	∅	↘
WNT5B	∅	↘	SFRP1	↗	↗
WNT6	↗	↗	SFRP2	↘	↘
WNT7A	∅	↘	SFRP4	↗	↗
WNT7B	∅	=	SFRP5	∅	↗
WNT8A	∅	↘	FRZB	↗	↘
WNT9A/14	∅	↘	Wise	↘	↘
WNT9B/15	∅	=	SOST	=	↗
WNT10A	∅	=	PP1	↗	↗
WNT10B	=	=	PP2A	=	=
WNT11	=	↘	MACF1	↘	=
WNT16	∅	=	Caprin2	∅	=
FZD1	↘	=	Chibby	∅	=
FZD2	↗	=	iCAT	↗	↘
FZD3	=	↗	RANBP3	=	=
FZD4	↘	=	RAC1	=	=
FZD5	∅	↗	JNK2	=	=
FZD6	∅	=	Diversin	↘	↘
FZD7	↘	↘	BCL9	=	=
FZD8	∅	=	PAF1	=	↘
FZD9	↘	=	Pygopus	∅	=
FZD10	↘	=	TCF1/TCF7	↗	↘
CTNNB1	↗	↗	TCF3/TCF7L1	=	↘
DSH	=	∅	TCF4/TCF7L2	↘	=
NKD1	∅	=	LEF1	↗	=
LRP5	↘	↗	HDAC1	=	=
LRP6	∅	↗	HDAC2	=	↗
LGR4	↘	=	HDAC3	↗	=
LGR5	∅	=	HDAC5	=	=
LGR6	=	=	HDAC7A	↘	↘
APC	↘	=	HDAC8	=	↘
Axin 1	=	↗	HDAC10	=	=
Axin 2	=	↗	Myc	↗	=
GSK3b	↗	=	Cycline D	↘	↗
CK1	=	=	MMP7	↗	↗
IDAX	∅	=	CD44	↗	↘

Tableau 20 : Expression des gènes de la voie WNT dans les adénocarcinomes pulmonaires ovins et humains.

ADENOCARCINOME LEPIDIQUE

HOMME



MOUTON

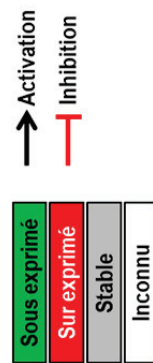
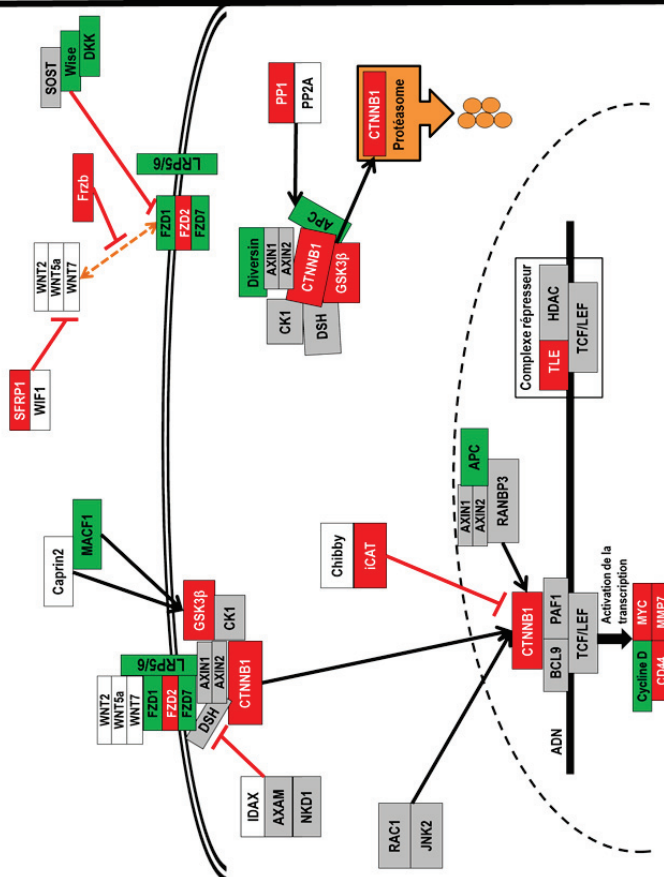


Figure 37 : Dérégulation de la voie de la signalisation WNT dans les adénocarcinomes lépidiques ovins

III.2.5. Angiogenèse et lymphangiogenèse

Nous avons analysé l'expression de 43 des gènes intervenant dans la voie de l'angiogenèse. Vingt-six gènes avaient une expression dérégulée chez le mouton et 29 gènes avaient une expression dérégulée chez l'homme.

De manière générale, dans les adénocarcinomes lépidiques humains et ovins, les gènes de la voie de l'angiogenèse étaient sous exprimés. Chez le mouton, les ligands *VEGFA*, *VEGFC* et *VEGFD* et les récepteurs *VEGFR2* et *VEGFR3* étaient sous exprimés ainsi que les autres activateurs de la voie, les PDGF/PDGRs et les ANGPT/ANGPTRs (Tableau 21, Figure 38). Les molécules agissant sur la dégradation de la matrice extracellulaire étaient dérégulées avec une sous expression de la métalloprotéase *MMP2* et la surexpression de *MMP9* et de son inhibiteur *TIMP1*. Les inhibiteurs de l'angiogenèse, *COL18A1*, les *THBS1* et *THBS3* étaient sous exprimés et *THBS2* était surexprimé. *HIF1 α* , facteur de transcription stabilisé en cas d'hypoxie et activateur de l'expression de *VEGFA* était surexprimé dans les cancers ovins. Les mêmes régulations de l'expression ont été retrouvées dans les cellules épithéliales alvéolaires de type II pour tous les ligands VEGF et le récepteur *VEGFR1*. C'était également le cas pour les gènes *MMP2*, *MMP9*, le récepteur *PDGFRB* et les inhibiteurs de l'angiogenèse, *COL18A1* et *THBS1*. Chez l'homme, les principaux acteurs de la voie VEGF étaient dérégulés avec la sous expression de *VEGFC*, *VEGFD*, *VEGFR1* et *VEGFR3* (Tableau 21, Figure 38). Les gènes de la voie de l'angiopoiétine étaient également sous exprimés. Les gènes *VEGFA*, *MMP9*, *TIMP1*, *PDGFB*, *PDFGC* étaient, eux, surexprimés. De nombreuses similarités ont été observées entre les adénocarcinomes lépidiques et les adénocarcinomes papillaires, *VEGFC* et *VEGFD*, *VEGFR1* et *VEGFR3*, *ANGPT1* et *ANGPT2* et *THBS1* étaient sous exprimés et *TIMP1*, *PDGF-C*, *PDGFR-L*, *THBS2* et *THBS3* étaient surexprimés dans les deux sous-types histologiques.

L'expression des gènes de la voie de l'angiogenèse était très proche entre les adénocarcinomes lépidiques humains et ovins. En effet, sur les 42 gènes, 15 avaient une régulation de l'expression similaire entre ces deux adénocarcinomes dont la sous expression de *VEGFC*, *VEGFD*, *VEGFR3*, *MMP2*, *PDGFRA* et la voie de l'angiopoiétine et la surexpression de *MMP9*, *TIMP1*, *PDGFRL*.

	Mouton	Homme		Mouton	Homme
<i>VEGFA</i>	↓	↑	<i>IL-8</i>	∅	↓
<i>VEGFB</i>	↑	=	<i>endostatine</i>	↓	↓
<i>VEGFC</i>	↓	↓	<i>THBS1</i>	↓	↓
<i>VEGFD</i>	↓	↓	<i>THBS2</i>	↑	↑
<i>VEGFR1</i>	↑	↓	<i>THBS3</i>	↓	↑
<i>VEGFR2</i>	↓	=	<i>THBS4</i>	=	↓
<i>VEGFR3</i>	↓	↓			
<i>FGF1</i>	=	=			
<i>FGF2</i>	∅	=			
<i>FGFR1</i>	↑	=			
<i>FGFR2</i>	=	↑			
<i>PI3K</i>	=	↓			
<i>AKT</i>	=	=			
<i>mTOR</i>	=	↑			
<i>RAS</i>	=	=			
<i>RAF</i>	↓	=			
<i>MEK</i>	↓	=			
<i>ERK</i>	=	=			
<i>MMP2</i>	↓	↓			
<i>MMP9</i>	↑	↑			
<i>TIMP1</i>	↑	↑			
<i>PLAU</i>	=	↓			
<i>PAI1</i>	∅	↑			
<i>eNOS</i>	=	↓			
<i>HSP90</i>	=	↑			
<i>HIF1A</i>	↑	=			
<i>PDGF-A</i>	↓	=			
<i>PDGF-B</i>	↓	↑			
<i>PDGF-C</i>	∅	↑			
<i>PDGF-D</i>	∅	=			
<i>PDGFR-A</i>	↓	↓			
<i>PDGFR-B</i>	=	=			
<i>PDGFR-L</i>	↑	↑			
<i>ANGPT1</i>	↓	↓			
<i>ANGPT2</i>	↓	↓			
<i>TIE1</i>	↓	↓			
<i>TIE2</i>	↓	↓			

Tableau 21 : Expression des gènes de la voie de l'angiogenèse dans les adénocarcinomes pulmonaires ovins et humains.

ADENOCARCINOME LEPIDIQUE

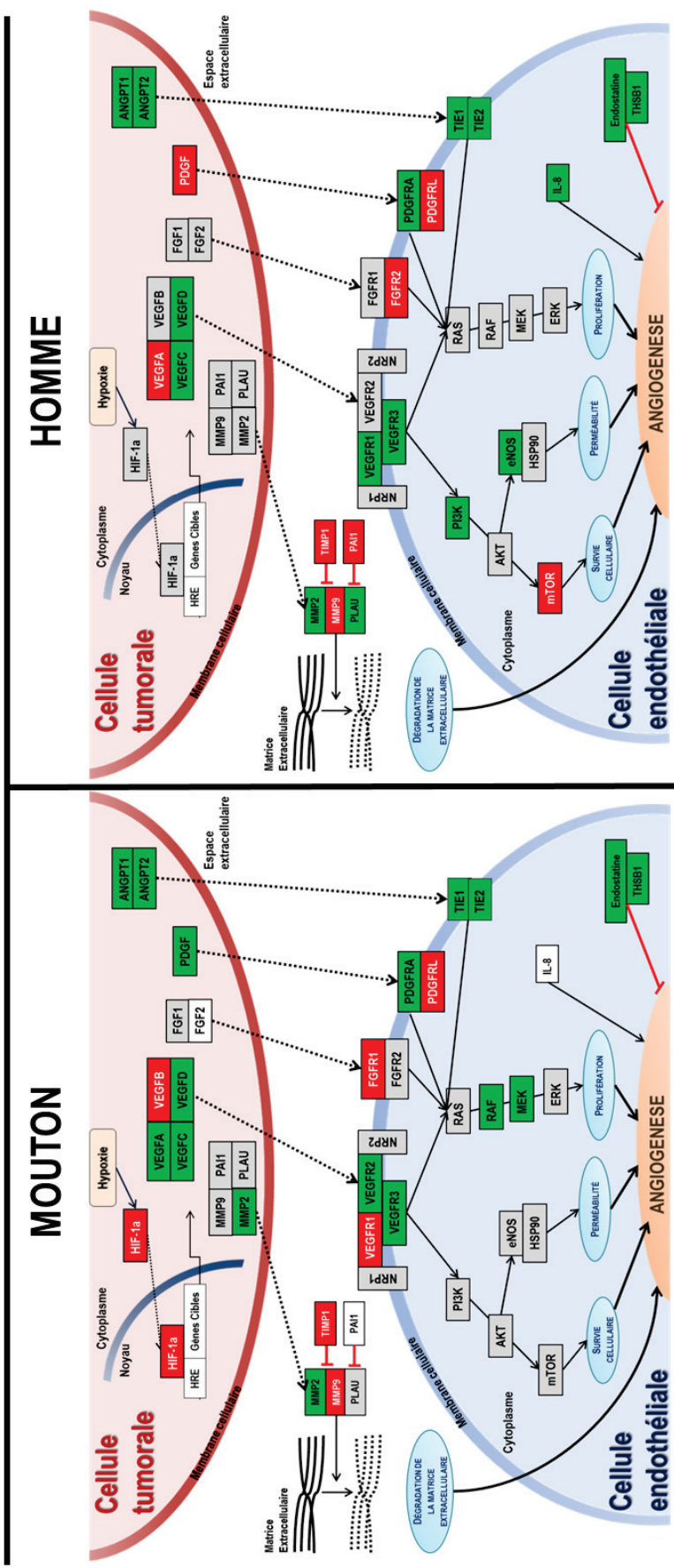


Figure 38 : Dérégulation de la voie de l'angiogenèse dans les adénocarcinomes lépidiques ovins et humains.

IV. Discussion

L'objectif de l'étude était d'analyser les profils d'expression des gènes impliqués dans les mécanismes de transformation potentiels des cellules tumorales induisant des lésions lépidiques et dans la dissémination des cellules tumorales au sein de l'organisme, c'est-à-dire les voies BMI1, NOTCH, Hedgehog, WNT, de l'angiogenèse et de la lymphangiogenèse. Pour cela, nous avons réalisé des puces transcriptomiques sur des tumeurs lépidiques humaines et ovines.

L'analyse de ces puces humaines et ovines a permis de mettre en évidence de nombreuses dérégulations dans l'expression globale des gènes et a permis de différencier les échantillons tumoraux des échantillons normaux lors du clustering des échantillons pulmonaires en fonction de l'expression de leurs gènes. Chez le mouton, 23 et 19% des gènes surexprimés appartenaient aux voies de l'inflammation et du métabolisme cellulaire et 15% des gènes sous exprimés appartenaient à la voie de l'adhésion cellulaire. L'inflammation et l'augmentation ou le changement de métabolisme cellulaire font partis des caractéristiques des cancers comprenant entre autre, l'angiogenèse ou l'immortalité des cellules tumorales (198). L'inflammation, en situation non cancéreuse, est un moyen de défense face à des agressions extérieures telles que la présence d'un pathogène ou d'un traumatisme et ne perdure que le temps de l'élimination du pathogène ou du traumatisme. Les cancers, au contraire, activent l'inflammation et celle-ci persiste permettant la sécrétion de cytokines et de facteurs de croissance favorisant le développement des cancers (357). Ceci a également été observé dans les cancers pulmonaires (99). Une augmentation ou un changement de métabolisme des cellules tumorales peut être déterminant pour l'activation ou non de l'angiogenèse tumorale (6). Ainsi, cette augmentation de l'expression des gènes impliqués dans l'inflammation et dans le métabolisme des cellules tumorales est cohérente avec le cancer pulmonaire ovin. Bien que l'adénocarcinome pulmonaire ovin ne se dissémine pas en dehors du poumon, il a la capacité de l'envahir entièrement (353). Cela ne peut se faire que si les cellules épithéliales tumorales perdent leur capacité d'adhésion entre elles et à la membrane basale soutenant l'épithélium pulmonaire (551). La diminution de l'expression des gènes impliqués dans l'adhésion cellulaire expliquerait cette invasion des cellules tumorales dans le poumon. Chez l'homme, des dérégulations de l'expression des gènes intervenant dans les mouvements cellulaires, les cancers, les interactions et mouvements entre cellules sont également en cohérence avec le cancer pulmonaire lépidique.

Lors de l'analyse détaillée des voies de signalisation BMI1, NOTCH, Hedgehog, WNT et de l'angiogenèse dans les adénocarcinomes lépidiques humains et animaux, nous avons mis en évidence de nombreuses dérégulations dans l'expression des gènes entre tumeurs et poumons normaux. Chez le mouton, l'expression des gènes dans les AECII dérivées de poumons tumoraux ovins a montré que plus de la moitié des gènes avaient une régulation de l'expression identique avec les poumons tumoraux. Ceci indique une régulation de l'expression spécifique des AECII pour ces gènes. Chez l'homme, en plus de l'analyse des adénocarcinomes de type lépidiques, nous avons également analysé les dérégulations de l'expression des gènes au sein de zones tumorales de type papillaire. Lors du clustering des échantillons par l'expression des

gènes, il a été possible de classer les échantillons entre normal et tumoral mais il a été impossible de faire la différence entre échantillons lépidiques et papillaires. De plus, lors de l'analyse des voies de signalisation BMI1, NOTCH, Hedgehog, WNT et de l'angiogenèse, environ la moitié des gènes avaient une régulation identique entre échantillons lépidiques et papillaires. Les tumeurs pulmonaires humaines utilisées pour l'analyse du transcriptome étaient des adénocarcinomes lépidiques prédominants présentant également des zones papillaires et n'étaient pas des adénocarcinomes papillaires. Il est possible que ce soit la raison du peu de différence dans l'expression des gènes entre zones lépidiques et papillaires. En dehors des adénocarcinomes lépidiques, les autres cancers pulmonaires forment des métastases (68). Les tumeurs analysées n'étaient pas métastatiques expliquant pourquoi l'expression des gènes de la voie de l'angiogenèse était peu différente entre les deux sous-types d'adénocarcinomes.

Ce travail s'inscrit de façon inédite dans un modèle de pathologie comparée entre les deux tumeurs lépidiques humaines et animales. Ainsi, une comparaison des régulations de l'expression des gènes entre ces adénocarcinomes a été réalisée. Lors de la comparaison de l'expression des gènes des voies de signalisation, 5/8 avaient une expression identique entre tumeurs humaines et ovines pour la voie BMI1, 7/20 avaient une expression identique pour la voie Hedgehog, 19/41 avaient une expression identique pour la voie NOTCH, 24/55 avaient une expression identique pour la voie WNT, 20/38 avaient une régulation identique pour la voie de l'angiogenèse. Trente-sept de ces gènes sur soixante-quinze ayant une régulation identique entre tumeurs humaines et ovines étaient stables. De par leur stabilité dans les adénocarcinomes lépidiques humains et ovins, ces gènes, comme ceux n'ayant pas les mêmes régulations, ne semblent pas être responsables spécifiquement des lésions lépidiques. Au contraire, les trente-huit gènes ayant des régulations identiques sont particulièrement intéressants dans le contexte de la pathologie cancéreuse.

La voie BMI1 active la transition épithélio-mésenchymateuse et l'invasion des cellules par l'inhibition de CDH1. Dans les adénocarcinomes lépidiques, CDH1 était surexprimé et l'un de ces inhibiteurs, SNAI2 était sous exprimé. Dans des lignées de cancers pulmonaires, une forte expression de CDH1 indique un phénotype épithélial et une forte expression de SNAI2, un phénotype mésenchymateux (13). Dans les adénocarcinomes lépidiques humains et ovins, la forte expression de CDH1 et la faible expression de SNAI2 indique qu'il n'y aurait pas eu de transition épithélio-mésenchymateuse et que les cellules tumorales seraient de phénotype épithélial et non mésenchymateux. Ceci ne favorise pas l'invasion des cellules tumorales à travers la membrane basale. Les régulations des gènes de cette voie sont cohérentes avec les adénocarcinomes lépidiques.

L'analyse de la voie Hedgehog dans les cancers lépidiques était particulièrement intéressante car une augmentation de l'expression protéique de Sonic Hedgehog était corrélée à des tumeurs pulmonaires de type lépidiques et à des tumeurs pulmonaires mutées pour *EGFR* sur une cohorte de 166 adénocarcinomes (261). Lors de l'analyse des transcriptomes humains et ovins, il était difficile de voir une régulation franche, c'est-à-dire une sur ou sous expression des gènes de la voie, dans les deux cancers lépidiques. En effet, chez le

mouton, SHH était sous exprimé et chez l'homme, SHH était stable et les autres ligands Hedgehog, IHH et DHH étaient surexprimés ; l'expression de l'activateur GLI1 était inconnue. De plus, la plupart des gènes ayant une régulation de l'expression identique entre mouton et homme étaient stables. Les trois autres gènes, SMO, GLI3 et FOXF1, étaient sous exprimés. La surexpression ou des mutations activatrices de SMO sont responsables des cancers (517). Se faisant, SMO a été la première cible thérapeutique et des inhibiteurs de SMO ont été testés chez l'homme (431). Ici, SMO était sous exprimé remettant en question l'utilisation de ces thérapies dans les adénocarcinomes lépidiques. GLI3 est un répresseur transcriptionnel de la voie Hedgehog, sa sous expression n'est pas à lui seul un indicateur de l'activation de la voie, à la différence de GLI1 (261). FOXF1, un des gènes cibles de la voie Hedgehog, est exprimé dans plus de 70% des cancers pulmonaires non à petites cellules et son expression est corrélée à la présence de métastases dans les ganglions lymphatiques (182). L'expression de FOXF1 était sous exprimé dans nos données transcriptomiques humaines et ovines, cette sous expression est cohérente avec les cancers lépidiques non métastatiques.

La voie NOTCH peut avoir un rôle oncogénique comme montré dans les leucémies ou un rôle de suppresseur de tumeurs comme montré dans les cancers de la peau (422). L'expression de DLL4, NOTCH1 et 3 dans les cancers pulmonaires non à petites cellules est facteur de mauvais pronostic (141, 200). Un des gènes cibles de la voie NOTCH, HES1 est un répresseur transcriptionnel et est impliqué dans la dissémination des cellules tumorales, les métastases et la résistance aux chimiothérapies (308). Dans nos données transcriptomiques, une diminution de l'expression de nombreux ligands et récepteurs tels que les ligands *JAG1* et 2 et le récepteur *NOTCH1* était observé. C'était également le cas pour *HES1* indiquant une sous expression de la voie NOTCH. Ainsi, dans les adénocarcinomes lépidiques ovins, la voie NOTCH ne semble pas activée. Chez l'homme, globalement, moins de gènes étaient sous exprimés mais DLL4, JAG2 et NOTCH1 l'étaient, comme dans les tumeurs ovines. Au contraire, NOTCH3 et HES1 étaient surexprimés indiquant un potentiel rôle de ce récepteur et de ce répresseur transcriptionnel dans le cancer humain qui ne serait pas spécifique du sous type lépidique.

La voie WNT permet l'activation de gènes impliqués dans divers cancers par la stabilisation de CTNNB1 qui, à son tour, active des cibles tels que la cycline D et c-MYC, importants pour la prolifération cellulaire (476). WNT2, WNT3, WNT5A, WNT7A et WNT11 sont surexprimés dans les cancers pulmonaires non à petites cellules (476). L'un des problèmes majeurs dans l'analyse de l'expression des gènes de la voie WNT chez le mouton était le manque de données d'expression des ligands WNT sur les puces transcriptomiques ne donnant pas assez d'informations pertinentes sur la régulation de leur expression. Il est donc impossible de comparer les niveaux de régulation des ligands WNT entre les cancers humains et ovins. Sur les quatre présents dans les données transcriptomiques ovines, WNT6 et WNT10B avaient une régulation identique entre mouton et zone lépidiques humaines. Chez l'homme, les ligands WNT3, WNT5A, WNT7A et WNT11 étaient soit stables soit sous exprimés et seul WNT2 était surexprimé comme dans de nombreux cancers pulmonaires non à petites cellules. Une augmentation de l'expression de nombreux récepteurs FZD est impliquée dans de nombreux cancers (476). Dans les données transcriptomiques ovines et humaines, le seul

récepteur FZD7 était sous exprimé chez l'homme comme chez le mouton. Dans les cancers, dont les cancers pulmonaires, c'est l'augmentation de l'expression de FZD7 et par son intermédiaire l'activation de la voie WNT qui est responsable de la prolifération des cellules cancéreuses (263). Il ne semble donc pas que FZD7 ait un rôle dans les cancers pulmonaires lépidiques humains et ovins. De façon intéressante, CTNNB1, le facteur de transcription permettant la transcription des gènes cibles de la voie WNT est surexprimé aussi bien dans les cancers lépidiques humains qu'ovins. Le rôle de CTNNB1 dans les cancers pulmonaires peut être double. En effet, dans de nombreux cancers pulmonaires, une augmentation de l'expression de CTNNB1 permet l'augmentation de la prolifération des cellules tumorales mais parfois une perte d'expression de CTNNB1 est associée à une croissance tumorale (197, 476). L'accumulation de CTNNB1 dans les cancers tend à indiquer une activation de la voie WNT mais il est également important de vérifier sa localisation cellulaire puisque ce n'est que dans le noyau que CTNNB1 joue son rôle de facteur de transcription. Il est difficile d'établir un rôle précis de la présence de CTNNB1 dans les cancers pulmonaires car sa surexpression peut être ou non de mauvais pronostic pour les patients (161). Cependant, cette augmentation de l'expression de CTNNB1 confirme ce qui avait été observé dans les tumeurs pulmonaires murines induites par JSRV où une augmentation de CTNNB1 avait été observée (516).

L'adénocarcinome pulmonaire ovin et l'adénocarcinome lépidique humain sont deux cancers pulmonaires non métastatiques. L'angiogenèse et la lymphangiogenèse jouent un rôle déterminant dans la dissémination des cellules et des métastases ; ainsi connaître l'état de régulation de l'expression des gènes de ces voies peut nous éclairer sur l'absence de métastases de ces deux cancers. Chez le mouton, de nombreux gènes de la voie VEGF étaient sous exprimés dont les deux plus importants pour l'angiogenèse, VEGFA et VEGFR2. Lorsque ces deux gènes ne sont pas exprimés, l'angiogenèse n'est pas activée (282). Le gène HIF1 α , facteur de transcription activant l'expression de VEGFA, est surexprimée dans les poumons tumoraux indiquant la présence d'une hypoxie cellulaire et pourtant HIF1 α ne semble pas activer l'expression de VEGFA. La régulation d'HIF1 α se fait au niveau protéique avec stabilisation de la protéine en cas d'hypoxie et envoi de la protéine vers le protéasome en condition normale (403). Il est possible que l'augmentation des messagers dans les tissus tumoraux ne soit pas une indication de la présence de la protéine dans ces tissus pulmonaires tumoraux. Chez l'homme comme chez le mouton, les couples ligands récepteurs VEGF activateurs de la lymphangiogenèse, VEGFC et VEGFD/VEGFR3 étaient sous exprimés. Ces couples sont essentiels pour l'activation de la lymphangiogenèse tumorale (564). Ainsi, avec ces données d'expression, nous avons un premier indice quant à la raison de l'absence de métastases extra-thoraciques dans les adénocarcinomes lépidiques. De plus, parmi les voies annexes activatrices de l'angiogenèse, les gènes de la voie ANGPT/TIE étaient sous exprimés n'indiquant aucune compensation par cette voie dans les adénocarcinomes lépidiques. Cette voie est habituellement fréquemment sur exprimée dans les cancers pulmonaires non à petites cellules et la surexpression de ANGPT2, par exemple corrèle avec une issue clinique plus défavorable (559). Parmi les gènes ayant une même régulation entre cancers humains et ovins étaient retrouvés les gènes impliqués dans la dégradation de la matrice extracellulaire permettant la croissance des vaisseaux sanguins en direction de la

tumeur. Dans les cancers pulmonaires, une surexpression de MMP9 et MMP2 était observée et leur expression est facteur de mauvais pronostic (153, 454). Dans les adénocarcinomes lépidiques humains et ovins, MMP9 était surexprimé tout comme son inhibiteur TIMP1 mais MMP2 était sous exprimé. L'augmentation de MMP9 est peut être contrebalancée par l'augmentation de la présence de son inhibiteur TIMP1.

En conclusion de cette analyse, nous avons observé de nombreuses dérégulations dans l'expression des gènes dans les adénocarcinomes lépidiques humains et ovins. L'analyse en détail de l'expression des gènes des voies NOTCH, WNT et Hedgehog ont mis en évidence des régulations similaires dans l'expression de certains gènes de ces voies indiquant majoritairement des sous expressions. Cependant, les nombreuses différences d'expression des gènes de ces voies indique que celles-ci ne sont pas spécifiques des adénocarcinomes lépidiques. Au contraire, l'analyse de la voie BMI1 et de l'angiogenèse a permis d'établir une première hypothèse quant à l'absence de métastases extra-thoraciques dans les adénocarcinomes lépidiques. En effet, l'expression des gènes de la voie BMI1 n'indique pas d'activation de la transition épithélio-mésenchymateuse et celle de la voie de l'angiogenèse et de la lymphangiogenèse n'indique pas non plus d'activation de ces deux voies aussi bien chez l'homme que chez le mouton. C'est pourquoi nous avons choisi d'analyser plus en détail et sur un nombre d'échantillons plus important la voie de l'angiogenèse et de la lymphangiogenèse dans les adénocarcinomes lépidiques humains et ovins afin de confirmer les régulations similaires dans l'expression des gènes permettant de valider le potentiel blocage de la voie de l'angiogenèse mis en évidence par l'analyse transcriptomique.

La voie VEGF/VEGFR impliquée dans l'angiogenèse est dérégulée dans les adénocarcinomes lépidiques humains et ovins

I. Etat de l'art

Les cancers se développent lors de la dérégulation de processus cellulaires multiples tels que la résistance à la mort cellulaire, la non réponse aux suppresseurs de croissance et l'inflammation (198). L'angiogenèse et la lymphangiogenèse sont deux voies essentielles pour la dissémination des cellules tumorales de la tumeur primitive aux organes où elles s'implanteront pour former les métastases. L'angiogenèse est la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux sanguins existants et est un processus hautement régulé (384). Ce mécanisme cellulaire est crucial pour la progression des cancers et est une cible majeure dans le développement de thérapies anticancéreuses (195). Quand la voie de l'angiogenèse est activée, les cellules cancéreuses communiquent avec les cellules endothéliales par l'intermédiaire de facteurs pro-angiogéniques qui activent la prolifération des cellules endothéliales. L'activation de l'angiogenèse est contrôlée par le relargage de nombreux médiateurs intercellulaires par les cellules cancéreuses. La voie de signalisation principale pour l'activation de l'angiogenèse est déclenchée par les VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) et leur fixation sur les VEGFR. Les ligands VEGFA, B, C et D sont sécrétés par les cellules cancéreuses et leurs récepteurs, VEGFR1, R2 et R3 sont exprimés à la surface des cellules endothéliales (465). La fixation des ligands VEGF sur leurs récepteurs VEGFR induit la dimérisation, l'autophosphorylation de ces récepteurs et l'activation d'une cascade de phosphorylation aboutissant à la prolifération et la migration des cellules endothéliales (465). VEGFA a été le premier ligand VEGF identifié et il est exprimé par de nombreux types de cellules, y compris dans les cancers (9). VEGFA est l'activateur principal de l'angiogenèse ; ainsi le couple ligand/récepteur VEGFA/VEGFR2 est clé pour l'activation de l'angiogenèse (282). VEGFA stimule la croissance du réseau vasculaire qui permet la croissance cellulaire et est souvent surexprimé dans les cancers (9). La lymphangiogenèse participe à la dissémination des cellules cancéreuses par l'activation de la croissance des vaisseaux lymphatiques lors de l'interaction entre les ligands VEGFC et VEGFD et leur récepteur VEGFR3 exprimé à la surface des cellules endothéliales lymphatiques. VEGFC et VEGFD peuvent également activer l'angiogenèse par l'intermédiaire de leur fixation sur VEGFR2 (564). Les NRP1 et 2 (Neuropiline 1 et 2), deux corécepteurs des VEGFR, permettent la potentialisation de la fixation entre les ligands VEGF et leurs récepteurs (425). La dégradation de la matrice extracellulaire est essentielle pour la croissance et la progression des cancers par l'intermédiaire d'activités protéolytiques qui facilitent la croissance ou la dissémination des vaisseaux sanguins et lymphatiques au sein des tumeurs primaires (384). L'activité des protéases dégradant la matrice extracellulaire est très contrôlée en conditions normales. En situation cancéreuse, les cellules ont la capacité d'activer les activités protéolytiques de PLAU (Plasminogen Activator Urokinase), MMP (Matrix Metalloproteinase) 2 et 9, impliquées dans la dégradation de la matrice extracellulaire pendant le processus d'invasion des cellules cancéreuses et l'angiogenèse (130, 351).

SERPINE1 (Serpine family E member 1) et TIMP1 (Tissue Inhibitor of MetalloProteinase 1) sont les inhibiteurs de PLAU et de MMP9 respectivement. D'autres voies de signalisation sont impliquées dans la régulation de l'angiogenèse telles que la voie FGF contrôlée par les ligands FGF (Fibroblast Growth Factor) et leurs récepteurs (62).

L'adénocarcinome pulmonaire ovin est un cancer pulmonaire viro-induit touchant les moutons et les chèvres. Le β -rétrovirus JSRV (Jaagsiekte Sheep RetroVirus), responsable du cancer, est transmis par les aérosols, le lait, le colostrum et *in utero* (110, 190). JSRV infecte et transforme les cellules par l'intermédiaire de son enveloppe portant les propriétés oncogéniques du virus. JSRV transforme les cellules épithéliales du poumon profond, c'est-à-dire, les cellules épithéliales alvéolaires de type II dans les alvéoles et les cellules Club dans les bronchioles. L'adénocarcinome pulmonaire ovin est cliniquement, radiologiquement et histologiquement similaire à l'adénocarcinome lépidique prédominant de type pneumonique (132, 349, 353). Les lésions lépidiques consistent en la prolifération des cellules tumorales le long de la paroi alvéolaire sans destruction de l'architecture alvéolaire et sans invasion stromale, pleurale ou vasculaire. Les adénocarcinomes lépidiques prédominants touchent plus les non-fumeurs, les femmes et les patients jeunes que les autres types de cancers pulmonaires (59). Ce sont des cancers à croissance lente et, comme les adénocarcinomes pulmonaires ovins, les métastases sont rares. La plupart des cancers pulmonaires sont invasifs (111) et l'activation de l'angiogenèse dans ces cancers est associée à un mauvais pronostic (446). Ainsi, l'absence de métastases dans les adénocarcinomes lépidiques ovins et humains nous a amené à étudier la voie de l'angiogenèse dans ces deux cancers.

Nos résultats ont montré une sous expression des gènes clés de l'angiogenèse dans les cancers pulmonaires ovins induits par JSRV. Aucune expression protéique n'a été observée pour le ligand VEGFA et son récepteur VEGFR2 dans ces cancers et l'expression en ARNm des gènes *VEGFB* et *VEGFD* était significativement réduite. L'expression de l'inhibiteur des métalloprotéases TIMP1 était augmentée. Dans les adénocarcinomes lépidiques prédominants humains, des résultats similaires ont été observés avec une faible expression protéique de VEGFA et l'absence d'expression de son récepteur VEGFR2. L'expression en ARNm de *VEGFD*, *FGF2*, *MMP2*, *NRP1* et *NRP2* était diminuée dans les adénocarcinomes lépidiques prédominants par rapport aux poumons normaux. La sous expression des gènes clés de l'angiogenèse pourrait contribuer au contrôle de l'invasion extra-thoracique des cellules cancéreuses dans les adénocarcinomes lépidiques humains et ovins.

II. Article 1 : Accepted in Veterinary Research

Expression of key genes of the angiogenic pathway is blocked in JSRV-induced lepidic lung adenocarcinomas

Maryline Gomes¹, Fabienne Archer ¹, Nicolas Girard ^{1,2}, Barbara Gineys ¹, Christine Dolmazon ¹,
Alexandra Erny ¹, Jean-François Mornex ^{1,2}, Caroline Leroux ^{1*}

¹ IVPC UMR754, INRA, Univ Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, EPHE, PSL Research University, LYON, France. ² Hospices Civils de Lyon, Louis Pradel Hospital, Department of Respiratory Diseases

maryline.gomes@etu.univ-lyon1.fr;

fabienne.archer@univ-lyon1.fr,

nicolas.girard@chu-lyon.fr;

barbara.gineys@univ-lyon1.fr;

christine.dolmazon@univ-lyon1.fr;

alexandra.erny@univ-lyon1.fr

mornex@univ-lyon1.fr

caroline.leroux@univ-lyon1.fr

*Corresponding author: caroline.leroux@univ-lyon1.fr

Abstract

JSRV (Jaagsiekte Sheep Retrovirus) is a retrovirus inducing a transmissible lung adenocarcinoma in sheep and goats with predominantly lepidic lesions. This naturally occurring lung cancer in large animals shares many features with human pneumonic-type lung adenocarcinomas with predominant lepidic growth. The metastatic spread is rare in both the human and animal cancers. This unique feature prompted us to decipher the angiogenesis pathway in these cancers. We focused on the levels of mRNAs and proteins of genes implicated in the extension of JSRV-induced lung adenocarcinomas by studying their expression in lung cancers (n=10) and normal lungs (n=10) and in primary epithelial alveolar type II cells derived from cancers (n=10) or normal lungs (n=6). In parallel we evaluated the levels of expression of key genes in lung tissues collected from lepidic (n=13) or papillary (n=5) adenocarcinomas and, when available, adjacent normal lungs (n=11). We measured the expression of the same key genes implicated in angiogenesis, lymphangiogenesis and degradation of the extracellular matrix. In animal lepidic adenocarcinomas, *VEGFR2* and *VEGFD* mRNAs were downregulated in cancers; *MMP9*, *TIMP1* and *FGFR2* mRNAs were overexpressed as compared to normal lungs. Importantly; VEGFA and VEGFR2 proteins were not expressed in JSRV-induced cancers. In human lepidic adenocarcinomas, *VEGFA* and *VEGFR2* mRNAs were weakly expressed and no VEGFR2 protein was detectable. Downregulation of key angiogenic players may contribute to the control of extrathoracic invasion of cancer cells in human and ovine pneumonic-type adenocarcinoma with predominant lepidic growth.

Keywords: lung, retrovirus, VEGF, lepidic, PTLA, JSRV

Introduction

Cancers develop as the result of deregulation of multiple cell processes such as resistance to cell death, independence from growth suppressors and inflammation (198). Angiogenesis and lymphangiogenesis mechanisms are involved in the spreading of cancer cells. Angiogenesis is the neo-formation of blood vessels from pre-existing ones and is a highly-regulated mechanism (384). This cell mechanism is crucial for the extension of cancers and is a major target for drug development (195). When angiogenic pathways are activated, cancer cells communicate with endothelial cells through pro-angiogenic factors that activate the proliferation of endothelial cells. Activation of angiogenesis is controlled by the release of a wide array of intercellular mediators by cancer cells. The main angiogenesis signaling pathway is triggered by VEGFs (Vascular Endothelial Growth Factor) and ligation to the VEGF receptors. While VEGFA, B, C and D are secreted by cancer cells, their receptors VEGFR1, R2 and R3 are expressed at the surface of endothelial cells (465). Ligands bind to their receptors inducing their dimerization and auto-phosphorylation; the activation of signal transduction results in endothelial cell survival and expression of genes involved in cell proliferation (465). VEGFA was the first-identified member of the VEGF family and is expressed by various cell types including cancer cells (9). VEGFA is the main inducer of angiogenesis and of proliferation and migration of cancer cells; thereby the VEGFA/VEGFR2 complex is a key player for the activation of angiogenesis (282). VEGFA stimulates the growth of the vascular network that supports cancer growth and metastasis and is often up-regulated in cancers (9). On the other hand, lymphangiogenesis participates in dissemination of cancer cell by its activation of the growth of lymphatic vessels through the interaction of VEGFC or VEGFD ligands with VEGFR3 receptors expressed at the surface of lymphatic endothelial cells. VEGFC and VEGFD can also activate angiogenesis through their interaction with VEGFR2 (564). NRP1 and NRP2 (Neuropilin 1 and 2) are VEGFR co-receptors that potentiate VEGF fixation on VEGFRs (425). Finally, the degradation of the extracellular matrix is essential for cancer growth and progression through proteolytic activities that facilitate the growth or spread of new blood and lymphatic vessels into the primary cancer (384). The activity of extracellular matrix proteases is under tight control in normal conditions but cancer cells are prone to activate the proteolytic activities of PLAU (Plasminogen Activator Urokinase), MMP (Matrix Metalloproteinase) 2 and 9, involved in extracellular matrix degradation during cancer invasion process and angiogenesis (130, 351). *SERPINE1* (Serpin family E member 1) and TIMP1 (Tissue Inhibitor of MetalloProteinase 1) are inhibitors of PLAU and MMP9 respectively. Other pathways are implicated in the regulation of angiogenesis such as the FGF pathway controlled by FGF (Fibroblast Growth Factor) ligands and their receptors (62).

Ovine pulmonary adenocarcinoma is a virally induced lung cancer affecting sheep and goats. The JSRV (Jaagsiekte Sheep RetroVirus) β -retrovirus responsible for the disease is transmitted by aerosols, milk, colostrum and *in utero* (110, 190). JSRV infects and transforms cells through its envelope, carrying the oncogenic properties. The retrovirus solely transforms epithelial cells from the distal lung namely AECII (Alveolar Epithelial type II Cells) in the alveoli and Club cells in the bronchiole. Ovine pulmonary adenocarcinoma shares striking similarities with human pneumonic-type lung adenocarcinoma (PTLA) with

predominant lepidic growth (132, 349, 353). This growth pattern refers to the lining of cancer cells along the alveolar septa without disorganization of the alveolar architecture and with no evidence of stromal, vascular or pleural invasion. Lepidic adenocarcinomas affects more non-smokers, women and young subjects than other lung adenocarcinomas (59). These cancers are slow-growing and, as with ovine pulmonary adenocarcinoma, metastatic spread is rare. This unique feature prompted us to decipher the angiogenesis pathway in the animal and human lepidic adenocarcinomas especially when considering that most lung cancers in humans are highly invasive (111) and that the activation of angiogenesis is associated with a poor prognosis (446).

