



Le sVEGFR1 : quel rôle dans la réponse aux thérapies antiangiogéniques dans les carcinomes pulmonaires squameux ?

Chérine Abou Faycal

► To cite this version:

Chérine Abou Faycal. Le sVEGFR1 : quel rôle dans la réponse aux thérapies antiangiogéniques dans les carcinomes pulmonaires squameux ?. Médecine humaine et pathologie. Université Grenoble Alpes, 2016. Français. NNT : 2016GREAV022 . tel-01787987v1

HAL Id: tel-01787987

<https://theses.hal.science/tel-01787987v1>

Submitted on 8 May 2018 (v1), last revised 14 May 2018 (v2)

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.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE LA COMMUNAUTÉ UNIVERSITÉ
GRENOBLE ALPES**

Spécialité : **Biologie cellulaire et oncogénèse**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Chérine ABOU FAYCAL

Thèse dirigée par **Dr. Béatrice EYMIN**

préparée au sein de l'**Institute for Advanced Biosciences (IAB)**
INSERM U1209–CNRS UMR 5309–Université Grenoble Alpes

dans l'**École Doctorale Chimie et Sciences pour le Vivant**

Le sVEGFR1 : quel rôle dans la réponse aux thérapies anti- angiogéniques dans les carcinomes pulmonaires squameux?

Thèse soutenue publiquement le **16 Décembre 2016** ,
devant le jury composé de :

Dr. Gilles PAGES

Nice, Rapporteur

Dr. Julie GAVARD

Nantes, Rapporteur

Dr. Laurent CORCOS

Brest, examinateur

Dr. Nadia CHERRADI

Grenoble, examinateur

Dr. Jean-Luc COLL

Grenoble, Président

Dr. Béatrice EYMIN

Grenoble, directrice de thèse



Remerciements

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier la Ligue contre le Cancer qui a financé mes quatre années de thèse.

Je tiens à remercier vivement ma directrice de thèse, Dr. Béatrice Eymin, qui m'a donné la chance de mener ce projet de thèse dans son laboratoire du début jusqu'à la fin. Avec Béatrice, j'ai appris que « dans la vie il faut positiver et dans la recherche il faut plus que positiver ». Je vous remercie pour votre présence, votre disponibilité et votre réel engagement dans ce projet de recherche. Je ne peux qu'être reconnaissante pour tous les efforts que vous avez faits et pour tout le temps que vous avez consacré pour construire en moi le jeune scientifique que je suis aujourd'hui. C'était un vrai plaisir pour moi de travailler avec vous. Pendant ces quatre ans j'ai pu apprécier aussi vos réelles qualités humaines qui m'ont beaucoup aidées pour avancer de façon très enthousiaste tout le long de cette aventure.

Je souhaite remercier les membres de mon jury de thèse, Dr. Gilles Pagès et Dr. Julie Gavard qui ont accepté d'évaluer mes travaux en tant que rapporteurs. Leur lecture attentive du manuscrit ainsi que leurs corrections m'ont beaucoup aidées à avoir une vision plus globale sur mon sujet de thèse. Je remercie également Dr. Nadia Cherradi et Dr. Laurent Corcos qui ont accepté de faire partie de mon jury de thèse en tant qu'examinateurs. Veuillez trouver ici ma profonde gratitude.

Je tiens à remercier particulièrement Dr. Jean-Luc Coll qui a d'abord accepté de faire partie de mon comité de suivi de thèse et qui a ensuite accepté, avec un grand plaisir, de présider mon jury de thèse. Je te remercie pour ta curiosité scientifique, tes conseils toujours précieux et tes remarques très pertinentes qui m'ont aidé à progresser dans mon raisonnement scientifique.

Je voudrais également remercier Dr. Sylvie Gazzeri pour ses questions toujours intéressantes dans les réunions d'équipe. Grâce aux remarques indispensables de Sylvie, j'ai pu acquérir toutes les compétences nécessaires pour effectuer une communication orale simple, claire et réussie.

Je remercie également Dr. Sabine Bailly de m'avoir accompagné, avec le Dr. Jean-Luc Coll, pendant ces quatre années en participant à mon comité de suivi de thèse. Ton regard critique sur les résultats et ton soutien m'ont permis de progresser tout le long de ce travail.

Je tiens à remercier Dr. Pedro Miguel Lacal qui, dans le cadre d'une collaboration avec son équipe, nous a fourni des outils de travail qui ont été très utiles pour l'avancement de mon projet de thèse.

Je remercie également Dr. Jackeline Agorreta, Dr. Luis Montuenga et Dr. Ruben Pio avec qui nous avons collaboré aussi pour faire les études in vivo. Votre participation a apporté sans doute une valeur ajoutée à mes travaux de thèse. Je remercie également Anthony Lucas et Jacques Mazzega qui m'ont beaucoup aidés dans l'analyse des marquages IHC in vivo.

Je voudrais remercier Delphine, une ancienne doctorante, pour ses petites astuces toujours utiles et tous ses conseils pendant mes deux premières années de thèse. Même après ton départ je me réfère à toi pour certains protocoles de transfection. J'ai beaucoup apprécié tous les bons moments qu'on a partagés ensemble et toutes les discussions qu'on a eu sur des sujets divers et variés aussi bien au labo qu'en dehors du labo.

Je remercie également Asma, une ancienne doctorante aussi, qui m'a soutenue surtout lors du démarrage de ma thèse. Je me rappelle toujours de tes histoires rigolottes. Ta bonne humeur et ton fou rire me manquent beaucoup.

Je remercie énormément Anne-sophie et Marie Leverve qui, en plus d'être de très bonnes collègues de travail, étaient mes premières amies dans le monde professionnel. Je vous remercie pour votre soutien pendant les moments difficiles et pour tous les bons moments inoubliables et les week-ends qu'on a partagés ensemble. C'est un plaisir pour moi de connaître des gens aussi ouverts d'esprits, aimables et sincères comme vous. Je souhaite maintenir cette amitié qui me tient beaucoup à cœur.

Je tiens à remercier aussi Tao mon « chen-ami » pour toutes les discussions et le partage d'expérience que nous avons vécus pendant la thèse. Merci pour tous les encouragements et le soutien que tu m'as donné pendant ces quatre ans. Ta connaissance m'a beaucoup enrichie et cela m'a vraiment fait plaisir.

Je remercie aussi mes compatriotes libanaises Hiba et Manal. Hiba, je te remercie d'être toujours à l'écoute depuis le début de ma thèse même quand mes histoires étaient interminables. Merci pour ton soutien et pour la relation très spéciale que j'ai pu avoir avec toi. Je ne pourrais jamais penser à ma thèse sans me souvenir de toi. Manal, nous n'avons pas partagé le même bureau ni le même sujet de recherche mais nous avons la même chef ce qui n'est pas négligeable. Ce fut un plaisir de te rencontrer et de discuter avec toi de beaucoup de choses.