Our data showed that the expression of key genes implicated in angiogenesis were dramatically downregulated in JSRV-induced lung cancers. Protein expression of VEGFA and of its receptor VEGFR2 was almost abolished in cancers while *VEGFB* and *VEGFD* mRNA expression were significantly reduced. At the same time, expression of *TIMP1*, inhibiting the metalloproteinases, was increased. Similarly, VEGFA was weakly expressed and VEGFR2 was not expressed in human lepidic adenocarcinomas. Moreover, mRNA expression *VEGFD*, *FGF2* *MMP2*, *NRP1* and *NRP2* was decreased in lepidic adenocarcinomas when compared to the normal lungs. Downregulation of key angiogenic players may contribute to the control of extrathoracic invasion of cancer cells in lepidic adenocarcinomas both in sheep and humans.

Materials and methods

Biological materials

Ovine pulmonary adenocarcinoma specimens were collected *post mortem* from twenty-five spontaneously infected sheep with clinical evidence of lung cancer obtained from flocks in the Southern France and from twenty-one sheep without clinical signs of cancer obtained from the Corbas slaughterhouse, nearby Lyon (France) (Table 1). Formal authorization for accessing the facilities was obtained and access was granted under the supervision of a veterinarian. None of the animals used in this study were engaged in an experimental protocol. Clinical status was confirmed by the presence of gross lesions and by the detection of JSRV genome using semi-nested PCR with primers located in *env* and LTR regions, generated from sequences of field isolates as previously described (350). All cancer samples were positive for JSRV DNA integration and were lepidic predominant with papillary subtypes. When possible, primary alveolar epithelial type II cells (AECII) were derived from the tissues. Seventeen primary AECIIs have been obtained from lung cancers and sixteen from normal lungs (Table 1). The derived ovine AECII have been phenotypically characterized for the expression of pro-SP-C and cytokeratin and cultured as previously described (16). As much as possible, we studied the mRNA and protein expression in lungs and lung-derived AECIIs from the same animals; unfortunately, due to the limited number of primary cells directly derived from cancer or normal lungs, this was not possible in all cases. When necessary, we used AECII from other animals from our biobank.

Table 1: Lung samples from sheep with or without pulmonary adenocarcinomas. Lungs were obtained from slaughterhouse or flocks with endemic cases of cancers. For these reasons, the data collected were incomplete. "-": missing data.

With lesion of pulmonary adenocarcinoma					Without lesion				
Studied samples					Studied samples				
#	Sex	Age (Month)	Lung	AECII	#	Sex	Age (Month)	Lung	AECII
1167	F	60	No	Yes	1010	-	< 6	Yes	Yes
1171	F	-	No	Yes	1011	-	< 6	Yes	Yes
1220	F	-	No	Yes	1045	-	ND	No	Yes
1221	F	-	No	Yes	1124	-	< 6	No	Yes
1295	F	72	No	Yes	1169	-	< 1	No	Yes
1296	F	24	No	Yes	1223	-	< 6	Yes	Yes
1297	F	15	No	Yes	1224	-	< 6	Yes	Yes
1298	F	15	No	Yes	1472	-	< 6	No	Yes
1468	F	-	No	Yes	1486	-	< 1	No	Yes
1481	-	-	No	Yes	1487	-	< 1	Yes	Yes
1482	F	-	No	Yes	1507	-	< 1	No	Yes
2055	-	-	Yes	No	1508	-	< 1	No	Yes
2334	F	-	Yes	No	1823	-	< 6	Yes	No
2335	-	-	Yes	No	1824	-	< 6	Yes	No
2339	M	-	Yes	No	1825	-	< 6	Yes	No
2369	F	-	Yes	No	2340	-	< 6	Yes	No
2371	F	-	Yes	No	2355	-	< 6	Yes	No
2433	-	-	Yes	Yes	2645	-	< 6	No	Yes
2374	-	-	No	Yes	2649	-	< 6	No	Yes
2434	F	18	Yes	No	2650	-	< 6	No	Yes
2436	-	-	Yes	Yes	2652	-	< 6	No	Yes
2479	F	-	Yes	No					
2528	M	-	No	Yes					
2529	M	-	No	Yes					
2585	M	12	No	Yes					

Human lung specimens from eighteen patients (thirteen lepidic and five papillary adenocarcinomas) and their associated data were obtained from Cardiobiotec Biobank (CRB-HCL Hospices Civils de Lyon BB-0033-00046), a center for biological resources authorized by the French Ministry of Social Affairs and Health. All samples were collected and used in accordance with the ethical rules of the Biobank and in agreement with the French legislation. All patients signed a written informed consent. When available in the Biobank, adjacent normal lung was collected and analyzed (Table 2).

Table 2: Lung samples from human lung adenocarcinomas. ND: not determined (or not known). NA: not applicable. TNM: Tumor Node Metastasis staging. * Lesions from patient 975 were described as predominantly lepidic with a contingent of acinar lesions; the TNM was not determined.

	#	Sex	Age (years)	TNM	Mutation status						Mucine status	Analyzed tissues	
					EGFR	KRAS	BRAF	ERBB2	PIK3CA	ALK		Tumoral	Normal
LEPIDIC	923	Female	50	T1bN0M0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	Nonmucinous	Yes	No
	974	Male	58	T4N0M0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	Unspecified	Yes	No
	975	Female	79	*	ND	ND	ND	ND	ND	ND	Mucinous	Yes	No
	979	Female	76	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	Unspecified	Yes	No
	1030	Female	53	T1bN0M0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	Unspecified	Yes	No
	1042	Male	40	T1bN0M0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	Unspecified	Yes	No
	2363	Male	53	T2bN0M0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	Unspecified	Yes	No
	2532	Female	66	T1aN0M0	-	+	-	-	-	-	Nonmucinous	Yes	Yes
	2533	Male	78	T3N0M0	-	-	+	-	-	-	Mucinous	Yes	Yes
	2534	Male	46	T1bN0M0	-	+	-	-	-	-	Nonmucinous	Yes	Yes
	2535	Female	76	T1aN0M0	-	-	-	-	-	-	Nonmucinous	Yes	Yes
	2537	Male	62	T2aN0M0	-	ND	+	-	-	-	Nonmucinous	Yes	Yes
2538	Male	54	T2bN0M0	-	+	-	-	-	-	Mixed	Yes	Yes	
PAPILLARY	2536	Female	54	T3N2M0	-	ND	+	-	-	-	Mucinous	Yes	Yes
	2539	Male	61	T3N0M0	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	Yes	Yes
	2540	Male	61	T3N1M0	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	No	Yes
	2541	Male	63	T1N0M0	-	-	-	-	-	-	ND	Yes	Yes
	2542	Female	51	T1N0M0	-	-	+	-	-	-	ND	Yes	Yes
	2543	Female	83	T2bN2M0	-	-	+	-	-	ND	ND	Yes	No

Expression of genes involved in angiogenesis, lymphangiogenesis and degradation extracellular-matrix

Total RNAs from twenty ovine and twenty-nine human lung tissues were extracted using the “RNeasy Plus Universal Mini” kit (Qiagen) and total RNAs from ovine primary AECII (n=16) were extracted using the “PureLink RNA mini” kit and treated with the “Turbo DNA free” kit (Ambion) as recommended. One microgram of total RNAs was reverse transcribed using the “iScript cDNA synthesis” kit (Biorad) and the cDNAs amplified using the “KAPA SYBR® FAST Universal qPCR kit” (Clinisciences) in triplicates using a MiniOpticon thermocycler (Biorad) with an initial denaturation step at 95°C for 3 minutes, followed by 40 cycles of 5s at 95°C and 20s at 60°C. The melting curves were obtained by a temperature increase from 60°C to 95°C with fluorescence

reading every 0.5°C. The primers for genes coding for ligands (*VEGFA*, *VEGFB*, *VEGFC*, *VEGFD*, *FGF1*, *FGF2*), receptors (*VEGFR1*, *VEGFR2*, *VEGFR3*, *FGFR1*, *FGFR2*, *NRP1*, *NRP2*), peptidases and peptidase inhibitors (*MMP2*, *MMP9*, *PLAU*, *TIMP1*, *SERPINE1*) and reference genes (*PPIA*, *PSMB2*, *RPS11*, *YWHAZ*) (supplementary data, table 1) were designed with Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) from available GenBank sequences with a primer spanning an exon-exon junction or with forward and reverse primers into two different exons to avoid interfering amplifications from residual DNA. They allowed the amplification of small fragments from 100 to 200bp. Primer efficiency was tested and validated for each primer set using a five-point dilution series of cDNA. All primer efficiency was between 95% and 110%.

Three reference genes (Table 1 in Supporting Information) have been selected to normalize expression of the genes of interest. Their stability had been evaluated with the geNorm software (514). The *PPIA*, *PSMB2* and *YWHAZ* genes have been selected as the most stable reference genes for ovine RNAs, and *PPIA*, *PSMB2* and *RPS11* as the most stable ones for human RNAs (Table 1 in Supporting Information). All three genes for each species were used for the normalization. Normalized relative expression levels were calculated with the $2^{-\Delta\Delta Cq}$ method (409).

Viral quantification of JSRV in lungs and AECII

JSRV RNAs were extracted, reversed transcribed and amplified as described in the previous paragraph. JSRV RNAs were quantified by RT-qPCR using primers specific of the exogenous JSRV, located at the end of the *env* gene (forward primer 5'- GAGTTGAAATGCTGCATATG -3') and the LTR (reverse primer 5'- GGATTCTTACACAATCACC -3') used to amplify a 287 bp amplicon (350). Primer efficiency was validated. A standard curve has been generated with known number of DNA copies of the target deleted of 50 bp cloned in a pCR2.1 plasmid (ThermoFisher). The standard curve and the mRNA samples to be tested were amplified using the "KAPA SYBR® FAST Universal qPCR kit" (Clinisciences). JSRV RNA loads were expressed as the number of viral RNA per ng of total RNA.

Analysis of VEGFA and VEGFR2 protein expression

Total proteins were extracted from ovine and human lung tissues and ovine primary cells. Prior to extraction, lung tissues were dissociated in T-PER lysis buffer (ThermoScientific) using the "FastPrep" device (MP Biomedicals) as recommended. After an incubation of 30 minutes on ice, lysates were disrupted by four sonication cycles for 20 seconds at 300 W (Bioblock, Fisher Scientific). Supernatants were collected by centrifugation, and their protein contents quantified using the "Quick Start™ Bradford 1X Dye Reagent" kit (Biorad) as recommended. After heat denaturation, 15-20 µg of total proteins were separated by electrophoretic migration on SDS-PAGE and transferred onto a nitrocellulose membrane. The membranes were pre-incubated with TBST-milk (25 mM Tris pH 7.6; 0.15 M NaCl; 0.05% Tween 20, 5% non-fat dry milk) for 1 hour at room temperature. After three washes in TBST, membranes were incubated overnight at 4°C with specific antibodies.

The VEGFA and VEGFR2 proteins were detected with a 1/500 dilution in TBST-milk of rabbit anti-VEGFA antibodies (ab46154, Abcam) and of rabbit anti-VEGFR2 antibodies (ab39256, Abcam). After three washes with TBST, membranes were incubated for 1 hour at room temperature with a 1/10000 dilution of anti-rabbit IgG (whole molecule)-peroxidase antibodies (A0545, Sigma). Detection of β -actin (A3854, Sigma) was performed as a loading control. Immunoreactive bands were detected using the SuperSignal West Pico reagent (ThermoFisher). Detection of VEGFA and VEGFR2 was repeated three times and the protein expression was semi-quantified by densitometry using the image processing software UN-SCAN-IT™ (Silk Scientific Corporation).

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using Wilcoxon, Student or Welsh tests using R software (<https://www.R-project.org>). All tests were done with a significance threshold of 0.05.

Results

The VEGF pathway is downregulated in JSRV-induced adenocarcinomas

We analyzed the levels of mRNA expression of *VEGFA* using RT-qPCR and its protein expression by Western blot in normal lungs, cancers, and lung-derived AECII. The level of *VEGFA* mRNA was not significantly altered in JSRV-induced cancers or derived-AECII when compared to normal samples (Fig 1). Interestingly, the expression of *VEGFA* protein was abolished in most cancers (90%), while the protein was expressed in 80% normal lungs (Figs 2A and 2C). AECII derived from normal lungs or cancers both expressed *VEGFA* at a similar level (Figs 2B and 2C), suggesting an effect of cell culture condition on *VEGFA* expression.

The mRNA expression of *VEGFR2*, the main receptor of *VEGFA*, was significantly reduced in cancers as compared to normal lungs and undetectable in AECII derived from cancers or normal lungs (Fig 1). Correlating with the decrease of mRNA expression, *VEGFR2* proteins were undetectable in cancers but present in 80% of normal lungs (Figs 2A and 2C). *VEGFR2* protein expression was null in primary AECII derived from normal lungs or cancers (Fig 2B). These results highlight the loss of expression of *VEGFA* and of its main receptor *VEGFR2* in JSRV-induced pulmonary adenocarcinomas.

We measured mRNA expression of *VEGFB*, *VEGFC*, *VEGFD* ligands, of their receptors *VEGFR1*, *VEGFR3* and of their coreceptors *NRP1* and *NRP2*. Except for the expression of *VEGFD*, which was significantly reduced in JSRV-induced adenocarcinomas, none of the other genes were differentially expressed in cancers (Fig 3). Expression of *VEGFB* and *VEGFC* was low to undetectable in most tested tissues (Fig 3A). Expression of the *VEGFR1* and *VEGFR3* receptors (Fig 3B) and *NRP1* and *NRP2* (data not shown) was not modified in JSRV-induced cancers when compared to normal lungs. Expression of *VEGFB* mRNA was significantly reduced by 2.5-fold in primary AECII derived from cancers as compared to cells derived from normal lungs and

VEGFC expression was downregulated in cancer AECII (p-value at 0.056). These results indicate that expression of genes involved in lymphangiogenesis was altered in JSRV-induced lung cancers with *VEGFC* and *VEGFD* under-expressed in cancers as compared to normal lungs.

Expression of genes from the FGF pathway is unchanged in ovine pulmonary adenocarcinoma except for the overexpression of *FGFR2* mRNA.

We analyzed the expression of genes involved in the FGF pathway by quantification of mRNA expression of the *FGF1* and *FGF2* ligands and of their *receptors* (*FGFR1* and *FGFR2*) in lungs and primary AECII. No difference of mRNA expression was measured for *FGF1*, *FGF2* and *FGFR1* between normal lungs and cancers (Fig 4). *FGFR2* mRNAs were over-expressed in cancers when compared to normal lungs (Fig 4B). These results highlight that the FGF pathway was unchanged in ovine pulmonary adenocarcinoma except for the over-expression of *FGFR2*.

The metalloprotease/ antiprotease pathway is impaired in JSRV- induced cancers

Degradation of the extracellular matrix is an important step for cancer extension. Among key genes, mRNA expression of *MMP2*, *MMP9* and *PLAU* peptidases and *TIMP1* and *SERPINE1* peptidase inhibitors has been measured in lungs and AECIIs (Fig 5). No difference in mRNA levels was evidenced in cancers when compared to normal lungs for *MMP2* metalloproteinase, *PLAU* or its inhibitor *SERPINE1* (Fig 5A and 5B). No expression of *MMP9* was observed in normal samples and only four cancers expressed this gene (Fig 5A). Interestingly, *TIMP1*, one of the metallopeptidase inhibitors, was significantly over-expressed in cancers as compared to normal lungs (Fig 5B). Expression of *MMP2* and *MMP9* metalloproteinases was retained in primary normal AECII (Fig 5A). These results suggested that in JSRV-induced lung adenocarcinomas, mRNA expression of *MMP2* and *MMP9* was reduced in cancer-derived AECII, while not statistically significant, compared to AECII derived from normal lungs. We showed that metalloproteinases able to enhance cell migration by degrading the extracellular matrix were not overexpressed in cancer except for *MMP9* and that the expression of *TIMP1*, one of their inhibitors, was increased suggesting a blockade of this pathway leading to the degradation of the extracellular matrix.

JSRV viral load was analyzed by RT-qPCR (Fig 6). Levels of expression of the different ligands and receptor did not correlate with JSRV viral load suggesting that the observed deregulation is part of the tumoral process induced by JSRV but are not directly linked to the retroviral load (data not shown).

Dysregulation of the expression of genes implicated in angiogenesis in human lepidic adenocarcinomas

We evaluated the levels of expression of key genes in lung tissues collected from lepidic or papillary adenocarcinomas and when available adjacent, non-tumoral lungs from the same patients. Unlike JSRV-

induced adenocarcinomas, mRNAs (Fig 7A) and proteins (Fig 7B) of *VEGFA* were expressed in human lepidic adenocarcinomas but at very low levels in cancers and in their normal counterparts. *VEGFA* protein expression was detected in 6/13 lepidic adenocarcinomas, 3/5 papillary adenocarcinoma and 9/11 normal lungs. We did not detect differences in the levels of *VEGFA* mRNAs or proteins between lepidic and papillary adenocarcinomas (Fig 7).

Interestingly, we detected a weak expression (not significant) of *VEGFR2*, the main *VEGFA* receptor, in lepidic and papillary samples compared to normal tissues (Fig 7). No *VEGFR2* protein was detected in lepidic, papillary and normal lung samples (Fig 7). The low mRNA expression of *VEGFA* and the absence of expression of *VEGFR2* in lepidic adenocarcinomas suggested the lack of activation of the angiogenic pathway.

The expression of *VEGFD* and *FGF2* mRNAs was significantly downregulated in lepidic and papillary adenocarcinomas when compared to adjacent normal lung tissues (Fig 8). Interestingly, mRNA expression of the *MMP2*, *NRP1* and *NRP2* genes was lower (but not significantly) in lepidic adenocarcinomas when compared to the normal tissues of the same patients (Fig 8). The same results were observed in papillary samples with *MMP2* mRNA expression significantly lowered in papillary-type cancers when compared to normal lungs (Fig 8). Every other gene analyzed in JSRV induced adenocarcinoma was analyzed in human adenocarcinomas; their expression was not different in cancers and normal lungs (data not shown).

Taking all together, this study showed the absence of significant over-expression of genes implicated in metastasis and/or degradation of the extracellular matrix. On the contrary, we observed decreased mRNA expression of *VEGFD*, *FGF2* and *MMP2* and the absence of *VEGFR2* proteins in human lepidic adenocarcinomas.

Discussion

Lung cancer is not a unique disease and can be divided according to different pathological types and subtypes (507); they may evolve differently in patients and this does influence prognosis and treatment. Most animal models of lung cancers are developed in small rodent. Our work focused on ovine pulmonary adenocarcinoma, a virally-induced lung cancer in large animals, as a model of human lepidic adenocarcinomas with pneumonic presentation. Both cancers share clinical, radiological and pathological similarities (353). Predominantly lepidic pulmonary adenocarcinomas are characterized by their development into the lung parenchyma without evidence of stromal, vascular or pleural invasion (353). Recently, a transgenic mouse model with a JSRV-env transgene was developed and exhibited spontaneous lung adenocarcinomas with a metastatic phenotype (86). These lung cancers were associated with epithelial-mesenchymal transition gene expression regulation. Our work focused on naturally induced lung lepidic adenocarcinomas in sheep and human, two cancers for which metastatic spread is rare suggesting that mouse model may not perfectly reproduce the naturally-induced disease (353).

Similar to normal tissues, cancers need nutrients, oxygen and a way to evacuate metabolic waste to survive. These functions rely on blood and lymphatic vessels. In the peculiar context of a limited extra-thoracic extension of the cancer cells in predominantly lepidic-type adenocarcinomas, we analyzed the expression of genes involved in angiogenesis, lymphangiogenesis and degradation of the extracellular matrix in order to decipher this specific feature and we have conducted a comparative study in human and ovine lung cancers. The analysis of the VEGFA/ VEGFR2 pathway of the main angiogenesis pathway gave some leads to understand these features. We compared the mRNA expression of the genes of interest in lepidic and in papillary subtypes of human lung cancers, and when available in adjacent normal lungs from lepidic-type adenocarcinomas. For the ovine virally-induced adenocarcinomas, we compared tissues from tumors with positive detection of JSRV genome and JSRV-negative tissues without lesions. When available, we measured the mRNA expression in primary alveolar epithelial type II cells, derived from tumoral or normal tissues as previously described (16). We identified modulations of the mRNA and protein levels of key genes that might participate to the limitation of extrathoracic metastatic extension in lepidic adenocarcinoma.

We report the absence of VEGFA proteins in JSRV-induced lepidic adenocarcinomas in sheep, while the mRNA level of VEGFA was maintained and not different in normal lungs and cancers. *VEGFA* is a key gene during the development of vessels during organogenesis or cancer. Its expression is highly regulated at the translational level (18). It has been reported in humans that miRNAs regulated *VEGFA* expression such as miRNA-297, miRNA-299, miRNA-567 and miRNA-609 that are able to control its expression by preventing protein production without inhibition of the transcription (237). The existence and activity of this VEGFA-specific miRNAs have to be explored in sheep but our data might suggest a similar control in small ruminants. Interestingly, VEGFA protein expression was restored in primary cultures of AECII derived from both normal lungs and cancers, proving that these cells retained their potential to produce VEGFA proteins. Our observation may be simply due to the *in vitro* conditions used to culture and maintain the cells, conditions that do not strictly mimic the *in vivo* cancer environment. The miRNA activity may also be only efficient in the cancer context since the microenvironment has been reported as an important factor for miRNAs inhibition of VEGFA in pancreatic or human colon cancers (572).

We analyzed the mRNA expression of *VEGFR2*, a key receptor for angiogenesis. Interestingly, we observed a significant reduction of *VEGFR2* mRNA and protein expression in ovine lung cancers as compared to normal lungs suggesting a negative control of the receptor in JSRV-induced cancers. The VEGFR2 receptor is mainly present at the surface of the endothelial cells and logically, primary AECII did not expressed the proteins while the level of mRNA was low to undetectable. Taken together, without VEGFA and VEGFR2, angiogenesis is not activated (465). Comparatively, we did not see differences of VEGFA expression in human lepidic adenocarcinomas. The VEGFR2 protein was absent in lepidic as well as in papillary adenocarcinomas, while the levels of mRNA stayed very low. To summarize, we showed that the main angiogenesis pathway was blocked in ovine JSRV-induced tumors with the absence of VEGFA and VEGFR2 proteins. In human cancers, VEGFA expression was not altered but VEGFR2 was not expressed. Blocking the VEGFA and VEGFR2 might

contribute to the limitation of extrathoracic dissemination of lepidic adenocarcinomas in humans and animals. These two proteins, essential for angiogenesis, are targeted by anti-metastasis drugs in various cancers including lung cancers (195).

Alternative pathways play a role in angiogenesis. We then analyzed the expression of other genes implicated in angiogenesis, lymphangiogenesis and degradation of the extracellular matrix. Overall, we measured a reduced expression of *VEGFB* mRNA in cancer-derived AECII when compared to cells derived from normal lungs. The expression in tissues was inconstant and low in all cases. Only half of tissues had detectable *VEGFB* mRNA expression. *VEGFB* is a peculiar angiogenesis ligand. It interacts with *VEGFR1* but this interaction does not necessarily activate angiogenesis; the effects of *VEGFB* vary under specific conditions from induction of endothelial cell permeability to anti-growth and anti-angiogenic effects (293). Interestingly, the level of *VEGFD* mRNAs was lower in cancers than in normal lungs both in human and ovine lepidic adenocarcinomas. A significant mRNA down-expression of *VEGFC* and *VEGFD* has been reported in human lung adenocarcinomas (370). In both tumors, the lower expression of *VEGFD* and the stable expression of *VEGFR3* in tumoral tissues when compared to normal tissues might contribute to the control of metastatic extension of the lepidic adenocarcinomas.

Aside from the neo-vascularization, tumoral extension necessitates the degradation of the extracellular matrix by cellular peptidases. We measured mRNAs expression levels of peptidases such as *MMP2* and *MMP9*, *PLAU* and of their inhibitors, *SERPINE1* and *TIMP1*. Less than 50% of the JSRV-induced tumors expressed *MMP9* mRNA, otherwise absent in normal tissues, suggesting a blocking of this protease. But interestingly *TIMP1*, an MMP inhibitor, was strongly expressed in tumors. Besides its inhibitory properties, *TIMP1* can block the response of endothelial cells to angiogenic factors and participate to the inhibition of endothelial cell migration (236). We hypothesized that even if some tumors expressed *MMP9*, the expression of *TIMP1* should block their protease function.

The FGF pathway participates to angiogenesis through its action on cancer cell proliferation (511). Our results showed perturbation of the mRNA expression of *FGF2* and *FGFR2*. The *FGFR2* expression is significantly higher in tumoral lungs than in normal tissues in sheep and the *FGF2* ligand is down regulated in human lepidic tumors. Aside from its role in angiogenesis, *FGFR2* has a role on cell proliferation (511). Our results show that key genes implicated in angiogenesis were impaired during sheep lung tumors and that similar results were obtained when analyzing this pathway in human lepidic adenocarcinoma.

The ovine pulmonary adenocarcinoma is induced by a retrovirus while the etiology of human lepidic adenocarcinoma is still unknown although a viral etiology has been questioned for decades (349). Some oncogenic viruses have the ability to directly activate angiogenesis (528) such as EBV (Epstein Barr Virus), HPV (human papillomavirus) and HBV (hepatitis b virus) that carry viral proteins with proangiogenic activities (283, 312, 359). To explore a potential direct effect of JSRV proteins on the mRNA levels of the studied genes,

we quantified JSRV RNA expression in lungs and AECII of tumoral lungs. We found no correlation between the level of JSRV expression and the observed deregulation in tumoral tissues and AECII.

We performed similar analyses in lepidic adenocarcinoma and papillary adenocarcinomas. The results were comparable: VEGFA and VEGFR2 pattern of expression were similar; *VEGFD*, *FGF2* were significantly downregulated like in lepidic adenocarcinomas and *MMP2* was also significantly downregulated. This may be explained by the non-invasive pattern of the cancers analyzed in our study, as shown by their TNM staging.

Taken together, our results indicate that angiogenesis does not represent a hallmark of human and ovine lepidic adenocarcinoma with predominant lepidic growth. In humans, lepidic adenocarcinoma is a rare lung cancer with no extra thoracic extension. We showed that the absence of VEGFA/ VEGFR2 activation could presumably contribute to the control of extra-thoracic spreading of cancer cells in the virally induced cancer in sheep and in lepidic adenocarcinomas in humans.

The reported benefit of anti-angiogenic agents for the treatment of lung adenocarcinomas at large, may not be observed in the subset of patients with lepidic adenocarcinomas or at least those with no VEGFA and VEGFR2 expression; patients may then avoid potential toxicities that may occur with those agents, that would not be delivered if limited benefit is expected. Ultimately, as we shown, JSRV-induced lung adenocarcinoma which naturally occurs in sheep provides a unique model to help to decipher the specific features of lepidic adenocarcinomas in humans.

Competing interests

The authors declare no conflicts of interest

Funding

The work was funded by grants from the "Plan Cancer 2009-2013" and "Ligue contre le Cancer, Ardèche". MG is the recipient of a PhD fellowship from the "Plan Cancer 2009-2013".

Authors' contributions

MG, FA, CL made substantial contributions to conception design, acquisition, analysis and interpretation of data. BG, CD, and AE made major contributions to data acquisition. MG and CL drafted the manuscript. NG and JFM have been involved in drafting the manuscript and revising it critically. All the authors read and improved the final version of the manuscript and agreed to be accountable for all aspects of the work.

Acknowledgments

We thank François Guiguen, DVM, Jean-Christophe Natorp, DVM, and Rémy Falguière for the collection of tissues. We thank Pr Jacques Cadranet, Dr Madeleine Duc Dodon and Dr Catherine Legras- Lachuer for helpful discussions.

Figures

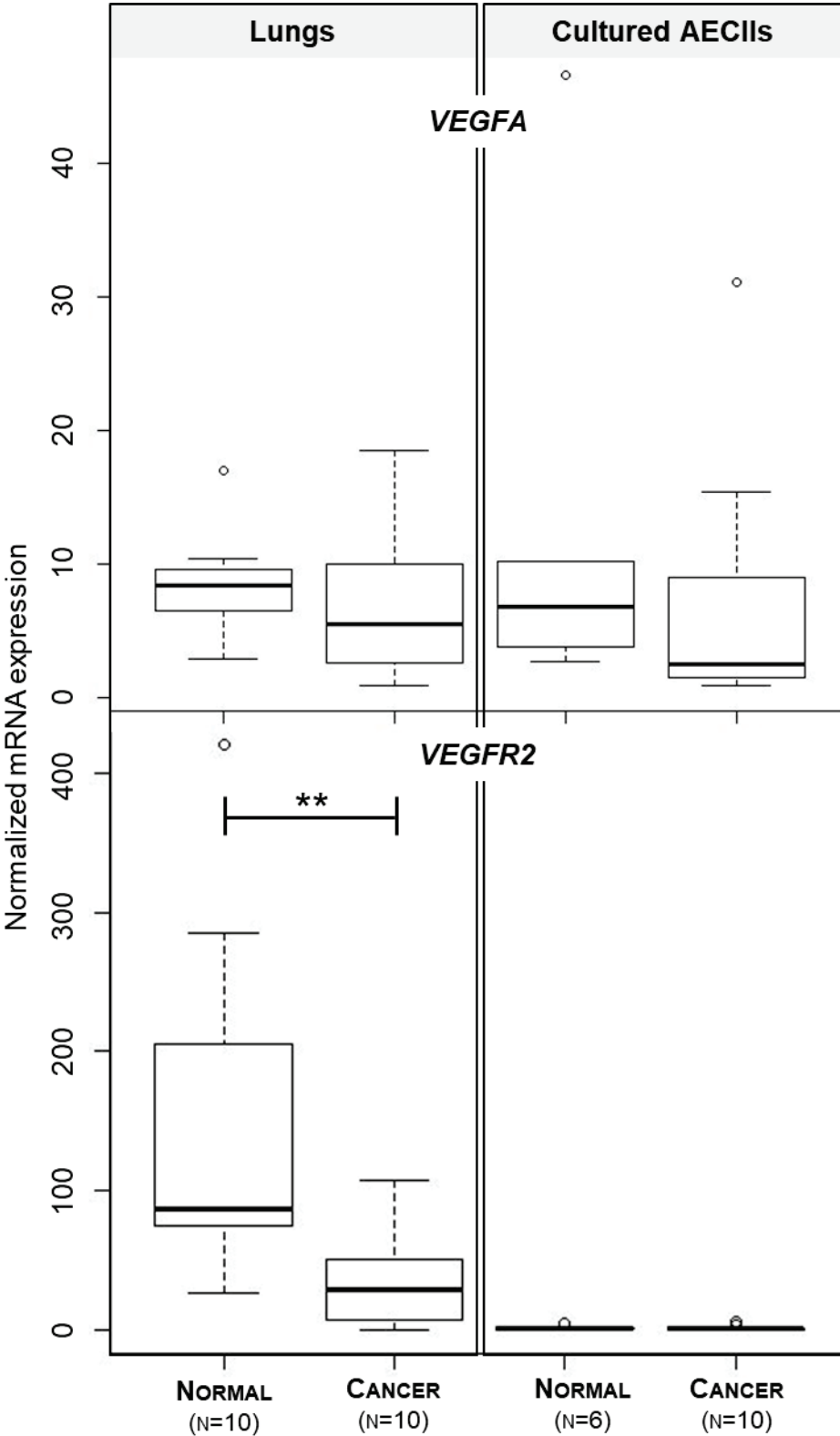


Fig 1. *VEGFA* and *VEGFR2* mRNA expression in JSRV-induced adenocarcinoma. The mRNA expression of ovine *VEGFA* and *VEGFR2* was analyzed by RT-qPCR in lung tissues and lung-derived primary AECII from sheep with or without cancers. Statistical analysis was performed using Wilcoxon test with ** = $p < 0.005$.

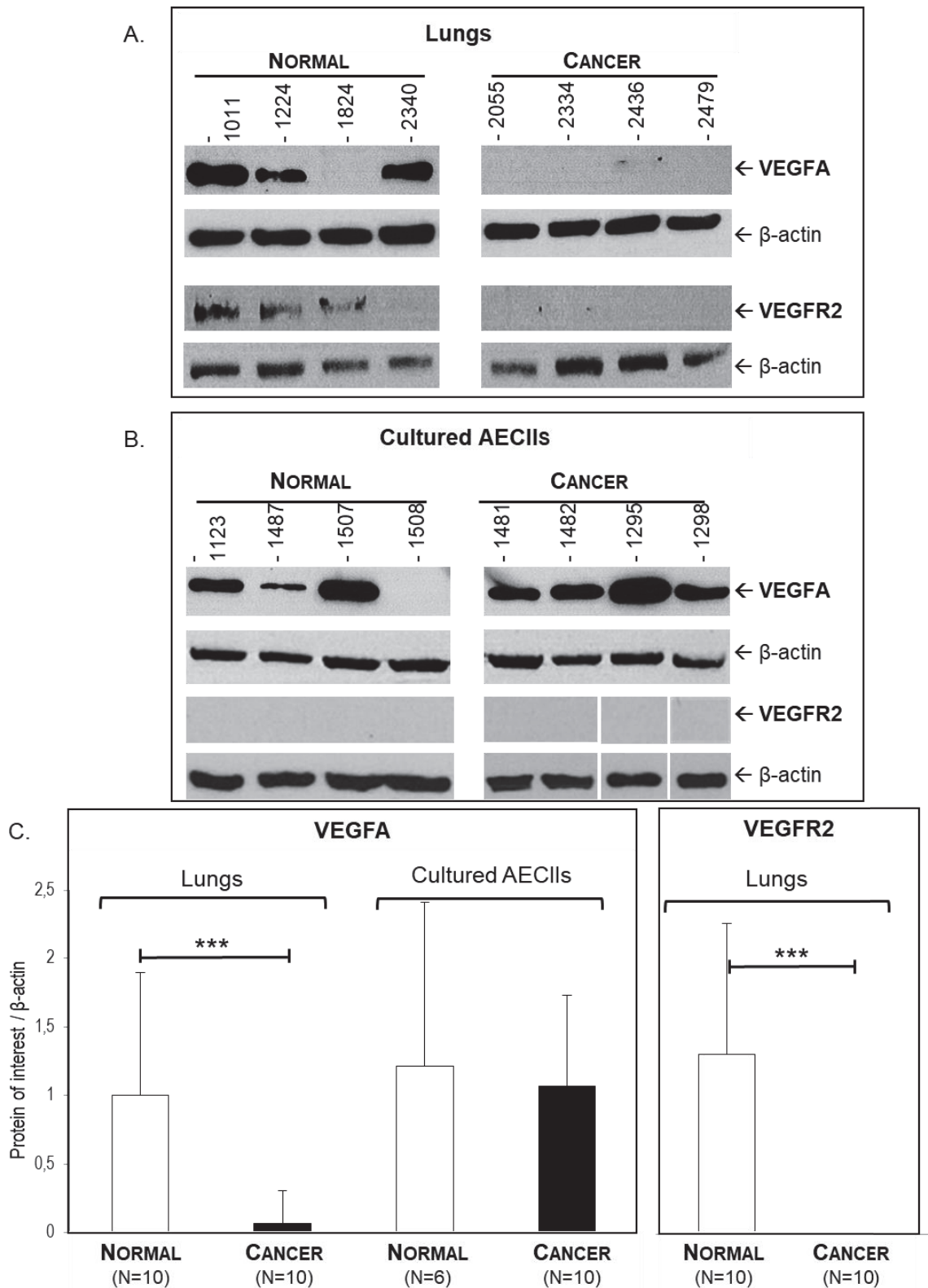


Fig 2. Downregulation of VEGFA and VEGFR2 protein expression in JSRV-induced adenocarcinoma. Levels of protein expression of VEGFA and VEGFR2 were analyzed by Western blot in lungs (A) and AECII (B). C. Protein expression of each sample was semi-quantified by densitometry and a ratio [protein of interest/ β -actin] was calculated. Statistical analysis was performed using Student t-test or the Wilcoxon test with *** = $p < 0.0005$.

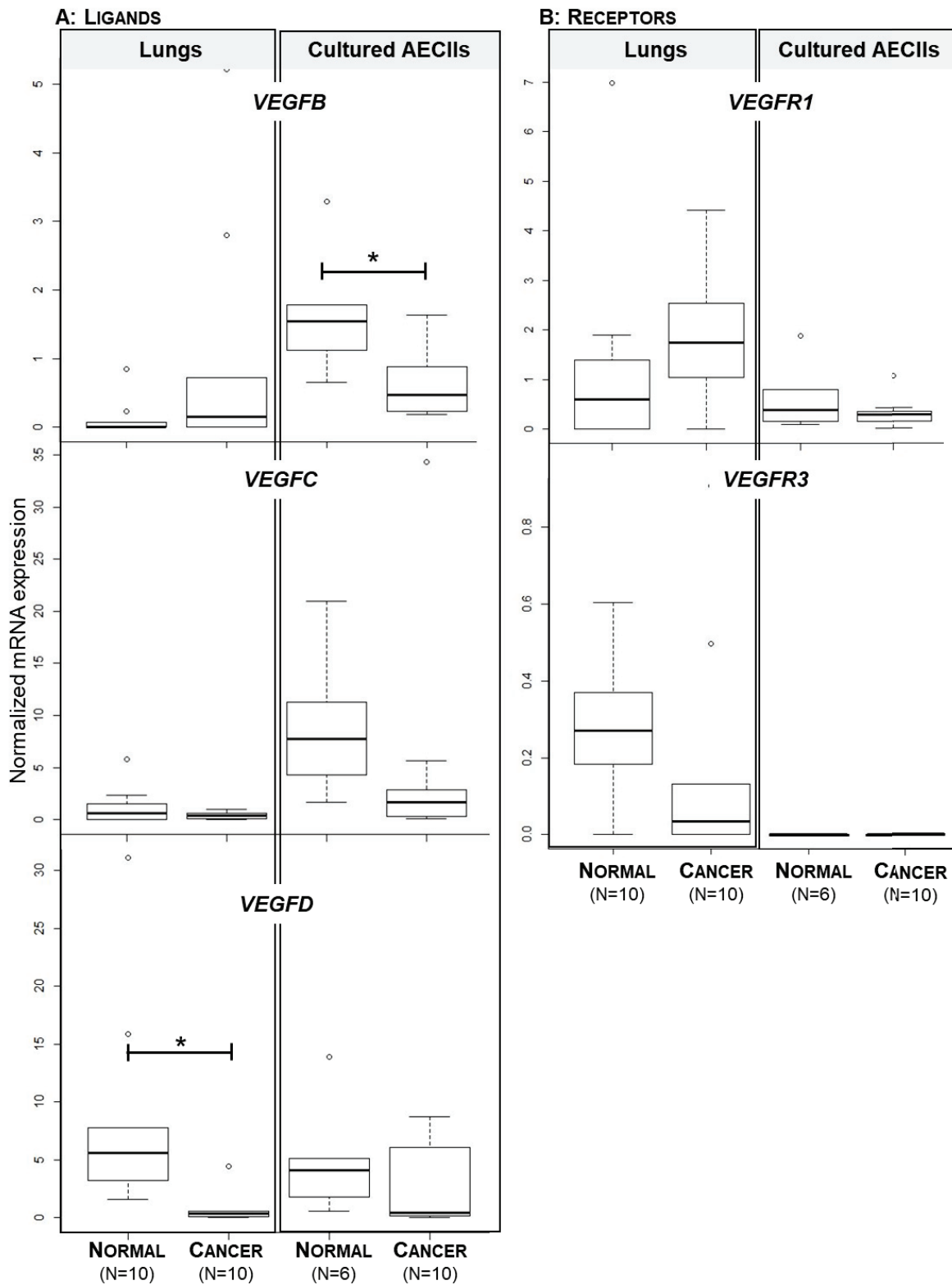


Fig 3. Alteration of VEGF/VEGFR mRNA expression in JSRV-induced adenocarcinomas. The mRNA expression of ligands *VEGFB*, *VEGFC* and *VEGFD* (A), and their receptors *VEGFR1* and *VEGFR3* (B) were analyzed by RT-qPCR in lungs and AECII derived from lungs. Statistical analysis was performed using Student t-test or the Wilcoxon test with * = $p < 0.05$.