Je remercie les techniciens de l'équipe : Céline Lampréia-Barrial, Pascal Perron, Floriane Albert, Virginie Rouyre et Sophie Michallet qui ont mis beaucoup d'efforts pour mettre au point des protocoles expérimentaux que nous avons utilisés pour réussir les manips. D'autre part, je ne peux qu'apprécier leur bonnes pratiques et leur bonne organisation de laboratoire qui nous ont facilité le travail et nous ont fait gagner du temps au quotidien.

Je remercie les autres membres de l'équipe EYMIN : Marie Guérard, Ulrique, Anais, Thomas, Yutin, Kutub, Alvie, Mohamed, sophie qui ont participé à mettre une très belle ambiance qui m'a fait plaisir au quotidien dans le laboratoire.

Je remercie également tous les membres de l'équipe de Jean-Luc Coll et de Stéfan Dimitrov et tous les membres de l'IAB avec qui j'ai pu discuter dans les bureaux, dans la cafette et dans les couloirs. Ceci a beaucoup facilité mon intégration au sein de l'institut et a rendu le lieu de travail un deuxième « chez moi » très agréable.

Je remercie particulièrement mes amis qui étaient une deuxième famille pour moi à Grenoble: Christelle, Elias, Mohamad, Jimmy, Zyad, Charbel, Joseph, Raja, François, Jean et Manuella, Layale, Antonio, Fares, Elie, Rose-mary, Nahia, Maria, Elionore et Joe. Sans le savoir, vous avez contribué fortement à mon bien-être pendant ces quatre ans. Je vous remercie pour tous les voyages et les moments inoubliables qu'on a partagé ensemble. Ces souvenirs resteront gravés dans ma mémoire.

Enfin, je remercie mes parents Béchara et Raghida, mon frère Ryad et surtout ma sœur Jeanine qui, malgré la distance étaient présents avec moi au quotidien et dans les moindres détails. Je vous remercie pour votre soutien continu et votre amour inconditionnel et infini. Si je suis là aujourd'hui, c'est bien grâce à vous. J'espère rester fidèle aux valeurs que vous m'avez enseignées.

Sommaire

Sommaire

REMERCIEMENTS	
SOMMAIRE	
PUBLICATIONS ET FORMATIONS	
RESUME	
ABSTRACT	
LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX	
LISTE DES ABREVIATIONS	
INTRODUCTION	2
PARTIE 1. LES CANCERS DU POUMON	2
1. Données épidémiologiques	2
2. Facteurs étiologiques	4
3. Classification histologique et pathologique des cancers pulmonaires	5
3.1 Classification selon l’OMS	5
3.2 Classification pTNM selon l’UICC	7
4. La carcinogenèse bronchique : un processus multi-étapes	10
4.1 Mécanisme du développement tumoral	10
4.2 Les anomalies moléculaires des CBnPCs	12
4.3 Altérations des récepteurs membranaires	14
4.4 Altérations des voies de signalisation	16
4.5 Altérations des facteurs de transcription	17

5. Prise en charge thérapeutique des CBnPCs	17
5.1 La chirurgie	17
5.2 La radiothérapie.....	18
5.3 La chimiothérapie.....	19
5.4 Les thérapies ciblées.....	19
5.5 Les autres thérapies ciblées	21
 PARTIE 2. L'ANGIOGENESE.....	25
1. Angiogenèse physiologique et pathologique	25
1.1. Les facteurs pro-angiogéniques.....	27
1.2. Les facteurs anti-angiogéniques	28
1.3. Le « switch » angiogénique.....	28
1.4. Caractéristiques des vaisseaux tumoraux	29
2. Les acteurs de l'angiogenèse : un jeu connecté entre ligands, récepteurs et co-récepteurs.....	31
2.1 La famille des ligands VEGF	31
2.1.1. Le VEGF-A	32
2.1.2. Les fonctions biologiques du VEGF-A	33
2.1.3. Régulation du VEGF-A.....	34
2.2 Les récepteurs du VEGF	40
2.3 Les co-récepteurs NRP-1 et NRP-2	43
2.4 Les intégrines: structure et fonction de nouveaux partenaires d'interface.....	45
3. Signalisations dépendantes des récepteurs VEGFR : cellules endothéliales, des cibles majeures	47
3.1 Signalisation dépendante du récepteur VEGFR-1	47
3.2 Signalisation dépendante du VEGFR-2	49

3.3	Signalisation dépendante des neuropilines.....	51
3.4	Signalisation dépendante des intégrines.....	52
4.	Signalisation autocrine et intracrine des VEGFRs : une expression tumorale de ces récepteurs et de leurs co-récepteurs	54
4.1	Signalisations intracrine et autocrine du VEGFR-1	55
4.2	Signalisations intracrine et autocrine du VEGFR-2	57
4.3	Signalisation autocrine dépendante des neuropilines et des intégrines.....	58

PARTIE 3. LES VARIANTS SOLUBLES DU VEGFR-1: UN ROLE COMPLEXE DANS L'ANGIOGENESE ET AU COURS DU DEVELOPPEMENT TUMORAL..... 59

1.	Variants solubles du VEGFR-1: entre épissage et clivage protéolytique	59
1.1	Isoformes épissées de type sVEGFR-1 : sVEGFR-1-i13 le chef de file.....	59
1.2	sVEGFR-1 : une forme clivée du VEGFR-1	63
2.	Régulation de l'expression des variants solubles sVEGFR-1.....	65
2.1	Régulation par les ligands : VEGF-A et PIGF	65
2.2	Régulation par d'autres facteurs de croissance	66
2.3	Régulation par l'hypoxie.....	66
2.4	Regulation par la protéine Jumonji Domain containing-protein 6 (JMJD6)	67
2.5	Régulation par la voie de signalisation NOTCH1	68
3.	Mécanismes moléculaires d'action des sVEGFR-1.....	68
3.1	Séquestration du VEGF-A	69
3.2	Hétérodimérisation avec les récepteurs VEGFR.....	70
3.3	sVEGFR-1-i13: un ligand de l'intégrine β 1	70
4.	Fonctions biologiques des sVEGFR-1	71
4.1	Statut différentiel des sVEGFR-1 dans les tissus.....	71

4.2 Fonctions vasculaires des sVEGFR-1	72
4.3 Autres fonctions du sVEGFR-1	74
4.4 Fonctions pathologiques du sVEGFR-1	75

PARTIE 4. LES THERAPIES ANTI-ANGIOGENIQUES DANS LE TRAITEMENT DU CANCER

1. Généralités sur les thérapies anti-angiogéniques	80
2. Les thérapies anti-VEGF-A	82
2.1 Les anticorps monoclonaux anti-VEGF-A.....	82
2.2 L’Aflibercept: un VEGF-trap ou “Decoy receptor”	84
3. Les thérapies anti-VEGFR.....	85
3.1 Les inhibiteurs du domaine tyrosine kinase des récepteurs du VEGF-A.....	88
3.2 Autres inhibiteurs pharmacologiques.....	90
3.3 Les anticorps monoclonaux anti-VEGFR	90
4. Les thérapies ciblant les co-récepteurs	91
4.1 Ciblage thérapeutique des neuropilines.....	91
4.2 Ciblage thérapeutique de la $\beta 1$ intégrine.....	92
4.3 Autres thérapies anti-angiogéniques	93
5. Les limitations des thérapies anti-angiogéniques	94
5.1 Résistance aux thérapies anti-angiogéniques	94
5.2 Absence de biomarqueurs prédictifs de réponse	99
5.3 Les biomarqueurs circulants.....	99
5.4 Les biomarqueurs intra-tumoraux et dans le microenvironnement tumoral	102
6. Vers une combinaison de biomarqueurs pour prédire la réponse aux thérapies anti-angiogéniques.....	103