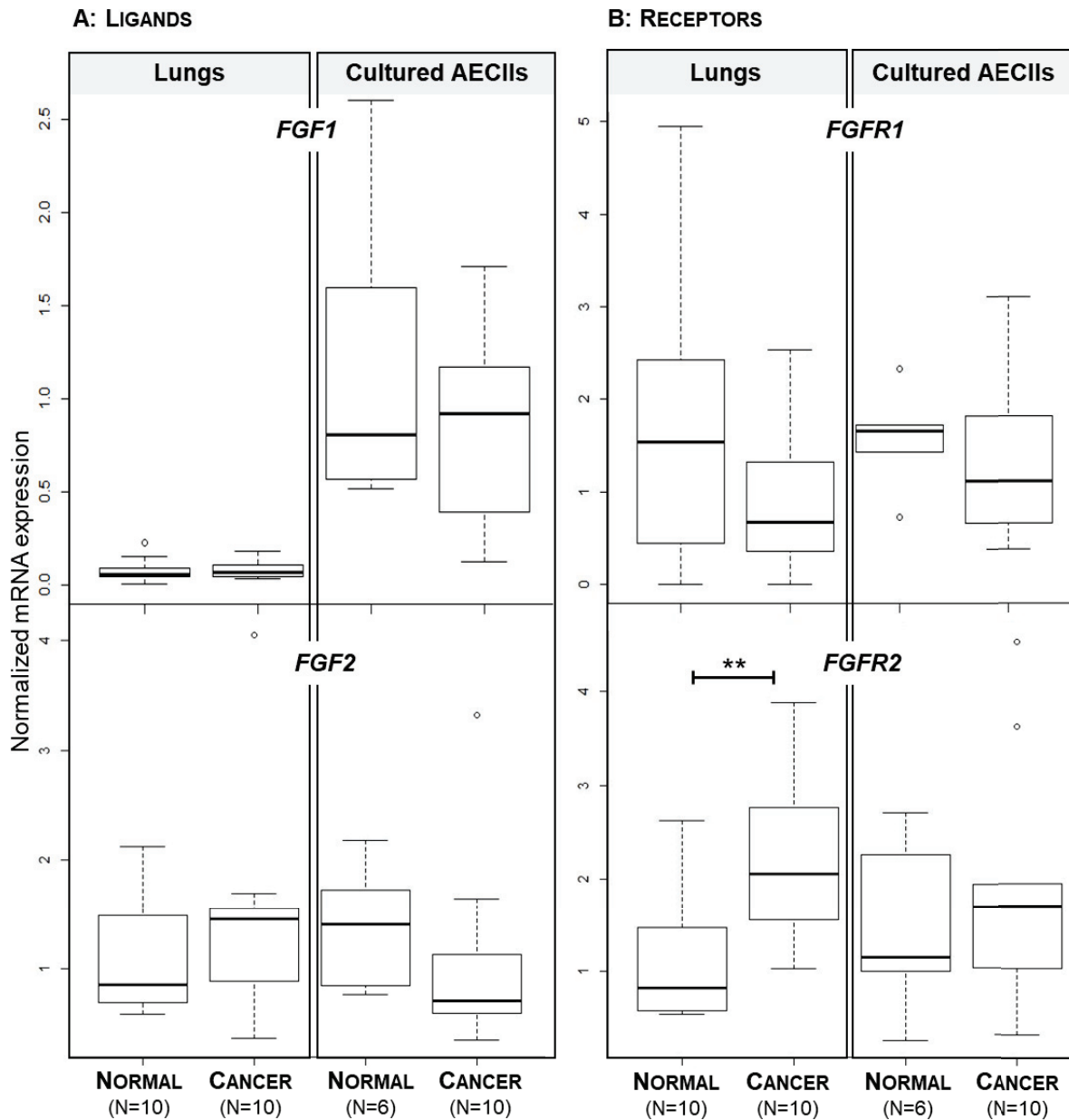


Fig 4. FGF and FGFR mRNA expression in ovine cancers. The mRNA expression of *FGF1* and *FGF2* (A), *FGFR1* and *FGFR2* (B) was quantified by RT-qPCR in lungs and AECII from sheep. Statistical analysis was performed using Wilcoxon test with **: $p < 0.005$.

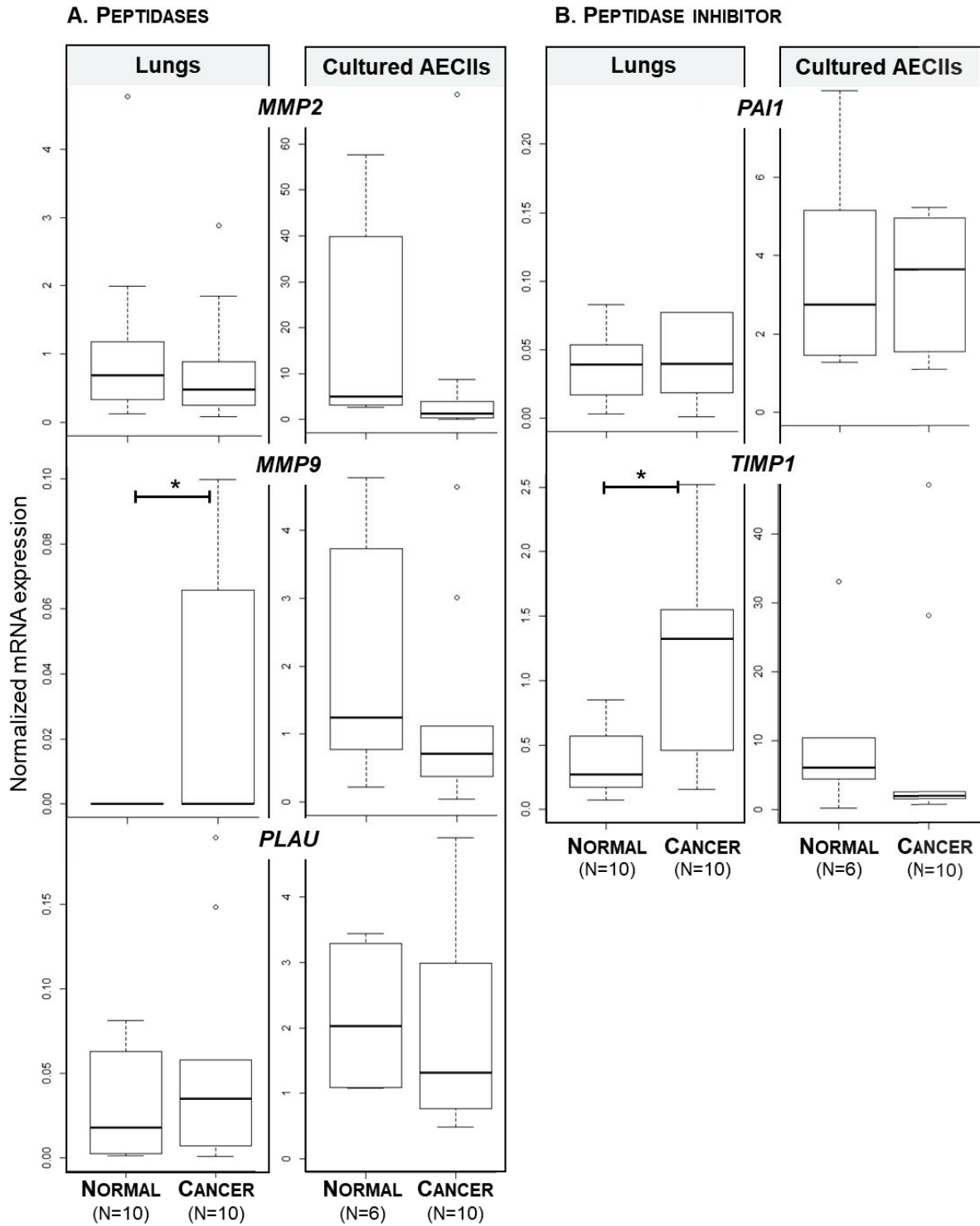


Fig 5. Expression of genes involved in extracellular matrix degradation in JSRV-induced adenocarcinomas. Expression of *PLAU*, *MMP2* and *MMP9* (A) and *SERPINE1* and *TIMP1* (B) mRNAs was quantified by RT-qPCR in lungs and AECIIs. Statistical analysis was performed using Wilcoxon test with *: $p < 0.05$.

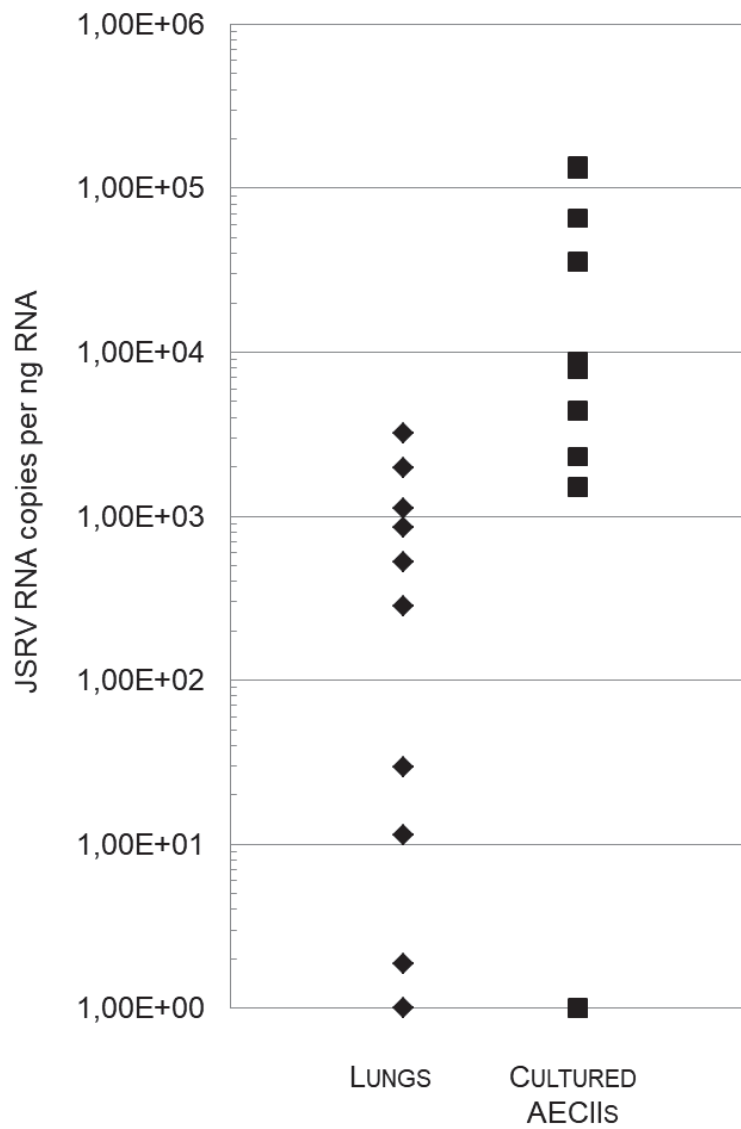
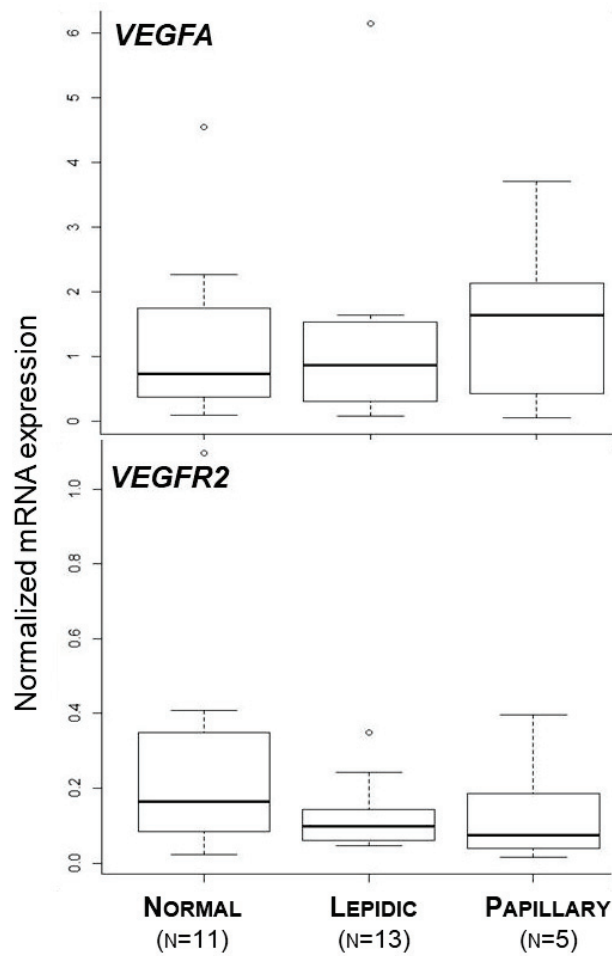


Fig 6: Quantification of viral genome in cancers and cancer-derived AECII. JSRV viral RNAs have been quantified by RT-qPCR in cancers (n= 10) (◆) and cancer-derived AECII (n= 10) (■). The level of JSRV RNAs was expressed as the number of copies per ng of total RNAs.

A: mRNA expression



B: Protein expression

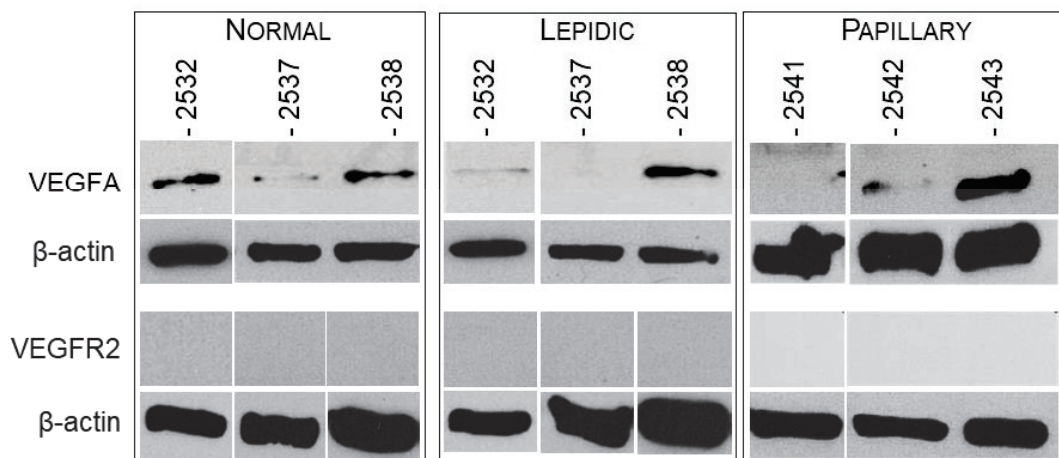


Fig 7. Lack of VEGFA and VEGFR2 protein expression in human lepidic adenocarcinomas. A. mRNA expression of VEGFA and VEGFR2 analyzed by RT-qPCR in normal lungs and lepidic or papillary adenocarcinomas. B. VEGFA and VEGFR2 protein expression by Western blot.

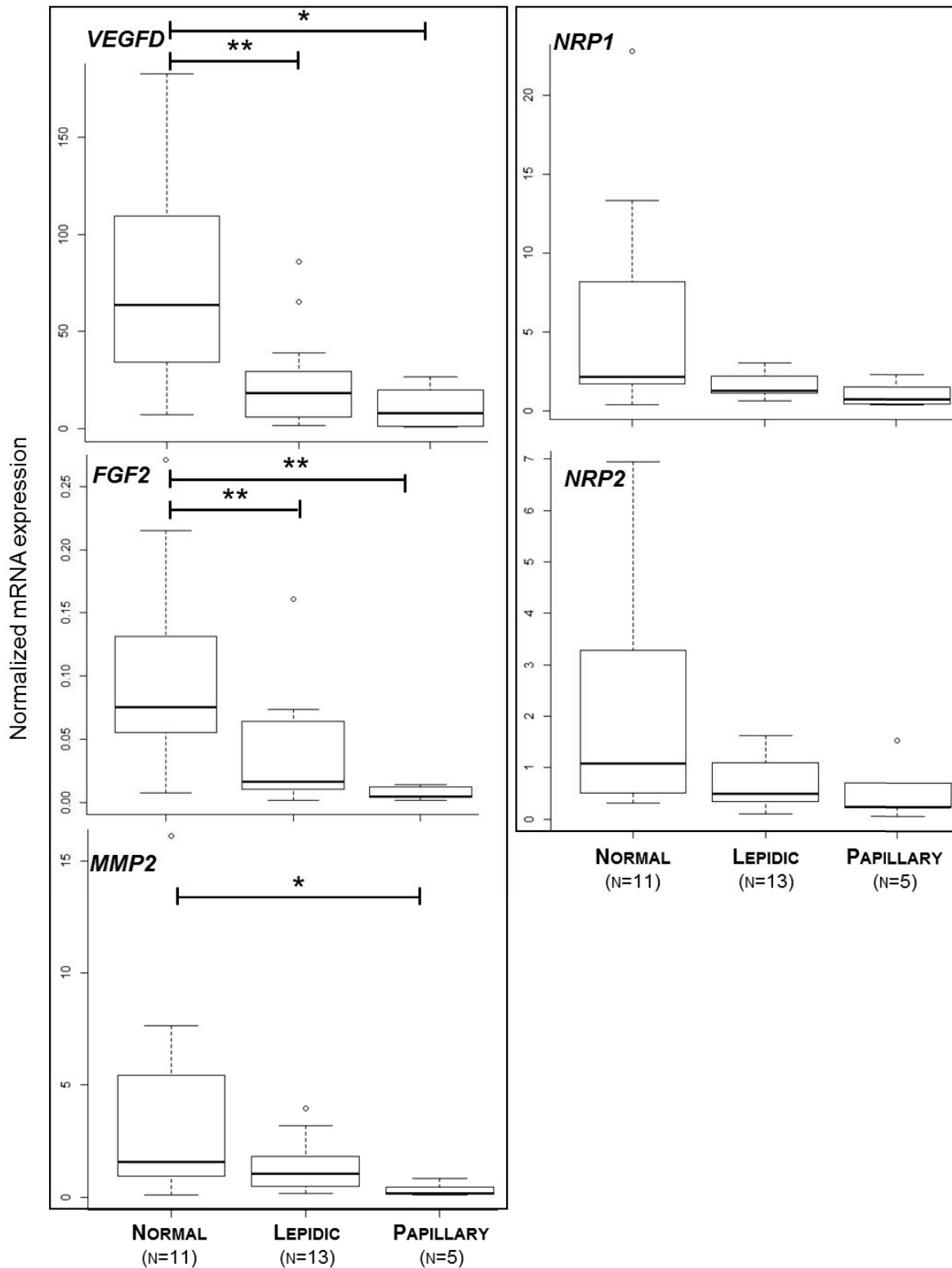


Fig 8. Expression of genes involved in angiogenesis in human lepidic adenocarcinomas. Expression of human *VEGFD*, *FGF2*, *MMP2*, *NRP1* and *NRP2* mRNAs were analyzed by RT-qPCR in normal lungs and lepidic or papillary lung adenocarcinomas. Statistical analysis was performed using Wilcoxon test with *: $p < 0.05$ and **: $p < 0.005$.

Supporting information

Table 1: Primers for detecting mRNAs in human and sheep

Gene	Name	GenBank #	Species		5'-3' Forward	5'-3' Reverse
			Sheep	Human		
LIGANDS	VEGFA	vascular endothelial growth factor A	NM_001025110.1	x	GGGCTGCTGTAATGACGAAG	TCATCTCCTATGTGCTGGC
			NM_001171623.1	x	GCAGAAATCATCAGAAAGTGT	GGCACACAGATGGCTTGA
	VEGFB	vascular endothelial growth factor B	XM_004019872.1	x	CCAGAAGAAAGTGGTGTCTAGG	CACTCCAGGCGCATCGTCAG
			NM_0038377.4	x	CTGACGATGGCTGGAGTGT	AGGCTCGAATCACACTGGC
	VEGFC	vascular endothelial growth factor C	XM_004021836.1	x	ATGTGGGAAAGGATTTGGAG	CTGGTTTGGGCCCTTGAGG
	VEGFD	vascular endothelial growth factor D	XM_004021929.1	x	GAGCCTCGTCTGTGCAATAC	GATCTTCTGGGATCTGGATGG
			NM_004469.4	x	GGAGCCTGCTGCCAAGAAGAC	CGCCCTGGGCAGCCCTTTT
	FGF1	fibroblast growth factor 1	XM_004008910.1	x	GTGGATGGGACGAAAGACAG	CTGGGTGTTGTGAGCCGTA
			NM_000800.4	x	GGAGCACCAGCACATTACAG	GGTTCTCCAGCCCTTCC
	FGF2	fibroblast growth factor 2	NM_001009789	x	GCAGAAGAGAGAGGGGTGT	CCAGTTGCTTTCAGTGCCA
			NM_002005.4	x	GCAGAAGAGAGAGAGTGT	CCAGTTGCTTTCAGTGCCA
	VEGFR1	vascular endothelial growth factor receptor 1	XM_004012285.1	x	TTCCTGCTTGATGACTACCA	AAACCTGGGCTCGCTGAGG
			NM_002019.4	x	ACATACTAACTCTGCCCTTCT	TGCCCTGGTAGTCATCAAAC
	VEGFR2	vascular endothelial growth factor receptor 2	NM_001278565	x	AAAGACGCAACTCCAAAGAC	GGTACAGGCACCAAGAAGATTG
			NM_002253.2	x	TCCAGATGACACCAGACG	GCCTTCAGATGCCACAGACT
RECEPTORS	VEGFR3	vascular endothelial growth factor receptor 3	XM_012177600.1	x	CCGAGGGATGGAGTTCTCTG	AGGGTCTCTGTAGATGTCCC
			XM_012123734.1	x	GGATCTACCCACCAGACG	GGTTGTCCATCATGACCCCT
	FGFR1	fibroblast growth factor receptor 1	NM_023110.2	x	GCTGACTCAAGTGCATCCAT	GGGGTTTTGCCTAAGCCAGT
	FGFR2	fibroblast growth factor receptor 2	XM_012103034.1	x	GTGATGCTGGTCTCTCCGGG	GGTCTCTGTGAGGGTACTGC
			NM_000141.4	x	CCTGGATGTTGTGGAGCCAT	GCCCGTATTACTGCCCGTTC
	NRP1	neuropilin 1	XM_004014210.1	x	TCAGGATCACAGGAGATGG	GTGATGCAGTGGGGAGATG
	NRP2	neuropilin 2	XM_004004851.1	x	TGCACATGACACCCCTGAC	TGTGGGCTTTGAGTCTGTCC
			XM_005246934.2	x	TGCACATGACACCCCTGAC	CGTGGGCTTGGAGTCTGTCC
	MMP2	matrix metalloproteinase 2	NM_001166180.1	x	GGCATCTCTCAGATCCCGTGG	CCCTTCTCCTCTGTGGTCT
			NM_004530.5	x	TCATTTGGCGSACTGTGACG	AGGGTGTGGCTGAGTAGAT
PEPTIDASES/ PEPTIDASE INHIBITORS	MMP9	matrix metalloproteinase 9	XM_004014614	x	GGCTGGGCTTAGATCACTC	TCAGGGCGAGGACCATACA
			NM_004994.2	x	ITCCAGTACCAGAGAAAGCCAT	GGTACAGTAGCCACITGGT
	PLAU	plasminogen activator, urokinase	NM_001163593.1	x	GGTGATCGGACTGTGGCTG	TGAGGTCTGTGGCCCTTC
			NM_002658.3	x	CTGCCCTCGCTCGATGATAAC	CTTCAGAGCCGTAGTAGTGGG
PEPTIDASES/ PEPTIDASE INHIBITORS	TIMP1	metalloproteinase inhibitor 1	NM_001009319.2	x	TACTTCCACAGGTCCTCAAGAT	GCAGGGGATAGATGAGCAGG
			NM_003254.2	x	TACTTCCACAGGTCCTCAAG	GCAGGGGATGGATAAACAGG
			NM_001174114	x	CCCCATGAAAGAGGTGCC	AGGGAGAACTTGGGCAAAAC
	SERPINE1	serpin family E member 1	NM_000602.4	x	TCCAGAAATGAAATCGAGGT	CCAGGGTCAGGGTCCATCA
REFERENCE	PPIA	peptidyl isomerase A	XM_004013990	x	GTGCCAGGGTGGTGTGACTTC	CCACATGCTTCCCATCCAAC
			NM_001300981.1	x	GTGTCAAGGTTGGTACTTC	CCACATGCTTCCCATCCAAC
	PSMB2	proteasome subunit beta 2	XM_004001790.1	x	GCTATGATGAGCAGCAGGGT	CGCGAGATGTTGGCGGTAA
		NM_002794	x	TCACGTGAGAGGGCAGTGAAC	CCCTGGCAAAGTGGGAGGAG	
	RPS11	ribosomal protein S11	NM_00101015.4	x	TGACTATACCTCCGAAGTACA	CACGTTGAAGGGCAGCTGCT
	YWHAZ	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta	NC_019466	x	AACTCCCTCGAAGAAAGCCCTG	CCGATGTGCCAACAAATGTCAAGTT

III. L'inducteur de VEGFA, HIF1 α , est surexprimé dans les adénocarcinomes pulmonaires ovins

Afin de comprendre le blocage de l'expression de VEGFA dans les adénocarcinomes pulmonaires ovins, nous avons analysé par RT-qPCR l'expression du facteur de transcription HIF1 α , responsable de l'activation de l'expression de ce ligand. HIF1 α était surexprimé dans les poumons tumoraux ovins et ne l'était pas dans les AECII dérivées de poumons tumoraux par rapport à leur contrepartie normale (Figure 39A). Aucune différence significative n'a été observée dans l'expression d'HIF1 α entre les poumons normaux et les adénocarcinomes pulmonaires humains (Figure 39B).

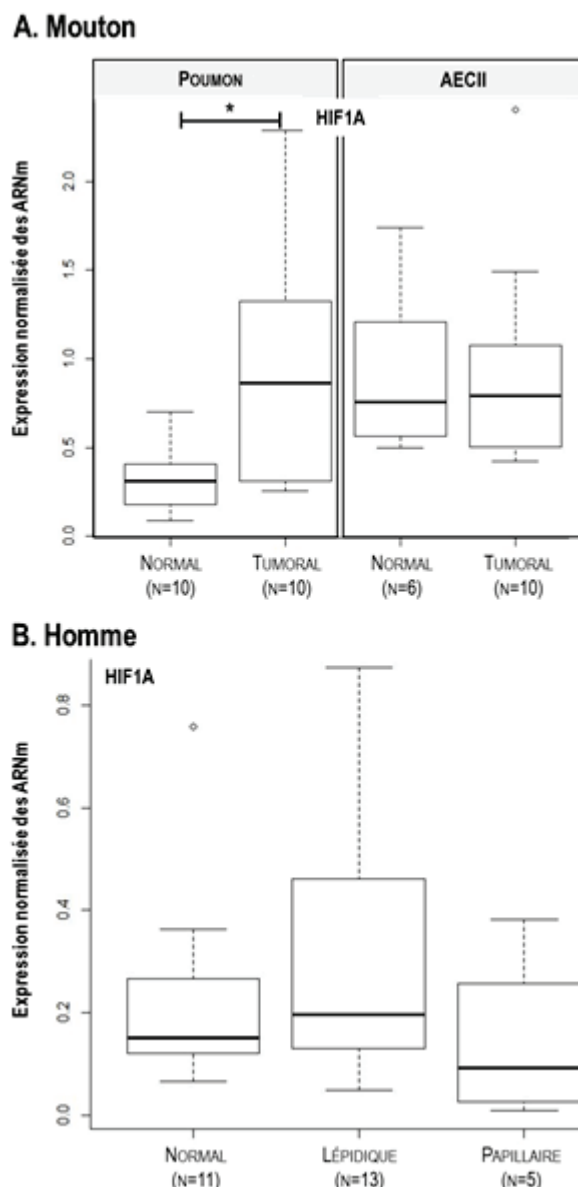


Figure 39 : HIF1 α est surexprimé dans les adénocarcinomes pulmonaires ovins.

L'expression de HIF1 α a été analysée par RT-qPCR dans A. des adénocarcinomes pulmonaires ovins et des AECII dérivées de poumons tumoraux et normaux et B. dans les adénocarcinomes lépidiques, papillaires et dans leurs contreparties normales. L'expression des échantillons a été normalisée par trois gènes de référence. Les analyses statistiques ont été réalisées avec le test de Wilcoxon avec $*=p<0.05$.

IV. Discussion

L'adénocarcinome pulmonaire ovin et l'adénocarcinome lépidique humain sont deux cancers de type pneumonique ; le cancer ovin viro-induit servant de modèle animal au cancer humain de par ses similarités cliniques, radiologiques et pathologiques (353). Ces deux cancers forment des lésions histologiques de type lépidiques, c'est-à-dire qu'ils sont caractérisés par la prolifération des cellules tumorales dans le parenchyme pulmonaire sans invasion stromale, pleurale ou vasculaire et avec un rare développement de métastases (353). Récemment, un modèle transgénique de souris exprimant l'enveloppe de JSRV a été développé (86). Ces souris développaient des adénocarcinomes pulmonaires spontanés avec un phénotype métastatique. Ces adénocarcinomes étaient associés à l'activation de la transition épithélio-mésenchymateuse. Notre travail s'est concentré sur les adénocarcinomes lépidiques humains et ovins naturellement induits, deux cancers où les métastases sont rares suggérant que le modèle souris ne reproduit pas parfaitement la maladie.

Les cancers comme les tissus normaux ont besoin de nutriments, d'oxygène et d'un moyen d'évacuer leurs déchets pour survivre. Ces fonctions sont assurées par l'angiogenèse et la lymphangiogenèse. Ces voies permettent également la dissémination des cellules tumorales au sein de l'organisme. Dans un contexte de cancers non métastatiques, notre travail avait pour objectif d'analyser l'expression des gènes des voies de l'angiogenèse et de la lymphangiogenèse dans les deux cancers de type pneumonique, l'adénocarcinome pulmonaire ovin et l'adénocarcinome lépidique humain. Premièrement, l'analyse par puce transcriptomique de l'expression des gènes nous avait permis d'établir une hypothèse : l'absence de métastases dans l'adénocarcinome pulmonaire ovin et l'adénocarcinome lépidique humain est dû à un blocage des voies de l'angiogenèse et de la lymphangiogenèse. En effet, l'expression des gènes clés de l'angiogenèse et de la lymphangiogenèse était diminuée dans les échantillons tumoraux par rapport aux échantillons normaux. Ici, nous avons validé l'expression des gènes par RT-qPCR dans des poumons ovins tumoraux et normaux, dans des AECII dérivées de poumons ovins normaux et tumoraux, dans des tumeurs pulmonaires humaines de type lépidique ou papillaire et dans leurs contreparties non tumorales. Les protéines VEGFA et VEGFR2, indispensables à l'activation de l'angiogenèse, ont été analysées par Western blot dans ces mêmes échantillons. Nous avons identifié des modulations de la quantité des ARNm et des protéines de gènes clés dans la régulation de l'angiogenèse et de la lymphangiogenèse participant à la limitation des métastases dans les adénocarcinomes lépidiques humains et ovins.

Nous avons tout d'abord montré l'absence du ligand VEGFA dans les adénocarcinomes induits par JSRV chez le mouton bien que les niveaux en ARNm ne soient pas différents entre les poumons tumoraux et normaux. VEGFA est un ligand clé dans l'activation de l'angiogenèse pendant le développement embryonnaire et les cancers. De par l'importance de ce ligand, VEGFA est hautement régulé, du niveau transcriptionnel au niveau post traductionnel (237). Au niveau transcriptionnel, VEGFA est régulé par HIF1 α . L'expression de ce facteur de transcription est augmentée dans les poumons tumoraux par rapport aux poumons normaux et est stable dans les AECII. HIF1 α est transcrit et traduit puis transloqué dans le noyau sous condition hypoxique afin

d'activer la transcription de *VEGFA* (403). Ici, malgré la surexpression d'*HIF1 α* , *VEGFA* n'est pas surexprimé. En normoxie, un niveau basal d'expression d'*HIF1 α* est présent mais la protéine est rapidement dégradée par le protéasome (403). Il est donc possible que l'augmentation des messagers dans les tissus tumoraux ne soit pas une indication de la présence de la protéine dans ces tissus ce qui expliquerait qu'il n'y ait pas d'activation de la transcription de *VEGFA* dans les poumons tumoraux. L'absence de protéine *VEGFA* dans les poumons tumoraux sans dérégulation de l'expression des ARNm questionne sur la régulation de l'expression de *VEGFA*. Au niveau traductionnel chez l'homme, *VEGFA* est régulé par des miRNA tels que miRNA-297, miRNA-299, miRNA-567 et miRNA-609 qui ont la capacité de contrôler l'expression de *VEGFA* en empêchant la traduction de son ARNm en protéine mais sans dégradation de l'ARNm (237). L'existence et l'efficacité de ces miRNA dirigés contre *VEGFA* devraient être examinées dans les moutons afin de vérifier si cette régulation est responsable de l'absence de protéine *VEGFA* dans les poumons tumoraux. De façon intéressante, l'expression de la protéine *VEGFA* est restaurée dans les cultures de cellules épithéliales alvéolaires de type II tumorales. En effet, il n'y a aucune différence dans l'expression protéique de *VEGFA* dans les AECII dérivées de poumons tumoraux et normaux. Ce résultat nous indique que les AECII présentes dans les poumons tumoraux ont toujours la capacité de produire le *VEGFA*. La restauration de l'expression de *VEGFA* dans les AECII peut être due aux conditions de culture *in vitro* qui permettent le maintien des cellules primaires mais qui ne permettent pas de retrouver le poumon en condition *in vivo*. Le microenvironnement est très important dans la régulation des miRNA. La régulation de l'expression de *VEGFA* par les miRNA en fonction du microenvironnement tumoral a été montrée dans les cancers pancréatiques ou colorectaux (572). Il est possible que la mise en culture des cellules primaires perturbe le microenvironnement cellulaire et induise un regain de l'expression de *VEGFA* dans les AECII tumorales. Suite à l'analyse du ligand *VEGFA*, nous avons analysé l'expression en ARNm et en protéine du récepteur principal de l'angiogenèse, *VEGFR2*. *VEGFR2* était sous exprimé dans les poumons tumoraux ovins par rapport aux poumons normaux et aucune détection de la protéine *VEGFR2* n'a été observée dans les poumons tumoraux ovins. Le récepteur *VEGFR2* est majoritairement retrouvé à la surface des cellules endothéliales expliquant que l'on ne détecte pas *VEGFR2* dans les AECII. En conclusion de ces résultats, nous avons montré l'absence du ligand *VEGFA* et du récepteur *VEGFR2*, le couple ligand/récepteur principal activateur de l'angiogenèse. Sans *VEGFA* ou *VEGFR2*, l'angiogenèse n'est pas activée, il semble donc qu'elle soit bloquée dans les adénocarcinomes pulmonaires ovins (465).

Nous avons ensuite réalisé les mêmes analyses chez l'homme dans des adénocarcinomes lépidiques prédominants, des adénocarcinomes papillaires et leurs contreparties non tumorales. Nous n'avons pas mis en évidence de différence dans l'expression en ARNm et en protéine de *VEGFA* dans les adénocarcinomes humains par rapport aux poumons normaux. Bien qu'aucune différence significative dans l'expression en ARNm de *VEGFR2* n'ait été détectée dans les échantillons humains, le niveau d'expression était faible et aucune expression en protéine n'a été observée. Le blocage de *VEGFR2* peut participer à la limitation de la dissémination extra-thoracique des adénocarcinomes chez l'homme et le mouton. Ces deux protéines,

essentielles pour l'angiogenèse, sont ciblées par les drogues anti-métastatiques dans de nombreux cancers dont le cancer du poumon (195).

D'autres voies alternatives jouent des rôles dans l'angiogenèse. Nous avons analysé l'expression des autres gènes impliqués dans l'angiogenèse, la lymphangiogenèse et la dégradation de la matrice extracellulaire dans les cancers ovins et humains. Nous avons observé une diminution de l'expression en ARNm de *VEGFB* dans les AECII dérivées de poumons tumoraux comparée à l'expression dans les AECII dérivées de poumons normaux. L'expression de *VEGFB* dans les tissus était faible et inconstante avec seulement la moitié des échantillons exprimant ce gène. *VEGFB* est un ligand différent de *VEGFA*, il interagit avec le récepteur *VEGFR1* mais son interaction n'est pas forcément signe de l'activation de l'angiogenèse. Les effets de *VEGFB* varient en fonction des conditions allant de l'induction de la perméabilité des cellules endothéliales à des effets anti-angiogéniques (293). Les ligands impliqués dans la lymphangiogenèse *VEGFC* et *VEGFD* étaient sous exprimés dans les AECII dérivées de poumons tumoraux et dans les poumons tumoraux respectivement. Bien que la sous expression de *VEGFC* ne soit pas significative, une tendance nette à la sous expression était observée. *VEGFD* était également sous exprimé dans les tumeurs lépidiques humaines par rapport aux poumons normaux. Des sous expressions de *VEGFC* et *VEGFD* ont été reportées dans les adénocarcinomes pulmonaires humains (370). L'expression des récepteurs *VEGFR1* et *VEGFR3* était stable dans les cancers ovins et humains. De façon intéressante, une tendance à la sous expression de *VEGFR3* a été observée dans les poumons tumoraux et comme *VEGFR2*, *VEGFR3* n'était pas exprimé dans les AECII dérivées de poumons ovins. Ceci est cohérent avec l'expression de *VEGFR3* à la surface des cellules endothéliales lymphatiques (564). Dans les deux tumeurs ovines et humaines, la diminution de l'expression de *VEGFD* et l'expression stable de *VEGFR3* dans les échantillons tumoraux comparée aux échantillons normaux contribueraient au contrôle de l'extension des métastases dans les adénocarcinomes lépidiques.

En plus de la croissance de nouveaux vaisseaux sanguins et lymphatiques, la dégradation de la matrice extracellulaire par les métalloprotéases est importante pour l'arrivée des vaisseaux jusqu'à la tumeur. Nous avons mesuré l'expression des ARNm des gélatinases *MMP2* et *MMP9*, de la peptidase *PLAU* et de leurs inhibiteurs *TIMP1* et *SERPINE1*. Moins de 50% des tumeurs induites par JSRV exprimaient *MMP9* et les poumons normaux ne l'exprimaient pas. Ceci suggère un blocage de l'expression de cette protéase. *TIMP1*, l'inhibiteur de *MMP9* est fortement exprimé dans les tumeurs pulmonaires ovines. En plus de ces activités inhibitrices, *TIMP1* peut bloquer la réponse des cellules endothéliales aux facteurs pro-angiogéniques et participer à l'inhibition de la migration des cellules endothéliales (236). Nous supposons que bien que quelques tumeurs ovines expriment *MMP9*, la surexpression de *TIMP1* bloque les fonctions de ces protéases. Les gènes *PLAU* et *SERPINE1* n'ont pas de différence d'expression entre les échantillons tumoraux et normaux ovins et humains. Pris dans leur globalité, ces résultats sur l'expression des gènes des protéases et de leurs inhibiteurs n'indiquent pas de dégradation de la matrice extracellulaire dans les tumeurs lépidiques ovines et humaines. Ces résultats sont cohérents avec la pathologie puisque les cellules tumorales envahissent le poumon mais n'envahissent pas les organes et les structures autour du poumon (353).

En dehors de la voie VEGF/VEGFR, la voie FGF/FGFR participe également à l'activation de l'angiogenèse de par son rôle dans la prolifération cellulaire (511). L'analyse de l'expression des gènes de cette voie a montré une perturbation dans l'expression de FGF2 dans les tumeurs humaines et de FGFR2 dans les tumeurs ovines. En effet, FGF2 était sous exprimé dans les poumons tumoraux lépidiques humains comparés aux poumons normaux et FGFR2 était surexprimé dans les poumons tumoraux ovins par rapport aux poumons normaux. En plus de son rôle dans l'angiogenèse, FGFR2 joue un rôle important dans la prolifération cellulaire (511). Sa surexpression n'est donc peut-être pas liée à l'angiogenèse mais à la prolifération des cellules tumorales pulmonaires. Dans les cancers pulmonaires non à petites cellules, la surexpression de FGF2 induit la survie des cellules tumorales, l'angiogenèse et est un facteur de mauvais pronostic (181, 366). La sous expression retrouvée dans les poumons tumoraux lépidiques indique, encore une fois, un potentiel blocage de l'activation de l'angiogenèse dans ces tumeurs.

L'adénocarcinome pulmonaire ovin est induit par le rétrovirus JSRV. Le cancer humain, lui n'a pas d'étiologie virale démontrée bien que cette question soit posée depuis des années (349). Certains virus oncogènes tels qu'EBV, HPV ou HBV ont la capacité d'activer l'angiogenèse par l'intermédiaire de leurs protéines virales (Tableau 12) (116, 300, 486). Pour savoir si les protéines de JSRV peuvent avoir un rôle dans l'activation de l'expression de gènes de l'angiogenèse étudiés ici, nous avons quantifié l'expression de l'ARN de JSRV dans les poumons et dans les AECII dérivées de poumons ovins tumoraux. Premièrement, une quantité plus importante de virus a été observée dans les AECII dérivées de poumons tumoraux par rapport aux poumons tumoraux, montrant la spécificité de JSRV pour ce type cellulaire. Après analyse, nous n'avons trouvé aucune corrélation entre le niveau d'expression de JSRV et les dérégulations de l'expression des gènes observées dans les tissus ou les AECII dérivées de poumons tumoraux.

Nous avons, en plus des analyses sur les adénocarcinomes pulmonaires ovins et sur les adénocarcinomes lépidiques prédominant, testé l'expression des mêmes gènes dans les adénocarcinomes papillaires. Les résultats étaient comparables avec ceux observés dans les adénocarcinomes lépidiques prédominants. Les niveaux d'expression de *VEGFA* et *VEGFR2* étaient similaires entre échantillons lépidiques et papillaires ; *VEGFD* et *FGF2* étaient significativement sous exprimés. En plus de ces dérégulations, les tumeurs papillaires sous exprimaient la métalloprotéase *MMP2* et le corécepteur *NRP2*. Des tendances à la sous expression étaient également observées dans les échantillons lépidiques mais ces différences n'étaient pas significatives. Dans l'ensemble, les gènes des voies de l'angiogenèse et de la lymphangiogenèse étaient stables ou sous exprimés. Ces résultats similaires peuvent être dus au petit nombre d'échantillon de tumeurs papillaires (N=5) mais également à l'aspect clinique de ces tumeurs papillaires. En effet, lorsque les tumeurs pulmonaires papillaires ont été opérées, elles n'étaient pas invasives et les ganglions lymphatiques des patients étaient intacts (Table 2 Article Materials and methods section). Ces niveaux d'expression pourraient être spécifiques de tumeurs non invasive et pas seulement des tumeurs lépidiques.

En conclusion, nos résultats indiquent que l'angiogenèse n'est pas activée dans les cancers lépidiques prédominants de type pneumonique ovins et humains. Chez l'homme, les adénocarcinomes lépidiques prédominants sont des cancers rares sans extension extra-thoracique. Nous avons montré que l'absence du ligand VEGFA et de son récepteur VEGFR2 contribue au contrôle de l'invasion des cellules tumorales pulmonaires au reste de l'organisme dans ces deux cancers ovins et humains. Ainsi, les bénéfices dans l'utilisation de traitement anti-angiogéniques, souvent utilisés dans les traitements des adénocarcinomes, pourraient ne pas être retrouvés dans le traitement des adénocarcinomes lépidiques prédominants. En ne recevant pas ces traitements, les patients éviteraient de potentielles toxicités. De plus, nous avons montré ici la similarité dans la régulation de l'expression des gènes de l'angiogenèse et de la lymphangiogenèse appuyant encore plus le fait que l'adénocarcinome pulmonaire ovin est un bon modèle d'étude pour l'adénocarcinome lépidique chez l'homme.

CHAPITRE 2 : MUC1 et MUC5B sont exprimés dans les adénocarcinomes pulmonaires ovin induits par JSRV

I. Etat de l'art

Les mucines sont des glycoprotéines composées de chaînes oligosaccharidiques liées à une longue chaîne polypeptidique. Elles sont exprimées dans l'appareil digestif, les glandes mammaires et l'appareil respiratoire. Les sucres présents sur les mucines s'oligomérisent pour former un gel qui protège les cellules épithéliales pulmonaires des environnements dangereux subissant des fluctuations de pH, de concentrations en ions, d'oxygénation ou d'hydratation, des expositions aux protéases, aux glycosidases, aux lipases, aux toxines et aux agents infectieux tels que les bactéries et les virus (44). Les mucines sont caractérisées par des répétitions en tandem riches en sérine et thréonine et sont classées en mucines liées à la membrane (MUC1, MUC3A, MUC3B, MUC4, MUC12, MUC13, MUC15, MUC16, MUC17, MUC20 et MUC21) et en mucines sécrétées (MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6, MUC7, MUC8 et MUC19). MUC1, MUC2, MUC4, MUC5AC, MUC5B, MUC6 et MUC7 sont exprimées pendant le développement du poumon et pendant les cancers pulmonaires (274, 419).

Les mucines peuvent altérer de nombreuses voies de signalisation et la dérégulation de leur expression a été associée avec la progression des cancers et les métastases (556). Les cancers pulmonaires sur expriment fréquemment MUC1, particulièrement les adénocarcinomes où cette surexpression est retrouvée dans environ 80% des tumeurs (467). En condition normale, l'expression de MUC1 est restreinte au pôle apical des cellules épithéliales mais en condition de dépolarisation des cellules épithéliales, l'expression de MUC1 se retrouve à la surface entière de la cellule (364). Cette relocalisation permet à MUC1 d'interagir avec des facteurs de croissance tels que l'EGFR induisant l'activation de la voie MAPK (271). Entre autres fonctions, MUC1 a la capacité d'activer l'angiogenèse en augmentant l'expression de VEGFA. MUC1 est également impliqué dans la perte de l'adhésion entre les cellules et la matrice extracellulaire et entre cellules dans les cancers pulmonaires. L'interaction entre MUC1 et CTNBN1 permet la promotion de la prolifération des cellules tumorales (274). L'expression de la mucine sécrétée MUC5AC augmente entre les lésions précancéreuses et les adénocarcinomes pulmonaires (311). MUC5AC peut augmenter la migration des cellules pulmonaires tumorales par son interaction avec l'intégrine $\beta 4$ qui active la voie de signalisation médiée par la FAK (Focal adhesion kinase) et joue ainsi un rôle dans la progression des cancers pulmonaires (275, 575). Une augmentation de l'expression de MUC5AC est un facteur de mauvais pronostic dans les cancers pulmonaires (275). Dans les cancers pulmonaires non à petites cellules, l'expression de MUC5B est associée à une mauvaise différenciation cellulaire, à un stade histologique plus élevé et à un mauvais pronostic (361).

L'adénocarcinome pulmonaire ovin est induit par le β -rétrovirus JSRV et touche les moutons et les chèvres. Le virus JSRV est transmis par les aérosols, le lait, le colostrum et *in utero* (110, 190). Il infecte et

transforme les cellules épithéliales du poumon profond, les AECII dans les alvéoles et les cellules Club dans les bronchioles. Les tumeurs induites par JSRV sont associées à une croissance de type lépidique prédominante. L'adénocarcinome pulmonaire ovin est cliniquement, radiologiquement et histologiquement similaire à l'adénocarcinome lépidique de type pneumonique chez l'homme (132, 349). Les adénocarcinomes lépidiques sont peu liés au tabagisme et touchent plus les femmes et les patients jeunes que les autres types d'adénocarcinomes (59, 317). Ces cancers ont une croissance lente et les métastases sont rares.

Les adénocarcinomes lépidiques ont été redéfinis lors de la dernière classification de l'OMS en adénocarcinome lépidique prédominant, un adénocarcinome pulmonaire non-mucineux composé d'une tumeur de type lépidique de plus de 3 cm avec une composante invasive de plus de 5 mm et les adénocarcinomes mucineux invasifs, un variant des adénocarcinomes lépidiques prédominants (507). Parmi les adénocarcinomes lépidiques, 45% sont des adénocarcinomes mucineux, 40% sont des adénocarcinomes non-mucineux et 15% sont mixtes (132). Les adénocarcinomes lépidiques prédominants et les adénocarcinomes mucineux invasifs ont un statut mutationnel et des marqueurs immunohistochimiques différents. Les adénocarcinomes lépidiques prédominants sont fréquemment mutés pour *EGFR* et expriment le TTF-1 (Thyroid Transcription Factor 1) et les adénocarcinomes mucineux invasifs sont fréquemment mutés pour *KRAS* et expriment CK-20 (Cytokeratin 20) (151, 279). Ces deux types d'adénocarcinomes lépidiques ont des profils d'expression des mucines différents avec MUC1 majoritairement exprimé dans les adénocarcinomes lépidiques prédominants et MUC5AC, MUC5B et MUC6 majoritairement exprimé dans les adénocarcinomes mucineux invasifs (101).

Le but de l'étude était d'analyser le statut mucine des adénocarcinomes de type pneumoniques induits par JSRV. A partir de 37 échantillons de tumeurs pulmonaires ovines, nous avons montré que 62% (23/37) étaient non-mucineux. Le gène MUC1 était surexprimé dans les cancers pulmonaires ovins par rapport aux poumons normaux, MUC5B était exprimé dans plus de la moitié des cancers pulmonaires ovins et MUC5AC n'était pas ou peu exprimé. Ces résultats suggèrent que les adénocarcinomes pulmonaires ovins sont composés d'adénocarcinomes mucineux et non-mucineux et l'analyse de l'expression des mucines a montré que ce cancer ovin était proche des adénocarcinomes lépidiques prédominants.

II. Article 2 : Short note in preparation

MUC1 and MUC5B are expressed in JSRV-induced lung adenocarcinoma

Gomes M¹, Chalabreysse L³, Mornex J.F. ^{1,2}, Leroux C¹

¹Université de Lyon, Université Lyon 1, INRA, UMR754, UMS 3444, SFR BioSciences, F-69007 Lyon, France.

²Department of Respiratory Medicine, Louis Pradel Hospital, Hospices Civils de Lyon, F-69677 Lyon, France.

³Department of Pathology, Louis Pradel Hospital, Hospices Civils de Lyon, F-69677 Lyon, France

The authors declare no potential conflicts of interest.

Keyword: lung, retrovirus, MUC1, MUC5AC, MUC5B, lepidic, JSRV

Abstract

Mucins are glycoproteins expressed in the respiratory tract. They protect lung epithelial cells from challenging environment. They are classified in two groups: membrane-bound and secreted mucins. They can alter various signaling pathways and the deregulation of their expression has been associated with cancer progression and metastases. Among mucins, MUC1, MUC2, MUC4, MUC5AC, MUC5B, MUC6 and MUC7 are expressed in lung cancer.

The betaretrovirus JSRV (Jaagsiekte Sheep Retrovirus) is responsible for a transmissible lung adenocarcinoma in sheep and goats. Lesions appear as multiple nodules in the lung parenchyma with a pneumonic extension and absence of extra-pulmonary lesions. This naturally occurring lung cancer in large animals shares many features with human pneumonic-type lung adenocarcinomas with predominant lepidic growth. Human lepidic pulmonary adenocarcinomas have been redefined in the last WHO classification of lung tumors as lepidic predominant adenocarcinoma (LPA), a non-mucinous lung adenocarcinoma and invasive mucinous adenocarcinoma (IMA), a mucinous variant of lepidic-predominant adenocarcinomas. These two subtypes have different patterns of mucin expression: while LPA mostly express MUC1, IMA preferentially express MUC5AC, MUC5B and MUC6.

In this retrospective study on 37 JSRV-induced cancers, we showed that 62% were non-mucinous and that MUC1 was overexpressed in cancers as compared to normal lungs. MUC5B mRNAs were expressed in half of cancers and MUC5AC mRNAs were absent or weakly expressed. These results highlight that pneumonic-type ovine pulmonary adenocarcinomas are composed of mucinous and non-mucinous lung cancers and that it is closer related to LPA than IMA, when we considered the profiles of mucin expression.

Introduction

Mucins are glycoproteins composed of oligosaccharide chains linked to a long peptidic chain. They are expressed in the digestive tract, the mammary gland and the respiratory tract. Mucins sugar chains oligomerize to form a mucinous gel that protects pulmonary epithelial cells from challenging environment such as pH changes, ion concentration, oxygenation and hydration fluctuations, exposition to enzymes like proteases, glycosidases, lipases or biological factors such as toxins, bacteria or viruses (44). These proteins are characterized by multiple tandems of serine-/ threonine-rich repeats and are classified as membrane-bound for MUC1, MUC3A, MUC3B, MUC4, MUC12, MUC13, MUC15, MUC16, MUC17, MUC20 and MUC21 or secreted mucins for MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6, MUC7, MUC8 and MUC19. MUC1, MUC2, MUC4, MUC5AC, MUC5B, MUC6 and MUC7 are expressed during lung development and in cancer (274, 419).

Mucins can alter various signaling pathways and their expression has been associated with cancer progression and metastases (556). MUC1 overexpression is a common pattern in non-small cells lung cancer especially in adenocarcinomas (467). In normal conditions, MUC1 expression is restricted to the luminal pole of epithelial cells but upon cell depolarization, MUC1 can be expressed over the entire cell surface (364). This re-localization allows MUC1 to interact with growth factor such as EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) leading to the activation of the MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) pathway (271). Among several functions, the membrane-bound MUC1 favors angiogenesis by upregulating VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) expression. MUC1 is also involved in loss of cell-to-extracellular matrix and cell-to-cell adhesion of lung cancer cells and interacts with CTNNB1 (β -catenin) promoting cancer cell proliferation (274). The expression of the secreted MUC5AC increases from pre-malignant lesions to lung adenocarcinomas (311). MUC5AC can enhance the migration of cancer cells by its interaction with integrin β 4 that activates FAK (Focal adhesion kinase)-mediated signaling (275) and as such plays a role in lung cancer progression (575). Increased expression of MUC5AC is a marker of poor prognosis in lung cancer (275). In NSCLC, expression of MUC5B is associated with poor cell differentiation, higher pathological TNM stage and poor prognosis (361).

The betaretrovirus JSRV (Jaagsiekte Sheep Retrovirus) is responsible for a transmissible pulmonary adenocarcinoma in sheep and goats. JSRV is transmitted by aerosols, milk, colostrum and *in utero* (110, 190). Cancer cells derive from Alveolar Epithelial type II Cells (AECII) in the alveoli and epithelial Club cells in the bronchiole. The JSRV-induced cancer is associated with predominant lepidic growth. JSRV-induced lung adenocarcinoma is clinically, radiologically and histologically similar to pneumonic-type human lung adenocarcinoma with predominant lepidic growth (132, 349). Lepidic adenocarcinomas affect more non-smokers, women and young subjects than other lung adenocarcinomas (60, 317). These cancers are slow growing and metastasis spread is rare. Human lepidic pulmonary adenocarcinomas have been redefined in the last WHO classification of lung tumors as lepidic predominant adenocarcinoma (LPA), a non-mucinous lung adenocarcinoma composed of a lepidic tumor larger than 3 cm with an invasive component larger than 5 mm and invasive mucinous adenocarcinoma (IMA), a mucinous variant of lepidic-predominant adenocarcinomas

(506). Among lepidic adenocarcinomas, 45% are of mucinous type, 40% are of non-mucinous type and 15% are of mixed subtypes (132). Lepidic predominant adenocarcinoma and invasive mucinous adenocarcinoma are different by their mutation status and their immunohistochemistry markers. Lepidic adenocarcinomas are frequently mutated for *EGFR* and express TTF-1 (Thyroid Transcription Factor 1) and invasive mucinous adenocarcinomas are frequently mutated for *KRAS* (*KRAS* proto-oncogen, GTPase) and express CK-20 (Cytokeratin 20) (151, 279). These two subtypes of lepidic adenocarcinomas have a different pattern of mucin expression with lepidic predominant adenocarcinoma mostly expressing *MUC1* and invasive mucinous adenocarcinoma preferentially expressing *MUC5AC*, *MUC5B* and *MUC6* (101).

The aim of this study was to analyze the mucin status of JSRV-induced pneumonic-type adenocarcinomas. From a cohort of thirty-seven cancers, we established that 62% (23/37) were non-mucinous. *MUC1* mRNAs were overexpressed in cancers as compared to normal lungs, *MUC5B* mRNAs were expressed in half of cancers and *MUC5AC* mRNAs were absent or weakly expressed. These results highlight that ovine pulmonary adenocarcinomas may be mucinous or non-mucinous but are analogous to LPA for the expression of mucins.

Materials and methods

Biological materials

Ovine pulmonary adenocarcinoma specimens were collected *post mortem* from thirty-seven spontaneously JSRV-infected sheep with clinical evidences of lung cancer obtained from flocks in the Southern France and from ten sheep with no signs of cancer collected from the Corbas slaughterhouse, nearby Lyon (France) (Table 1). Formal authorization for accessing the facilities was obtained and access was granted under the supervision of a veterinarian. None of the 37 animals were engaged in an experimental protocol. Frozen samples were kept at -80°C. Clinical status was confirmed by the presence of gross lesions and by the detection of JSRV genome using semi-nested PCR on genomic DNA as previously reported (350).

With lesion of pulmonary adenocarcinoma				Without lesion		
#	Sex	Age (Month)	Mucine status	#	Sex	Age (Month)
887	F	24	Non mucinous	1010	ND	<6
888	F	24	Non mucinous	1011	ND	<6
889	F	24	Non mucinous	1223	ND	<6
890	F	24	Non mucinous	1224	ND	<6
892	F	24	Mucinous	1487	ND	<1
893	F	24	Non mucinous	1823	ND	<6
896	ND	<1	Non mucinous	1824	ND	<6
913	F	ND	Non mucinous	1825	ND	<6
925	ND	ND	Non mucinous	2355	ND	<6
929	ND	ND	Non mucinous	2340	ND	<6
985	M	96	Mucinous			
1022	F	36	Non mucinous			
1024	F	36	Non mucinous			
1025	F	36	Non mucinous			
1026	F	36	Non mucinous			
1027	F	48	Non mucinous			
1121	ND	ND	Mucinous			
1165	ND	ND	Mucinous			
1166	ND	ND	Mucinous			
1167	F	60	Mucinous			
2055	ND	ND	Mucinous			
2334	F	ND	Non mucinous			
2335	ND	ND	Non mucinous			
2339	M	ND	Mucinous			
2369	F	ND	Mucinous			
2370	F	ND	Mucinous			
2371	F	ND	Non mucinous			
2433	ND	ND	Non mucinous			
2434	F	18	Non mucinous			
2436	ND	ND	Non mucinous			
2479	F	ND	Mucinous			
2585	M	12	Non mucinous			
2586	F	ND	Mucinous			
2638	ND	ND	Non mucinous			
2755	M	ND	Mucinous			
2764	F	ND	Mucinous			
2765	F	ND	Non mucinous			

Table 1: Ovine specimens used in the study. “-”: ND : no data

Histochemical staining

Five μm thick frozen sections were cut with a CM1860 Cryo-microtome (Leica) and placed on SuperFrost® Plus (Menzel-Glaser) glass slides.

Lung sections were fixed with 4% paraformaldehyde for 20 min and were stained using the hematoxylin-eosin-safran reagents (RAL Diagnostics) according to the manufacturer recommendations. Sections were then rinsed in a 100% alcohol bath, poured into a xylene bath and mounted on coverslips with a xylene based medium, HistoRal (RAL Diagnostics).

Periodic Acid Schiff (PAS) staining with or without α -amylase

Tumoral lung sections were fixed with 4% paraformaldehyde for 20 min and treated with PAS (Periodic Acid Schiff) reagent (Abcam). For each animal, a differential staining was performed on lung slices treated with α -amylase (15 min incubation at 37°C) to allow sugar hydrolysis or untreated. Briefly, sections were immersed in periodic acid reagent for 5 min, rinsed in distilled water; immersed in Schiff's solution for 15 min, rinsed and stained with hematoxylin for 3 min. After a wash under running tap water, slides were immersed in Bluing reagent solution for 30 sec, rinsed and treated with Light Green solution for 2 min. After dehydration through graded alcohol, slides were poured into a xylene bath and mounted on coverslips with HistoRal (RAL Diagnostics). Slides were observed and pictures were taken with an EFD3 Nikon and an Olympus DP70 camera. Without α -amylase pre-treatment, all the sugars were stained in magenta; in α -amylase treated slides only mucins, resistant to the hydrolysis, were stained in magenta; nuclei were stained in black and other components in green/blue.

Expression of mucin mRNAs

Total RNAs were extracted from thirty-seven lungs using the "RNeasy Plus Universal Mini" kit (Qiagen) and treated with the "Turbo DNA free" kit (Ambion) as recommended. One microgram of total RNAs was reverse transcribed using the "iScript cDNA synthesis" kit (Biorad). The cDNAs were amplified with 1 unit of KAPA Taq Polymerase (KAPABiosystem), 1X of KAPA Taq Buffer, 0.2 μM of MUC1, MUC5AC, MUC5B or SDHA primers, 0.2mM of dNTPs up to 25 μl DNase/RNase free water and amplified for 35 cycles for 30 sec at 95°C, 30 sec at 60°C and 30 sec at 72°C. PCR products were separated onto a 2% agarose gel supplemented with SYBR Safe 1X (LifeTechnologies).

MUC1 mRNAs were quantified in triplicates using the "KAPA SYBR® FAST Universal qPCR kit" (Clinisciences) in a MiniOpticon thermocycler (Biorad) with 40 cycles (5 sec at 95°C, 20 sec at 60°C) followed by a melting curve under a 60°C to 95°C range with fluorescence reading every 0.5°C. *PPIA*, *PSMB2* and *YWHAZ* genes were used for *MUC1* quantification; their stability had been evaluated with the geNorm software (514) and proved to be the most stable reference genes for ovine lungs.

The primers for *MUC1*, *MUC5AC*, *MUC5B*, *SDHA*, *PPIA*, *PSMB2* and *YWHAZ* have been designed with Primer-BLAST from available GenBank ovine sequences with a primer spanning an exon-exon junction or with forward and reverse primer into two different exons to avoid interfering amplifications from residual DNA (Table 2). They allowed the amplification of small fragments from 100 to 200bp. Normalized relative expression levels were calculated with the $2^{-\Delta\Delta C_q}$ method (409).

Gene	Name	GenBank #	5'-3' Forward	5'-3' Reverse
MUC genes	<i>MUC1</i>	XM_012107297.1	AGTTCAGGCCAGGATCTGTG	AGGAAGGAAACTGGGCATCG
	<i>MUC5AC</i>	XM_012169394.1	ATGGGCTCGTGGTGTGA	GTTGGGTAGGGGGCAGAAAG
	<i>MUC5B</i>	XM_012108419.1	TGCAACACCACCTGCCTC	CGTTGGGGTCAGCATAGGG
Reference genes	<i>SDHA</i>	XM_004017097	CATGCAGAAAGT CGATGCAGAG	AGTGTTCCAGACCCATTCCCC
	<i>PPIA</i>	XM_004013990	GTCCCAGGGTGGTGACTTC	CCACATGCTT GCCATCCAAC
	<i>PSMB2</i>	XM_004001790.1	GCTAT GATGAGCACCAGGGT	CGCGAGATAGTTGGCGTGTAA
	<i>YWHAZ</i>	NC_019466	AACTCCCCTGAGAAAGCCCTG	CCGATGTCCACAAATGTCAGTT

Table 2: Primers used in the study.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using Wilcoxon tests using the R software (<https://www.R-project.org>). All tests were done with a significance threshold of 0.05.

Results

Ovine pulmonary adenocarcinomas are predominantly of non-mucinous type

The quality of the lung sections from frozen tissues was verified by HES staining. Mucin expression was detected using PAS staining after α -amylase pre-treatment to allow sugar hydrolysis and thus to only detect mucin expression. Mucin appears as magenta staining in the cancer cells. Over the 37 JSRV-induced cancers, 62% (23/37) were of non-mucinous type (Figure 1; Table 1).

MUC1 is overexpressed in JSRV-induced cancers

The expression of *MUC1* mRNAs was analyzed by RT-PCR with *SDHA* gene as a control of mRNA quality in thirty JSRV-induced lung cancers. All samples expressed *MUC1* (data not shown). The levels of gene expression were compared by quantitative RT-PCR on RNA extracted from ten cancers (five of mucinous type and five of non-mucinous type) and 10 normal lungs. *PPIA*, *PSMB2* and *YWHAZ* genes were used as reference genes to normalize expression. *MUC1* was overexpressed in cancers as compared to normal lungs (Figure 2A). The analysis of mucinous and non-mucinous types did not reveal differences in the expression of *MUC1* mRNAs between the two subtypes (Figure 2A). Interestingly, *MUC1* expression was analyzed in alveolar epithelial type II cells derived from tumoral and normal lungs and all of them expressed *MUC1* (data not shown).

MUC5B and MUC5AC are differentially expressed in JSRV-induced lung cancers

The expression of *MUC5AC* and *MUC5B* mRNAs was analyzed using RT-PCR on 30 tumoral lung samples, 9 normal lungs. *SDHA* was used as the reference gene for mRNA quality control. *MUC5AC* mRNAs were barely detected, with low levels in 60% (18/30) of cancers and 55% (5/9) of normal lungs (Figure 2B). *MUC5B* expression was found in 63% (19/30) of cancers and in only 22% (2/9) of normal lungs (Figure 2B). *MUC5B* was not preferentially expressed in mucinous nor in non-mucinous status, suggesting from our data that *MUC5B* was not limited to one subtype (not shown).

Discussion

Our work focused on pneumonic-type lung adenocarcinoma with predominant lepidic growth. Human lepidic predominant adenocarcinomas express *MUC1* and are *EGFR* mutated and invasive mucinous adenocarcinomas express *MUC5AC* and *MUC5B* and are *KRAS* mutated (151). Currently, animal models for human lung cancer are mainly developed in rodents. Human and rodent lungs sustain airway structure and

composition differences and the rodent model may not be the best model for human lung diseases (434). Differently, sheep lungs are similar in size and structure with human lung and are a good model for respiratory diseases (334). Virally induced ovine pulmonary adenocarcinoma is a lepidic lung adenocarcinoma clinically, radiologically and histologically close to human lepidic adenocarcinoma. Our goal was to know if ovine pulmonary adenocarcinoma was, as lepidic adenocarcinoma, composed of various entities and if this ovine lung cancer is still a good animal model for human lepidic adenocarcinoma. We analyzed JSRV-induced lung cancers for their mucin status as well as for mRNA expression of *MUC1*, *MUC5AC* and *MUC5B*, three mucins differentially expressed in human lung adenocarcinomas.

Among lepidic lung adenocarcinomas, LPA and IMA are reported; they differ by their α -amylase resistant PAS staining status. The two mucinous and non-mucinous types were represented in the ovine cancer, with ~60% of ovine lung tumors of non-mucinous type and thus resemble human LPA. We analyzed the mRNA expression of *MUC1*, *MUC5AC* and *MUC5B* genes, three major mucin genes in lung adenocarcinomas. *MUC1* was expressed in normal lungs as well as in JSRV-induced cancers, but strongly overexpressed in cancers. *MUC1* expression has been reported in LPA and IMA but is more expressed in LPA than in IMA. *MUC1* overexpression is frequently observed in cancers and it can interact with various growth factors such as EGFR important for cell proliferation and survival (271, 467). *MUC5AC* expression was barely detectable and when expressed, has been detected in both cancers and normal lungs. *MUC5B* expression was detectable predominantly in JSRV-induced cancers (63% in cancer *versus* only 22% in normal lung). *MUC5B* expression in human cancer is a marker of bad prognosis, associated with cancer aggressiveness (361). In human, expression of *MUC5AC* and *MUC5B* is mostly associated with invasive mucinous adenocarcinoma. This was not as clear in ovine cancers for which *MUC5AC* and *MUC5B* expression, when detectable, was indifferently associated with mucinous and non-mucinous types.

In conclusion, JSRV-induced lung cancers may be of mucinous or non-mucinous type. Interestingly, as in humans, *MUC1* expression is associated with the non-mucinous type. To date, there is no data of evolution or aggressiveness of these two subtypes in animals. A systematic PAS staining may help us understand the clinical features and the disease evolution in sheep.

Acknowledgments

GM is the recipient of a PhD fellowship from the “Plan Cancer 2009-2013”. We thank François Guiguen, DMV, Jean-Christophe Natorp, DMV and Rémy Falguière for the collection of tissues.

Figures

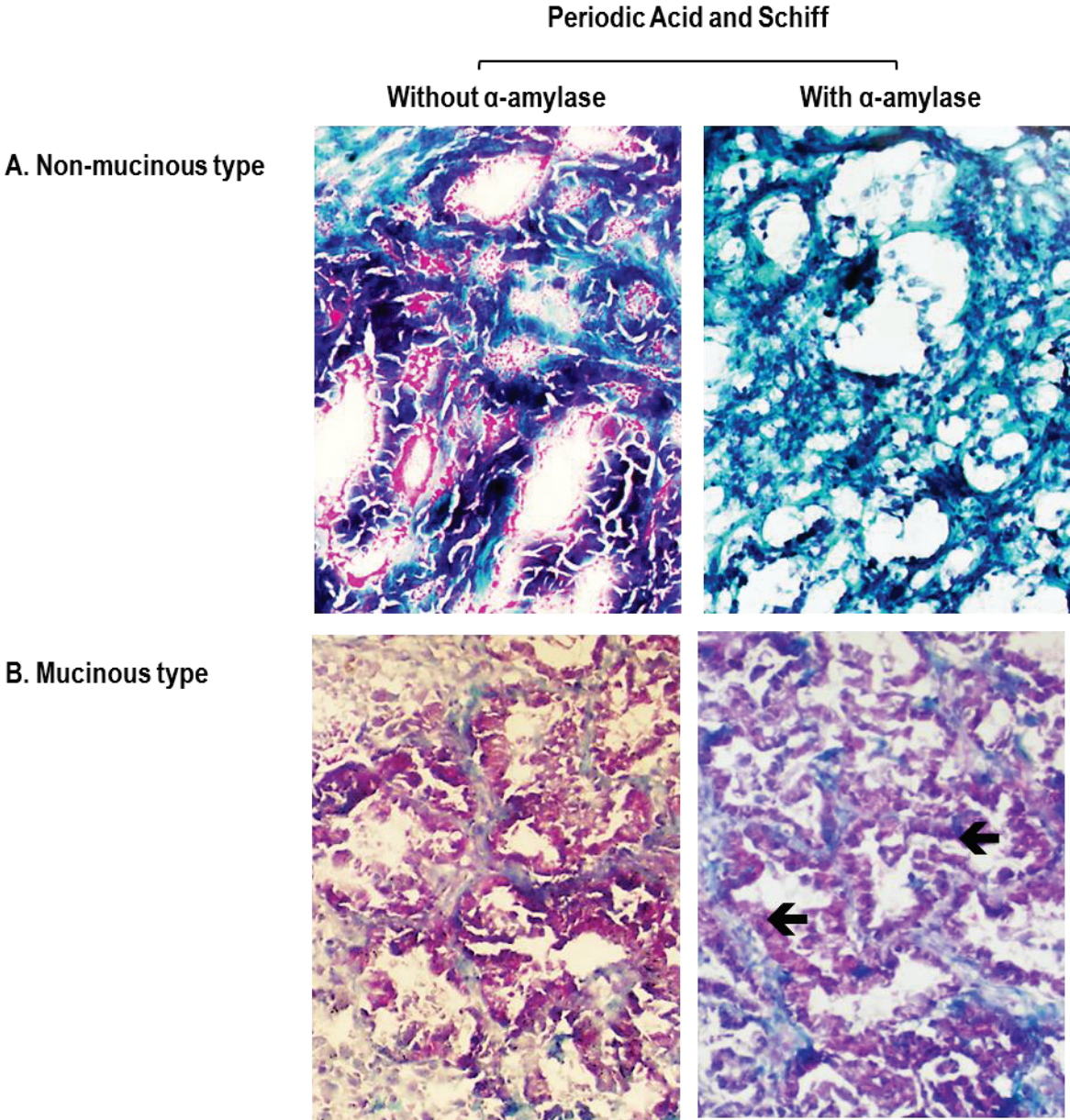
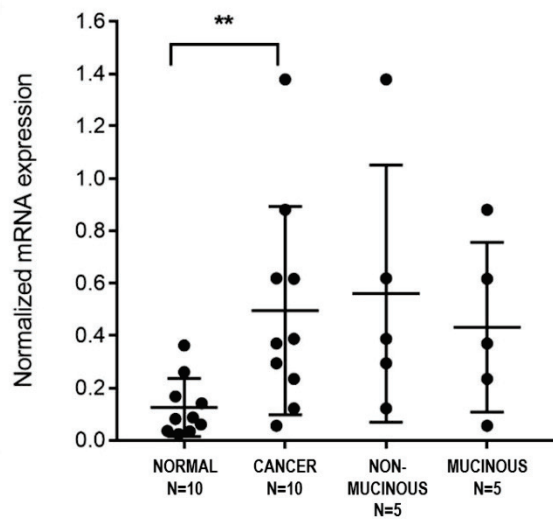


Fig 1. Ovine pulmonary adenocarcinomas are mostly non-mucinous type adenocarcinomas. Lungs sections were stained with Periodic Acid Schiff for mucin detection with or without α -amylase treatment. A. Non mucinous type (lung from sheep #888). B. Mucinous type (lung from #2339). Without α -amylase pre-treatment, all the sugars were stained in magenta; in α -amylase treated slides only mucins, resistant to the hydrolysis, were stained in magenta (\blackleftarrow); nuclei were stained in black and other components in green/bleu.

A. MUC1 mRNA expression



B. MUC5 mRNA expression

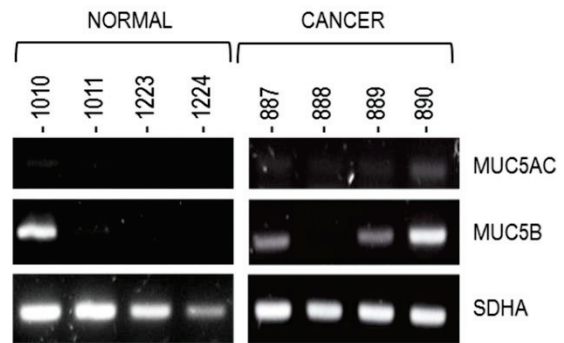


Fig 2. Expression of *MUC1*, *MUC5AC* and *MUC5B* mRNAs. A. *MUC1* expression was quantified in lungs from sheep with or without cancers by RT-qPCR. *PPIA*, *PSMB2* and *YWHAZ* genes were used as reference gene for quantification. Statistical analysis was performed using Wilcoxon test with ** = $p < 0.005$. B. *MUC5AC* and *MUC5B* expression were verified by RT-PCR in 30 lung cancers and in 9 normal lungs. *SDHA* was used as cDNA quality control.

III. Discussion

Notre travail a porté sur les adénocarcinomes lépidiques de type pneumonique. Chez l'homme, ils sont composés de deux entités : les adénocarcinomes lépidiques prédominants non mucineux exprimant *MUC1* et étant mutés pour l'*EGFR* et les adénocarcinomes mucineux invasifs exprimant *MUC5AC* et *MUC5B* et étant mutés pour *KRAS* (151). Actuellement, les modèles animaux sont majoritairement développés chez les rongeurs. La composition et la structure des poumons entre humains et rongeurs sont différentes, ainsi les rongeurs ne sont peut-être pas le modèle le plus pertinent pour les maladies pulmonaires humaines (434). De façon différente, les poumons ovins ont une taille et une structure similaires à celles des poumons humains et sont un bon modèle d'étude pour les maladies respiratoires (334). L'adénocarcinome pulmonaire ovin de type pneumonique induit par JSRV est proche cliniquement, radiologiquement et histologiquement de l'adénocarcinome lépidique humain. Le but de ce travail était de voir si l'adénocarcinome pulmonaire ovin, comme l'adénocarcinome lépidique, était composé de plusieurs entités et si ce cancer ovin était un bon modèle d'étude pour le cancer humain. Nous avons analysé, dans les cancers induits par JSRV, la présence des mucines et l'expression des gènes *MUC1*, *MUC5AC* et *MUC5B*, trois mucines différemment exprimées dans les adénocarcinomes humains.

Les adénocarcinomes non mucineux et mucineux ont été retrouvés chez le mouton avec environ 60% des cancers pulmonaires étant de type non mucineux et se rapprochant de l'adénocarcinome lépidique prédominant non mucineux. L'analyse de l'expression des mucines *MUC1*, *MUC5AC* et *MUC5B* a montré l'expression de *MUC1* dans les poumons normaux et tumoraux avec une surexpression significative dans les tumeurs ovines. Chez l'homme, *MUC1* est exprimé dans les deux types d'adénocarcinomes lépidiques avec une expression plus forte dans les adénocarcinomes lépidiques prédominants non mucineux. La surexpression de *MUC1* est fréquente dans les cancers ; *MUC1* peut interagir avec plusieurs facteurs de croissance dont l'*EGFR* important pour la prolifération et la survie cellulaire (271, 467). L'expression de *MUC5AC* était à peine détectable dans les cancers et les poumons normaux. L'expression de *MUC5B* était détectable dans les adénocarcinomes pulmonaires ovins induits par JSRV (dans 63% des cancers contre 22% des poumons normaux). L'expression de *MUC5B* dans les cancers humains est un facteur de mauvais pronostic et est associé à un cancer plus agressif (361). Chez l'homme, l'expression de *MUC5AC* et *MUC5B* est majoritairement observé dans les adénocarcinomes mucineux invasifs (101). Cette expression différentielle n'était pas claire chez le mouton où *MUC5AC* et *MUC5B* étaient exprimés aussi bien dans les tumeurs non mucineuses que mucineuses.

L'adénocarcinome lépidique humain est également caractérisé par un statut de mutation *EGFR* et *KRAS* différentiel (151). Les mutations *EGFR* et *KRAS* n'ont pas été analysées dans l'adénocarcinome pulmonaire ovin car la transformation cellulaire dans le cancer ovin est induite par les propriétés oncogéniques de l'enveloppe virale de JSRV. Celle-ci est nécessaire et suffisante pour induire la transformation cellulaire par l'activation des voies de signalisation PI3K/AKT et MAPK (349, 397).

En conclusion, les cancers pulmonaires induits par JSRV peuvent être mucineux et non mucineux. De façon intéressante, l'expression de *MUC1* a été associée au type non mucineux. A ce jour, il n'y a pas de données sur l'évolution ou l'agressivité de ces deux types de cancers chez le mouton. Une analyse systématique du statut mucine par un marquage à l'Acide Périodique et au Schiff des tumeurs ovines traitées à l' α -amylase nous permettrait de comprendre les caractéristiques cliniques et l'évolution de la maladie chez le mouton.

CONCLUSION

DISCUSSION GENERALE

L'adénocarcinome pulmonaire ovin et l'adénocarcinome lépidique humain sont deux cancers pulmonaires de type pneumonique partageant des caractéristiques cliniques, radiologiques et histologiques (353). La dernière classification des cancers pulmonaires de l'OMS de 2015 a redéfini les cancers bronchioalvéolaires en adénocarcinomes lépidiques et a mis en évidence deux types principaux d'adénocarcinomes lépidiques : l'adénocarcinome lépidique prédominant non mucineux et l'adénocarcinome mucineux invasif différenciés par leur production de mucine, l'expression de *MUC1*, *MUC5AC* et *MUC5B* et par le statut des mutations *EGFR* et *KRAS* (506). Afin de définir vers quel type d'adénocarcinome lépidique se rapproche l'adénocarcinome pulmonaire ovin et de valider la pertinence de ce modèle d'étude, nous avons analysé la production de mucine et l'expression de *MUC1*, *MUC5AC* et *MUC5B* dans le cancer ovin. Nous avons montré que 62% des cancers pulmonaires ovins étaient non mucineux, qu'ils exprimaient tous *MUC1* et que *MUC1* était surexprimé dans les cancers par rapport aux poumons normaux. Cette surexpression peut également être impliquée dans la progression tumorale puisque la surexpression de *MUC1* est fréquente dans les cancers. *MUC1* peut interagir avec plusieurs facteurs de croissance dont l'EGFR important pour la prolifération et la survie cellulaire (271, 467). Les cancers ovins exprimaient faiblement *MUC5AC* et plus de la moitié exprimaient *MUC5B* indépendamment du statut mucine. Nous avons ainsi observé, comme chez l'homme, deux types différents d'adénocarcinomes ovins : un non mucineux et un mucineux. De par l'absence de mucine dans la majorité des cancers ovins et l'expression de *MUC1* dans tous nos échantillons, l'adénocarcinome pulmonaire ovin semble se rapprocher de l'adénocarcinome lépidique prédominant non mucineux. Cette étude apporte des éléments renforçant l'utilité du modèle ovin pour les adénocarcinomes lépidiques humains. Ainsi, le cancer ovin est un modèle d'étude précieux pour la compréhension des mécanismes de transformation des cellules pulmonaires en cellules tumorales formant des lésions de type lépidique. Nous avons alors voulu mieux connaître et caractériser ces deux cancers pulmonaires en partant de l'hypothèse que des événements cellulaires identiques devaient être impliqués dans l'initiation et/ ou la progression des tumeurs lépidiques humaines et ovines.

Les cancers pulmonaires sont métastatiques et se disséminent préférentiellement dans les glandes surrénales, les os, le foie et le cerveau (241). Les métastases sont responsables de plus de 90% de la mortalité des cancers montrant l'importance de l'étude des mécanismes permettant leur formation (512). A la différence de nombreux autres cancers pulmonaires, les adénocarcinomes lépidiques se développent dans le poumon sans invasion stromale, pleurale et vasculaire et les métastases extra-thoraciques sont rares (353). Ces caractéristiques sont également retrouvées dans l'adénocarcinome pulmonaire ovin. La compréhension de la « non dissémination » des cellules tumorales au reste de l'organisme dans ces deux cancers pulmonaires permettrait de découvrir potentiellement de nouvelles cibles thérapeutiques dans le traitement des cancers métastatiques.