OBJECTIFS DES TRAVAUX DE THESE	106
RESULTATS	110
I- Présentation de l'étude.....	110
II- Résultats	111
III-Conclusion	114
IV- Article	115
RESULTATS COMPLEMENTAIRES.....	174
1. Effets complémentaires des traitements.....	174
1.1 Effet de la combinaison bevacizumab+cisplatine sur l'expression du sVEGFR-1-i13	174
1.2 Effet du bevacizumab sur l'expression du sVEGFR-2	175
1.3 Effet du bevacizumab sur la « vasculogenomimicry »	176
2. Mécanismes moléculaires de régulation du sVEGFR-1-i13.....	178
2.1 Les protéines SR : des acteurs potentiels dans la régulation du sVEGFR-1-i13 ?.....	178
2.2 La régulation du sVEGFR-1-i13 par le VEGF ₁₆₅ est médiée par le facteur de transcription SOX2 dans les SCCs	180
2.3 Régulation du sVEGFR-1 par clivage protéolytique	182
2.4 NOTCH1 et JMJD6 ne régulent pas l'expression du sVEGFR-1-i13 dans les cellules de carcinomes pulmonaires squameux	183
3. Effets du sVEGFR-1 sur le trafic intra-cellulaire de la neuropiline-1	186
4. Statut de l'ARNm sVEGFR-1-i13 chez les patients CBnPCs	188

DISCUSSION ET PERSPECTIVES	191
1. sVEGFR-1 : différentes localisations pour différentes fonctions ?	191
1.1 Le sVEGFR-1-i13 nucléaire: un variant pas si soluble que cela.....	191
1.2 sVEGFR-1-i13 : un composant de la matrice extra-cellulaire qui signale via son interaction avec les intégrines.....	193
1.3 sVEGFR-1 : un composant du micro-environnement tumoral via son interaction avec les syndécans	194
2. Régulation de l'expression du sVEGFR-1-i13	195
3. Rôle du sVEGFR-1 en clinique	197
3.1 Le sVEGFR-1 : une thérapie en lui-même ou une cible thérapeutique à inhiber ?	198
3.1.1 Le sVEGFR-1 : une thérapie en lui-même	198
3.1.2 Le sVEGFR-1-i13 : une cible thérapeutique à inhiber ?	200
3.1.3 Le sVEGFR-1-i13 : cible thérapeutique, thérapie ou biomarqueur de réponse aux thérapies anti-angiogéniques dans les SCC ?	200
3.2 sVEGFR-1-i13 : une des composantes possible à la réponse différentielle aux thérapies anti-angiogéniques entre ADC et SCC ?	205
3.2.1 L'augmentation du sVEGFR-1-i13 : une des causes des effets indésirables chez les patients SCC ?	205
3.2.2 Régulation différentielle du sVEGFR-1-i13 entre SCC et ADC.....	206
3.2.3 Variants d'épissage du VEGFR-1 et du VEGF-A : des rôles différents dans la réponse aux thérapies anti-angiogéniques entre SCC et ADC.....	208
CONCLUSION.....	211
BIBLIOGRAPHIE	213
ANNEXES	253

Publications et formations

Revues

-C Abou Faycal, S Gazzeri, B Eymin. RNA splicing, cell signaling and response to therapies. **Curr Opinion in Oncol.** 2016 Jan; 28(1): 58-64.

-C Abou Faycal, A-S Hatat, S Gazzeri, B Eymin.

Splice variants of RTK family: their role in tumor progression and response to targeted therapy. **Internation Journal of Molecular Sciences.** En préparation.

Chapitre de livre

-B. Eymin, A. Boudria, **C. Abou-Faycal**. VEGF-A splice variants: do they play a role in tumor response to anti-angiogenic therapies? *Molecular Mechanisms of Angiogenesis: From ontogenesis to oncogenesis.* 2014. **Edition Springer.**

Articles originaux

-A Boudria, S Gout, M Keramidas, **C Abou Faycal**, S Dermendjieva, JL Coll, AC Toffart, D Moro-Sibilot, C Albiges-Rizo, E Faurobert, C Brambilla, E Brambilla, S Gazzeri, B Eymin. VEGF_{165b} promotes lung tumor progression and escape from anti angiogenic therapies through a β 1 integrin/VEGFR/neuropilin autocrine loop. **En préparation.**

-C Abou Faycal, E Brambilla, A Lucas, J Agorreta Arrazubi, P Lacal, R Pio, S Gazzeri, B.Eymin. sVEGFR-1: a dual factor in the response of squamous cell lung carcinoma to antiangiogenic therapies. **En préparation.**

Communications orales

-Journées de Recherche Respiratoire (J2R). Dijon, France, 2015

sVEGFR-1 a splice variant of VEGFR-1: it's role in the response to anti-angiogenic therapies squamous cell lung carcinomas.

-Journée de Recherche Médicale (JRM). Grenoble, France, 2016

sVEGFR-1 a splice variant of VEGFR-1: it's role in the response to anti-angiogenic therapies squamous cell lung carcinomas.

Communications affichées

-Abou Faycal C, Brambilla E, Agorreta J, Lucas A, Lacal PM, Montuenga LM, Pio R, Gazzeri S and Eymin B. sVEGFR-1, the VEGFR-1 splice variant: a dual function in the response of squamous cell lung carcinoma to anti-angiogenic therapies. **24th Bennial Congress of the European Association for Cancer Research (EACR), 9-12 July, Manchester.**

-Abou Faycal C, Brambilla E, Agorreta J, Lucas A, Lacal PM, Montuenga LM, Pio R, Gazzeri S and Eymin B. sVEGFR-1, the VEGFR-1 splice variant: a dual function in the response of squamous cell lung carcinoma to anti-angiogenic therapies. **Journée de Recherche Médicale (JRM), Grenoble, France, 2016.**

-ABOU FAYCAL Cherine, BRAMBILLA Elisabeth, GAZZERI Sylvie, EYMIN Beatrice. sVEGFR-1 splice variant: it's role in the response to anti-angiogenic therapies in squamous cell lung carcinoma. **Forum de Recherche en Cancérologie Rhône Alpes Auvergne (CLARA), 29-30 Mars 2016, Lyon, France.**

- C. Abou Faycal, E. Brambilla, S. Gazzeri and B. Eymin. Regulation and function of VEGFxxx and VEGFR-1 splice variants in response to antiangiogenic therapies in Squamous Cell Lung

Carcinoma. **5th annual meeting of Société Française d'Angiogenèse (SFA), 02-04 Avril 2014, Chamonix.**

-C. Abou Faycal, E. Brambilla, S. Gazzeri and B. Eymin. sVEGFR-1 and VEGF₁₆₅ splice variants: their role in the response to anti-angiogenic therapies in Squamous Cell Lung Carcinoma. **Journées de Recherche Respiratoire J2R, 10-11 Octobre 2014, Bordeaux.**

-C. Abou Faycal, A. Lucas, E. Brambilla, S. Gazzeri and B. Eymin. sVEGFR-1 a splice variant of VEGFR-1: it's role in the response to anti-angiogenic therapies in squamous cell lung carcinomas. **Les Oncorials, 7 Juillet 2015, Andrézieux ; Forum de Recherche en Cancérologie Rhône Alpes Auvergne (CLARA), 7-8 Avril 2015 Lyon ; Journée de Recherche Médicale (JRM), 5 Juin 2015, Grenoble.**

- **C. Abou Faycal**, E. Brambilla, A. Lucas, J. Agorreta Arrazubi, P. Lacal, S. Gazzeri and B. Eymin. sVEGFR-1 a splice variant of VEGFR-1: role in the response to anti-angiogenic therapies in squamous cell lung carcinomas. **CRCL symposium, 21-23 Septembre ;2015, Lyon 6ème congrès de la SFA ; 24-25 Septembre 2015, Paris.**

Formations suivies

Formation complémentaire de niveau doctoral

-Encadrement 5 jours pour un stage d'introduction à la recherche scientifique dans le cadre d'un échange avec Boston University, 40 heures

Formations scientifiques

-Formation à l'expérimentation animale pour les cadres biologistes- niveau 1, 81 heures.

-Initiation à la cytométrie en flux - 16h.

-Journée scientifique Ecole Doctorale –poster.

Formations transversales

-Stage TME: Travail et management d'équipe, 21 heures.

-Stage TRE : Les techniques de recherche d'emploi, 21 heures.

-Gestion de projets, 16 heures.

-Management stratégique et technologie, 18 heures.

-Organiser sa recherche d'information (Initiation à LATEX et ZOTERO).

Formations d'insertion professionnelle

-Label REI : Recherche et innovation

-Heures de vacances: TP MEP101, 32 heures, niveau L1

Résumé

Résumé

Le VEGF-A joue un rôle clé au cours de l'angiogenèse physiologique mais aussi de la néo-vascularisation tumorale essentielle à la croissance des tumeurs malignes. Le VEGF-A et ses récepteurs (VEGFR-1/2) représentent une cible de première importance pour le développement de thérapies anti-tumorales, et un certain nombre de médicaments anti-angiogéniques (AAG) inhibant le VEGF-A ou ses récepteurs sont actuellement utilisés en clinique dans le traitement des carcinomes pulmonaires. Parmi les thérapies anti-angiogéniques ciblant le VEGF-A, on peut lister : soit l'anticorps monoclonal anti-VEGF-A bevacizumab (Avastin[®]) ou bien les inhibiteurs pharmacologiques de l'activité tyrosine kinase des VEGFRs: les VEGFR-TKI. Seuls les patients porteurs d'adénocarcinomes pulmonaires peuvent bénéficier de thérapies AAG, les patients porteurs de carcinomes squameux (SCC) présentant de sévères complications (hémorragies pulmonaires). Le sVEGFR-1-i13 est un variant tronqué du VEGFR-1 qui ne contient que les premiers six motifs N-terminaux extracellulaires de type Ig du domaine extracellulaire et il est dépourvu des domaines transmembranaire et tyrosine kinase. Le sVEGFR-1 a été initialement considéré comme un facteur anti-angiogénique qui neutralise les fonctions du VEGF-A dans les cellules endothéliales. Les hauts niveaux ont été corrélés avec un mauvais pronostic et une mauvaise réponse aux thérapies dans plusieurs types de cancer. Nous avons montré in vitro dans 4 lignées cellulaires de SCC que le bevacizumab, ainsi que les inhibiteurs VEGF-TKI (Semaxanib, KI8751) augmentent les niveaux intra- et extra-cellulaires du sVEGFR-1-i13. Nous avons confirmé ces résultats in vivo dans des modèles murins de xénogreffes squameux induits par NCTU. De façon intéressante, l'augmentation du sVEGFR-1-i13 en réponse aux thérapies anti-angiogéniques est spécifique des modèles squameux et n'est pas observée dans les modèles d'adénocarcinome in vitro et in vivo. Sur le plan moléculaire, nous avons montré que le VEGF₁₆₅ par l'intermédiaire de SOX2 régule l'expression du sVEGFR-1-i13 en réponse aux thérapies AAG. De plus, nous avons identifié une boucle autocrine β 1 intégrine/VEGFR-1/VEGFR-2 par laquelle le sVEGFR-1-i13 contrôle différenciellement la prolifération cellulaire et la survie, permettant notamment de distinguer les cellules SCC sensibles ou résistantes aux thérapies AAG. Enfin, dans une série de 77 cancers bronchiques non à petites cellules, nous avons montré que 11% et 44% des patients SCC expriment de bas ou de hauts niveaux de sVEGFR-1-i13 respectivement. Les hauts niveaux ont été corrélés avec des stades pTNM avancés. Dans l'ensemble, nos résultats sont la première preuve que les thérapies AAG augmentent l'expression du sVEGFR-1-i13 dans les cellules SCC. En outre, nos données mettent en évidence une fonction pro-tumorale inattendue du sVEGFR-1-i13 grâce à l'activation d'une boucle autocrine VEGFR/intégrine β 1. Ces résultats identifient des mécanismes moléculaires sous-tendant la réponse différentielle aux thérapies AAG dans les sous-types ADC et SCC pulmonaires. Ils permettront aussi d'identifier les patients SCC qui pourraient être éligibles à ces thérapies.