Notre étude a porté sur l'analyse en parallèle des voies de signalisation impliquées dans les cancers pulmonaires et dans la dissémination des cellules tumorales. Afin d'analyser l'expression des gènes de ces voies, nous avons réalisé des puces transcriptomiques sur des tumeurs lépidiques humaines et ovines. Premièrement, lors de l'analyse sans a priori des voies de signalisation dans l'adénocarcinome pulmonaire ovin induit par JSRV, nous avons montré une surexpression des gènes de l'inflammation et une sous expression des gènes impliqués dans l'adhésion cellulaire, deux mécanismes essentiels de la formation des cancers ; l'inflammation permettant le relargage de cytokines favorisant la prolifération cellulaire et la perte d'adhésion cellulaire permettant aux cellules tumorales d'envahir le poumon (357, 551). Deuxièmement, l'analyse transcriptomique nous a permis de montrer de nombreuses dérégulations dans l'expression des gènes des voies BMI1, NOTCH, Hedgehog, WNT, de l'angiogenèse et de la lymphangiogenèse ; dont environ la moitié (75/162 gènes analysés), étaient communes entre cancers humains et ovins. Ces similarités étaient pour la plupart observées dans la voie BMI1 et dans les voies de l'angiogenèse et de la lymphangiogenèse; trois voies de signalisation primordiales dans le développement de métastases. La voie BMI1 est impliquée dans la transition épithélio-mésenchymateuse par la déstabilisation de l'E-cadhérine, protéine essentielle pour la jonction entre elles des cellules épithéliales (463). Les voies de l'angiogenèse et de la lymphangiogenèse permettent la croissance de nouveaux vaisseaux sanguins et lymphatiques en direction de la tumeur et la dissémination des cellules tumorales par ces vaisseaux néoformés (564). Nous avons mis en évidence une diminution de l'expression des gènes *BMI1*, *SNAI2* et *TWIST* et une augmentation de l'expression de l'*E-cadhérine*. De plus, nous avons montré une diminution de l'expression de nombreux ligands et récepteurs impliqués dans l'activation de l'angiogenèse et de la lymphangiogenèse tels que les gènes *VEGFA*, *VEGFC*, *VEGFD*, *VEGFR2* et *VEGFR3* pour la voie principale ; de *PDGFA*, *PDGFB*, *PDGFRA*, *ANGPT1*, *ANGPT2*, *TIE1* et *TIE2* pour les voies annexes d'activation indiquant un potentiel blocage de ces voies. Ces profils d'expression ne sont pas en faveur de l'invasion des cellules tumorales à travers la membrane basale ou à travers de potentiels vaisseaux néoformés et sont cohérents avec les caractéristiques des tumeurs lépidiques. Une étude récente sur un modèle de cancers pulmonaires induits par JSRV chez des souris montre la présence de métastases extra-thoraciques et une activation de la transition épithélio-mésenchymateuse par diminution de la protéine E-cadhérine et augmentation de la fibronectine (86). Notre travail a porté sur des tumeurs lépidiques naturellement induites chez l'homme et le mouton et non métastatiques suggérant que le modèle souris n'est peut-être pas le plus pertinent pour cette pathologie. Il est donc important d'analyser les gènes impliqués dans la transition épithélio-mésenchymateuse en détails dans les cancers ovins et humains afin de connaître l'état réel de celle-ci dans des tumeurs lépidiques naturellement induites.

Lors de l'analyse transcriptomique, nous avons observé que les dérégulations de l'expression des gènes observées dans les voie NOTCH, WNT et Hedgehog ne semblaient pas spécifiques des tumeurs lépidiques. En revanche, elles pourraient témoigner de la progression tumorale des cancers ovins et humains.

La dérégulation de l'expression de plus de la moitié des gènes des voies de l'angiogenèse et de la lymphangiogenèse nous a incité à analyser ces voies plus en détail et sur un nombre plus important

d'échantillons humains et ovins ; l'objectif étant de confirmer les régulations observées lors de l'analyse transcriptomique afin de valider le potentiel blocage de la voie de l'angiogenèse dans les adénocarcinomes lépidiques. Premièrement, bien qu'aucune différence d'expression significative en ARNm n'ait été observée entre cancers pulmonaires et poumons normaux ovins, la protéine VEGFA n'a pas été retrouvée dans les cancers ovins. L'absence de protéine sans diminution de l'ARNm peut être expliquée par la présence de certains miRNA. Chez l'homme, l'expression de VEGFA est, entre autre, contrôlée par 4 miRNA qui ciblent la séquence CARE en 3'-UTR de l'ARNm et inhibent fortement l'expression protéique sans dégradation de l'ARNm (237). Une étude de la présence des équivalents de ces miRNA chez le mouton serait importante pour la vérification de la régulation de l'expression de VEGFA au niveau post transcriptionnel. En plus de l'absence de VEGFA, une sous expression en ARNm a été observée pour le récepteur VEGFR2 et la protéine VEGFR2 n'était pas exprimée dans les cancers ovins. L'absence de l'expression de VEGFR2 a également été retrouvée dans les adénocarcinomes lépidiques humains. Ces résultats indiquent un blocage de la voie principale de l'angiogenèse dans les tumeurs ovines et humaines ; en effet, sans VEGFA ou VEGFR2, l'angiogenèse n'est pas activée (465). Le blocage des protéines VEGFA et VEGFR2 dans les tumeurs ovines et le blocage de la protéine VEGFR2 dans les tumeurs humaines peuvent participer à la limitation de la dissémination extra-thoracique des adénocarcinomes lépidiques humains et ovins. Les bénéfices dans l'utilisation de molécules anti-angiogéniques pourraient ne pas être retrouvés dans le traitement des adénocarcinomes lépidiques. En ne recevant pas ces traitements, les patients éviteraient ainsi de potentielles toxicités.

Deuxièmement, nous avons voulu vérifier si les voies alternatives d'activation de l'angiogenèse ou de la lymphangiogenèse pouvaient compenser le blocage de la voie principale. Nous avons observé une diminution de l'expression de VEGFB, VEGFC (non significative), VEGFD et VEGFR3 (non significative) dans les cancers ou les cellules épithéliales alvéolaires de type II dérivées de cancers ovins. La diminution de l'expression de VEGFD était commune aux cancers ovins et humains. Ainsi, la voie VEGF ne semble pas activée ; de plus, la sous expression de VEGFD et l'expression stable voire diminuée chez l'ovine de VEGFR3 indiquent que la lymphangiogenèse n'est pas activée non plus (564). Ces résultats soulignent un contrôle de l'extension des métastases dans les adénocarcinomes lépidiques humains et ovins.

Troisièmement, l'analyse de l'expression des gènes impliqués dans la dégradation de la matrice extracellulaire a montré que moins de 50% des tumeurs ovines exprimaient la métalloprotéase MMP9. TIMP1, inhibiteur de cette protéase était également surexprimées dans les cancers ovins suggérant un blocage de MMP9. TIMP1 peut également bloquer la réponse des cellules endothéliales aux facteurs pro-angiogéniques et participer à l'inhibition de la migration de ces cellules (236). Ces résultats plus la stabilité de l'expression des gènes MMP2, PLAU, SERPINE1 et PAI1 chez l'homme et le mouton n'indiquent pas de dégradation de la matrice extracellulaire dans les adénocarcinomes lépidiques.

Finalement, l'analyse de la voie FGF a montré une surexpression de FGFR2 dans les cancers ovins et une sous expression de FGF2 dans les cancers humains. FGFR2 joue un rôle important dans la prolifération

des cellules tumorales, ainsi sa surexpression dans les adénocarcinomes pulmonaires ovins n'est peut-être pas liée à l'angiogenèse mais à la prolifération des cellules tumorales pulmonaires (511). Ces différents aspects sont cohérents avec les caractéristiques non métastatiques des cancers lépidiques humains et ovins et sont différents des observations faites dans les tumeurs invasives (Figure 40).

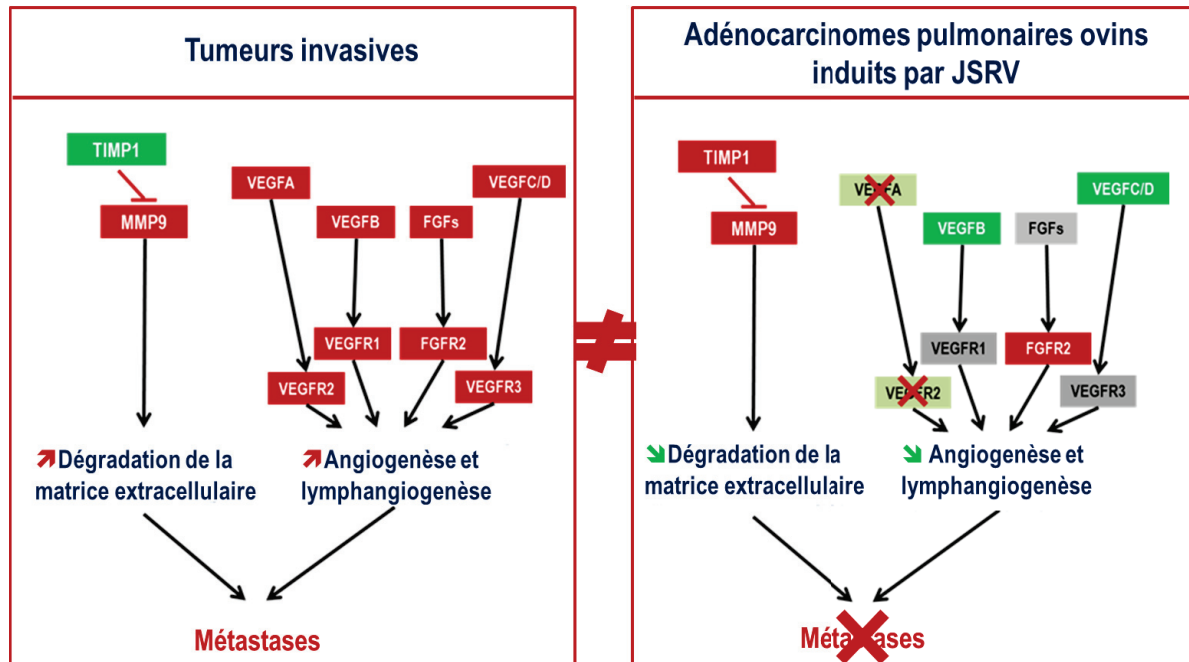


Figure 40 : Hypothèse de régulation de la voie de l'angiogenèse dans les adénocarcinomes pulmonaires ovins induits par JSRV.

L'expression des gènes de la voie de l'angiogenèse dans les tumeurs invasives est décrite à gauche et celle dans les adénocarcinomes pulmonaires ovins induits par JSRV à droite. Les gènes surexprimés sont indiqués en rouge, les sous exprimés en vert et les gènes dont l'expression est stable en gris.

Il est connu que certaines protéines virales telles que la protéine LANA du virus HHV8 ou la protéine LMP1 du virus EBV ont la capacité d'activer l'angiogenèse (418, 486). Nous avons voulu vérifier l'implication de JSRV dans l'activation des gènes de l'angiogenèse. Aucune corrélation n'a été trouvée entre le niveau d'expression des ARN de JSRV et les niveaux d'expression des différents gènes de l'angiogenèse. Pour être surs de l'impact du virus sur les cellules tumorales, il serait intéressant de vérifier l'expression des gènes de la voie de l'angiogenèse *in vitro* sur des cellules infectées ou non par JSRV.

Certains cancers n'activent pas l'angiogenèse tumorale et répondent au déficit en oxygène et en nutriments en changeant de métabolisme cellulaire (6). Lors de l'analyse transcriptomique ovine, une des voies dont l'expression des gènes était dérégulée était la voie du métabolisme cellulaire. Il serait pertinent de voir quels gènes de cette voie sont dérégulés afin de comprendre comment ces tumeurs pulmonaires continuent de se développer sans nouvel apport sanguin. En effet, il a été remarqué que dans les tumeurs pulmonaires, les cellules tumorales pouvaient utiliser les vaisseaux sanguins déjà existants pour se nourrir et proliférer (399) mais cet apport en nutriment est-il suffisant lorsque la tumeur envahit l'intégralité du poumon ? Dans ces

circonstances, est-ce le changement métabolique qui permet aux cellules tumorales de survivre et de se multiplier ?

En conclusion, ce travail de thèse a permis de mieux caractériser l'adénocarcinome pulmonaire ovin comme modèle d'étude pour l'adénocarcinome lépidique humain. Il a également permis de mettre en évidence un blocage de la voie de l'angiogenèse dans les cancers ovins et humains participant à la limitation de la dissémination extra-thoracique des adénocarcinomes lépidiques. L'étude en parallèle de ces deux cancers doit être poursuivie et permettra peut-être de comprendre les mécanismes de transformation spécifiques des cellules tumorales en lésions lépidiques et comment prévenir cette transformation.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Abbott, N. J., A. A. Patabendige, D. E. Dolman, S. R. Yusof, and D. J. Begley.** 2010. Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis* **37**:13-25.
2. **Aceto, N., A. Bardia, D. T. Miyamoto, M. C. Donaldson, B. S. Wittner, J. A. Spencer, M. Yu, A. Pely, A. Engstrom, H. Zhu, B. W. Brannigan, R. Kapur, S. L. Stott, T. Shioda, S. Ramaswamy, D. T. Ting, C. P. Lin, M. Toner, D. A. Haber, and S. Maheswaran.** 2014. Circulating tumor cell clusters are oligoclonal precursors of breast cancer metastasis. *Cell* **158**:1110-22.
3. **Acosta, A. M., and S. S. Kadkol.** 2016. Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Pathway in Cutaneous Melanoma: An Updated Review. *Arch Pathol Lab Med* **140**:1290-1296.
4. **Adams, J. C., and J. Lawler.** 2011. The thrombospondins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**:a009712.
5. **Adelson, D. L., J. M. Raison, and R. C. Edgar.** 2009. Characterization and distribution of retrotransposons and simple sequence repeats in the bovine genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**:12855-60.
6. **Adighibe, O., R. D. Leek, M. Fernandez-Mercado, J. Hu, C. Snell, K. C. Gatter, A. L. Harris, and F. Pezzella.** 2016. Why some tumours trigger neovascularisation and others don't: the story thus far. *Chin J Cancer* **35**:18.
7. **Alanko, J., A. Mai, G. Jacquemet, K. Schauer, R. Kaukonen, M. Saari, B. Goud, and J. Ivaska.** 2015. Integrin endosomal signalling suppresses anoikis. *Nat Cell Biol* **17**:1412-21.
8. **Alberti, A., C. Murgia, S. L. Liu, M. Mura, C. Cousens, M. Sharp, A. D. Miller, and M. Palmarini.** 2002. Envelope-induced cell transformation by ovine betaretroviruses. *J Virol* **76**:5387-94.
9. **Alevizakos, M., S. Kaltsas, and K. N. Syrigos.** 2013. The VEGF pathway in lung cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* **72**:1169-81.
10. **Alian, A., D. Sela-Donenfeld, A. Panet, and A. Eldor.** 2000. Avian hemangioma retrovirus induces cell proliferation via the envelope (env) gene. *Virology* **276**:161-8.
11. **Allen, T. E., K. J. Sherrill, S. M. Crispell, M. R. Perrott, J. O. Carlson, and J. C. DeMartini.** 2002. The jaagsiekte sheep retrovirus envelope gene induces transformation of the avian fibroblast cell line DF-1 but does not require a conserved SH2 binding domain. *J Gen Virol* **83**:2733-42.
12. **Andrae, J., R. Gallini, and C. Betsholtz.** 2008. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes Dev* **22**:1276-312.
13. **Andriani, F., G. Bertolini, F. Facchinetti, E. Baldoli, M. Moro, P. Casalini, R. Caserini, M. Milione, G. Leone, G. Pelosi, U. Pastorino, G. Sozzi, and L. Roz.** 2016. Conversion to stem-cell state in response to microenvironmental cues is regulated by balance between epithelial and mesenchymal features in lung cancer cells. *Mol Oncol* **10**:253-71.
14. **Antoine, M., W. Wirz, C. G. Tag, M. Mavituna, N. Emans, T. Korff, V. Stoldt, A. M. Gressner, and P. Kiefer.** 2005. Expression pattern of fibroblast growth factors (FGFs), their receptors and antagonists in primary endothelial cells and vascular smooth muscle cells. *Growth Factors* **23**:87-95.
15. **Archer, F., A. Abi-Rizk, S. Desloire, C. Dolmazon, B. Gineys, F. Guiguen, V. Cottin, J. F. Mornex, and C. Leroux.** 2013. Lung progenitors from lambs can differentiate into specialized alveolar or bronchiolar epithelial cells. *BMC Vet Res* **9**:224.
16. **Archer, F., E. Jacquier, M. Lyon, J. Chastang, V. Cottin, J. F. Mornex, and C. Leroux.** 2007. Alveolar type II cells isolated from pulmonary adenocarcinoma: a model for JSRV expression in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol* **36**:534-40.
17. **Archer, F., J. F. Mornex, and C. Leroux.** 2012. Interplay Between JSRV, an Oncogenic Retrovirus, and the Pulmonary Epithelium. *Current Immunology Reviews* **8**.
18. **Arcondeguy, T., E. Lacazette, S. Millevoi, H. Prats, and C. Touriol.** 2013. VEGF-A mRNA processing, stability and translation: a paradigm for intricate regulation of gene expression at the post-transcriptional level. *Nucleic Acids Res* **41**:7997-8010.
19. **Arias, J. F., T. Koyama, M. Kinomoto, and K. Tokunaga.** 2012. Retroelements versus APOBEC3 family members: No great escape from the magnificent seven. *Front Microbiol* **3**:275.

20. **Armbruester, V., M. Sauter, K. Roemer, B. Best, S. Hahn, A. Nty, A. Schmid, S. Philipp, A. Mueller, and N. Mueller-Lantsch.** 2004. Np9 protein of human endogenous retrovirus K interacts with ligand of numb protein X. *J Virol* **78**:10310-9.
21. **Armezzani, A., M. Varela, T. E. Spencer, M. Palmarini, and F. Arnaud.** 2014. "Menage a Trois": the evolutionary interplay between JSRV, enJSRVs and domestic sheep. *Viruses* **6**:4926-45.
22. **Armstrong, E. P.** 2010. Prophylaxis of cervical cancer and related cervical disease: a review of the cost-effectiveness of vaccination against oncogenic HPV types. *J Manag Care Pharm* **16**:217-30.
23. **Armulik, A., A. Abramsson, and C. Betsholtz.** 2005. Endothelial/pericyte interactions. *Circ Res* **97**:512-23.
24. **Arnaud, F., M. Caporale, M. Varela, R. Biek, B. Chessa, A. Alberti, M. Golder, M. Mura, Y. P. Zhang, L. Yu, F. Pereira, J. C. Demartini, K. Leymaster, T. E. Spencer, and M. Palmarini.** 2007. A paradigm for virus-host coevolution: sequential counter-adaptations between endogenous and exogenous retroviruses. *PLoS Pathog* **3**:e170.
25. **Arnold, M., M. Leitzmann, H. Freisling, F. Bray, I. Romieu, A. Renehan, and I. Soerjomataram.** 2016. Obesity and cancer: An update of the global impact. *Cancer Epidemiol* **41**:8-15.
26. **Astin, J. W., M. J. Haggerty, K. S. Okuda, L. Le Guen, J. P. Misa, A. Tromp, B. M. Hogan, K. E. Crosier, and P. S. Crosier.** 2014. Vegfd can compensate for loss of Vegfc in zebrafish facial lymphatic sprouting. *Development* **141**:2680-90.
27. **Auguste, P., L. Fallavollita, N. Wang, J. Burnier, A. Bikfalvi, and P. Brodt.** 2007. The host inflammatory response promotes liver metastasis by increasing tumor cell arrest and extravasation. *Am J Pathol* **170**:1781-92.
28. **Averhoff, F. M., N. Glass, and D. Holtzman.** 2012. Global burden of hepatitis C: considerations for healthcare providers in the United States. *Clin Infect Dis* **55 Suppl 1**:S10-5.
29. **Avraham, H. K., S. Jiang, Y. Fu, H. Nakshatri, H. Ovadia, and S. Avraham.** 2014. Angiopoietin-2 mediates blood-brain barrier impairment and colonization of triple-negative breast cancer cells in brain. *J Pathol* **232**:369-81.
30. **Avrillon, V., F. Philit, L. Chalabreysse, R. W. Chumbi-Flores, F. Tronc, F. Thivolet-Bejui, and J. F. Mornex.** 2012. [Bronchiolo-alveolar carcinoma and lung transplantation]. *Rev Mal Respir* **29**:84-8.
31. **Babaian, A., M. T. Romanish, L. Gagnier, L. Y. Kuo, M. M. Karimi, C. Steidl, and D. L. Mager.** 2015. Onco-exaptation of an endogenous retroviral LTR drives IRF5 expression in Hodgkin lymphoma. *Oncogene* **35**:2542-6.
32. **Bagley, R. G., Y. Ren, W. Weber, M. Yao, L. Kurtzberg, J. Pinckney, D. Bangari, C. Nguyen, W. Brondyk, J. Kaplan, and B. A. Teicher.** 2011. Placental growth factor upregulation is a host response to antiangiogenic therapy. *Clin Cancer Res* **17**:976-88.
33. **Bai, J., J. V. Bishop, J. O. Carlson, and J. C. DeMartini.** 1999. Sequence comparison of JSRV with endogenous proviruses: envelope genotypes and a novel ORF with similarity to a G-protein-coupled receptor. *Virology* **258**:333-43.
34. **Baluk, P., J. Fuxe, H. Hashizume, T. Romano, E. Lashnits, S. Butz, D. Vestweber, M. Corada, C. Molendini, E. Dejana, and D. M. McDonald.** 2007. Functionally specialized junctions between endothelial cells of lymphatic vessels. *J Exp Med* **204**:2349-62.
35. **Bansal, A., M. P. Singh, and B. Rai.** 2016. Human papillomavirus-associated cancers: A growing global problem. *Int J Appl Basic Med Res* **6**:84-9.
36. **Baramova, E. N., K. Bajou, A. Remacle, C. L'Hoir, H. W. Krell, U. H. Weidle, A. Noel, and J. M. Foidart.** 1997. Involvement of PA/plasmin system in the processing of pro-MMP-9 and in the second step of pro-MMP-2 activation. *FEBS Lett* **405**:157-62.
37. **Barnes, N. L., J. L. Ooi, J. R. Yarnold, and N. J. Bundred.** 2012. Ductal carcinoma in situ of the breast. *BMJ* **344**:e797.
38. **Barron, L., S. A. Gharib, and J. S. Duffield.** 2016. Lung Pericytes and Resident Fibroblasts: Busy Multitaskers. *Am J Pathol* **186**:2519-31.
39. **Baumgart, A., S. Seidl, P. Vlachou, L. Michel, N. Mitova, N. Schatz, K. Specht, I. Koch, T. Schuster, R. Grundler, M. Kremer, F. Fend, J. T. Siveke, C. Peschel, J. Duyster, and T. Dechow.** 2010. ADAM17 regulates epidermal growth factor receptor expression through the activation of Notch1 in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* **70**:5368-78.
40. **Baylin, S. B., and P. A. Jones.** 2016. Epigenetic Determinants of Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **8**.

41. **Bazarbachi, A., R. Abou Merhi, A. Gessain, R. Talhouk, H. El-Khoury, R. Nasr, O. Gout, R. Sulahian, F. Homaidan, H. de The, O. Hermine, and M. E. El-Sabban.** 2004. Human T-cell lymphotropic virus type I-infected cells extravasate through the endothelial barrier by a local angiogenesis-like mechanism. *Cancer Res* **64**:2039-46.
42. **Becker, P. M., J. Waltenberger, R. Yachechko, T. Mirzapoiazova, J. S. Sham, C. G. Lee, J. A. Elias, and A. D. Verin.** 2005. Neuropilin-1 regulates vascular endothelial growth factor-mediated endothelial permeability. *Circ Res* **96**:1257-65.
43. **Becker, P. W., N. Sacilotto, S. Nornes, A. Neal, M. O. Thomas, K. Liu, C. Preece, I. Ratnayaka, B. Davies, G. Bou-Gharios, and S. De Val.** 2016. An Intronic Flk1 Enhancer Directs Arterial-Specific Expression via RBPJ-Mediated Venous Repression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **36**:1209-19.
44. **Behera, S. K., A. B. Praharaaj, B. Dehury, and S. Negi.** 2015. Exploring the role and diversity of mucins in health and disease with special insight into non-communicable diseases. *Glycoconj J* **32**:575-613.
45. **Bellomo, D., J. P. Headrick, G. U. Silins, C. A. Paterson, P. S. Thomas, M. Gartside, A. Mould, M. M. Cahill, I. D. Tonks, S. M. Grimmond, S. Townson, C. Wells, M. Little, M. C. Cummings, N. K. Hayward, and G. F. Kay.** 2000. Mice lacking the vascular endothelial growth factor-B gene (*Vegfb*) have smaller hearts, dysfunctional coronary vasculature, and impaired recovery from cardiac ischemia. *Circ Res* **86**:E29-35.
46. **Belshaw, R., J. Watson, A. Katzourakis, A. Howe, J. Woolven-Allen, A. Burt, and M. Tristem.** 2007. Rate of recombinational deletion among human endogenous retroviruses. *J Virol* **81**:9437-42.
47. **Benjamin, C. L., and H. N. Ananthaswamy.** 2007. p53 and the pathogenesis of skin cancer. *Toxicol Appl Pharmacol* **224**:241-8.
48. **Bermudez, O., E. Hennen, I. Koch, M. Lindner, and O. Eickelberg.** 2013. Gli1 mediates lung cancer cell proliferation and Sonic Hedgehog-dependent mesenchymal cell activation. *PLoS One* **8**:e63226.
49. **Bernardo, C., M. C. Cunha, J. H. Santos, J. M. da Costa, P. J. Brindley, C. Lopes, F. Amado, R. Ferreira, R. Vitorino, and L. L. Santos.** 2016. Insight into the molecular basis of *Schistosoma haematobium*-induced bladder cancer through urine proteomics. *Tumour Biol* **37**:11279-87.
50. **Berthet, N., L. Frangeul, K. A. Olausson, E. Brambilla, N. Dorvault, P. Girard, P. Validire, E. Fadel, C. Bouchier, A. Gessain, and J. C. Soria.** 2015. No evidence for viral sequences in five lepidic adenocarcinomas (former "BAC") by a high-throughput sequencing approach. *BMC Res Notes* **8**:782.
51. **Bertolini, G., L. Roz, P. Perego, M. Tortoreto, E. Fontanella, L. Gatti, G. Pratesi, A. Fabbri, F. Andriani, S. Tinelli, E. Roz, R. Caserini, S. Lo Vullo, T. Camerini, L. Mariani, D. Delia, E. Calabro, U. Pastorino, and G. Sozzi.** 2009. Highly tumorigenic lung cancer CD133+ cells display stem-like features and are spared by cisplatin treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**:16281-6.
52. **Bertrand, P., M. Cote, Y. M. Zheng, L. M. Albritton, and S. L. Liu.** 2008. Jaagsiekte sheep retrovirus utilizes a pH-dependent endocytosis pathway for entry. *J Virol* **82**:2555-9.
53. **Bittner, J. J.** 1936. Some Possible Effects of Nursing on the Mammary Gland Tumor Incidence in Mice. *Science* **84**:162.
54. **Boller, K., K. Schonfeld, S. Lischer, N. Fischer, A. Hoffmann, R. Kurth, and R. R. Tonjes.** 2008. Human endogenous retrovirus HERV-K113 is capable of producing intact viral particles. *J Gen Virol* **89**:567-72.
55. **Borkham-Kamphorst, E., and R. Weiskirchen.** 2016. The PDGF system and its antagonists in liver fibrosis. *Cytokine Growth Factor Rev* **28**:53-61.
56. **Borobia, M., M. De Las Heras, J. J. Ramos, L. M. Ferrer, D. Lacasta, A. De Martino, A. Fernandez, A. Loste, D. Marteles, and A. Ortin.** 2016. Jaagsiekte Sheep Retrovirus Can Reach Peyer's Patches and Mesenteric Lymph Nodes of Lambs Nursed by Infected Mothers. *Vet Pathol* **53**:1172-1179.
57. **Bos, P. D., X. H. Zhang, C. Nadal, W. Shu, R. R. Gomis, D. X. Nguyen, A. J. Minn, M. J. van de Vijver, W. L. Gerald, J. A. Foekens, and J. Massague.** 2009. Genes that mediate breast cancer metastasis to the brain. *Nature* **459**:1005-9.
58. **Bragado, P., Y. Estrada, F. Parikh, S. Krause, C. Capobianco, H. G. Farina, D. M. Schewe, and J. A. Aguirre-Ghiso.** 2013. TGF-beta2 dictates disseminated tumour cell fate in target organs through TGF-beta-RIII and p38alpha/beta signalling. *Nat Cell Biol* **15**:1351-61.

59. **Breathnach, O. S., D. J. Kwiatkowski, D. M. Finkelstein, J. Godleski, D. J. Sugarbaker, B. E. Johnson, and S. Mentzer.** 2001. Bronchioloalveolar carcinoma of the lung: Recurrences and survival in patients with stage I disease. *J Thorac Cardiovasc Surg* **121**:42-47.
60. **Breathnach, O. S., D. J. Kwiatkowski, D. M. Finkelstein, J. Godleski, D. J. Sugarbaker, B. E. Johnson, and S. Mentzer.** 2001. Bronchioloalveolar carcinoma of the lung: recurrences and survival in patients with stage I disease. *J Thorac Cardiovasc Surg* **121**:42-7.
61. **Breuss, J. M., and P. Uhrin.** 2012. VEGF-initiated angiogenesis and the uPA/uPAR system. *Cell Adh Migr* **6**:535-615.
62. **Brewer, J. R., P. Mazot, and P. Soriano.** 2016. Genetic insights into the mechanisms of Fgf signaling. *Genes Dev* **30**:751-71.
63. **Brindley, P. J., J. M. da Costa, and B. Sripa.** 2015. Why does infection with some helminths cause cancer? *Trends Cancer* **1**:174-182.
64. **Briscoe, J., and P. P. Therond.** 2013. The mechanisms of Hedgehog signalling and its roles in development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* **14**:416-29.
65. **Brock, M. V., C. M. Hooker, E. Ota-Machida, Y. Han, M. Guo, S. Ames, S. Glockner, S. Piantadosi, E. Gabrielson, G. Pridham, K. Pelosky, S. A. Belinsky, S. C. Yang, S. B. Baylin, and J. G. Herman.** 2008. DNA methylation markers and early recurrence in stage I lung cancer. *N Engl J Med* **358**:1118-28.
66. **Brown, D. M., and E. Ruoslahti.** 2004. Metadherin, a cell surface protein in breast tumors that mediates lung metastasis. *Cancer Cell* **5**:365-74.
67. **Brunckhorst, M. K., H. Wang, R. Lu, and Q. Yu.** 2010. Angiopoietin-4 promotes glioblastoma progression by enhancing tumor cell viability and angiogenesis. *Cancer Res* **70**:7283-93.
68. **Budczies, J., M. von Winterfeld, F. Klauschen, M. Bockmayr, J. K. Lennerz, C. Denkert, T. Wolf, A. Warth, M. Dietel, I. Anagnostopoulos, W. Weichert, D. Wittschieber, and A. Stenzinger.** 2015. The landscape of metastatic progression patterns across major human cancers. *Oncotarget* **6**:570-83.
69. **Bui, H. M., D. Enis, M. R. Robciuc, H. J. Nurmi, J. Cohen, M. Chen, Y. Yang, V. Dhillon, K. Johnson, H. Zhang, R. Kirkpatrick, E. Traxler, A. Anisimov, K. Alitalo, and M. L. Kahn.** 2016. Proteolytic activation defines distinct lymphangiogenic mechanisms for VEGFC and VEGFD. *J Clin Invest* **126**:2167-80.
70. **Cadranel, J., R. Gervais, P. Merle, D. Moro-Sibilot, V. Westeel, L. Bigay-Game, E. Quoix, S. Friard, F. Barlesi, C. Lethrosne, L. Moreau, I. Monnet, M. Salaun, G. Oliviero, P. J. Souquet, M. Antoine, A. Langlais, F. Morin, M. Wislez, and G. Zalcman.** 2015. Erlotinib versus carboplatin and paclitaxel in advanced lepidic adenocarcinoma: IFCT-0504. *Eur Respir J* **46**:1440-50.
71. **Camy, M.** 1955. Papillome granuleux des cavités nasales du mouton. *Bulletin Academie Veterinaire France* **28**:31-34.
72. **Caporale, M., P. Centorame, A. Giovannini, F. Sacchini, M. Di Ventura, M. De las Heras, and M. Palmarini.** 2005. Infection of lung epithelial cells and induction of pulmonary adenocarcinoma is not the most common outcome of naturally occurring JSRV infection during the commercial lifespan of sheep. *Virology* **338**:144-53.
73. **Caporale, M., C. Cousens, P. Centorame, C. Pinoni, M. De las Heras, and M. Palmarini.** 2006. Expression of the jaagsiekte sheep retrovirus envelope glycoprotein is sufficient to induce lung tumors in sheep. *J Virol* **80**:8030-7.
74. **Cappellen, D., C. De Oliveira, D. Ricol, S. de Medina, J. Bourdin, X. Sastre-Garau, D. Chopin, J. P. Thiery, and F. Radvanyi.** 1999. Frequent activating mutations of FGFR3 in human bladder and cervix carcinomas. *Nat Genet* **23**:18-20.
75. **Carlson, C. B., J. Lawler, and D. F. Mosher.** 2008. Structures of thrombospondins. *Cell Mol Life Sci* **65**:672-86.
76. **Carlson, J., M. Lyon, J. Bishop, A. Vaiman, E. Cribiu, J. F. Mornex, S. Brown, D. Knudson, J. DeMartini, and C. Leroux.** 2003. Chromosomal distribution of endogenous Jaagsiekte sheep retrovirus proviral sequences in the sheep genome. *J Virol* **77**:9662-8.
77. **Carmeliet, P.** 2005. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* **438**:932-6.
78. **Carmeliet, P., V. Ferreira, G. Breier, S. Pollefeyt, L. Kieckens, M. Gertsenstein, M. Fahrig, A. Vandenhoeck, K. Harpal, C. Eberhardt, C. Declercq, J. Pawling, L. Moons, D. Collen, W. Risau, and A. Nagy.** 1996. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* **380**:435-9.

79. **Carmeliet, P., and R. K. Jain.** 2011. Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases. *Nat Rev Drug Discov* **10**:417-27.
80. **Carmeliet, P., L. Moons, M. Dewerchin, N. Mackman, T. Luther, G. Breier, V. Ploplis, M. Muller, A. Nagy, E. Plow, R. Gerard, T. Edgington, W. Risau, and D. Collen.** 1997. Insights in vessel development and vascular disorders using targeted inactivation and transfer of vascular endothelial growth factor, the tissue factor receptor, and the plasminogen system. *Ann N Y Acad Sci* **811**:191-206.
81. **Carmeliet, P., L. Moons, A. Lutun, V. Vincenti, V. Compernelle, M. De Mol, Y. Wu, F. Bono, L. Devy, H. Beck, D. Scholz, T. Acker, T. DiPalma, M. Dewerchin, A. Noel, I. Stalmans, A. Barra, S. Blacher, T. VandenDriessche, A. Ponten, U. Eriksson, K. H. Plate, J. M. Foidart, W. Schaper, D. S. Charnock-Jones, D. J. Hicklin, J. M. Herbert, D. Collen, and M. G. Persico.** 2001. Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat Med* **7**:575-83.
82. **Centers for Disease Control and Prevention, U. N. C. f. C. D. P. a. H. P. U. O. o. S. a. H. U.** 2010, posting date. How Tobacco Smoke Causes Disease: The Biology and Behavioral Basis for Smoking-Attributable Disease: A Report of the Surgeon General. . [Online.]
83. **Cerimele, F., L. F. Brown, F. Bravo, G. M. Ihler, P. Kouadio, and J. L. Arbiser.** 2003. Infectious angiogenesis: Bartonella bacilliformis infection results in endothelial production of angiopoietin-2 and epidermal production of vascular endothelial growth factor. *Am J Pathol* **163**:1321-7.
84. **Chakraborti, S., M. Mandal, S. Das, A. Mandal, and T. Chakraborti.** 2003. Regulation of matrix metalloproteinases: an overview. *Mol Cell Biochem* **253**:269-85.
85. **Chang, A. L., J. A. Solomon, J. D. Hainsworth, L. Goldberg, E. McKenna, B. M. Day, D. M. Chen, and G. J. Weiss.** 2014. Expanded access study of patients with advanced basal cell carcinoma treated with the Hedgehog pathway inhibitor, vismodegib. *J Am Acad Dermatol* **70**:60-9.
86. **Chang, H. W., Z. M. Lin, M. J. Wu, L. Y. Wang, Y. H. Chow, S. S. Jiang, H. J. Ch'ang, and V. H. Chang.** 2017. Characterization of a transgenic mouse model exhibiting spontaneous lung adenocarcinomas with a metastatic phenotype. *PLoS One* **12**:e0175586.
87. **Chang, Y. H., Y. J. Chiu, H. C. Cheng, F. J. Liu, W. W. Lai, H. J. Chang, and P. C. Liao.** 2015. Down-regulation of TIMP-1 inhibits cell migration, invasion, and metastatic colonization in lung adenocarcinoma. *Tumour Biol* **36**:3957-67.
88. **Chatterjee, S., L. C. Heukamp, M. Siobal, J. Schottle, C. Wiczorek, M. Peifer, D. Frasca, M. Koker, K. Konig, L. Meder, D. Rauh, R. Buettner, J. Wolf, R. A. Brekken, B. Neumaier, G. Christofori, R. K. Thomas, and R. T. Ullrich.** 2013. Tumor VEGF:VEGFR2 autocrine feed-forward loop triggers angiogenesis in lung cancer. *J Clin Invest* **123**:1732-40.
89. **Chen, J. S., X. H. Huang, Q. Wang, J. Q. Huang, L. J. Zhang, X. L. Chen, J. Lei, and Z. X. Cheng.** 2013. Sonic hedgehog signaling pathway induces cell migration and invasion through focal adhesion kinase/AKT signaling-mediated activation of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in liver cancer. *Carcinogenesis* **34**:10-9.
90. **Chen, Q., J. Fei, L. Wu, Z. Jiang, Y. Wu, Y. Zheng, and G. Lu.** 2011. Detection of cathepsin B, cathepsin L, cystatin C, urokinase plasminogen activator and urokinase plasminogen activator receptor in the sera of lung cancer patients. *Oncol Lett* **2**:693-699.
91. **Chen, S., W. Chen, X. Zhang, S. Lin, and Z. Chen.** 2016. Overexpression of KiSS-1 reduces colorectal cancer cell invasion by downregulating MMP-9 via blocking PI3K/Akt/NF-kappaB signal pathway. *Int J Oncol* **48**:1391-8.
92. **Chen, T., Z. Meng, Y. Gan, X. Wang, F. Xu, Y. Gu, X. Xu, J. Tang, H. Zhou, X. Zhang, X. Gan, C. Van Ness, G. Xu, L. Huang, Y. Fang, J. Wu, S. Zheng, J. Jin, W. Huang, and R. Xu.** 2013. The viral oncogene Np9 acts as a critical molecular switch for co-activating beta-catenin, ERK, Akt and Notch1 and promoting the growth of human leukemia stem/progenitor cells. *Leukemia* **27**:1469-78.
93. **Chetty, C., S. S. Lakka, P. Bhoopathi, and J. S. Rao.** 2010. MMP-2 alters VEGF expression via alphaVbeta3 integrin-mediated PI3K/AKT signaling in A549 lung cancer cells. *Int J Cancer* **127**:1081-95.
94. **Claesson-Welsh, L.** 2016. VEGF receptor signal transduction - A brief update. *Vascul Pharmacol* **86**:14-17.
95. **Clevers, H., and R. Nusse.** 2012. Wnt/beta-catenin signaling and disease. *Cell* **149**:1192-205.