Abstract

Abstract

Vascular endothelial growth factors (VEGFs) and their receptors are critical regulators of physiological and pathological angiogenesis. In patients with squamous cell lung carcinoma (SCC), clinical trials evaluating anti-angiogenic therapies (AAG) have failed to identify strong benefits. Rather, these patients are at higher risk of bleeding complications when exposed to bevacizumab (BVZ), a humanized monoclonal anti-VEGF-A antibody. The soluble VEGF receptor-1, namely sVEGFR-1-i13, is a truncated version of the cell membrane-spanning VEGFR-1 that only retains the first six N-terminal Ig-like extracellular motifs of VEGFR-1 owing to alternative splicing of its pre-mRNA. As a consequence, sVEGFR-1-i13 is mainly viewed as an anti-angiogenic factor that counteracts VEGF-A functions on endothelial cells. Moreover, high levels of sVEGFR-1 were correlated with bad prognosis and bad response to therapies in many cancer types. Using various SCC cell lines, we showed that bevacizumab as well as VEGFR-Tyrosine Kinase Inhibitors (Semaxanib, KI8751) increase the intra- and extra-cellular levels of sVEGFR-1-i13. We confirmed this up-regulation in NCTU-induced SCC murine tumorgrafts models treated with VEGFR-TKI (sunitinib) or anti-VEGFR-2 (DC101). Of note, this effect was never observed in the lung adenocarcinoma histological sub-type (ADC), using either cell lines or a mouse model treated in the same conditions. At the molecular level, we identified the VEGF₁₆₅ and SOX2 proteins as crucial upstream regulators of sVEGFR-1-i13 in response to AAG. Moreover, we unraveled an original autocrine signaling network regulated by sVEGFR-1-i13 involving β 1 integrin/VEGFR-1/VEGFR-2 that allows to discriminate between AAG-sensitive or -resistant SCC cells. Finally, in a series of 77 Non Small Cell Lung Carcinoma, we provided the first description of a differential pattern of sVEGFR-1-i13 expression with 11% and 44% of SCC exhibiting no or high expression respectively, high levels of sVEGFR-1-i13 being correlated with advanced pTNM stages. As a whole, our results provide the first evidence that AAG therapies upregulate sVEGFR-1-i13 expression in SCC cells. In addition, our data highlight an unexpected pro-tumoral function of sVEGFR-1-i13 through the activation of a β 1 integrin-dependent VEGFR autocrine loop. These results might help to understand why SCC are less responsive to AAG drugs than ADC and to identify SCC patients eligible to these therapies.

Liste des figures et des tableaux

Liste des figures et des tableaux

FIGURES

Figure 1. Nombre de nouveaux cas et de décès par cancer en fonction du sexe et du niveau de développement économique du pays	3
Figure 2. Localisations anatomopathologiques des carcinomes pulmonaires squameux et des adénocarcinomes.....	7
Figure 3. Les propriétés d'une cellule cancéreuse	12
Figure 4. Représentation schématique des principales étapes de l'angiogenèse (exemple de l'angiogenèse tumorale).....	27
Figure 5. Le « switch angiogénique » est nécessaire pour la croissance tumorale.....	29
Figure 6. Comparaison de l'aspect de vaisseaux sanguins normaux et tumoraux dans une xénogreffe de tumeur humaine chez la souris nude observés par microscopie électronique à balayage.	30
Figure 7. Les membres de la famille du VEGF (A-B-C-D et PlGF) et ses récepteurs VEGFR-1,2,3 et NRP-1,2)	32
Figure 8. Les fonctions physiologiques et pathologiques du VEGF au cours de l'embryogenèse et dans les tissus adultes.....	34
Figure 9. Structure du gène du VEGF-A humain et des différents isoformes de la famille du VEGF-A.....	37
Figure 10. Les différentes isoformes du VEGF-A et leur interaction avec la MEC et les VEGFRs.	38
Figure 11. Représentation schématique du mécanisme d'activation des VEGFRs.....	41
Figure 12. La famille neuropilines et leurs ligands.....	44
Figure 13. Les récepteurs intégrines et leurs ligands.	46

Figure 14. Représentation schématique des sites de phosphorylation et des voies de signalisation d'aval du récepteur VEGFR-1.	48
Figure 15. Représentation schématique des sites de phosphorylation (indiqués par des numéros) et des voies de signalisation d'aval du récepteur VEGFR-2.....	51
Figure 16. L'activation et la signalisation bidirectionnelle « inside-out » et « outside-in » des intégrines.....	53
Figure 17. Représentation schématique du VEGFR-1, sVEGFR-1 et des différentes isoformes intracellulaires du VEGFR-1.	56
Figure 18. Les différents variants d'épissage du sVEGFR-1	60
Figure 19. Structure protéique du VEGFR-1 et du sVEGFR-1-i13.....	61
Figure 20. Représentation schématique des différents isoformes protéiques du sVEGFR-1	62
Figure 21. Représentation schématique du mécanisme de sécrétion du sVEGFR-1-i13..	63
Figure 22. Mécanismes moléculaires du clivage protéolytique du VEGFR-1.	64
Figure 23. Mécanismes moléculaires médiant les fonctions des sVEGFR-1.....	69
Figure 24. Structures protéiques du VEGFR-1 et du sVEGFR-1.....	70
Figure 25. Expression de l'ARNm VEGFR-1 et des différents transcrits sVEGFR-1 dans différents organes.....	72
Figure 26. Différents types de thérapies anti-angiogéniques.....	81
Figure 27. Structure schématique de l'Aflibercept.	85
Figure 28. Les deux modes de résistance aux traitements anti-angiogéniques.....	95
Figure 29. Les différents mécanismes de résistance acquise aux traitements anti-angiogéniques.	96
Figure 30. Modèles prédictifs de réponse ou de résistance au BevacizumabBevacizumab..	104
Figure 31. Le cisplatine combiné ou non au bevacizumabbevacizumab diminue l'expression du sVEGFR-1-i13..	175

Figure 32. Le bevacizumabbevacizumab ne modifie pas l'expression du sVEGFR-2.....	176
Figure 33. Test de mimétisme vasculogénique.....	177
Figure 34. Les protéines SR régulent l'expression intra- et extra-cellulaire du sVEGFR-1-i13 dans les cellules MGH7 et H2170.	179
Figure 35. SOX2 régule l'expression intracellulaire du sVEGFR-1-i13 dans les cellules MGH7 et H2170.....	181
Figure 36. Biogenèse du sVEGFR-1 par clivage protéolytique dans la lignée MGH7.	182
Figure 37. NOTCH ne régule pas l'expression du sVEGFR-1-i13 dans nos modèles d'étude. .	184
Figure 38. JMJD6 ne régule pas l'expression du sVEGFR-1-i13 dans nos modèles d'étude. ...	185
Figure 39. Le sVEGFR-1 induit l'internalisation de la neuropiline-1 dans les cellules MGH7.	187
Figure 40. Le ratio sVEGFR-1-i13:VEGFR-1 est élevé chez les patients porteurs de carcinomes pulmonaires squameux de stades avancés..	189
Figure 41. Représentation schématique du mécanisme d'action moléculaire du sVEGFR-1-i13 dans les carcinomes SCC.....	194
Figure 42. Représentation schématique du rôle de l'interaction sVEGFR-1/syndecan dans les podocytes.	195
Figure 43. Mécanismes moléculaires de la régulation traductionnelle par SRSF1 (SF2/ASF)..	197
Figure 44. Représentation schématique de la différence entre VEGF-Trap et VEGF-Grab.	199
Figure 45. Mécanismes moléculaires de résistance aux thérapies AAG dans les carcinomes pulmonaires SCCs.....	202
Figure 46. Mécanismes moléculaires de réponse aux thérapies AAG dans les carcinomes pulmonaires SCCs. Les thérapies AAG augmentent l'expression du VEGF165 qui induit la production du sVEGFR-1-i13.....	203
Figure 47. Mécanismes différentiels de régulation du sVEGFR-1 dans les adénocarcinomes (ADC) et les carcinomes pulmonaires squameux (SCC).....	207