96. **Clevidence, D. E., D. G. Overdier, R. S. Peterson, A. Porcella, H. Ye, K. E. Paulson, and R. H. Costa.** 1994. Members of the HNF-3/forkhead family of transcription factors exhibit distinct cellular expression patterns in lung and regulate the surfactant protein B promoter. *Dev Biol* **166**:195-209.
97. **Cohen, J. I., A. S. Fauci, H. Varmus, and G. J. Nabel.** 2011. Epstein-Barr virus: an important vaccine target for cancer prevention. *Sci Transl Med* **3**:107fs7.
98. **Contreras-Galindo, R., M. H. Kaplan, P. Leissner, T. Verjat, I. Ferlenghi, F. Bagnoli, F. Giusti, M. H. Dosik, D. F. Hayes, S. D. Gitlin, and D. M. Markovitz.** 2008. Human endogenous retrovirus K (HML-2) elements in the plasma of people with lymphoma and breast cancer. *J Virol* **82**:9329-36.
99. **Conway, E. M., L. A. Pikor, S. H. Kung, M. J. Hamilton, S. Lam, W. L. Lam, and K. L. Bennewith.** 2016. Macrophages, Inflammation, and Lung Cancer. *Am J Respir Crit Care Med* **193**:116-30.
100. **Cooper, W. A., D. C. Lam, S. A. O'Toole, and J. D. Minna.** 2013. Molecular biology of lung cancer. *J Thorac Dis* **5 Suppl 5**:S479-90.
101. **Copin, M. C., M. P. Buisine, E. Leteurtre, C. H. Marquette, H. Porte, J. P. Aubert, B. Gosselin, and N. Porchet.** 2001. Mucinous bronchioloalveolar carcinomas display a specific pattern of mucin gene expression among primary lung adenocarcinomas. *Hum Pathol* **32**:274-81.
102. **Cote, M., Y. M. Zheng, L. M. Albritton, and S. L. Liu.** 2008. Fusogenicity of Jaagsiekte sheep retrovirus envelope protein is dependent on low pH and is enhanced by cytoplasmic tail truncations. *J Virol* **82**:2543-54.
103. **Cote, M., Y. M. Zheng, L. M. Albritton, and S. L. Liu.** 2011. Single residues in the surface subunits of oncogenic sheep retrovirus envelopes distinguish receptor-mediated triggering for fusion at low pH and infection. *Virology* **421**:173-83.
104. **Cote, M., Y. M. Zheng, K. Li, S. H. Xiang, L. M. Albritton, and S. L. Liu.** 2012. Critical role of leucine-valine change in distinct low pH requirements for membrane fusion between two related retrovirus envelopes. *J Biol Chem* **287**:7640-51.
105. **Coumans, F. A., S. Siesling, and L. W. Terstappen.** 2013. Detection of cancer before distant metastasis. *BMC Cancer* **13**:283.
106. **Cousens, C., C. Alleaume, E. Bijmans, H. M. Martineau, J. Finlayson, M. P. Dagleish, and D. J. Griffiths.** 2015. Jaagsiekte sheep retrovirus infection of lung slice cultures. *Retrovirology* **12**:31.
107. **Cousens, C., J. V. Bishop, A. W. Philbey, C. A. Gill, M. Palmarini, J. O. Carlson, J. C. DeMartini, and J. M. Sharp.** 2004. Analysis of integration sites of Jaagsiekte sheep retrovirus in ovine pulmonary adenocarcinoma. *J Virol* **78**:8506-12.
108. **Cousens, C., N. Maeda, C. Murgia, M. P. Dagleish, M. Palmarini, and H. Fan.** 2007. In vivo tumorigenesis by Jaagsiekte sheep retrovirus (JSRV) requires Y590 in Env TM, but not full-length orfX open reading frame. *Virology* **367**:413-21.
109. **Cousens, C., E. Minguiljon, R. G. Dalziel, A. Ortin, M. Garcia, J. Park, L. Gonzalez, J. M. Sharp, and M. de las Heras.** 1999. Complete sequence of enzootic nasal tumor virus, a retrovirus associated with transmissible intranasal tumors of sheep. *J Virol* **73**:3986-93.
110. **Cousens, C., L. Thonur, S. Imlach, J. Crawford, J. Sales, and D. J. Griffiths.** 2009. Jaagsiekte sheep retrovirus is present at high concentration in lung fluid produced by ovine pulmonary adenocarcinoma-affected sheep and can survive for several weeks at ambient temperatures. *Res Vet Sci* **87**:154-6.
111. **D'Antonio, C., A. Passaro, B. Gori, E. Del Signore, M. R. Migliorino, S. Ricciardi, A. Fulvi, and F. de Marinis.** 2014. Bone and brain metastasis in lung cancer: recent advances in therapeutic strategies. *Ther Adv Med Oncol* **6**:101-14.
112. **Dalla-Favera, R., M. Bregni, J. Erikson, D. Patterson, R. C. Gallo, and C. M. Croce.** 1982. Human c-myc onc gene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**:7824-7.
113. **Dang, T. P., S. Eichenberger, A. Gonzalez, S. Olson, and D. P. Carbone.** 2003. Constitutive activation of Notch3 inhibits terminal epithelial differentiation in lungs of transgenic mice. *Oncogene* **22**:1988-97.
114. **Danilkovitch-Miagkova, A., F. M. Duh, I. Kuzmin, D. Angeloni, S. L. Liu, A. D. Miller, and M. I. Lerman.** 2003. Hyaluronidase 2 negatively regulates RON receptor tyrosine kinase and mediates transformation of epithelial cells by jaagsiekte sheep retrovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:4580-5.
115. **Davydova, N., N. C. Harris, S. Roufail, S. Paquet-Fifield, M. Ishaq, V. A. Streltsov, S. P. Williams, T. Karnezis, S. A. Stacker, and M. G. Achen.** 2016. Differential Receptor Binding and Regulatory

- Mechanisms for the Lymphangiogenic Growth Factors Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)-C and -D. *J Biol Chem* **291**:27265-27278.
116. **de Freitas, A. C., A. P. Gurgel, E. G. de Lima, B. de Franca Sao Marcos, and C. M. do Amaral.** 2016. Human papillomavirus and lung carcinogenesis: an overview. *J Cancer Res Clin Oncol* **142**:2415-2427.
 117. **De las Heras, M.** 1999. Enfermedades neoplásicas contagiosas del aparato respiratorio de los pequeños rumiantes: Adenomatosis pulmonar ovina y tumor intranasal enzoótico. *Ovis. Mongrafias de actualidad. Aula Veterinaria. Editorial Luzan* **5**.
 118. **De las Heras, M., S. H. Barsky, P. Hasleton, M. Wagner, E. Larson, J. Egan, A. Ortin, J. A. Gimenez-Mas, M. Palmarini, and J. M. Sharp.** 2000. Evidence for a protein related immunologically to the jaagsiekte sheep retrovirus in some human lung tumours. *Eur Respir J* **16**:330-2.
 119. **De las Heras, M., J. A. Garcia de Jalon, E. Minguijon, E. W. Gray, P. Dewar, and J. M. Sharp.** 1995. Experimental transmission of enzootic intranasal tumors of goats. *Vet Pathol* **32**:19-23.
 120. **De las Heras, M., J. A. Garcia de Jalon, and J. M. Sharp.** 1991. Pathology of enzootic intranasal tumor in thirty-eight goats. *Vet Pathol* **28**:474-81.
 121. **De Las Heras, M., A. Ortin, A. Benito, C. Summers, L. M. Ferrer, and J. M. Sharp.** 2006. In-situ demonstration of mitogen-activated protein kinase Erk 1/2 signalling pathway in contagious respiratory tumours of sheep and goats. *J Comp Pathol* **135**:1-10.
 122. **De las Heras, M., A. Ortin, C. Cousens, E. Minguijon, and J. M. Sharp.** 2003. Enzootic nasal adenocarcinoma of sheep and goats. *Curr Top Microbiol Immunol* **275**:201-23.
 123. **De Las Heras, M., A. Ortin, D. Salvatori, M. Perez de Villareal, C. Cousens, L. Miguel Ferrer, L. Miguel Cebrian, J. A. Garcia de Jalon, L. Gonzalez, and J. Michael Sharp.** 2005. A PCR technique for the detection of Jaagsiekte sheep retrovirus in the blood suitable for the screening of ovine pulmonary adenocarcinoma in field conditions. *Res Vet Sci* **79**:259-64.
 124. **De las Heras, M. M., E.; Ferrer, LM.; Ortín, A.; Dewar, P.; Cebrian, LM.; Pascual, Z.; García, L.; García de Jalón, JA.; Sharp, JM.;** 1998. Naturally occurring enzootic nasal tumour of sheep in Spain: pathology and associated retrovirus. *European Journal of Veterinary Pathology* **5**:1-5.
 125. **de Perrot, M., S. Chernenko, T. K. Waddell, Y. Shargall, A. F. Pierre, M. Hutcheon, and S. Keshavjee.** 2004. Role of lung transplantation in the treatment of bronchogenic carcinomas for patients with end-stage pulmonary disease. *J Clin Oncol* **22**:4351-6.
 126. **Denne, M., M. Sauter, V. Armbruester, J. D. Licht, K. Roemer, and N. Mueller-Lantsch.** 2007. Physical and functional interactions of human endogenous retrovirus proteins Np9 and rec with the promyelocytic leukemia zinc finger protein. *J Virol* **81**:5607-16.
 127. **Denner, J.** 2016. Expression and function of endogenous retroviruses in the placenta. *APMIS* **124**:31-43.
 128. **Denner, J.** 2016. How Active Are Porcine Endogenous Retroviruses (PERVs)? *Viruses* **8**.
 129. **Depil, S., C. Roche, P. Dussart, and L. Prin.** 2002. Expression of a human endogenous retrovirus, HERV-K, in the blood cells of leukemia patients. *Leukemia* **16**:254-9.
 130. **Deryugina, E. I., and J. P. Quigley.** 2015. Tumor angiogenesis: MMP-mediated induction of intravasation- and metastasis-sustaining neovasculature. *Matrix Biol* **44-46**:94-112.
 131. **Desai, S., S. Laskar, and B. N. Pandey.** 2013. Autocrine IL-8 and VEGF mediate epithelial-mesenchymal transition and invasiveness via p38/JNK-ATF-2 signalling in A549 lung cancer cells. *Cell Signal* **25**:1780-91.
 132. **Detterbeck, F. C., E. M. Marom, D. A. Arenberg, W. A. Franklin, A. G. Nicholson, W. D. Travis, N. Girard, P. J. Mazzone, J. S. Donington, L. T. Tanoue, V. W. Rusch, H. Asamura, R. Rami-Porta, I. Staging, C. Prognostic Factors, B. Advisory, and W. Multiple Pulmonary Sites.** 2015. The IASLC Lung Cancer Staging Project: Background Data and Proposals for the Application of TNM Staging Rules to Lung Cancer Presenting as Multiple Nodules with Ground Glass or Lepidic Features or a Pneumonic Type of Involvement in the Forthcoming Eighth Edition of the TNM Classification. *J Thorac Oncol* **11**:666-80.
 133. **Dewerchin, M., and P. Carmeliet.** 2012. PIGF: a multitasking cytokine with disease-restricted activity. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2**.
 134. **Ding, M., L. Liu, C. Hu, Y. Liu, Y. Qiao, and X. Jiang.** 2014. Expression of VEGFR2 and NRP-1 in non-small cell lung cancer and their clinical significance. *Chin J Cancer Res* **26**:669-77.

135. **Ding, X. M.** 2014. MicroRNAs: regulators of cancer metastasis and epithelial-mesenchymal transition (EMT). *Chin J Cancer* **33**:140-7.
136. **Dirks, C., F. M. Duh, S. K. Rai, M. I. Lerman, and A. D. Miller.** 2002. Mechanism of cell entry and transformation by enzootic nasal tumor virus. *J Virol* **76**:2141-9.
137. **Dong, J. C., H. Gao, S. Y. Zuo, H. Q. Zhang, G. Zhao, S. L. Sun, H. L. Han, L. L. Jin, L. H. Shao, W. Wei, and S. Z. Jin.** 2015. Neuropilin 1 expression correlates with the Radio-resistance of human non-small-cell lung cancer cells. *J Cell Mol Med* **19**:2286-95.
138. **Dong, Y., S. Kase, Z. Dong, J. Fukuhara, Y. Tagawa, E. T. Ishizuka, M. Murata, Y. Shinmei, T. Ohguchi, A. Kanda, K. Noda, and S. Ishida.** 2016. Regulation of vascular endothelial growth factor-C by tumor necrosis factor-alpha in the conjunctiva and pterygium. *Int J Mol Med* **38**:545-50.
139. **Donnem, T., S. Al-Saad, K. Al-Shibli, S. Andersen, L. T. Busund, and R. M. Bremnes.** 2008. Prognostic impact of platelet-derived growth factors in non-small cell lung cancer tumor and stromal cells. *J Thorac Oncol* **3**:963-70.
140. **Donnem, T., S. Andersen, S. Al-Saad, K. Al-Shibli, L. T. Busund, and R. M. Bremnes.** 2011. Prognostic impact of angiogenic markers in non-small-cell lung cancer is related to tumor size. *Clin Lung Cancer* **12**:106-15.
141. **Donnem, T., S. Andersen, K. Al-Shibli, S. Al-Saad, L. T. Busund, and R. M. Bremnes.** 2010. Prognostic impact of Notch ligands and receptors in nonsmall cell lung cancer: coexpression of Notch-1 and vascular endothelial growth factor-A predicts poor survival. *Cancer* **116**:5676-85.
142. **Dovey, J. S., S. J. Zacharek, C. F. Kim, and J. A. Lees.** 2008. Bmi1 is critical for lung tumorigenesis and bronchioalveolar stem cell expansion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**:11857-62.
143. **Downey, R. F., F. J. Sullivan, F. Wang-Johanning, S. Ambs, F. J. Giles, and S. A. Glynn.** 2015. Human endogenous retrovirus K and cancer: Innocent bystander or tumorigenic accomplice? *Int J Cancer* **137**:1249-57.
144. **Downward, J., Y. Yarden, E. Mayes, G. Scrace, N. Totty, P. Stockwell, A. Ullrich, J. Schlessinger, and M. D. Waterfield.** 1984. Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erb-B oncogene protein sequences. *Nature* **307**:521-7.
145. **Dufourt, A. S., P.; Galy, P.; Touraine, R, G.; Rieeat, G.,.** 1954. Adenomatosis et soi-disant cancer alvéolaire. Les proliférations épithéliales intra-alvéolaires de type bronchique. *Sem Hôp Paris* **30**:1209.
146. **Dumont, D. J., L. Jussila, J. Taipale, A. Lymboussaki, T. Mustonen, K. Pajusola, M. Breitman, and K. Alitalo.** 1998. Cardiovascular failure in mouse embryos deficient in VEGF receptor-3. *Science* **282**:946-9.
147. **Dungal, N.** 1946. Experiments with Jaagsiekte. *Am J Pathol* **22**:737-59.
148. **Dunlap, K. A., M. Palmarini, and T. E. Spencer.** 2006. Ovine endogenous betaretroviruses (enJSRVs) and placental morphogenesis. *Placenta* **27 Suppl A**:S135-40.
149. **Dunlap, K. A., M. Palmarini, M. Varela, R. C. Burghardt, K. Hayashi, J. L. Farmer, and T. E. Spencer.** 2006. Endogenous retroviruses regulate periimplantation placental growth and differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:14390-5.
150. **Duruiseaux, M.** 2015. Signature moléculaire des adénocarcinomes pulmonaires de type lépidique prédominant et mucineux invasifs et dérégulation. Université Pierre et Marie Curie, Paris.
151. **Duruiseaux, M., M. Antoine, N. Rabbe, V. Poulot, J. Fleury-Feith, T. Vieira, A. Lavole, J. Cadranel, and M. Wislez.** 2014. The impact of intracytoplasmic mucin in lung adenocarcinoma with pneumonic radiological presentation. *Lung Cancer* **83**:334-40.
152. **Eckstrand, C. D., D. Castillo, S. J. McDonnel, C. N. Hillman, N. Vapniarsky, S. Shanthalingam, M. de las Heras, and B. G. Murphy.** 2013. Genetic variability and in vitro transcriptional permissibility of primary ovine beta-retrovirus promoter isolates. *Am J Vet Res* **74**:1421-7.
153. **Ei-Badrawy, M. K., A. M. Yousef, D. Shaalan, and A. Z. Elsamanoudy.** 2014. Matrix metalloproteinase-9 expression in lung cancer patients and its relation to serum mmp-9 activity, pathologic type, and prognosis. *J Bronchology Interv Pulmonol* **21**:327-34.
154. **Ei-Serag, H. B.** 2012. Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* **142**:1264-1273 e1.
155. **Ei Agha, E., D. Kosanovic, R. T. Schermuly, and S. Bellusci.** 2016. Role of fibroblast growth factors in organ regeneration and repair. *Semin Cell Dev Biol* **53**:76-84.

156. **Erler, J. T., K. L. Bennewith, T. R. Cox, G. Lang, D. Bird, A. Koong, Q. T. Le, and A. J. Giaccia.** 2009. Hypoxia-induced lysyl oxidase is a critical mediator of bone marrow cell recruitment to form the premetastatic niche. *Cancer Cell* **15**:35-44.
157. **Etienne, B., M. Bertocchi, J. P. Gamondes, T. Wiesendanger, J. Brune, and J. F. Mornex.** 1997. Successful double-lung transplantation for bronchioalveolar carcinoma. *Chest* **112**:1423-4.
158. **Fabisiewicz, A., and E. Grzybowska.** 2017. CTC clusters in cancer progression and metastasis. *Med Oncol* **34**:12.
159. **Fagiani, E., and G. Christofori.** 2013. Angiopoietins in angiogenesis. *Cancer Lett* **328**:18-26.
160. **Fan, H., and C. Johnson.** 2011. Insertional oncogenesis by non-acute retroviruses: implications for gene therapy. *Viruses* **3**:398-422.
161. **Fang, X., P. Gu, C. Zhou, A. Liang, S. Ren, F. Liu, Y. Zeng, Y. Wu, Y. Zhao, B. Huang, Z. Zhang, and X. Yi.** 2014. beta-Catenin overexpression is associated with gefitinib resistance in non-small cell lung cancer cells. *Pulm Pharmacol Ther* **28**:41-8.
162. **Fanjul-Fernandez, M., A. R. Folgueras, S. Cabrera, and C. Lopez-Otin.** 2010. Matrix metalloproteinases: evolution, gene regulation and functional analysis in mouse models. *Biochim Biophys Acta* **1803**:3-19.
163. **Fantin, A., Q. Schwarz, K. Davidson, E. M. Normando, L. Denti, and C. Ruhrberg.** 2011. The cytoplasmic domain of neuropilin 1 is dispensable for angiogenesis, but promotes the spatial separation of retinal arteries and veins. *Development* **138**:4185-91.
164. **Farina, A. R., and A. R. Mackay.** 2014. Gelatinase B/MMP-9 in Tumour Pathogenesis and Progression. *Cancers (Basel)* **6**:240-96.
165. **Favier, B., A. Alam, P. Barron, J. Bonnin, P. Laboudie, P. Fons, M. Mandron, J. P. Herault, G. Neufeld, P. Savi, J. M. Herbert, and F. Bono.** 2006. Neuropilin-2 interacts with VEGFR-2 and VEGFR-3 and promotes human endothelial cell survival and migration. *Blood* **108**:1243-50.
166. **Fehrenbach, H.** 2001. Alveolar epithelial type II cell: defender of the alveolus revisited. *Respir Res* **2**:33-46.
167. **Feng, H., M. Shuda, Y. Chang, and P. S. Moore.** 2008. Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma. *Science* **319**:1096-100.
168. **Ferrara, N., and A. P. Adamis.** 2016. Ten years of anti-vascular endothelial growth factor therapy. *Nat Rev Drug Discov* **15**:385-403.
169. **Fischer, C., M. Mazzone, B. Jonckx, and P. Carmeliet.** 2008. FLT1 and its ligands VEGFB and PlGF: drug targets for anti-angiogenic therapy? *Nat Rev Cancer* **8**:942-56.
170. **Fiuzza, U. M., and A. M. Arias.** 2007. Cell and molecular biology of Notch. *J Endocrinol* **194**:459-74.
171. **Fleitas, T., V. Martinez-Sales, V. Vila, E. Reganon, D. Mesado, M. Martin, J. Gomez-Codina, J. Montalar, and G. Reynes.** 2013. VEGF and TSP1 levels correlate with prognosis in advanced non-small cell lung cancer. *Clin Transl Oncol* **15**:897-902.
172. **Folkman, J.** 1971. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* **285**:1182-6.
173. **Fong, G. H., L. Zhang, D. M. Bryce, and J. Peng.** 1999. Increased hemangioblast commitment, not vascular disorganization, is the primary defect in flt-1 knock-out mice. *Development* **126**:3015-25.
174. **Forman, D., C. de Martel, C. J. Lacey, I. Soerjomataram, J. Lortet-Tieulent, L. Bruni, J. Vignat, J. Ferlay, F. Bray, M. Plummer, and S. Franceschi.** 2012. Global burden of human papillomavirus and related diseases. *Vaccine* **30 Suppl 5**:F12-23.
175. **Gale, N. W., G. Thurston, S. F. Hackett, R. Renard, Q. Wang, J. McClain, C. Martin, C. Witte, M. H. Witte, D. Jackson, C. Suri, P. A. Campochiaro, S. J. Wiegand, and G. D. Yancopoulos.** 2002. Angiopoietin-2 is required for postnatal angiogenesis and lymphatic patterning, and only the latter role is rescued by Angiopoietin-1. *Dev Cell* **3**:411-23.
176. **Gantt, S., and C. Casper.** 2011. Human herpesvirus 8-associated neoplasms: the roles of viral replication and antiviral treatment. *Curr Opin Infect Dis* **24**:295-301.
177. **Garver, R. I., Jr., G. L. Zorn, X. Wu, D. C. McGiffin, K. R. Young, Jr., and N. B. Pinkard.** 1999. Recurrence of bronchioalveolar carcinoma in transplanted lungs. *N Engl J Med* **340**:1071-4.
178. **Gay, L. J., and B. Felding-Habermann.** 2016. Contribution of platelets to tumour metastasis. *Nat Rev Cancer* **11**:123-34.
179. **Gerber, H. P., F. Condorelli, J. Park, and N. Ferrara.** 1997. Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes. Flt-1, but not Flk-1/KDR, is up-regulated by hypoxia. *J Biol Chem* **272**:23659-67.

180. **Gessain, A., and O. Cassar.** 2012. Epidemiological Aspects and World Distribution of HTLV-1 Infection. *Front Microbiol* **3**:388.
181. **Giacomini, A., P. Chiodelli, S. Matarazzo, M. Rusnati, M. Presta, and R. Ronca.** 2016. Blocking the FGF/FGFR system as a "two-compartment" antiangiogenic/antitumor approach in cancer therapy. *Pharmacol Res* **107**:172-85.
182. **Gialmanidis, I. P., V. Bravou, I. Petrou, H. Kourea, A. Mathioudakis, I. Lilis, and H. Papadaki.** 2013. Expression of Bmi1, FoxF1, Nanog, and gamma-catenin in relation to hedgehog signaling pathway in human non-small-cell lung cancer. *Lung* **191**:511-21.
183. **Giam, C. Z., and O. J. Semmes.** 2016. HTLV-1 Infection and Adult T-Cell Leukemia/Lymphoma-A Tale of Two Proteins: Tax and HBZ. *Viruses* **8**.
184. **Giampieri, S., C. Manning, S. Hooper, L. Jones, C. S. Hill, and E. Sahai.** 2009. Localized and reversible TGFbeta signalling switches breast cancer cells from cohesive to single cell motility. *Nat Cell Biol* **11**:1287-96.
185. **Giannelli, G., J. Falk-Marzillier, O. Schiraldi, W. G. Stetler-Stevenson, and V. Quaranta.** 1997. Induction of cell migration by matrix metalloprotease-2 cleavage of laminin-5. *Science* **277**:225-8.
186. **Goldman, C. K., R. L. Kendall, G. Cabrera, L. Soroceanu, Y. Heike, G. Y. Gillespie, G. P. Siegal, X. Mao, A. J. Bett, W. R. Huckle, K. A. Thomas, and D. T. Curiel.** 1998. Paracrine expression of a native soluble vascular endothelial growth factor receptor inhibits tumor growth, metastasis, and mortality rate. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:8795-800.
187. **Goswami, M. T., A. K. Reka, H. Kurapati, V. Kaza, J. Chen, T. J. Standiford, and V. G. Keshamouni.** 2016. Regulation of complement-dependent cytotoxicity by TGF-beta-induced epithelial-mesenchymal transition. *Oncogene* **35**:1888-98.
188. **Gramolelli, S., and T. F. Schulz.** 2015. The role of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus in the pathogenesis of Kaposi sarcoma. *J Pathol* **235**:368-80.
189. **Green, S., P. Walter, V. Kumar, A. Krust, J. M. Bornert, P. Argos, and P. Chambon.** 1986. Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature* **320**:134-9.
190. **Grego, E., D. De Meneghi, V. Alvarez, A. A. Benito, E. Minguijon, A. Ortin, M. Mattoni, B. Moreno, M. Perez de Villarreal, A. Alberti, M. T. Capucchio, M. Caporale, R. Juste, S. Rosati, and M. De las Heras.** 2008. Colostrum and milk can transmit jaagsiekte retrovirus to lambs. *Vet Microbiol* **130**:247-57.
191. **Griffiths, D. J., H. M. Martineau, and C. Cousens.** 2010. Pathology and pathogenesis of ovine pulmonary adenocarcinoma. *J Comp Pathol* **142**:260-83.
192. **Groen, H. J., M. A. Socinski, F. Grossi, E. Juhasz, C. Gridelli, P. Baas, C. A. Butts, E. Chmielowska, T. Usari, P. Selaru, C. Harmon, J. A. Williams, F. Gao, L. Tye, R. C. Chao, and G. R. Blumenschein, Jr.** 2013. A randomized, double-blind, phase II study of erlotinib with or without sunitinib for the second-line treatment of metastatic non-small-cell lung cancer (NSCLC). *Ann Oncol* **24**:2382-9.
193. **Guzy, R. D., I. Stoilov, T. J. Elton, R. P. Mecham, and D. M. Ornitz.** 2015. Fibroblast growth factor 2 is required for epithelial recovery, but not for pulmonary fibrosis, in response to bleomycin. *Am J Respir Cell Mol Biol* **52**:116-28.
194. **Hagberg, C. E., A. Falkevall, X. Wang, E. Larsson, J. Huusko, I. Nilsson, L. A. van Meeteren, E. Samen, L. Lu, M. Vanwildemeersch, J. Klar, G. Genove, K. Pietras, S. Stone-Elander, L. Claesson-Welsh, S. Yla-Herttuala, P. Lindahl, and U. Eriksson.** 2010. Vascular endothelial growth factor B controls endothelial fatty acid uptake. *Nature* **464**:917-21.
195. **Hall, R. D., T. M. Le, D. E. Haggstrom, and R. D. Gantzler.** 2015. Angiogenesis inhibition as a therapeutic strategy in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Transl Lung Cancer Res* **4**:515-23.
196. **Haller, K., T. Ruckes, I. Schmitt, D. Saul, E. Derow, and R. Grassmann.** 2000. Tax-dependent stimulation of G1 phase-specific cyclin-dependent kinases and increased expression of signal transduction genes characterize HTLV type 1-transformed T cells. *AIDS Res Hum Retroviruses* **16**:1683-8.
197. **Han, A., Z. Song, C. Tong, D. Hu, X. Bi, L. H. Augenlicht, and W. Yang.** 2008. Sulindac suppresses beta-catenin expression in human cancer cells. *Eur J Pharmacol* **583**:26-31.
198. **Hanahan, D., and R. A. Weinberg.** 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**:646-74.
199. **Hartmann, K.** 2012. Clinical aspects of feline retroviruses: a review. *Viruses* **4**:2684-710.

200. **Haruki, N., K. S. Kawaguchi, S. Eichenberger, P. P. Massion, S. Olson, A. Gonzalez, D. P. Carbone, and T. P. Dang.** 2005. Dominant-negative Notch3 receptor inhibits mitogen-activated protein kinase pathway and the growth of human lung cancers. *Cancer Res* **65**:3555-61.
201. **Hashimoto, M., F. Tanaka, K. Yoneda, T. Takuwa, S. Matsumoto, Y. Okumura, N. Kondo, N. Tsubota, T. Tsujimura, C. Tabata, T. Nakano, and S. Hasegawa.** 2014. Significant increase in circulating tumour cells in pulmonary venous blood during surgical manipulation in patients with primary lung cancer. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* **18**:775-83.
202. **Hassan, M., D. Selimovic, H. Ghozlan, and O. Abdel-kader.** 2009. Hepatitis C virus core protein triggers hepatic angiogenesis by a mechanism including multiple pathways. *Hepatology* **49**:1469-82.
203. **Hatanpaa, K. J., S. Burma, D. Zhao, and A. A. Habib.** 2010. Epidermal growth factor receptor in glioma: signal transduction, neuropathology, imaging, and radioresistance. *Neoplasia* **12**:675-84.
204. **Hayward, A., M. Grabherr, and P. Jern.** 2013. Broad-scale phylogenomics provides insights into retrovirus-host evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**:20146-51.
205. **Hayward, W. S., B. G. Neel, and S. M. Astrin.** 1981. Activation of a cellular onc gene by promoter insertion in ALV-induced lymphoid leukosis. *Nature* **290**:475-80.
206. **Hecht, S. J., K. E. Stedman, J. O. Carlson, and J. C. DeMartini.** 1996. Distribution of endogenous type B and type D sheep retrovirus sequences in ungulates and other mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:3297-302.
207. **Hecht, S. S.** 1999. Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. *J Natl Cancer Inst* **91**:1194-210.
208. **Herring, A. J., J. M. Sharp, F. M. Scott, and K. W. Angus.** 1983. Further evidence for a retrovirus as the aetiological agent of sheep pulmonary adenomatosis (jaagsiekte). *Vet Microbiol* **8**:237-49.
209. **Herzog, B., C. Pellet-Many, G. Britton, B. Hartzoulakis, and I. C. Zachary.** 2011. VEGF binding to NRP1 is essential for VEGF stimulation of endothelial cell migration, complex formation between NRP1 and VEGFR2, and signaling via FAK Tyr407 phosphorylation. *Mol Biol Cell* **22**:2766-76.
210. **Hiratsuka, S., O. Minowa, J. Kuno, T. Noda, and M. Shibuya.** 1998. Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:9349-54.
211. **Hiratsuka, S., K. Nakamura, S. Iwai, M. Murakami, T. Itoh, H. Kijima, J. M. Shipley, R. M. Senior, and M. Shibuya.** 2002. MMP9 induction by vascular endothelial growth factor receptor-1 is involved in lung-specific metastasis. *Cancer Cell* **2**:289-300.
212. **Hiratsuka, S., A. Watanabe, H. Aburatani, and Y. Maru.** 2006. Tumour-mediated upregulation of chemoattractants and recruitment of myeloid cells predetermines lung metastasis. *Nat Cell Biol* **8**:1369-75.
213. **Hirschl, S., O. Schanab, H. Seppel, A. Waltenberger, J. Humer, K. Wolff, H. Pehamberger, and T. Muster.** 2007. Sequence variability of retroviral particles derived from human melanoma cells melanoma-associated retrovirus. *Virus Res* **123**:211-5.
214. **Hizi, A., and E. Herzog.** 2015. dUTPase: the frequently overlooked enzyme encoded by many retroviruses. *Retrovirology* **12**:70.
215. **Hoatlin, M. E., S. L. Kozak, F. Lilly, A. Chakraborti, C. A. Kozak, and D. Kabat.** 1990. Activation of erythropoietin receptors by Friend viral gp55 and by erythropoietin and down-modulation by the murine Fv-2r resistance gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**:9985-9.
216. **Hoesel, B., and J. A. Schmid.** 2013. The complexity of NF-kappaB signaling in inflammation and cancer. *Mol Cancer* **12**:86.
217. **Hofacre, A., and H. Fan.** 2010. Jaagsiekte sheep retrovirus biology and oncogenesis. *Viruses* **2**:2618-48.
218. **Hofacre, A., and H. Fan.** 2004. Multiple domains of the Jaagsiekte sheep retrovirus envelope protein are required for transformation of rodent fibroblasts. *J Virol* **78**:10479-89.
219. **Hofacre, A., T. Nitta, and H. Fan.** 2009. Jaagsiekte sheep retrovirus encodes a regulatory factor, Rej, required for synthesis of Gag protein. *J Virol* **83**:12483-98.
220. **Hohn, O., K. Hanke, and N. Bannert.** 2013. HERV-K(HML-2), the Best Preserved Family of HERVs: Endogenization, Expression, and Implications in Health and Disease. *Front Oncol* **3**:246.
221. **Holland, M. J., M. Palmarini, M. Garcia-Goti, L. Gonzalez, I. McKendrick, M. de las Heras, and J. M. Sharp.** 1999. Jaagsiekte retrovirus is widely distributed both in T and B lymphocytes and in mononuclear phagocytes of sheep with naturally and experimentally acquired pulmonary adenomatosis. *J Virol* **73**:4004-8.

222. **Hsu, T., A. Phung, K. Choe, J. W. Kim, and H. Fan.** 2015. Role for a Zinc Finger Protein (Zfp111) in Transformation of 208F Rat Fibroblasts by Jaagsiekte Sheep Retrovirus Envelope Protein. *J Virol* **89**:10453-66.
223. **Huang, C. L., D. Liu, S. Ishikawa, T. Nakashima, N. Nakashima, H. Yokomise, K. Kadota, and M. Ueno.** 2008. Wnt1 overexpression promotes tumour progression in non-small cell lung cancer. *Eur J Cancer* **44**:2680-8.
224. **Hughes, M. P., M. E. Hardee, L. A. Cornelius, L. F. Hutchins, J. C. Becker, and L. Gao.** 2014. Merkel Cell Carcinoma: Epidemiology, Target, and Therapy. *Curr Dermatol Rep* **3**:46-53.
225. **Hull, S., and H. Fan.** 2006. Mutational analysis of the cytoplasmic tail of jaagsiekte sheep retrovirus envelope protein. *J Virol* **80**:8069-80.
226. **Hung, M. S., I. C. Chen, P. Y. Lin, J. H. Lung, Y. C. Li, Y. C. Lin, C. T. Yang, and Y. H. Tsai.** 2016. Epidermal growth factor receptor mutation enhances expression of vascular endothelial growth factor in lung cancer. *Oncol Lett* **12**:4598-4604.
227. **Hurskainen, M., L. Eklund, P. O. Hagg, M. Fruttiger, R. Sormunen, M. Ilves, and T. Pihlajaniemi.** 2005. Abnormal maturation of the retinal vasculature in type XVIII collagen/endostatin deficient mice and changes in retinal glial cells due to lack of collagen types XV and XVIII. *FASEB J* **19**:1564-6.
228. **Hurst, D. R., and D. R. Welch.** 2011. Metastasis suppressor genes at the interface between the environment and tumor cell growth. *Int Rev Cell Mol Biol* **286**:107-80.
229. **IARC.** 2012. Personal habits and indoor combustions; A review of human carcinogens. OMS.
230. **IARC.** 2012. Pharmaceuticals, A review of human carcinogens. OMS.
231. **Iba, H., F. R. Cross, E. A. Garber, and H. Hanafusa.** 1985. Low level of cellular protein phosphorylation by nontransforming overproduced p60c-src. *Mol Cell Biol* **5**:1058-66.
232. **Iizasa, T., H. Chang, M. Suzuki, M. Otsuji, S. Yokoi, M. Chiyo, S. Motohashi, K. Yasufuku, Y. Sekine, A. Iyoda, K. Shibuya, K. Hiroshima, and T. Fujisawa.** 2004. Overexpression of collagen XVIII is associated with poor outcome and elevated levels of circulating serum endostatin in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* **10**:5361-6.
233. **Iramaneerat, K., P. Rattanatunyong, N. Khemapech, S. Triratanachat, and A. Mutirangura.** 2011. HERV-K hypomethylation in ovarian clear cell carcinoma is associated with a poor prognosis and platinum resistance. *Int J Gynecol Cancer* **21**:51-7.
234. **Ishida, T., Y. Obata, N. Ohara, H. Matsushita, S. Sato, A. Uenaka, T. Saika, T. Miyamura, K. Chayama, Y. Nakamura, H. Wada, T. Yamashita, T. Morishima, L. J. Old, and E. Nakayama.** 2008. Identification of the HERV-K gag antigen in prostate cancer by SEREX using autologous patient serum and its immunogenicity. *Cancer Immun* **8**:15.
235. **Iyengar, N. M., A. Gucalp, A. J. Dannenberg, and C. A. Hudis.** 2016. Obesity and Cancer Mechanisms: Tumor Microenvironment and Inflammation. *J Clin Oncol* **34**:4270-4276.
236. **Jackson, H. W., V. Defamie, P. Waterhouse, and R. Khokha.** 2016. TIMPs: versatile extracellular regulators in cancer. *Nat Rev Cancer* **17**:38-53.
237. **Jafarifar, F., P. Yao, S. M. Eswarappa, and P. L. Fox.** 2011. Repression of VEGFA by CA-rich element-binding microRNAs is modulated by hnRNP L. *EMBO J* **30**:1324-34.
238. **Jechlinger, M., A. Sommer, R. Moriggl, P. Seither, N. Kraut, P. Capodiecci, M. Donovan, C. Cordon-Cardo, H. Beug, and S. Grunert.** 2006. Autocrine PDGFR signaling promotes mammary cancer metastasis. *J Clin Invest* **116**:1561-70.
239. **Jeyakumar, A., L. Dissabandara, and V. Gopalan.** 2016. A critical overview on the biological and molecular features of red and processed meat in colorectal carcinogenesis. *J Gastroenterol*.
240. **Jin, D. Y., F. Spencer, and K. T. Jeang.** 1998. Human T cell leukemia virus type 1 oncoprotein Tax targets the human mitotic checkpoint protein MAD1. *Cell* **93**:81-91.
241. **Jin, K., T. Li, H. van Dam, F. Zhou, and L. Zhang.** 2016. Molecular insights into tumour metastasis: tracing the dominant events. *J Pathol*.
242. **Jubb, A. M., S. M. Sa, N. Ratti, L. A. Strickland, M. Schmidt, C. A. Callahan, and H. Koeppen.** 2012. Neuropilin-2 expression in cancer. *Histopathology* **61**:340-9.
243. **Jubb, A. M., L. A. Strickland, S. D. Liu, J. Mak, M. Schmidt, and H. Koeppen.** 2012. Neuropilin-1 expression in cancer and development. *J Pathol* **226**:50-60.
244. **Kaewpitoon, N., S. J. Kaewpitoon, P. Pengsaa, and B. Sripa.** 2008. *Opisthorchis viverrini*: the carcinogenic human liver fluke. *World J Gastroenterol* **14**:666-74.

245. **Kalitin, N. N., and A. F. Karamysheva.** 2016. RARalpha mediates all-trans-retinoic acid-induced VEGF-C, VEGF-D, and VEGFR3 expression in lung cancer cells. *Cell Biol Int* **40**:456-64.
246. **Kandath, C., M. D. McLellan, F. Vandin, K. Ye, B. Niu, C. Lu, M. Xie, Q. Zhang, J. F. McMichael, M. A. Wyczalkowski, M. D. Leiserson, C. A. Miller, J. S. Welch, M. J. Walter, M. C. Wendl, T. J. Ley, R. K. Wilson, B. J. Raphael, and L. Ding.** 2013. Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature* **502**:333-9.
247. **Kang, S. S., T. Kwon, D. Y. Kwon, and S. I. Do.** 1999. Akt protein kinase enhances human telomerase activity through phosphorylation of telomerase reverse transcriptase subunit. *J Biol Chem* **274**:13085-90.
248. **Kanzaki, H., M. Ouchida, H. Hanafusa, M. Yano, H. Suzuki, M. Aoe, K. Imai, N. Shimizu, K. Nakachi, and K. Shimizu.** 2006. Single nucleotide polymorphism of the AXIN2 gene is preferentially associated with human lung cancer risk in a Japanese population. *Int J Mol Med* **18**:279-84.
249. **Karkkainen, M. J., P. Haiko, K. Sainio, J. Partanen, J. Taipale, T. V. Petrova, M. Jeltsch, D. G. Jackson, M. Talikka, H. Rauvala, C. Betsholtz, and K. Alitalo.** 2004. Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins. *Nat Immunol* **5**:74-80.
250. **Kase, S., K. Sugio, K. Yamazaki, T. Okamoto, T. Yano, and K. Sugimachi.** 2000. Expression of E-cadherin and beta-catenin in human non-small cell lung cancer and the clinical significance. *Clin Cancer Res* **6**:4789-96.
251. **Kashatus, D. F.** 2013. Ral GTPases in tumorigenesis: emerging from the shadows. *Exp Cell Res* **319**:2337-42.
252. **Kassiotis, G.** 2014. Endogenous retroviruses and the development of cancer. *J Immunol* **192**:1343-9.
253. **Kato, E., T. Yamamoto, and F. Chishima.** 2016. Effects of Cytokines and TLR Ligands on the Production of PlGF and sVEGFR1 in Primary Trophoblasts. *Gynecol Obstet Invest* **82**:39-46.
254. **Katz, E., M. H. Lareef, J. C. Rassa, S. M. Grande, L. B. King, J. Russo, S. R. Ross, and J. G. Monroe.** 2005. MMTV Env encodes an ITAM responsible for transformation of mammary epithelial cells in three-dimensional culture. *J Exp Med* **201**:431-9.
255. **Kaufmann, S., M. Sauter, M. Schmitt, B. Baumert, B. Best, A. Boese, K. Roemer, and N. Mueller-Lantzsch.** 2010. Human endogenous retrovirus protein Rec interacts with the testicular zinc-finger protein and androgen receptor. *J Gen Virol* **91**:1494-502.
256. **Kawakami, T., T. Tokunaga, H. Hatanaka, H. Kijima, H. Yamazaki, Y. Abe, Y. Osamura, H. Inoue, Y. Ueyama, and M. Nakamura.** 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.
257. **Kawamura, H., X. Li, K. Goishi, L. A. van Meeteren, L. Jakobsson, S. Cebe-Suarez, A. Shimizu, D. Edholm, K. Ballmer-Hofer, L. Kjellen, M. Klagsbrun, and L. Claesson-Welsh.** 2008. Neuropilin-1 in regulation of VEGF-induced activation of p38MAPK and endothelial cell organization. *Blood* **112**:3638-49.
258. **Kawarada, Y., Y. Inoue, F. Kawasaki, K. Fukuura, K. Sato, T. Tanaka, Y. Itoh, and H. Hayashi.** 2016. TGF-beta induces p53/Smads complex formation in the PAI-1 promoter to activate transcription. *Sci Rep* **6**:35483.
259. **Kawatsuki, A., J. I. Yasunaga, Y. Mitobe, P. L. Green, and M. Matsuoka.** 2016. HTLV-1 bZIP factor protein targets the Rb/E2F-1 pathway to promote proliferation and apoptosis of primary CD4(+) T cells. *Oncogene* **35**:4509-17.
260. **Kim, I., J. H. Kim, S. O. Moon, H. J. Kwak, N. G. Kim, and G. Y. Koh.** 2000. Angiopoietin-2 at high concentration can enhance endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. *Oncogene* **19**:4549-52.
261. **Kim, J. E., H. Kim, J. Y. Choe, P. Sun, S. Jheon, and J. H. Chung.** 2013. High expression of Sonic hedgehog signaling proteins is related to the favorable outcome, EGFR mutation, and lepidic predominant subtype in primary lung adenocarcinoma. *Ann Surg Oncol* **20 Suppl 3**:S570-6.
262. **Kim, T. H., Y. K. Kim, and J. S. Woo.** 2012. The adenosine A3 receptor agonist CI-IB-MECA induces cell death through Ca²⁺(+)/ROS-dependent down regulation of ERK and Akt in A172 human glioma cells. *Neurochem Res* **37**:2667-77.
263. **King, T. D., W. Zhang, M. J. Suto, and Y. Li.** 2012. Frizzled7 as an emerging target for cancer therapy. *Cell Signal* **24**:846-51.