Figure 48. Mécanisme différentiel de régulation du sVEGFR-1-i13 entre les ADC et les SCC pulmonaires.....	208
---	-----

TABLEAUX

Tableau 1: Huitième classification pTNM des cancers broncho-pulmonaires selon l'UICC (2015).	9
Tableau 2: Correlation entre la classification pTNM et les stades anatomiques (proposition.....)	10
Tableau 3: Fréquence des anomalies génétiques dans les CBnPC.	13
Tableau 4 : Comparaison de l'aspect morphologique de vaisseaux sanguins normaux et tumoraux.	30
Tableau 5 : Expression tumorale des différents récepteurs VEGFR-1, VEGFR-2, NRP-1 et NRP-2 dans les cancers.....	55
Tableau 6 : Surexpression du sVEGFR-1 au niveau protéique dans différents types de cancers.	77
Tableau 7 : Les thérapies anti-angiogéniques approuvés par la FDA et/ou la MEA dans différents cancers.....	87
Tableau 8 : Niveaux d'expression des biomarqueurs potentiels de réponse ou de résistance aux thérapies AAG dans les carcinomes pulmonaires SCCs.....	201
Tableau 9 : Les niveaux d'expression des variants du VEGF-A : VEGF ₁₆₅ et VEGF _{165b} et du sVEGFR-1-i13 en réponse aux thérapies AAG dans les deux sous-types histologiques ADC et SCC.....	209

Liste des abréviations

Liste des abréviations

5-FU	5-Fluorouracile
ADC	Adénocarcinomes
ALK	Anaplastic Lymphoma Kinase
AND	Acide DésoxyriboNucléique
ARE	AU-Rich Element
ARF	ADP-Ribosylation Factor
ATS	American Thoracic Society
AVAiL	Avastin in Lung trial
BFA	Bréfeldine A
BMDC	Bone Marrow Derived Cells
BVZ	Bevacizumab
CBnPC	Cancers Broncho-Pulmonaires Non à Petites Cellules
CBPC	Cancers Broncho-Pulmonaires à Petites Cellules
CDC42	Cell Division Cycle 42
CGC	Carcinomes à grande cellule
CIRC	Centre International pour la Recherche sur le Cancer
CRC	Cancer Colorectal
CSF-1R	Colony Stimulating Factor-1 Receptor
DDR2	Discoidin Domain Receptor 2

DLL	Delta-Like
DSS	Distal Splice Site
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EGFRvIII	EGFR Variant III
EHS	Engelbreth-Holm-Swarm
EMA	European Medicines Agency
EML4	Echinoderm Microtubule-associated protein-Like 4
EMT	Transition Epithélio-Mésenchymateuse
ERS	European Respiratory Society
FAE	Fatal Adverse Event
FAK	Focal Adhesion Kinase
FDA	Food and Drug Administration
FGF	Fibroblast Growth Factor
FGF	Fibroblast Growth Factor
FGFR1	Fibroblast Growth Factor Receptor 1
FGFR1	Fibroblast Growth Factor Receptor 1
FLT-1	Fms-Like Tyrosine kinase 1
FLT-3	Fms-Like Tyrosine kinase 3
FLT-4	Fms-Like Tyrosine kinase-4

Grays	Gy
GTPases	G uanosine T riphosph a te hydrol a ses
HAP	H ydrocarbures A romatiques P olycycliques
HGF/SF	H epatic G rowth F actor- S catter F actor
HRE	H ypoxia R esponse E lement
HSP27	H eat S hock p rotein 27
HTA	H ypertension A rtérielle
IASLC	I nternational A ssociation for the S tudy of L ung C ancer
Ig	I mmunoglobulines
IL-8	I nterleukine- 8
IRES	I ntra R ibosomal E ntry S ite
KDR	K inase-insert D omain-containing R eceptor
KRAS	K irsten R at S arcoma
KRT6A	K ératine 6A
I'UICC	U nion for I nternational C ancer C ontrol
I'uPA	U rokinase-type P lasminogen A ctivator
LAD	L eucocyte A dhesion D eficiency
L-VEGF	L ongs V EGFs
MCSFR	M acrophage C olony S timulating F actor R eceptor
MEC	M atrice E xtracellulaire .
MMP	M atrix M etallo p roteases

OMS	O rganisation M ondiale de la S anté
PAIP2	P oly(A)-Binding I nteracting P rotein 2
PDGF	P latelet D erived G rowth F actor
PDGFR α	P latelet- D erived G rowth F actor R eceptor, A lpha
PI3K	P hosphatidylinositol- 3 - k inase
PKC	P rotéine k inase C
PIGF	P lacental G rowth F actor
PSS	Site d'épissage proximal
PTEN	P hosphatase et T ENsin homolog
pTNM	p athologic T umor, N ode, M etastasis
RE	R éticulum endoplasmique
ROS	E spèces R eactive O xygénées
SCC	S quamous C ell lung C arcinoma
Sck	S HC (S rchomology and C ollagenHomology)-related adaptor protein
SH2	S rc H omology domain 2
Shb	S H2-domain-containing adaptator protein B
SOX2	S RY (<u>s</u> ex determining <u>r</u> egion <u>Y</u>)- box2
SR	S er/ A rg- R ich
SRSF	S plicing F actor, arginine/ S erine- R ich
TAF	T umor A ssociated F ibroblasts
TAM	T umor A ssociated M acrophages

TGF	T ransforming G rowth F actor
TIMP	T issue I nhibitors of M atrix Metallo p roteases
TNF	T umour N ecrosis F actor
TNFSF15	T umor N ecrosis F actor S uperfamily 15
TSAd	T -Cell-Specific A daptator
TTP	T ristetraproline
uPA	U rokinase P lasminogen A ctivator
uPAR	U rokinase P lasminogen A ctivator R eceptor
VEGF-A	V ascular E ndothelial G rowth F actor A
VEGFRs	V ascular E ndothelial G rowth F actor R eceptors
VHL	V on H ippel-Lindau
VPF	V ascular P ermeability F actor

Introduction

Introduction

PARTIE 1. LES CANCERS DU POUMON

Dans ce chapitre dédié aux cancers du poumon, je décrirai les données épidémiologiques et les facteurs étiologiques dans les cancers du poumon. Je détaillerai ensuite les différentes classifications, les anomalies moléculaires et la prise en charge thérapeutique de ces cancers.