264. **Kinney, M. E., and G. W. Pye.** 2016. Koala Retrovirus: A Review. *J Zoo Wildl Med* **47**:387-96.
265. **Kishor, A., B. Tandukar, Y. V. Ly, E. A. Toth, Y. Suarez, G. Brewer, and G. M. Wilson.** 2013. Hsp70 is a novel posttranscriptional regulator of gene expression that binds and stabilizes selected mRNAs containing AU-rich elements. *Mol Cell Biol* **33**:71-84.
266. **Ko, Y. H.** 2015. EBV and human cancer. *Exp Mol Med* **47**:e130.
267. **Koch, M., D. Dettori, A. Van Nuffelen, J. Souffreau, L. Marconcini, G. Wallays, L. Moons, F. Bruyere, S. Oliviero, A. Noel, J. M. Foidart, P. Carmeliet, and M. Dewerchin.** 2009. VEGF-D deficiency in mice does not affect embryonic or postnatal lymphangiogenesis but reduces lymphatic metastasis. *J Pathol* **219**:356-64.
268. **Konishi, T., C. L. Huang, M. Adachi, T. Taki, H. Inufusa, K. Kodama, N. Kohno, and M. Miyake.** 2000. The K-ras gene regulates vascular endothelial growth factor gene expression in non-small cell lung cancers. *Int J Oncol* **16**:501-11.
269. **Krishnamurthy, J., B. A. Rabinovich, T. Mi, K. C. Switzer, S. Olivares, S. N. Maiti, J. B. Plummer, H. Singh, P. R. Kumaresan, H. M. Huls, F. Wang-Johanning, and L. J. Cooper.** 2015. Genetic Engineering of T Cells to Target HERV-K, an Ancient Retrovirus on Melanoma. *Clin Cancer Res* **21**:3241-51.
270. **Kubis, N., and B. I. Levy.** 2013. Vasculogenesis and Angiogenesis: Molecular and Cellular Controls. Part 2: Interactions between Cell and Extracellular Environment. *Interv Neuroradiol* **9**:239-48.
271. **Kufe, D. W.** 2009. Mucins in cancer: function, prognosis and therapy. *Nat Rev Cancer* **9**:874-85.
272. **Kuzmanov, A., U. Hopfer, P. Marti, N. Meyer-Schaller, M. Yilmaz, and G. Christofori.** 2014. LIM-homeobox gene 2 promotes tumor growth and metastasis by inducing autocrine and paracrine PDGF-B signaling. *Mol Oncol* **8**:401-16.
273. **Lagiou, P., and D. Trichopoulos.** 2011. Inflammatory biomarkers and risk of lung cancer. *J Natl Cancer Inst* **103**:1073-5.
274. **Lakshmanan, I., M. P. Ponnusamy, M. A. Macha, D. Haridas, P. D. Majhi, S. Kaur, M. Jain, S. K. Batra, and A. K. Ganti.** 2015. Mucins in lung cancer: diagnostic, prognostic, and therapeutic implications. *J Thorac Oncol* **10**:19-27.
275. **Lakshmanan, I., S. Rachagani, R. Hauke, S. R. Krishn, S. Paknikar, P. Seshacharyulu, S. Karmakar, R. K. Nimmakayala, G. Kaushik, S. L. Johansson, G. B. Carey, M. P. Ponnusamy, S. Kaur, S. K. Batra, and A. K. Ganti.** 2016. MUC5AC interactions with integrin beta4 enhances the migration of lung cancer cells through FAK signaling. *Oncogene* **35**:4112-21.
276. **Lantuejoul, S., B. Constantin, H. Drabkin, C. Brambilla, J. Roche, and E. Brambilla.** 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.
277. **Lantuejoul, S., D. Salameire, C. Salon, and E. Brambilla.** 2009. Pulmonary preneoplasia--sequential molecular carcinogenetic events. *Histopathology* **54**:43-54.
278. **Larkins, E., B. Scepura, G. M. Blumenthal, E. Bloomquist, S. Tang, M. Biabie, P. Kluetz, P. Keegan, and R. Pazdur.** 2015. U.S. Food and Drug Administration Approval Summary: Ramucirumab for the Treatment of Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer Following Disease Progression On or After Platinum-Based Chemotherapy. *Oncologist* **20**:1320-5.
279. **Lau, S. K., M. J. Desrochers, and D. J. Luthringer.** 2002. Expression of thyroid transcription factor-1, cytokeratin 7, and cytokeratin 20 in bronchioloalveolar carcinomas: an immunohistochemical evaluation of 67 cases. *Mod Pathol* **15**:538-42.
280. **Lavie, L., M. Kitova, E. Maldener, E. Meese, and J. Mayer.** 2005. CpG methylation directly regulates transcriptional activity of the human endogenous retrovirus family HERV-K(HML-2). *J Virol* **79**:876-83.
281. **Lavine, K. J., A. C. White, C. Park, C. S. Smith, K. Choi, F. Long, C. C. Hui, and D. M. Ornitz.** 2006. Fibroblast growth factor signals regulate a wave of Hedgehog activation that is essential for coronary vascular development. *Genes Dev* **20**:1651-66.
282. **Lee, S. H., D. Jeong, Y. S. Han, and M. J. Baek.** 2015. Pivotal role of vascular endothelial growth factor pathway in tumor angiogenesis. *Ann Surg Treat Res* **89**:1-8.
283. **Lee, S. W., Y. M. Lee, S. K. Bae, S. Murakami, Y. Yun, and K. W. Kim.** 2000. Human hepatitis B virus X protein is a possible mediator of hypoxia-induced angiogenesis in hepatocarcinogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* **268**:456-61.
284. **Lee, Y. N., and P. D. Bieniasz.** 2007. Reconstitution of an infectious human endogenous retrovirus. *PLoS Pathog* **3**:e10.

285. **Leroux, C., N. Girard, V. Cottin, T. Greenland, J. F. Mornex, and F. Archer.** 2007. Jaagsiekte Sheep Retrovirus (JSRV): from virus to lung cancer in sheep. *Vet Res* **38**:211-28.
286. **Leu, A. J., D. A. Berk, A. Lymboussaki, K. Alitalo, and R. K. Jain.** 2000. Absence of functional lymphatics within a murine sarcoma: a molecular and functional evaluation. *Cancer Res* **60**:4324-7.
287. **Leveen, P., M. Pekny, S. Gebre-Medhin, B. Swolin, E. Larsson, and C. Betsholtz.** 1994. Mice deficient for PDGF B show renal, cardiovascular, and hematological abnormalities. *Genes Dev* **8**:1875-87.
288. **Levinson, A. D., H. Oppermann, L. Levintow, H. E. Varmus, and J. M. Bishop.** 1978. Evidence that the transforming gene of avian sarcoma virus encodes a protein kinase associated with a phosphoprotein. *Cell* **15**:561-72.
289. **Lewis, C. E., M. De Palma, and L. Naldini.** 2007. Tie2-expressing monocytes and tumor angiogenesis: regulation by hypoxia and angiopoietin-2. *Cancer Res* **67**:8429-32.
290. **Lewis, F. I., F. Brulisauer, C. Cousens, I. J. McKendrick, and G. J. Gunn.** 2011. Diagnostic accuracy of PCR for Jaagsiekte sheep retrovirus using field data from 125 Scottish sheep flocks. *Vet J* **187**:104-8.
291. **Li, J., H. Yi, Z. Liu, H. Zhang, D. Zhang, W. Yue, H. Jia, S. Xu, and B. Li.** 2015. Association between VEGFR-3 expression and lymph node metastasis in non-small-cell lung cancer. *Exp Ther Med* **9**:389-394.
292. **Li, X., and U. Eriksson.** 2001. Novel VEGF family members: VEGF-B, VEGF-C and VEGF-D. *Int J Biochem Cell Biol* **33**:421-6.
293. **Li, X., A. Kumar, F. Zhang, C. Lee, and Z. Tang.** 2012. Complicated life, complicated VEGF-B. *Trends Mol Med* **18**:119-27.
294. **Lim, S. Y., A. E. Yuzhalin, A. N. Gordon-Weeks, and R. J. Muschel.** 2016. Tumor-infiltrating monocytes/macrophages promote tumor invasion and migration by upregulating S100A8 and S100A9 expression in cancer cells. *Oncogene* **35**:5735-5745.
295. **Lindahl, P., B. R. Johansson, P. Leveen, and C. Betsholtz.** 1997. Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice. *Science* **277**:242-5.
296. **Linnerth-Petrik, N. M., S. R. Walsh, P. N. Bogner, C. Morrison, and S. K. Wootton.** 2014. Jaagsiekte sheep retrovirus detected in human lung cancer tissue arrays. *BMC Res Notes* **7**:160.
297. **Liou, G. Y., and P. Storz.** 2010. Reactive oxygen species in cancer. *Free Radic Res* **44**:479-96.
298. **Liu, D., J. Nakano, S. Ishikawa, H. Yokomise, M. Ueno, K. Kadota, M. Urushihara, and C. L. Huang.** 2007. Overexpression of matrix metalloproteinase-7 (MMP-7) correlates with tumor proliferation, and a poor prognosis in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* **58**:384-91.
299. **Liu, F., J. K. Killian, M. Yang, R. L. Walker, J. A. Hong, M. Zhang, S. Davis, Y. Zhang, M. Hussain, S. Xi, M. Rao, P. A. Meltzer, and D. S. Schrupp.** 2010. Epigenomic alterations and gene expression profiles in respiratory epithelia exposed to cigarette smoke condensate. *Oncogene* **29**:3650-64.
300. **Liu, F., X. You, Y. Wang, Q. Liu, Y. Liu, S. Zhang, L. Chen, X. Zhang, and L. Ye.** 2014. The oncoprotein HBXIP enhances angiogenesis and growth of breast cancer through modulating FGF8 and VEGF. *Carcinogenesis* **35**:1144-53.
301. **Liu, H., Y. Yang, J. Xiao, Y. Lv, Y. Liu, H. Yang, and L. Zhao.** 2010. COX-2-mediated regulation of VEGF-C in association with lymphangiogenesis and lymph node metastasis in lung cancer. *Anat Rec (Hoboken)* **293**:1838-46.
302. **Liu, J., S. Cao, S. Kim, E. Y. Chung, Y. Homma, X. Guan, V. Jimenez, and X. Ma.** 2005. Interleukin-12: an update on its immunological activities, signaling and regulation of gene expression. *Curr Immunol Rev* **1**:119-137.
303. **Liu, Q., A. Li, Y. Tian, J. D. Wu, Y. Liu, T. Li, Y. Chen, X. Han, and K. Wu.** 2016. The CXCL8-CXCR1/2 pathways in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* **31**:61-71.
304. **Liu, S. L., F. M. Duh, M. I. Lerman, and A. D. Miller.** 2003. Role of virus receptor Hyal2 in oncogenic transformation of rodent fibroblasts by sheep betaretrovirus env proteins. *J Virol* **77**:2850-8.
305. **Liu, S. L., M. I. Lerman, and A. D. Miller.** 2003. Putative phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) binding motifs in ovine betaretrovirus Env proteins are not essential for rodent fibroblast transformation and PI3K/Akt activation. *J Virol* **77**:7924-35.
306. **Liu, S. L., and A. D. Miller.** 2005. Transformation of madin-darby canine kidney epithelial cells by sheep retrovirus envelope proteins. *J Virol* **79**:927-33.

307. **Liu, X. W., M. M. Bernardo, R. Fridman, and H. R. Kim.** 2003. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 protects human breast epithelial cells against intrinsic apoptotic cell death via the focal adhesion kinase/phosphatidylinositol 3-kinase and MAPK signaling pathway. *J Biol Chem* **278**:40364-72.
308. **Liu, Z. H., X. M. Dai, and B. Du.** 2015. Hes1: a key role in stemness, metastasis and multidrug resistance. *Cancer Biol Ther* **16**:353-9.
309. **Lohela, M., M. Bry, T. Tammela, and K. Alitalo.** 2009. VEGFs and receptors involved in angiogenesis versus lymphangiogenesis. *Curr Opin Cell Biol* **21**:154-65.
310. **Lokossou, A. G., C. Toudic, and B. Barbeau.** 2014. Implication of human endogenous retrovirus envelope proteins in placental functions. *Viruses* **6**:4609-27.
311. **Lopez-Ferrer, A., V. Curull, C. Barranco, M. Garrido, J. Lloreta, F. X. Real, and C. de Bolos.** 2001. Mucins as differentiation markers in bronchial epithelium. Squamous cell carcinoma and adenocarcinoma display similar expression patterns. *Am J Respir Cell Mol Biol* **24**:22-29.
312. **Lopez-Ocejo, O., A. Vilorio-Petit, M. Bequet-Romero, D. Mukhopadhyay, J. Rak, and R. S. Kerbel.** 2000. Oncogenes and tumor angiogenesis: the HPV-16 E6 oncoprotein activates the vascular endothelial growth factor (VEGF) gene promoter in a p53 independent manner. *Oncogene* **19**:4611-20.
313. **Lopez-Otin, C., M. A. Blasco, L. Partridge, M. Serrano, and G. Kroemer.** 2013. The hallmarks of aging. *Cell* **153**:1194-217.
314. **Lu, S., L. Li, Y. Luo, L. Zhang, G. Wu, Z. Chen, C. Huang, S. Guo, Y. Zhang, X. Song, Y. Yu, C. Zhou, W. Li, M. Liao, B. Li, L. Xu, P. Chen, and C. Hu.** 2015. A multicenter, open-label, randomized phase II controlled study of rh-endostatin (Endostar) in combination with chemotherapy in previously untreated extensive-stage small-cell lung cancer. *J Thorac Oncol* **10**:206-11.
315. **Luo, J., T. M. Beer, and J. N. Graff.** 2016. Treatment of Nonmetastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *Oncology (Williston Park)* **30**:336-44.
316. **Luppi, F., A. M. Longo, W. I. de Boer, K. F. Rabe, and P. S. Hiemstra.** 2007. Interleukin-8 stimulates cell proliferation in non-small cell lung cancer through epidermal growth factor receptor transactivation. *Lung Cancer* **56**:25-33.
317. **Lutringer-Magnin, D., N. Girard, J. Cadranet, C. Leroux, E. Quoix, V. Cottin, C. Del Signore, M. P. Lebitasy, G. Cordier, P. Vanhems, and J. F. Mornex.** 2012. Professional exposure to goats increases the risk of pneumonic-type lung adenocarcinoma: results of the IFCT-0504-Epidemio study. *PLoS One* **7**:e37889.
318. **Maeda, N., W. Fu, A. Ortin, M. de las Heras, and H. Fan.** 2005. Roles of the Ras-MEK-mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase-Akt-mTOR pathways in Jaagsiekte sheep retrovirus-induced transformation of rodent fibroblast and epithelial cell lines. *J Virol* **79**:4440-50.
319. **Maeda, N., Y. Inoshima, D. A. Fruman, S. M. Brachmann, and H. Fan.** 2003. Transformation of mouse fibroblasts by Jaagsiekte sheep retrovirus envelope does not require phosphatidylinositol 3-kinase. *J Virol* **77**:9951-9.
320. **Maeda, N., M. Palmarini, C. Murgia, and H. Fan.** 2001. Direct transformation of rodent fibroblasts by jaagsiekte sheep retrovirus DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:4449-54.
321. **Mager, D. L., and J. P. Stoye.** 2014. Mammalian Endogenous Retroviruses. *Microbiol Spectr* **3**:MDNA3-0009-2014.
322. **Maharaj, A. S., M. Saint-Geniez, A. E. Maldonado, and P. A. D'Amore.** 2006. Vascular endothelial growth factor localization in the adult. *Am J Pathol* **168**:639-48.
323. **Malhotra, J., M. Malvezzi, E. Negri, C. La Vecchia, and P. Boffetta.** 2016. Risk factors for lung cancer worldwide. *Eur Respir J* **48**:889-902.
324. **Malladi, S., D. G. Macalinao, X. Jin, L. He, H. Basnet, Y. Zou, E. de Stanchina, and J. Massague.** 2016. Metastatic Latency and Immune Evasion through Autocrine Inhibition of WNT. *Cell* **165**:45-60.
325. **Martin, A. R. R., C.; Demange, L.; Benhida, R.** 2017. Hypoxia inducible factor down-regulation, cancer and cancer stem cells (CSCs): ongoing success stories. *Med Chem Comm* **Advance article**.
326. **Martin, O. A., R. L. Anderson, K. Narayan, and M. P. MacManus.** 2017. Does the mobilization of circulating tumour cells during cancer therapy cause metastasis? *Nat Rev Clin Oncol* **14**:32-44.
327. **Martin, W. B., F. M. Scott, J. M. Sharp, K. W. Angus, and M. Norval.** 1976. Experimental production of sheep pulmonary adenomatosis (Jaagsiekte). *Nature* **264**:183-5.
328. **Matutes, E.** 2007. Adult T-cell leukaemia/lymphoma. *J Clin Pathol* **60**:1373-7.
329. **McAtee, C. O., J. J. Barycki, and M. A. Simpson.** 2014. Emerging roles for hyaluronidase in cancer metastasis and therapy. *Adv Cancer Res* **123**:1-34.

330. **McGee-Estrada, K., and H. Fan.** 2007. Comparison of LTR enhancer elements in sheep beta retroviruses: insights into the basis for tissue-specific expression. *Virus Genes* **35**:303-12.
331. **McGee-Estrada, K., and H. Fan.** 2006. In vivo and in vitro analysis of factor binding sites in Jaagsiekte sheep retrovirus long terminal repeat enhancer sequences: roles of HNF-3, NF-1, and C/EBP for activity in lung epithelial cells. *J Virol* **80**:332-41.
332. **McGee-Estrada, K., M. Palmarini, and H. Fan.** 2002. HNF-3beta is a critical factor for the expression of the Jaagsiekte sheep retrovirus long terminal repeat in type II pneumocytes but not in Clara cells. *Virology* **292**:87-97.
333. **McKinnon, A. O., J. Thorsen, M. A. Hayes, and C. R. Misener.** 1982. Enzootic nasal adenocarcinoma of sheep in Canada. *Can Vet J* **23**:88-94.
334. **Meeusen, E. N., K. J. Snibson, S. J. Hirst, and R. J. Bischof.** 2010. Sheep as a model species for the study and treatment of human asthma and other respiratory diseases. *Drug Discovery Today: Disease Models* **6**:101-106.
335. **Mehlem, A., I. Palombo, X. Wang, C. E. Hagberg, U. Eriksson, and A. Falkevall.** 2016. PGC-1alpha Coordinates Mitochondrial Respiratory Capacity and Muscular Fatty Acid Uptake via Regulation of VEGF-B. *Diabetes* **65**:861-73.
336. **Mekki, A. H., M. H. Pourgholami, and D. L. Morris.** 2014. Involvement of urokinase-type plasminogen activator system in cancer: an overview. *Med Res Rev* **34**:918-56.
337. **Mendez, W. M., Jr., S. Eftim, J. Cohen, I. Warren, J. Cowden, J. S. Lee, and R. Sams.** 2016. Relationships between arsenic concentrations in drinking water and lung and bladder cancer incidence in U.S. counties. *J Expo Sci Environ Epidemiol*.
338. **Meng, X., Y. Wang, X. Zheng, C. Liu, B. Su, H. Nie, B. Zhao, X. Zhao, and H. Yang.** 2012. shRNA-mediated knockdown of Bmi-1 inhibit lung adenocarcinoma cell migration and metastasis. *Lung Cancer* **77**:24-30.
339. **Millauer, B., S. Witzmann-Voos, H. Schnurch, R. Martinez, N. P. Moller, W. Risau, and A. Ullrich.** 1993. High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell* **72**:835-46.
340. **Miller, A. D., M. De Las Heras, J. Yu, F. Zhang, S. L. Liu, A. E. Vaughan, T. L. Vaughan, R. Rosadio, S. Rocca, G. Palmieri, J. J. Goedert, J. Fujimoto, and Wistuba, II.** 2017. Evidence against a role for jaagsiekte sheep retrovirus in human lung cancer. *Retrovirology* **14**:3.
341. **Miller, D. L., S. Ortega, O. Bashayan, R. Basch, and C. Basilico.** 2000. Compensation by fibroblast growth factor 1 (FGF1) does not account for the mild phenotypic defects observed in FGF2 null mice. *Mol Cell Biol* **20**:2260-8.
342. **Miller, J. M., L. D. Miller, C. Olson, and K. G. Gillette.** 1969. Virus-like particles in phytohemagglutinin-stimulated lymphocyte cultures with reference to bovine lymphosarcoma. *J Natl Cancer Inst* **43**:1297-305.
343. **Minguignon, E., R. Reina, M. Perez, L. Polledo, M. Villoria, H. Ramirez, I. Leginagoikoa, J. J. Badiola, J. F. Garcia-Marin, D. de Andres, L. Lujan, B. Amorena, and R. A. Juste.** 2015. Small ruminant lentivirus infections and diseases. *Vet Microbiol* **181**:75-89.
344. **Miquerol, L., B. L. Langille, and A. Nagy.** 2000. Embryonic development is disrupted by modest increases in vascular endothelial growth factor gene expression. *Development* **127**:3941-6.
345. **Missiaen, R., F. M. Rodriguez, G. Eelen, and P. Carmeliet.** 2017. Targeting endothelial metabolism for anti-angiogenesis therapy: A pharmacological perspective. *Vascul Pharmacol*.
346. **Miyake, T., K. Kumasawa, N. Sato, T. Takiuchi, H. Nakamura, and T. Kimura.** 2016. Soluble VEGF receptor 1 (sFLT1) induces non-apoptotic death in ovarian and colorectal cancer cells. *Sci Rep* **6**:24853.
347. **Mocellin, S., K. A. Pooley, and D. Nitti.** 2013. Telomerase and the search for the end of cancer. *Trends Mol Med* **19**:125-33.
348. **Mokhdomi, T. A., S. Bukhari, N. A. Chikan, A. Amin, A. H. Wafai, S. H. Wani, N. A. Chowdri, and R. A. Qadri.** 2016. A novel kinase mutation in VEGFR-1 predisposes its alphaC-helix/activation loop towards allosteric activation: Atomic insights from protein simulation. *Eur J Hum Genet* **24**:1287-93.
349. **Monot, M., F. Archer, M. Gomes, J. F. Mornex, and C. Leroux.** 2015. Advances in the study of transmissible respiratory tumours in small ruminants. *Vet Microbiol* **181**:170-7.

350. **Monot, M., A. Erny, B. Gineys, S. Desloire, C. Dolmazon, A. Aublin-Gex, V. Lotteau, F. Archer, and C. Leroux.** 2015. Early Steps of Jaagsiekte Sheep Retrovirus-Mediated Cell Transformation Involve the Interaction between Env and the RALBP1 Cellular Protein. *J Virol* **89**:8462-73.
351. **Montuori, N., and P. Ragno.** 2013. Role of uPA/uPAR in the modulation of angiogenesis. *Chem Immunol Allergy* **99**:105-22.
352. **Mornex, J. F.** 2003. Le mouton, modèle de pathologie pulmonaire humaine. *Rev Prat* **53**:241-244.
353. **Mornex, J. F., F. Thivolet, M. De las Heras, and C. Leroux.** 2003. Pathology of human bronchioloalveolar carcinoma and its relationship to the ovine disease. *Curr Top Microbiol Immunol* **275**:225-48.
354. **Morozov, V. A., V. L. Dao Thi, and J. Denner.** 2013. The transmembrane protein of the human endogenous retrovirus--K (HERV-K) modulates cytokine release and gene expression. *PLoS One* **8**:e70399.
355. **Morozov, V. A., S. Lagaye, J. Lower, and R. Lower.** 2004. Detection and characterization of betaretroviral sequences, related to sheep Jaagsiekte virus, in Africans from Nigeria and Cameroon. *Virology* **327**:162-8.
356. **Munger, K., A. Baldwin, K. M. Edwards, H. Hayakawa, C. L. Nguyen, M. Owens, M. Grace, and K. Huh.** 2004. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J Virol* **78**:11451-60.
357. **Munn, L. L.** 2016. Cancer and inflammation. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* **9**.
358. **Murcia, P. R., F. Arnaud, and M. Palmarini.** 2007. The transdominant endogenous retrovirus enJS56A1 associates with and blocks intracellular trafficking of Jaagsiekte sheep retrovirus Gag. *J Virol* **81**:1762-72.
359. **Murono, S., H. Inoue, T. Tanabe, I. Joab, T. Yoshizaki, M. Furukawa, and J. S. Pagano.** 2001. Induction of cyclooxygenase-2 by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 is involved in vascular endothelial growth factor production in nasopharyngeal carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:6905-10.
360. **Murphy, G.** 2011. Tissue inhibitors of metalloproteinases. *Genome Biol* **12**:233.
361. **Nagashio, R., J. Ueda, S. Ryuge, H. Nakashima, S. X. Jiang, M. Kobayashi, K. Yanagita, K. Katono, Y. Satoh, N. Masuda, Y. Murakumo, K. Hachimura, and Y. Sato.** 2015. Diagnostic and prognostic significances of MUC5B and TTF-1 expressions in resected non-small cell lung cancer. *Sci Rep* **5**:8649.
362. **Narayanan, D. L., R. N. Saladi, and J. L. Fox.** 2010. Ultraviolet radiation and skin cancer. *Int J Dermatol* **49**:978-86.
363. **Nasarre, P., R. M. Gemmill, V. A. Potiron, J. Roche, X. Lu, A. E. Baron, C. Korch, E. Garrett-Mayer, A. Lagana, P. H. Howe, and H. A. Drabkin.** 2013. Neuropilin-2 Is upregulated in lung cancer cells during TGF-beta1-induced epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Res* **73**:7111-21.
364. **Nath, S., and P. Mukherjee.** 2014. MUC1: a multifaceted oncoprotein with a key role in cancer progression. *Trends Mol Med* **20**:332-42.
365. **Naugler, W. E., and M. Karin.** 2008. NF-kappaB and cancer-identifying targets and mechanisms. *Curr Opin Genet Dev* **18**:19-26.
366. **Naumnik, W., M. Ossolinska, I. Plonska, E. Chyczewska, and J. Niklinski.** 2014. Circulating Thrombospondin-2 and FGF-2 in Patients with Advanced Non-small Cell Lung Cancer: Correlation with Survival. *Adv Exp Med Biol* **833**:9-14.
367. **Ngo, H. K., H. G. Lee, J. Y. Piao, X. Zhong, H. N. Lee, H. J. Han, W. Kim, D. H. Kim, Y. N. Cha, H. K. Na, and Y. J. Surh.** 2016. Helicobacter pylori induces Snail expression through ROS-mediated activation of Erk and inactivation of GSK-3beta in human gastric cancer cells. *Mol Carcinog* **55**:2236-2246.
368. **Nguyen, D. X., P. D. Bos, and J. Massague.** 2009. Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nat Rev Cancer* **9**:274-84.
369. **Nieberle, K.** 1940. Über endemischen Krebs im Siebbein von Schafen. *Z. schr. Krebsforsch* **49**:137-142.
370. **Niki, T., S. Iba, M. Tokunou, T. Yamada, Y. Matsuno, and S. Hirohashi.** 2000. Expression of vascular endothelial growth factors A, B, C, and D and their relationships to lymph node status in lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* **6**:2431-9.

371. **Nomori, H., T. Mori, K. Iyama, T. Okamoto, and M. Kamakura.** 2011. Risk of bronchioloalveolar carcinoma in patients with human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-I): case-control study results. *Ann Thorac Cardiovasc Surg* **17**:19-23.
372. **Nusse, R., and H. E. Varmus.** 1982. Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell* **31**:99-109.
373. **O'Reilly, M. S., T. Boehm, Y. Shing, N. Fukai, G. Vasios, W. S. Lane, E. Flynn, J. R. Birkhead, B. R. Olsen, and J. Folkman.** 1997. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* **88**:277-85.
374. **Oladipupo, S. S., C. Smith, A. Santeford, C. Park, A. Sene, L. A. Wiley, P. Osei-Owusu, J. Hsu, N. Zapata, F. Liu, R. Nakamura, K. J. Lavine, K. J. Blumer, K. Choi, R. S. Apte, and D. M. Ornitz.** 2013. Endothelial cell FGF signaling is required for injury response but not for vascular homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**:13379-84.
375. **Olofsson, B., K. Pajusola, A. Kaipainen, G. von Euler, V. Joukov, O. Saksela, A. Orpana, R. F. Pettersson, K. Alitalo, and U. Eriksson.** 1996. Vascular endothelial growth factor B, a novel growth factor for endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:2576-81.
376. **Olsen, C. L., P. P. Hsu, J. Glienke, G. M. Rubanyi, and A. R. Brooks.** 2004. Hedgehog-interacting protein is highly expressed in endothelial cells but down-regulated during angiogenesis and in several human tumors. *BMC Cancer* **4**:43.
377. **OMS 2015,** posting date. Cancer. [Online.]
378. **OMS 2012,** posting date. Globocan 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. IARC. [Online.]
379. **OMS 2016,** posting date. Human papillomavirus (HPV) and cervical cancer. [Online.]
380. **OpenStax 2014,** posting date. Anatomy & Physiology. OpenStax. [Online.]
381. **Oricchio, E., I. Sciamanna, R. Beraldi, G. V. Tolstonog, G. G. Schumann, and C. Spadafora.** 2007. Distinct roles for LINE-1 and HERV-K retroelements in cell proliferation, differentiation and tumor progression. *Oncogene* **26**:4226-33.
382. **Ortin, A., C. Cousens, E. Minguijon, Z. Pascual, M. P. Villarreal, J. M. Sharp, and L. Heras Mde.** 2003. Characterization of enzootic nasal tumour virus of goats: complete sequence and tissue distribution. *J Gen Virol* **84**:2245-52.
383. **Ortin, A., E. Minguijon, P. Dewar, M. Garcia, L. M. Ferrer, M. Palmarini, L. Gonzalez, J. M. Sharp, and M. De las Heras.** 1998. Lack of a specific immune response against a recombinant capsid protein of Jaagsiekte sheep retrovirus in sheep and goats naturally affected by enzootic nasal tumour or sheep pulmonary adenomatosis. *Vet Immunol Immunopathol* **61**:229-37.
384. **Otrock, Z. K., R. A. Mahfouz, J. A. Makarem, and A. I. Shamseddine.** 2007. Understanding the biology of angiogenesis: review of the most important molecular mechanisms. *Blood Cells Mol Dis* **39**:212-20.
385. **Pacheco-Pinedo, E. C., A. C. Durham, K. M. Stewart, A. M. Goss, M. M. Lu, F. J. Demayo, and E. E. Morrissey.** 2011. Wnt/beta-catenin signaling accelerates mouse lung tumorigenesis by imposing an embryonic distal progenitor phenotype on lung epithelium. *J Clin Invest* **121**:1935-45.
386. **Padera, T. P., A. Kadambi, E. di Tomaso, C. M. Carreira, E. B. Brown, Y. Boucher, N. C. Choi, D. Mathisen, J. Wain, E. J. Mark, L. L. Munn, and R. K. Jain.** 2002. Lymphatic metastasis in the absence of functional intratumor lymphatics. *Science* **296**:1883-6.
387. **Page-McCaw, A., A. J. Ewald, and Z. Werb.** 2007. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**:221-33.
388. **Paget, S.** 1889. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer Metastasis Rev* **8**:98-101.
389. **Palmarini, M., C. Cousens, R. G. Dalziel, J. Bai, K. Stedman, J. C. DeMartini, and J. M. Sharp.** 1996. The exogenous form of Jaagsiekte retrovirus is specifically associated with a contagious lung cancer of sheep. *J Virol* **70**:1618-23.
390. **Palmarini, M., S. Datta, R. Omid, C. Murgia, and H. Fan.** 2000. The long terminal repeat of Jaagsiekte sheep retrovirus is preferentially active in differentiated epithelial cells of the lungs. *J Virol* **74**:5776-87.
391. **Palmarini, M., P. Dewar, M. De las Heras, N. F. Inglis, R. G. Dalziel, and J. M. Sharp.** 1995. Epithelial tumour cells in the lungs of sheep with pulmonary adenomatosis are major sites of replication for Jaagsiekte retrovirus. *J Gen Virol* **76 (Pt 11)**:2731-7.

392. **Palmarini, M., and H. Fan.** 2003. Molecular biology of jaagsiekte sheep retrovirus. *Curr Top Microbiol Immunol* **275**:81-115.
393. **Palmarini, M., C. Hallwirth, D. York, C. Murgia, T. de Oliveira, T. Spencer, and H. Fan.** 2000. Molecular cloning and functional analysis of three type D endogenous retroviruses of sheep reveal a different cell tropism from that of the highly related exogenous jaagsiekte sheep retrovirus. *J Virol* **74**:8065-76.
394. **Palmarini, M., N. Maeda, C. Murgia, C. De-Fraja, A. Hofacre, and H. Fan.** 2001. A phosphatidylinositol 3-kinase docking site in the cytoplasmic tail of the Jaagsiekte sheep retrovirus transmembrane protein is essential for envelope-induced transformation of NIH 3T3 cells. *J Virol* **75**:11002-9.
395. **Palmarini, M., M. Mura, and T. E. Spencer.** 2004. Endogenous betaretroviruses of sheep: teaching new lessons in retroviral interference and adaptation. *J Gen Virol* **85**:1-13.
396. **Palmarini, M., C. Murgia, and H. Fan.** 2002. Spliced and prematurely polyadenylated Jaagsiekte sheep retrovirus-specific RNAs from infected or transfected cells. *Virology* **294**:180-8.
397. **Palmarini, M., J. M. Sharp, M. de las Heras, and H. Fan.** 1999. Jaagsiekte sheep retrovirus is necessary and sufficient to induce a contagious lung cancer in sheep. *J Virol* **73**:6964-72.
398. **Paloyan, E. B., L. J. Swinnen, A. Montoya, V. Lonchyna, H. J. Sullivan, and E. Garrity.** 2000. Lung transplantation for advanced bronchioloalveolar carcinoma confined to the lungs. *Transplantation* **69**:2446-8.
399. **Passalidou, E., M. Trivella, N. Singh, M. Ferguson, J. Hu, A. Cesario, P. Granone, A. G. Nicholson, P. Goldstraw, C. Ratcliffe, M. Tetlow, I. Leigh, A. L. Harris, K. C. Gatter, and F. Pezzella.** 2002. Vascular phenotype in angiogenic and non-angiogenic lung non-small cell carcinomas. *Br J Cancer* **86**:244-9.
400. **Patsialou, A., Y. Wang, J. Pignatelli, X. Chen, D. Entenberg, M. Oktay, and J. S. Condeelis.** 2015. Autocrine CSF1R signaling mediates switching between invasion and proliferation downstream of TGFbeta in claudin-low breast tumor cells. *Oncogene* **34**:2721-31.
401. **Patterson, C., M. A. Perrella, C. M. Hsieh, M. Yoshizumi, M. E. Lee, and E. Haber.** 1995. Cloning and functional analysis of the promoter for KDR/flk-1, a receptor for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* **270**:23111-8.
402. **Paulsson, J., M. Ehnman, and A. Ostman.** 2014. PDGF receptors in tumor biology: prognostic and predictive potential. *Future Oncol* **10**:1695-708.
403. **Pawlus, M. R., and C. J. Hu.** 2013. Enhanceosomes as integrators of hypoxia inducible factor (HIF) and other transcription factors in the hypoxic transcriptional response. *Cell Signal* **25**:1895-903.
404. **Payne, L. N., and V. Nair.** 2012. The long view: 40 years of avian leukosis research, p. 11-9, *Avian Pathol*, 2012/08/01 ed, vol. 41.
405. **Peloponese, J. M., Jr., and K. T. Jeang.** 2006. Role for Akt/protein kinase B and activator protein-1 in cellular proliferation induced by the human T-cell leukemia virus type 1 tax oncoprotein. *J Biol Chem* **281**:8927-38.
406. **Perk, K., R. Michalides, S. Spiegelman, and J. Schlom.** 1974. Biochemical and morphologic evidence for the presence of an RNA tumor virus in pulmonary carcinoma of sheep (Jaagsiekte). *J Natl Cancer Inst* **53**:131-5.
407. **Perot, P., N. Mugnier, C. Montgiraud, J. Gimenez, M. Jaillard, B. Bonnaud, and F. Mallet.** 2012. Microarray-based sketches of the HERV transcriptome landscape. *PLoS One* **7**:e40194.
408. **Petruzzello, A., S. Marigliano, G. Loquercio, A. Cozzolino, and C. Cacciapuoti.** 2016. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: An up-date of the distribution and circulation of hepatitis C virus genotypes. *World J Gastroenterol* **22**:7824-40.
409. **Pfaffl, M. W.** 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**:e45.
410. **Pise-Masison, C. A., R. Mahieux, H. Jiang, M. Ashcroft, M. Radonovich, J. Duvall, C. Guillerm, and J. N. Brady.** 2000. Inactivation of p53 by human T-cell lymphotropic virus type 1 Tax requires activation of the NF-kappaB pathway and is dependent on p53 phosphorylation. *Mol Cell Biol* **20**:3377-86.
411. **Platt, J. A., N. Kraipowich, F. Villafane, and J. C. DeMartini.** 2002. Alveolar type II cells expressing jaagsiekte sheep retrovirus capsid protein and surfactant proteins are the predominant neoplastic cell type in ovine pulmonary adenocarcinoma. *Vet Pathol* **39**:341-52.

412. **Plummer, M., C. de Martel, J. Vignat, J. Ferlay, F. Bray, and S. Franceschi.** 2016. Global burden of cancers attributable to infections in 2012: a synthetic analysis. *Lancet Glob Health* **4**:e609-16.
413. **Polk, D. B., and R. M. Peek, Jr.** 2010. *Helicobacter pylori*: gastric cancer and beyond. *Nat Rev Cancer* **10**:403-14.
414. **Poluzzi, C., R. V. Iozzo, and L. Schaefer.** 2016. Endostatin and endorepellin: A common route of action for similar angiostatic cancer avengers. *Adv Drug Deliv Rev* **97**:156-73.
415. **Popper, H.** 2017. Metastasis, p. 577-610, *Pathology of Lung Disease*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
416. **Psaila, B., and D. Lyden.** 2009. The metastatic niche: adapting the foreign soil. *Nat Rev Cancer* **9**:285-93.
417. **Puri, M. C., J. Rossant, K. Alitalo, A. Bernstein, and J. Partanen.** 1995. The receptor tyrosine kinase TIE is required for integrity and survival of vascular endothelial cells. *EMBO J* **14**:5884-91.
418. **Purushothaman, P., T. Uppal, R. Sarkar, and S. C. Verma.** 2016. KSHV-Mediated Angiogenesis in Tumor Progression. *Viruses* **8**.
419. **Qu, J., H. Yu, F. Li, C. Zhang, A. Trad, C. Brooks, B. Zhang, T. Gong, Z. Guo, Y. Li, G. Ragupathi, Y. Lou, P. Hwu, W. Huang, and D. Zhou.** 2016. Molecular basis of antibody binding to mucin glycopeptides in lung cancer. *Int J Oncol* **48**:587-94.
420. **Qureshi, T., S. Goswami, C. S. McClintock, M. T. Ramsey, and C. B. Peterson.** 2015. Distinct encounter complexes of PAI-1 with plasminogen activators and vitronectin revealed by changes in the conformation and dynamics of the reactive center loop. *Protein Sci* **25**:499-510.
421. **Raaschou-Nielsen, O., R. Beelen, M. Wang, G. Hoek, Z. J. Andersen, B. Hoffmann, M. Stafoggia, E. Samoli, G. Weinmayr, K. Dimakopoulou, M. Nieuwenhuijsen, W. W. Xun, P. Fischer, K. T. Eriksen, M. Sorensen, A. Tjonneland, F. Ricceri, K. de Hoogh, T. Key, M. Eeftens, P. H. Peeters, H. B. Bueno-de-Mesquita, K. Meliefste, B. Oftedal, P. E. Schwarze, P. Nafstad, C. Galassi, E. Migliore, A. Ranzi, G. Cesaroni, C. Badaloni, F. Forastiere, J. Penell, U. De Faire, M. Korek, N. Pedersen, C. G. Ostenson, G. Pershagen, L. Fratiglioni, H. Concin, G. Nagel, A. Jaensch, A. Ineichen, A. Naccarati, M. Katsoulis, A. Trichpoulou, M. Keuken, A. Jedynska, I. M. Kooter, J. Kukkonen, B. Brunekreef, R. S. Sokhi, K. Katsouyanni, and P. Vineis.** 2016. Particulate matter air pollution components and risk for lung cancer. *Environ Int* **87**:66-73.
422. **Radtke, F., and K. Raj.** 2003. The role of Notch in tumorigenesis: oncogene or tumour suppressor? *Nat Rev Cancer* **3**:756-67.
423. **Rai, S. K., J. C. DeMartini, and A. D. Miller.** 2000. Retrovirus vectors bearing jaagsiekte sheep retrovirus Env transduce human cells by using a new receptor localized to chromosome 3p21.3. *J Virol* **74**:4698-704.
424. **Raica, M., A. M. Cimpean, and D. Ribatti.** 2009. Angiogenesis in pre-malignant conditions. *Eur J Cancer* **45**:1924-34.
425. **Raimondi, C., and C. Ruhrberg.** 2013. Neuropilin signalling in vessels, neurons and tumours. *Semin Cell Dev Biol* **24**:172-8.
426. **Rak, J., Y. Mitsuhashi, L. Bayko, J. Filmus, S. Shirasawa, T. Sasazuki, and R. S. Kerbel.** 1995. Mutant ras oncogenes upregulate VEGF/VPF expression: implications for induction and inhibition of tumor angiogenesis. *Cancer Res* **55**:4575-80.
427. **Ravanat, J. L. D., T.** 2016. UV and ionizing radiations induced DNA damage, differences and similarities. *Radiation Physics and Chemistry* **128**:92-102.
428. **Ren, T., Y. Qiu, W. Wu, X. Feng, S. Ye, Z. Wang, T. Tian, Y. He, C. Yu, and Y. Zhou.** 2014. Activation of adenosine A3 receptor alleviates TNF-alpha-induced inflammation through inhibition of the NF-kappaB signaling pathway in human colonic epithelial cells. *Mediators Inflamm* **2014**:818251.
429. **Riaz, S. K., Y. Iqbal, and M. F. Malik.** 2015. Diagnostic and therapeutic implications of the vascular endothelial growth factor family in cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* **16**:1677-82.
430. **Ribet, H.** 2010. Formation et évolution des rétrovirus endogènes. *Virologie* **14**:141-150.
431. **Rimkus, T. K., R. L. Carpenter, S. Qasem, M. Chan, and H. W. Lo.** 2016. Targeting the Sonic Hedgehog Signaling Pathway: Review of Smoothed and GLI Inhibitors. *Cancers (Basel)* **8**.
432. **Rocca, S., M. P. Sanna, A. Leoni, A. Cossu, A. Lissia, F. Tanda, M. P. Satta, and G. Palmieri.** 2008. Presence of Jaagsiekte sheep retrovirus in tissue sections from human bronchioloalveolar carcinoma depends on patients' geographical origin. *Hum Pathol* **39**:303-4.