1. Données épidémiologiques

A l'échelle mondiale, le cancer du poumon est la première cause de mortalité par cancer chez les hommes et les femmes (Figure 1). En 2016, 1,58 millions de décès ont été estimés comme liés au cancer du poumon, ce qui représente $\frac{1}{4}$ des décès par cancer dans le monde (Cancer Facts & Figures, 2016). En 2012, selon l'étude GLOBOCAN, 1,8 millions de nouveaux cas de cancers de poumon ont été diagnostiqués, soit 13% de tous les cas de cancers. D'après cette même étude, le cancer du poumon est le cancer le plus fréquemment diagnostiqué (1,241,600 cas soit 16,71% de tous les cancers) et la première cause de mortalité par cancer chez les hommes (1,098,700 cas soit 23,61% de tous les cancers). Le cancer du poumon est aussi la première cause de mortalité par cancer chez les femmes dans les pays développés (209,900 cas soit 16,3% de tous les cancers) et en troisième position pour les cancers les plus fréquemment diagnostiqués chez les femmes à l'échelle mondiale (Torre et al. 2015)

Le nombre de cas de cancers du poumon diagnostiqués dans le monde entier a augmenté de 51 % (44% chez les hommes et 76 % chez les femmes) depuis 1985 (Cruz, Tanoue, et Matthay 2011). Toutes ces données sont la preuve que les cancers du poumon représentent un problème de santé publique majeur à l'échelle mondiale. En dépit des efforts diagnostiques et thérapeutiques, le taux global de survie à 5 ans est seulement de 15% (Brambilla et Gazdar 2009).

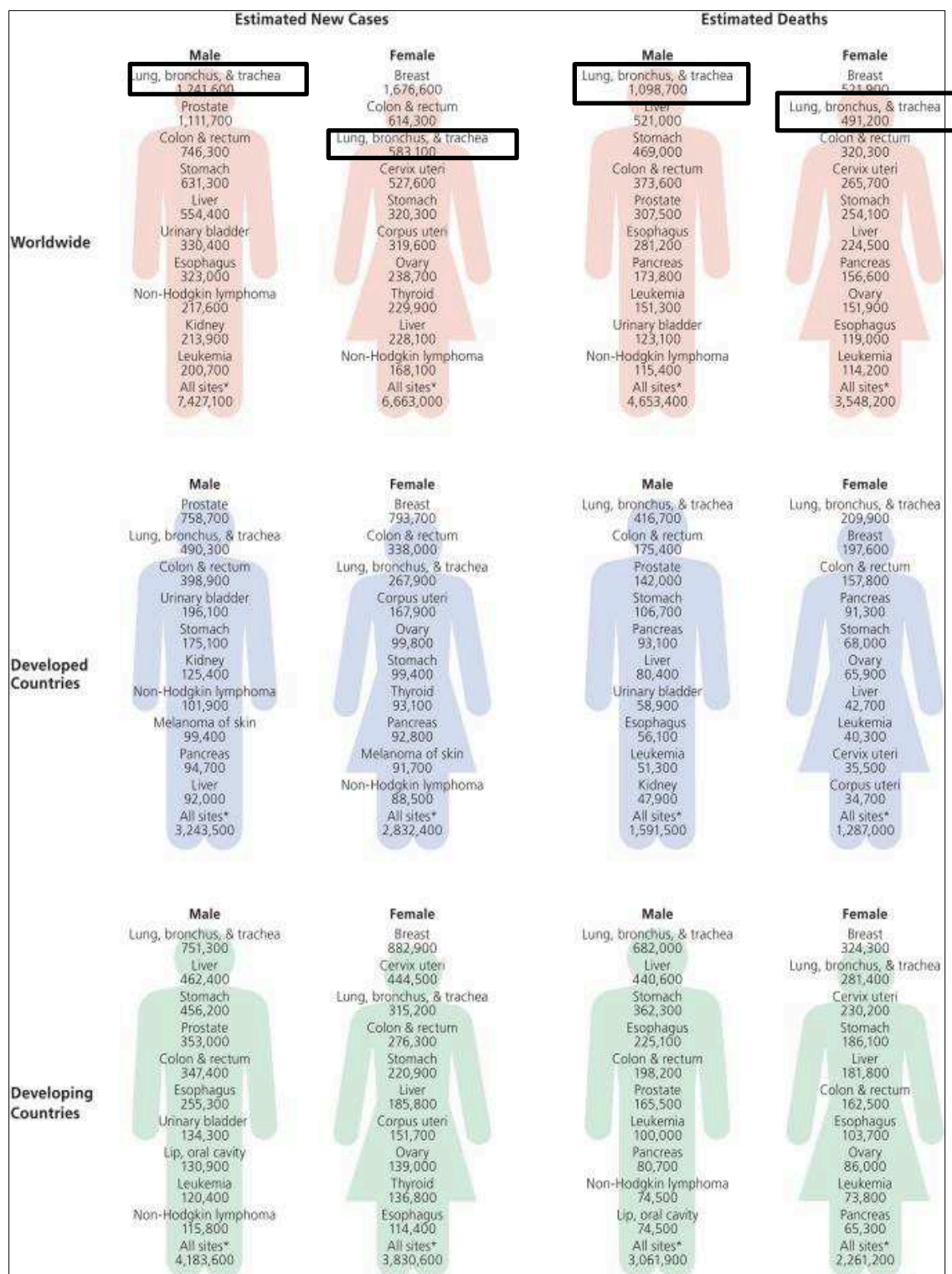


Figure 1. Nombre de nouveaux cas et de décès par cancer en fonction du sexe et du niveau de développement économique du pays (Torre et al. 2015).

2. Facteurs étiologiques

Une relation de cause à effet entre la consommation de tabac et les cancers du poumon a été établie dans de nombreuses études, à la fois écologiques et cliniques (Didkowska et al. 2016). En 1950, des études épidémiologiques ont identifié le tabagisme comme un facteur causal dans le carcinome bronchique (Cruz, Tanoue, et Matthay 2011). L'âge où l'on commence à fumer, la durée d'exposition et le nombre de cigarettes fumées sont des facteurs déterminants (Peto et Doll 1986). Le tabagisme est à l'origine de 80 % des décès par cancers du poumon chez les hommes et de 50 % des décès chez les femmes à l'échelle mondiale (Ezzati et Lopez 2003). Dans la fumée du tabac, il existe plus de 55 substances cancérigènes selon le Centre International pour la Recherche sur le Cancer (CIRC) qui sont fortement associées au développement du cancer du poumon (Hecht 1999). Les substances cancérigènes les plus connues sont les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) et les nitrosoamines qui conduisent à des mutations génétiques à travers la formation d'adduits sur l'acide désoxyribonucléique (ADN) (Brambilla et Gazdar 2009).

L'exposition à la fumée de tabac (ou le tabagisme passif) est aussi un facteur de risque des cancers du poumon chez les non fumeurs. Le CIRC a estimé que le risque de développer un cancer du poumon suite à l'exposition à la fumée de tabac s'élevait à 35 % chez les hommes et à 25 % chez les femmes par rapport aux hommes et aux femmes qui ne sont pas exposés (Couraud et al. 2012).

Le radon a été classé parmi les 4 grands risques environnementaux pour la santé publique aux États-Unis (Reuben 2010). L'exposition au radon est aussi la deuxième cause des cancers du poumon après la consommation de tabac (« National Health Advisory Issued for Radon » 2016).