433. **Rock, J. R., and B. L. Hogan.** 2011. Epithelial progenitor cells in lung development, maintenance, repair, and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* **27**:493-512.
434. **Rock, J. R., S. H. Randell, and B. L. Hogan.** 2010. Airway basal stem cells: a perspective on their roles in epithelial homeostasis and remodeling. *Dis Model Mech* **3**:545-56.
435. **Rokicki, W., M. Rokicki, J. Wojtacha, and A. Dzeljijli.** 2016. The role and importance of club cells (Clara cells) in the pathogenesis of some respiratory diseases. *Kardiochir Torakochirurgia Pol* **13**:26-30.
436. **Romieu, I., J. A. Berlin, and G. Colditz.** 1990. Oral contraceptives and breast cancer. Review and meta-analysis. *Cancer* **66**:2253-63.
437. **Rosati, S., M. Pittau, A. Alberti, S. Pozzi, D. F. York, J. M. Sharp, and M. Palmarini.** 2000. An accessory open reading frame (orf-x) of jaagsiekte sheep retrovirus is conserved between different virus isolates. *Virus Res* **66**:109-16.
438. **Rous, P.** 1911. A Sarcoma of the Fowl Transmissible by an Agent Separable from the Tumor Cells. *J Exp Med* **13**:397-411.
439. **Roy, S., S. Khanna, S. R. Hussain, S. Biswas, A. Azad, C. Rink, S. Gnyawali, S. Shilo, G. J. Nuovo, and C. K. Sen.** 2009. MicroRNA expression in response to murine myocardial infarction: miR-21 regulates fibroblast metalloprotease-2 via phosphatase and tensin homologue. *Cardiovasc Res* **82**:21-9.
440. **Rubaj, B. W., S.** 1967. Adenopapilloma enzooticum jamy nosowej u owiec. *Medycyny Weterynaryjnej* **23**:226-229.
441. **Saharinen, P., T. Tammela, M. J. Karkkainen, and K. Alitalo.** 2004. Lymphatic vasculature: development, molecular regulation and role in tumor metastasis and inflammation. *Trends Immunol* **25**:387-95.
442. **Sakurai, Y., K. Ohgimoto, Y. Kataoka, N. Yoshida, and M. Shibuya.** 2005. Essential role of Flk-1 (VEGF receptor 2) tyrosine residue 1173 in vasculogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:1076-81.
443. **Salameh, A., F. Galvagni, M. Bardelli, F. Bussolino, and S. Oliviero.** 2005. Direct recruitment of CRK and GRB2 to VEGFR-3 induces proliferation, migration, and survival of endothelial cells through the activation of ERK, AKT, and JNK pathways. *Blood* **106**:3423-31.
444. **Salvatori, D., L. Gonzalez, P. Dewar, C. Cousens, M. de las Heras, R. G. Dalziel, and J. M. Sharp.** 2004. Successful induction of ovine pulmonary adenocarcinoma in lambs of different ages and detection of viraemia during the preclinical period. *J Gen Virol* **85**:3319-24.
445. **Sands, M., K. Howell, C. M. Costello, and P. McLoughlin.** 2011. Placenta growth factor and vascular endothelial growth factor B expression in the hypoxic lung. *Respir Res* **12**:17.
446. **Sanmartin, E., R. Sirera, M. Uso, A. Blasco, S. Gallach, S. Figueroa, N. Martinez, C. Hernando, A. Honguero, M. Martorell, R. Guijarro, R. Rosell, E. Jantus-Lewintre, and C. Camps.** 2014. A gene signature combining the tissue expression of three angiogenic factors is a prognostic marker in early-stage non-small cell lung cancer. *Ann Surg Oncol* **21**:612-20.
447. **Sawaya, P. L., B. R. Stripp, J. A. Whitsett, and D. S. Luse.** 1993. The lung-specific CC10 gene is regulated by transcription factors from the AP-1, octamer, and hepatocyte nuclear factor 3 families. *Mol Cell Biol* **13**:3860-71.
448. **Scheffzek, K., M. R. Ahmadian, W. Kabsch, L. Wiesmuller, A. Lautwein, F. Schmitz, and A. Wittinghofer.** 1997. The Ras-RasGAP complex: structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic Ras mutants. *Science* **277**:333-8.
449. **Schiavetti, F., J. Thonnard, D. Colau, T. Boon, and P. G. Coulie.** 2002. A human endogenous retroviral sequence encoding an antigen recognized on melanoma by cytolytic T lymphocytes. *Cancer Res* **62**:5510-6.
450. **Schwab, M., J. Ellison, M. Busch, W. Rosenau, H. E. Varmus, and J. M. Bishop.** 1984. Enhanced expression of the human gene N-myc consequent to amplification of DNA may contribute to malignant progression of neuroblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**:4940-4.
451. **Seachrist, D. D., K. W. Bonk, S. M. Ho, G. S. Prins, A. M. Soto, and R. A. Keri.** 2016. A review of the carcinogenic potential of bisphenol A. *Reprod Toxicol* **59**:167-82.
452. **Senger, D. R., S. J. Galli, A. M. Dvorak, C. A. Perruzzi, V. S. Harvey, and H. F. Dvorak.** 1983. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* **219**:983-5.

453. **Shalaby, F., J. Rossant, T. P. Yamaguchi, M. Gertsenstein, X. F. Wu, M. L. Breitman, and A. C. Schuh.** 1995. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* **376**:62-6.
454. **Shao, W., W. Wang, X. G. Xiong, C. Cao, T. D. Yan, G. Chen, H. Chen, W. Yin, J. Liu, Y. Gu, M. Mo, and J. He.** 2011. Prognostic impact of MMP-2 and MMP-9 expression in pathologic stage IA non-small cell lung cancer. *J Surg Oncol* **104**:841-6.
455. **Sharma, S. V., D. W. Bell, J. Settleman, and D. A. Haber.** 2007. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nat Rev Cancer* **7**:169-81.
456. **Sharp, J. M., and J. C. DeMartini.** 2003. Natural history of JSRV in sheep. *Curr Top Microbiol Immunol* **275**:55-79.
457. **Sherlock, S., R. A. Fox, S. P. Niazi, and P. J. Scheuer.** 1970. Chronic liver disease and primary liver-cell cancer with hepatitis-associated (Australia) antigen in serum. *Lancet* **1**:1243-7.
458. **Shibuya, M.** 2011. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR) Signaling in Angiogenesis: A Crucial Target for Anti- and Pro-Angiogenic Therapies. *Genes Cancer* **2**:1097-105.
459. **Shibuya, M.** 2006. Vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1/Flt-1): a dual regulator for angiogenesis. *Angiogenesis* **9**:225-30; discussion 231.
460. **Shih, T. Y., M. O. Weeks, H. A. Young, and E. M. Scholnick.** 1979. Identification of a sarcoma virus-coded phosphoprotein in nonproducer cells transformed by Kirsten or Harvey murine sarcoma virus. *Virology* **96**:64-79.
461. **Shiojima, I., and K. Walsh.** 2002. Role of Akt signaling in vascular homeostasis and angiogenesis. *Circ Res* **90**:1243-50.
462. **Shiovitz, S., and L. A. Korde.** 2015. Genetics of breast cancer: a topic in evolution. *Ann Oncol* **26**:1291-9.
463. **Siddique, H. R., and M. Saleem.** 2012. Role of BMI1, a stem cell factor, in cancer recurrence and chemoresistance: preclinical and clinical evidences. *Stem Cells* **30**:372-8.
464. **Siemann, D. W.** 2011. The unique characteristics of tumor vasculature and preclinical evidence for its selective disruption by Tumor-Vascular Disrupting Agents. *Cancer Treat Rev* **37**:63-74.
465. **Simons, M., E. Gordon, and L. Claesson-Welsh.** 2016. Mechanisms and regulation of endothelial VEGF receptor signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **17**:611-25.
466. **Sistiaga-Poveda, M., A. Larruskain, M. Mateo-Abad, and B. M. Jugo.** 2016. Lack of association between polymorphic copies of endogenous Jaagsiekte sheep retrovirus (enJSRVs) and Ovine Pulmonary Adenocarcinoma. *Vet Microbiol* **185**:49-55.
467. **Situ, D., J. Wang, Y. Ma, Z. Zhu, Y. Hu, H. Long, and T. Rong.** 2011. Expression and prognostic relevance of MUC1 in stage IB non-small cell lung cancer. *Med Oncol* **28 Suppl 1**:S596-604.
468. **Soker, S., H. Q. Miao, M. Nomi, S. Takashima, and M. Klagsbrun.** 2002. VEGF165 mediates formation of complexes containing VEGFR-2 and neuropilin-1 that enhance VEGF165-receptor binding. *J Cell Biochem* **85**:357-68.
469. **Sonawane, G. G., B. N. Tripathi, R. Kumar, and J. Kumar.** 2016. Diagnosis and prevalence of ovine pulmonary adenocarcinoma in lung tissues of naturally infected farm sheep. *Vet World* **9**:365-70.
470. **Song, W., K. Tao, H. Li, C. Jin, Z. Song, J. Li, H. Shi, X. Li, Z. Dang, and K. Dou.** 2010. Bmi-1 is related to proliferation, survival and poor prognosis in pancreatic cancer. *Cancer Sci* **101**:1754-60.
471. **Sosa, M. S., P. Bragado, and J. A. Aguirre-Ghiso.** 2014. Mechanisms of disseminated cancer cell dormancy: an awakening field. *Nat Rev Cancer* **14**:611-22.
472. **Sozmen, M., and E. Beytut.** 2012. An investigation of growth factors and lactoferrin in naturally occurring ovine pulmonary adenomatosis. *J Comp Pathol* **147**:441-51.
473. **Spencer, T. E., M. Mura, C. A. Gray, P. J. Griebel, and M. Palmarini.** 2003. Receptor usage and fetal expression of ovine endogenous betaretroviruses: implications for coevolution of endogenous and exogenous retroviruses. *J Virol* **77**:749-53.
474. **Srikrishna, G.** 2012. S100A8 and S100A9: new insights into their roles in malignancy. *J Innate Immun* **4**:31-40.
475. **Stacker, S. A., S. P. Williams, T. Karnezis, R. Shayan, S. B. Fox, and M. G. Achen.** 2014. Lymphangiogenesis and lymphatic vessel remodelling in cancer. *Nat Rev Cancer* **14**:159-72.
476. **Stewart, D. J.** 2013. Wnt signaling pathway in non-small cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* **106**:djt356.

477. **Stoeltzing, O., S. A. Ahmad, W. Liu, M. F. McCarty, J. S. Wey, A. A. Parikh, F. Fan, N. Reinmuth, M. Kawaguchi, C. D. Bucana, and L. M. Ellis.** 2003. Angiopoietin-1 inhibits vascular permeability, angiogenesis, and growth of hepatic colon cancer tumors. *Cancer Res* **63**:3370-7.
478. **Strongin, A. Y., I. Collier, G. Bannikov, B. L. Marmer, G. A. Grant, and G. I. Goldberg.** 1995. Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease. *J Biol Chem* **270**:5331-8.
479. **Su, J. L., J. Y. Shih, M. L. Yen, Y. M. Jeng, C. C. Chang, C. Y. Hsieh, L. H. Wei, P. C. Yang, and M. L. Kuo.** 2004. Cyclooxygenase-2 induces EP1- and HER-2/Neu-dependent vascular endothelial growth factor-C up-regulation: a novel mechanism of lymphangiogenesis in lung adenocarcinoma. *Cancer Res* **64**:554-64.
480. **Su, J. L., C. J. Yen, P. S. Chen, S. E. Chuang, C. C. Hong, I. H. Kuo, H. Y. Chen, M. C. Hung, and M. L. Kuo.** 2007. The role of the VEGF-C/VEGFR-3 axis in cancer progression. *Br J Cancer* **96**:541-5.
481. **Suau, F., V. Cottin, F. Archer, S. Croze, J. Chastang, G. Cordier, F. Thivolet-Bejui, J. F. Mornex, and C. Leroux.** 2006. Telomerase activation in a model of lung adenocarcinoma. *Eur Respir J* **27**:1175-82.
482. **Suau, F. G., N.; Archer, F.; Cottin, V.; Croze, S.; Mornex, JF.; Leroux, C.** 2006. JSRV (jaagsiekte sheep retrovirus) et cancer du poumon associé chez le mouton. *Virologie* **10**:287-299.
483. **Subramanian, R. P., J. H. Wildschutte, C. Russo, and J. M. Coffin.** 2011. Identification, characterization, and comparative genomic distribution of the HERV-K (HML-2) group of human endogenous retroviruses. *Retrovirology* **8**:90.
484. **Sun, S. C., and S. Yamaoka.** 2005. Activation of NF-kappaB by HTLV-I and implications for cell transformation. *Oncogene* **24**:5952-64.
485. **Sunaga, N., K. Kaira, Y. Tomizawa, K. Shimizu, H. Imai, G. Takahashi, S. Kakegawa, Y. Ohtaki, T. Nagashima, N. Kasahara, O. Kawashima, T. Hisada, R. Saito, and M. Yamada.** 2014. Clinicopathological and prognostic significance of interleukin-8 expression and its relationship to KRAS mutation in lung adenocarcinoma. *Br J Cancer* **110**:2047-53.
486. **Sung, W. W., Y. C. Chu, P. R. Chen, M. H. Liao, and J. W. Lee.** 2016. Positive regulation of HIF-1A expression by EBV oncoprotein LMP1 in nasopharyngeal carcinoma cells. *Cancer Lett* **382**:21-31.
487. **Suri, C., P. F. Jones, S. Patan, S. Bartunkova, P. C. Maisonpierre, S. Davis, T. N. Sato, and G. D. Yancopoulos.** 1996. Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell* **87**:1171-80.
488. **Suzuki, M., H. Shigematsu, T. Nakajima, R. Kubo, S. Motohashi, Y. Sekine, K. Shibuya, T. Iizasa, K. Hiroshima, Y. Nakatani, A. F. Gazdar, and T. Fujisawa.** 2007. Synchronous alterations of Wnt and epidermal growth factor receptor signaling pathways through aberrant methylation and mutation in non small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* **13**:6087-92.
489. **Sweeney, M. D., S. Ayyadurai, and B. V. Zlokovic.** 2016. Pericytes of the neurovascular unit: key functions and signaling pathways. *Nat Neurosci* **19**:771-83.
490. **Swerdlow, S. H., E. Campo, S. A. Pileri, N. L. Harris, H. Stein, R. Siebert, R. Advani, M. Ghielmini, G. A. Salles, A. D. Zelenetz, and E. S. Jaffe.** 2016. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood* **127**:2375-90.
491. **Tadros, A., D. P. Hughes, B. J. Dunmore, and N. P. Brindle.** 2003. ABIN-2 protects endothelial cells from death and has a role in the antiapoptotic effect of angiopoietin-1. *Blood* **102**:4407-9.
492. **Taichman, R. S., L. R. Patel, R. Bedenis, J. Wang, S. Weidner, T. Schumann, K. Yumoto, J. E. Berry, Y. Shiozawa, and K. J. Pienta.** 2013. GAS6 receptor status is associated with dormancy and bone metastatic tumor formation. *PLoS One* **8**:e61873.
493. **Takamura, N., M. Orita, V. Saenko, S. Yamashita, S. Nagataki, and Y. Demidchik.** 2016. Radiation and risk of thyroid cancer: Fukushima and Chernobyl. *The Lancet: Diabetes & Endocrinology* **4**:647.
494. **Takashima, S., M. Kitakaze, M. Asakura, H. Asanuma, S. Sanada, F. Tashiro, H. Niwa, J. Miyazaki Ji, S. Hirota, Y. Kitamura, T. Kitsukawa, H. Fujisawa, M. Klagsbrun, and M. Hori.** 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.
495. **Tamimi, R. M.** 2017. *Epidemiology of Breast Cancer*, p. 151-172, Pathology and Epidemiology of Cancer, vol. 2. Springer International Publishing.
496. **Tarlinton, R. E., J. Meers, and P. R. Young.** 2006. Retroviral invasion of the koala genome. *Nature* **442**:79-81.

497. **Tarocchi, M., S. Polvani, G. Marroncini, and A. Galli.** 2014. Molecular mechanism of hepatitis B virus-induced hepatocarcinogenesis. *World J Gastroenterol* **20**:11630-40.
498. **Tchaikovski, V., G. Fellbrich, and J. Waltenberger.** 2008. The molecular basis of VEGFR-1 signal transduction pathways in primary human monocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **28**:322-8.
499. **Tennis, M. A., M. M. Vanscoyk, L. A. Wilson, N. Kelley, and R. A. Winn.** 2012. Methylation of Wnt7a is modulated by DNMT1 and cigarette smoke condensate in non-small cell lung cancer. *PLoS One* **7**:e32921.
500. **Thomas, M., and H. G. Augustin.** 2009. The role of the Angiopoietins in vascular morphogenesis. *Angiogenesis* **12**:125-37.
501. **Thurston, G., C. Suri, K. Smith, J. McClain, T. N. Sato, G. D. Yancopoulos, and D. M. McDonald.** 1999. Leakage-resistant blood vessels in mice transgenically overexpressing angiopoietin-1. *Science* **286**:2511-4.
502. **Timmerman, L. A., J. Grego-Bessa, A. Raya, E. Bertran, J. M. Perez-Pomares, J. Diez, S. Aranda, S. Palomo, F. McCormick, J. C. Izpisua-Belmonte, and J. L. de la Pompa.** 2004. Notch promotes epithelial-mesenchymal transition during cardiac development and oncogenic transformation. *Genes Dev* **18**:99-115.
503. **Tominaga, N., N. Kosaka, M. Ono, T. Katsuda, Y. Yoshioka, K. Tamura, J. Lotvall, H. Nakagama, and T. Ochiya.** 2015. Brain metastatic cancer cells release microRNA-181c-containing extracellular vesicles capable of destructing blood-brain barrier. *Nat Commun* **6**:6716.
504. **Torino, F., R. Sarmiento, R. Longo, and G. Gasparini.** 2017. Therapeutic agents that inhibit angiogenesis, p. 757-769. *In* W. B. Coleman and G. J. Tsongalis (ed.), *The molecular basis of human cancer*. Springer New York.
505. **Travis, W. D., C. Brambilla, A. P. Burke, A. Marx, and A. G. Nicholson.** 2015. WHO Classification of Tumours of Lung, Pleura, Thymus and Heart (4th edition).
506. **Travis, W. D., E. Brambilla, A. G. Nicholson, Y. Yatabe, J. H. Austin, M. B. Beasley, L. R. Chirieac, S. Dacic, E. Duhig, D. B. Flieder, K. Geisinger, F. R. Hirsch, Y. Ishikawa, K. M. Kerr, M. Noguchi, G. Pelosi, C. A. Powell, M. S. Tsao, and I. Wistuba.** 2015. The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances Since the 2004 Classification. *J Thorac Oncol* **10**:1243-60.
507. **Travis, W. D., E. Brambilla, A. G. Nicholson, Y. Yatabe, J. H. Austin, M. B. Beasley, L. R. Chirieac, S. Dacic, E. Duhig, D. B. Flieder, K. Geisinger, F. R. Hirsch, Y. Ishikawa, K. M. Kerr, M. Noguchi, G. Pelosi, C. A. Powell, M. S. Tsao, I. Wistuba, and W. H. O. Panel.** 2015. The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances Since the 2004 Classification. *J Thorac Oncol* **10**:1243-60.
508. **Tsuchida, R., T. Osawa, F. Wang, R. Nishii, B. Das, S. Tsuchida, M. Muramatsu, T. Takahashi, T. Inoue, Y. Wada, T. Minami, Y. Yuasa, and M. Shibuya.** 2014. BMP4/Thrombospondin-1 loop paracrinally inhibits tumor angiogenesis and suppresses the growth of solid tumors. *Oncogene* **33**:3803-11.
509. **Tsuta, K., M. Kawago, E. Inoue, A. Yoshida, F. Takahashi, H. Sakurai, S. Watanabe, M. Takeuchi, K. Furuta, H. Asamura, and H. Tsuda.** 2013. The utility of the proposed IASLC/ATS/ERS lung adenocarcinoma subtypes for disease prognosis and correlation of driver gene alterations. *Lung Cancer* **81**:371-6.
510. **Turelli, P., N. Castro-Diaz, F. Marzetta, A. Kapopoulou, C. Raclot, J. Duc, V. Tieng, S. Quenneville, and D. Trono.** 2014. Interplay of TRIM28 and DNA methylation in controlling human endogenous retroelements. *Genome Res* **24**:1260-70.
511. **Turner, N., and R. Grose.** 2010. Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. *Nat Rev Cancer* **10**:116-29.
512. **Valastyan, S., and R. A. Weinberg.** 2011. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell* **147**:275-92.
513. **van de Lagemaat, L. N., P. Medstrand, and D. L. Mager.** 2006. Multiple effects govern endogenous retrovirus survival patterns in human gene introns. *Genome Biol* **7**:R86.
514. **Vandesompele, J., K. De Preter, F. Pattyn, B. Poppe, N. Van Roy, A. De Paepe, and F. Speleman.** 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* **3**:RESEARCH0034.
515. **Varjosalo, M., and J. Taipale.** 2008. Hedgehog: functions and mechanisms. *Genes Dev* **22**:2454-72.

516. **Vaughan, A. E., C. L. Halbert, S. K. Wootton, and A. D. Miller.** 2012. Lung cancer in mice induced by the jaagsiekte sheep retrovirus envelope protein is not maintained by rare cancer stem cells, but tumorigenicity does correlate with Wnt pathway activation. *Mol Cancer Res* **10**:86-95.
517. **Velcheti, V., and R. Govindan.** 2007. Hedgehog signaling pathway and lung cancer. *J Thorac Oncol* **2**:7-10.
518. **Veldhuizen, E. J., and H. P. Haagsman.** 2000. Role of pulmonary surfactant components in surface film formation and dynamics. *Biochim Biophys Acta* **1467**:255-70.
519. **Vempati, P., A. S. Popel, and F. Mac Gabhann.** 2013. Extracellular regulation of VEGF: isoforms, proteolysis, and vascular patterning. *Cytokine Growth Factor Rev* **25**:1-19.
520. **Vernin, C., M. Thenoz, C. Pinatel, A. Gessain, O. Gout, M. H. Delfau-Larue, N. Nazaret, C. Legras-Lachuer, E. Wattel, and F. Mortreux.** 2014. HTLV-1 bZIP factor HBZ promotes cell proliferation and genetic instability by activating OncomiRs. *Cancer Res* **74**:6082-93.
521. **Verwoerd, D. W., E. M. De Villiers, and R. C. Tustin.** 1980. Aetiology of jaagsiekte: experimental transmission to lambs by means of cultured cells and cell homogenates. *Onderstepoort J Vet Res* **47**:13-8.
522. **Verwoerd, D. W., A. L. Williamson, and E. M. De Villiers.** 1980. Aetiology of jaagsiekte: transmission by means of subcellular fractions and evidence for the involvement of a retrovirus. *Onderstepoort J Vet Res* **47**:275-80.
523. **Vigdorovich, V., A. D. Miller, and R. K. Strong.** 2007. Ability of hyaluronidase 2 to degrade extracellular hyaluronan is not required for its function as a receptor for jaagsiekte sheep retrovirus. *J Virol* **81**:3124-9.
524. **Vigdorovich, V., R. K. Strong, and A. D. Miller.** 2005. Expression and characterization of a soluble, active form of the jaagsiekte sheep retrovirus receptor, Hyal2. *J Virol* **79**:79-86.
525. **Viginier, B., C. Dolmazon, I. Lantier, F. Lantier, F. Archer, C. Leroux, and C. Terzian.** 2012. Copy number variation and differential expression of a protective endogenous retrovirus in sheep. *PLoS One* **7**:e41965.
526. **Vitellozzi, G. M., L.; Palmarini, M.; Mandara, MT.; Mechelli, L.; Shar, JM.; Manocchio, I.** 1993. Enzootic intranasal tumour of goats in Italy. *Journal of Veterinary Medicine B* **40**:459-468.
527. **Vogt, P. K.** 2012. Retroviral oncogenes: a historical primer. *Nat Rev Cancer* **12**:639-48.
528. **Vrancken, K., P. Vervaeke, J. Balzarini, and S. Liekens.** 2011. Viruses as key regulators of angiogenesis. *Rev Med Virol* **21**:181-200.
529. **Vrzalikova, K., J. Skarda, J. Ehrmann, P. G. Murray, E. Fridman, J. Kopolovic, P. Knizetova, M. Hajdich, J. Klein, V. Kolek, L. Radova, and Z. Kolar.** 2008. Prognostic value of Bmi-1 oncoprotein expression in NSCLC patients: a tissue microarray study. *J Cancer Res Clin Oncol* **134**:1037-42.
530. **Wakiya, K., A. Begue, D. Stehelin, and M. Shibuya.** 1996. A cAMP response element and an Ets motif are involved in the transcriptional regulation of flt-1 tyrosine kinase (vascular endothelial growth factor receptor 1) gene. *J Biol Chem* **271**:30823-8.
531. **Walsh, S. R., N. M. Linnerth-Petrik, D. L. Yu, R. A. Foster, P. I. Menzies, A. Diaz-Mendez, H. J. Chalmers, and S. K. Wootton.** 2013. Experimental transmission of enzootic nasal adenocarcinoma in sheep. *Vet Res* **44**:66.
532. **Wang-Johanning, F., M. Li, F. J. Esteva, K. R. Hess, B. Yin, K. Rycaj, J. B. Plummer, J. G. Garza, S. Ambs, and G. L. Johanning.** 2014. Human endogenous retrovirus type K antibodies and mRNA as serum biomarkers of early-stage breast cancer. *Int J Cancer* **134**:587-95.
533. **Wang-Johanning, F., J. Liu, K. Rycaj, M. Huang, K. Tsai, D. G. Rosen, D. T. Chen, D. W. Lu, K. F. Barnhart, and G. L. Johanning.** 2007. Expression of multiple human endogenous retrovirus surface envelope proteins in ovarian cancer. *Int J Cancer* **120**:81-90.
534. **Wang-Johanning, F., L. Radvanyi, K. Rycaj, J. B. Plummer, P. Yan, K. J. Sastry, C. J. Piyathilake, K. K. Hunt, and G. L. Johanning.** 2008. Human endogenous retrovirus K triggers an antigen-specific immune response in breast cancer patients. *Cancer Res* **68**:5869-77.
535. **Wang, H., W. Fu, J. H. Im, Z. Zhou, S. A. Santoro, V. Iyer, C. M. DiPersio, Q. C. Yu, V. Quaranta, A. Al-Mehdi, and R. J. Muschel.** 2004. Tumor cell alpha3beta1 integrin and vascular laminin-5 mediate pulmonary arrest and metastasis. *J Cell Biol* **164**:935-41.
536. **Wang, H. Q., M. L. Xu, J. Ma, Y. Zhang, and C. H. Xie.** 2012. Frizzled-8 as a putative therapeutic target in human lung cancer. *Biochem Biophys Res Commun* **417**:62-6.

537. **Wang, J., Y. Huang, J. Zhang, Y. Wei, S. Mahoud, A. M. Bakheet, L. Wang, S. Zhou, and J. Tang.** 2016. Pathway-related molecules of VEGFC/D-VEGFR3/NRP2 axis in tumor lymphangiogenesis and lymphatic metastasis. *Clin Chim Acta* **461**:165-71.
538. **Watkins, D. N., D. M. Berman, S. G. Burkholder, B. Wang, P. A. Beachy, and S. B. Baylin.** 2003. Hedgehog signalling within airway epithelial progenitors and in small-cell lung cancer. *Nature* **422**:313-7.
539. **Wei, Q., Y. Zhao, Z. Q. Yang, Q. Z. Dong, X. J. Dong, Y. Han, C. Zhao, and E. H. Wang.** 2008. Dishevelled family proteins are expressed in non-small cell lung cancer and function differentially on tumor progression. *Lung Cancer* **62**:181-92.
540. **Weiss, R. A.** 2006. The discovery of endogenous retroviruses. *Retrovirology* **3**:67.
541. **Werle, B., M. Kotzsch, T. T. Lah, J. Kos, D. Gabrijelcic-Geiger, E. Spiess, J. Schirren, W. Ebert, W. Fiehn, T. Luther, V. Magdolen, M. Schmitt, and N. Harbeck.** 2004. Cathepsin B, plasminogenactivator-inhibitor (PAI-1) and plasminogenactivator-receptor (uPAR) are prognostic factors for patients with non-small cell lung cancer. *Anticancer Res* **24**:4147-61.
542. **Whitehead, T. P., C. Metayer, J. L. Wiemels, A. W. Singer, and M. D. Miller.** 2016. Childhood Leukemia and Primary Prevention. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care* **46**:317-352.
543. **Wild, J. R., C. A. Staton, K. Chapple, and B. M. Corfe.** 2012. Neuropilins: expression and roles in the epithelium. *Int J Exp Pathol* **93**:81-103.
544. **Wislez, M., V. Gounant, and J. Cadranet.** 2005. [Bronchioloalveolar carcinoma]. *Rev Mal Respir* **22**:8S70-5.
545. **Wittko, I. M., A. Schanzer, A. Kuzmichev, F. T. Schneider, M. Shibuya, S. Raab, and K. H. Plate.** 2009. VEGFR-1 regulates adult olfactory bulb neurogenesis and migration of neural progenitors in the rostral migratory stream in vivo. *J Neurosci* **29**:8704-14.
546. **Wolff, L., and S. Ruscetti.** 1988. The spleen focus-forming virus (SFFV) envelope gene, when introduced into mice in the absence of other SFFV genes, induces acute erythroleukemia. *J Virol* **62**:2158-63.
547. **Wootton, S. K., C. L. Halbert, and A. D. Miller.** 2006. Envelope proteins of Jaagsiekte sheep retrovirus and enzootic nasal tumor virus induce similar bronchioalveolar tumors in lungs of mice. *J Virol* **80**:9322-5.
548. **Wootton, S. K., C. L. Halbert, and A. D. Miller.** 2005. Sheep retrovirus structural protein induces lung tumours. *Nature* **434**:904-7.
549. **Wyckoff, J., W. Wang, E. Y. Lin, Y. Wang, F. Pixley, E. R. Stanley, T. Graf, J. W. Pollard, J. Segall, and J. Condeelis.** 2004. A paracrine loop between tumor cells and macrophages is required for tumor cell migration in mammary tumors. *Cancer Res* **64**:7022-9.
550. **Wynn, T. A., and K. M. Vannella.** 2016. Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis. *Immunity* **44**:450-62.
551. **Xiao, D., and J. He.** 2010. Epithelial mesenchymal transition and lung cancer. *J Thorac Dis* **2**:154-9.
552. **Xie, M., C. S. He, S. H. Wei, and L. Zhang.** 2013. Notch-1 contributes to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor acquired resistance in non-small cell lung cancer in vitro and in vivo. *Eur J Cancer* **49**:3559-72.
553. **Xin, H., J. A. Brown, C. Gong, H. Fan, G. Brewer, and J. R. Gnarra.** 2012. Association of the von Hippel-Lindau protein with AUF1 and posttranscriptional regulation of VEGFA mRNA. *Mol Cancer Res* **10**:108-20.
554. **Xiong, D., Y. Ye, Y. Fu, J. Wang, B. Kuang, H. Wang, X. Wang, L. Zu, G. Xiao, and M. Hao.** 2015. Bmi-1 expression modulates non-small cell lung cancer progression. *Cancer Biol Ther* **16**:756-63.
555. **Xu, K., N. Moghal, and S. E. Egan.** 2013. Notch signaling in lung development and disease. *Adv Exp Med Biol* **727**:89-98.
556. **Xu, M., D. C. Wang, X. Wang, and Y. Zhang.** 2017. Correlation between mucin biology and tumor heterogeneity in lung cancer. *Semin Cell Dev Biol* **64**:73-78.
557. **Xu, X., Y. Zhang, J. Jasper, E. Lykken, P. B. Alexander, G. J. Markowitz, D. P. McDonnell, Q. J. Li, and X. F. Wang.** 2016. MiR-148a functions to suppress metastasis and serves as a prognostic indicator in triple-negative breast cancer. *Oncotarget* **7**:20381-94.
558. **Xu, Y., L. Yuan, J. Mak, L. Pardanaud, M. Caunt, I. Kasman, B. Larrivee, R. Del Toro, S. Suchting, A. Medvinsky, J. Silva, J. Yang, J. L. Thomas, A. W. Koch, K. Alitalo, A. Eichmann, and A. Bagri.**

2010. Neuropilin-2 mediates VEGF-C-induced lymphatic sprouting together with VEGFR3. *J Cell Biol* **188**:115-30.
559. **Xuan, Z. X., S. Zhang, S. J. Yuan, W. Wang, and J. Yu.** 2016. Prognostic value of angiopoietin-2 in non-small cell lung cancer patients: a meta-analysis. *World J Surg Oncol* **14**:237.
560. **Yan, C., H. Wang, Y. Toh, and D. D. Boyd.** 2003. Repression of 92-kDa type IV collagenase expression by MTA1 is mediated through direct interactions with the promoter via a mechanism, which is both dependent on and independent of histone deacetylation. *J Biol Chem* **278**:2309-16.
561. **Yogi, K., E. Sridhar, N. Goel, R. Jalali, A. Goel, A. Moiyadi, R. Thorat, P. Panwalkar, A. Khire, A. Dasgupta, P. Shetty, and N. V. Shirsat.** 2015. MiR-148a, a microRNA upregulated in the WNT subgroup tumors, inhibits invasion and tumorigenic potential of medulloblastoma cells by targeting Neuropilin 1. *Oncoscience* **2**:334-48.
562. **Yonemichi, H., T. Ohgi, Y. Fujimoto, K. Okada, M. Onuma, and T. Mikami.** 1978. Intranasal tumor of the ethmoid olfactory mucosa in sheep. *Am J Vet Res* **39**:1599-606.
563. **York, D. F., R. Vigne, D. W. Verwoerd, and G. Querat.** 1991. Isolation, identification, and partial cDNA cloning of genomic RNA of jaagsiekte retrovirus, the etiological agent of sheep pulmonary adenomatosis. *J Virol* **65**:5061-7.
564. **Yoshimatsu, Y., H. Miyazaki, and T. Watabe.** 2016. Roles of signaling and transcriptional networks in pathological lymphangiogenesis. *Adv Drug Deliv Rev* **99**:161-71.
565. **Yousem, S. A., S. D. Finkelstein, P. A. Swalsky, A. Bakker, and N. P. Otori.** 2001. Absence of jaagsiekte sheep retrovirus DNA and RNA in bronchioloalveolar and conventional human pulmonary adenocarcinoma by PCR and RT-PCR analysis. *Hum Pathol* **32**:1039-42.
566. **Yuan, H. T., E. V. Khankin, S. A. Karumanchi, and S. M. Parikh.** 2009. Angiopoietin 2 is a partial agonist/antagonist of Tie2 signaling in the endothelium. *Mol Cell Biol* **29**:2011-22.
567. **Yuan, L., D. Moyon, L. Pardanaud, C. Breant, M. J. Karkkainen, K. Alitalo, and A. Eichmann.** 2002. Abnormal lymphatic vessel development in neuropilin 2 mutant mice. *Development* **129**:4797-806.
568. **Zacharek, S. J., C. M. Fillmore, A. N. Lau, D. W. Gludish, A. Chou, J. W. Ho, R. Zamponi, R. Gazit, C. Bock, N. Jager, Z. D. Smith, T. M. Kim, A. H. Saunders, J. Wong, J. H. Lee, R. R. Roach, D. J. Rossi, A. Meissner, A. A. Gimelbrant, P. J. Park, and C. F. Kim.** 2011. Lung stem cell self-renewal relies on BMI1-dependent control of expression at imprinted loci. *Cell Stem Cell* **9**:272-81.
569. **Zeni, E., L. Mazzetti, D. Miotto, N. Lo Cascio, P. Maestrelli, P. Querzoli, M. Pedriali, E. De Rosa, L. M. Fabbri, C. E. Mapp, and P. Boschetto.** 2007. Macrophage expression of interleukin-10 is a prognostic factor in nonsmall cell lung cancer. *Eur Respir J* **30**:627-32.
570. **Zhang, L., J. Chen, Y. Ke, R. E. Mansel, and W. G. Jiang.** 2005. Expression of Placenta growth factor (PlGF) in non-small cell lung cancer (NSCLC) and the clinical and prognostic significance. *World J Surg Oncol* **3**:68.
571. **Zhang, X. H., Q. Wang, W. Gerald, C. A. Hudis, L. Norton, M. Smid, J. A. Foekens, and J. Massague.** 2009. Latent bone metastasis in breast cancer tied to Src-dependent survival signals. *Cancer Cell* **16**:67-78.
572. **Zhang, Y., P. Yang, and X. F. Wang.** 2016. Microenvironmental regulation of cancer metastasis by miRNAs. *Trends Cell Biol* **24**:153-60.
573. **Zhao, J., K. Rycaj, S. Geng, M. Li, J. B. Plummer, B. Yin, H. Liu, X. Xu, Y. Zhang, Y. Yan, S. A. Glynn, T. H. Dorsey, S. Ambs, G. L. Johanning, L. Gu, and F. Wang-Johanning.** 2011. Expression of Human Endogenous Retrovirus Type K Envelope Protein is a Novel Candidate Prognostic Marker for Human Breast Cancer. *Genes Cancer* **2**:914-22.
574. **Zhao, M., E. W. Howard, A. B. Parris, Z. Guo, Q. Zhao, and X. Yang.** 2016. Alcohol promotes migration and invasion of triple-negative breast cancer cells through activation of p38 MAPK and JNK. *Mol Carcinog*.
575. **Zhao, X., and J. L. Guan.** 2011. Focal adhesion kinase and its signaling pathways in cell migration and angiogenesis. *Adv Drug Deliv Rev* **63**:610-5.
576. **Zheng, H., H. Saito, S. Masuda, X. Yang, and Y. Takano.** 2007. Phosphorylated GSK3beta-ser9 and EGFR are good prognostic factors for lung carcinomas. *Anticancer Res* **27**:3561-9.
577. **Zhou, C., Y. L. Wu, G. Chen, X. Liu, Y. Zhu, S. Lu, J. Feng, J. He, B. Han, J. Wang, G. Jiang, C. Hu, H. Zhang, G. Cheng, X. Song, Y. Lu, H. Pan, W. Zheng, and A. Y. Yin.** 2015. BEYOND: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Multicenter, Phase III Study of First-Line

- Carboplatin/Paclitaxel Plus Bevacizumab or Placebo in Chinese Patients With Advanced or Recurrent Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol* **33**:2197-204.
578. **Zhou, S., Y. Yang, H. Tao, D. Li, J. Zhang, G. Jiang, and J. Fang.** 2013. Combination therapy of VEGF-trap and gemcitabine results in improved anti-tumor efficacy in a mouse lung cancer model. *PLoS One* **8**:e68589.