L'exposition professionnelle aux métaux lourds et à d'autres agents chimiques cancérigènes, tels que l'arsenic, le cadmium, le nickel, la poussière de métal, les HAPs ou le chlorure de vinyle contribue aussi au développement des cancers du poumon (11th Report on Carcinogens, 2016).

Finalement, des facteurs environnementaux tels que l'exposition à la pollution atmosphérique (Trédaniel et al. 2009) et à la vapeur de l'huile de colza (Gao et al. 1987) ont aussi été identifiés comme facteurs de risque des carcinomes pulmonaires.

3. Classification histologique et pathologique des cancers pulmonaires

Sur le plan histologique, il existe deux principales classifications pour distinguer les différents types de cancer du poumon. La première est proposée par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) et elle repose sur les critères morphologiques des tumeurs. La deuxième classification est décrite par Union for International Cancer Control (UICC) et prend en compte l'extension anatomique des tumeurs. Ces classifications servent à prévoir le pronostic, à définir des sous-groupes de patients et à établir des protocoles thérapeutiques.

3.1 Classification selon l'OMS

La classification selon l'OMS 2004 divise les tumeurs selon leur grade de différenciation :

- Grade I : tumeurs carcinoïdes
- Grade II : tumeurs carcinoïdes atypiques
- Grade III : carcinomes à petites et larges cellules

Sur la base de cette classification, nous identifions deux types de cancers pulmonaires. Les cancers broncho-pulmonaires à petites cellules (CBPC) et les cancers broncho-pulmonaires non à petites cellules (CBnPC) qui représentent environ 15% et 85% des cancers du poumon respectivement.

CBPC

Selon la classification WHO en 1999, les CBPC sont des tumeurs qui se développent à partir des cellules neuroendocrines qui sont dispersées à l'état normal dans tout l'épithélium bronchique. Les CBPC représentent la catégorie des cancers du poumon la plus agressive. Plus de 95 % des patients qui développent un cancer du poumon à petites cellules sont des fumeurs. Bien que les CBPCs répondent dans un premier temps à la chimiothérapie, plus de 95% des patients finissent par mourir.

CBnPC

Nous distinguons trois principaux types de CBnPCs: les carcinomes épidermoïdes (ou squameux), les adénocarcinomes et les carcinomes du poumon à grandes cellules. Le diagnostic de ces cancers repose sur les mêmes principes, mais le traitement peut différer selon le type de maladie.

A-Les adénocarcinomes (ADC)

Les ADCs pulmonaires représentent le type histo-pathologique le plus fréquent (52% des cas) (Travis et al. 2011). Ils sont principalement causés par le tabac et par la survenue de mutations spontanées (Hashimoto et al. 2000). La classification histologique des ADCs pulmonaires a évolué avec le temps compte tenu de la très grande hétérogénéité architecturale de ces tumeurs. En 2011, une nouvelle classification a été proposée par l'International Association for the Study of Lung Cancer (IASLC), l'American Thoracic Society (ATS) et l'European Respiratory Society (ERS) dans laquelle les ADCs invasifs sont divisés en 5 sous-types histologiques selon le type architectural prédominant : acineux, papillaire, micro-papillaire, bronchiolo-alvéolaire et solide. Plusieurs autres variants cytologiques ont été aussi décrits (colloïdes, fœtaux ou entériques) (Travis et al. 2011).

B- Les carcinomes squameux (SCC) (ou épidermoïdes ou malphigien)

Les SCCs sont le deuxième type de cancer le plus fréquent après les ADCs et il représente 30% des CBnPCs. Ces tumeurs proviennent de la transformation de cellules épithéliales bronchiques comme le montre la Figure 2. Alors que l'adénocarcinome pulmonaire apparaît habituellement dans les cellules du poumon situées sur la partie externe (périphérie), le carcinome pulmonaire squameux se développe habituellement dans les grosses bronches situées dans la partie centrale du poumon. Ils se caractérisent par la synthèse de kératine et par la formation de ponts inter-cellulaires (Travis et al. 2011). La classification de l'OMS 2004 identifie 4 sous-types de SCC: les cellules claires, les petites cellules, les papillaires et les basaloïdes.

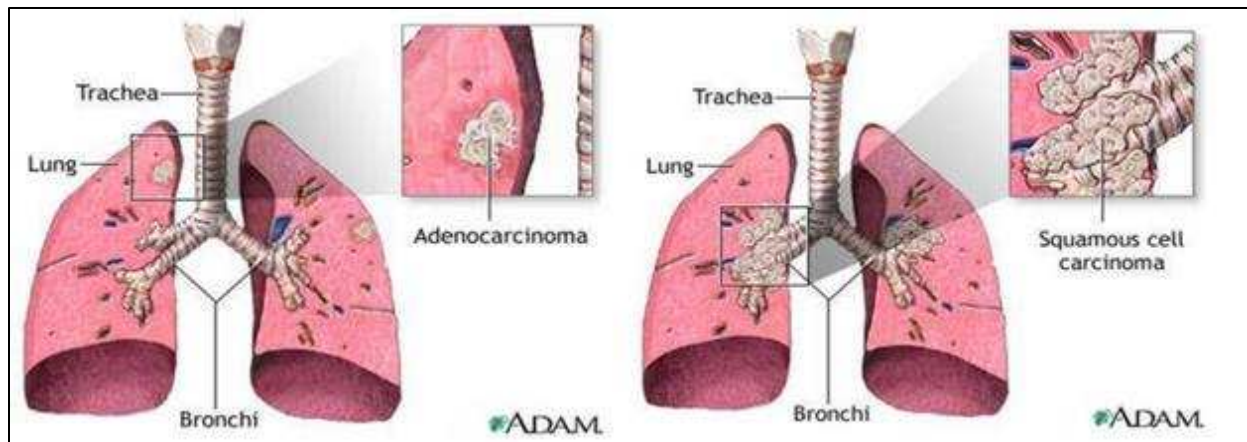


Figure 2. Localisations anatomopathologiques des carcinomes pulmonaires squameux et des adénocarcinomes (PubMed Health, 2011). L'adénocarcinome pulmonaire apparaît habituellement dans les cellules du poumon situées sur la partie externe (périphérie) du poumon. A l'inverse, le carcinome pulmonaire squameux se développe habituellement dans les grosses bronches situées dans la partie centrale du poumon

C- Les carcinomes à grande cellule (CGC)

Les carcinomes à grandes cellules représentent environ 20% des CBnPCs. Il s'agit de tumeurs malignes ne présentant pas les mêmes caractéristiques de différenciation que celles des carcinomes neuro-endocrines, glandulaires ou à petites cellules. Ces carcinomes n'ont aucune caractéristique clinique à part le fait qu'ils sont indifférenciés.

3.2 Classification pTNM selon l'UICC

La classification pTNM (pathologic Tumor, Node, Metastasis) est basée sur l'extension anatomique des tumeurs. Les symptômes cliniques et les caractérisations biologiques et moléculaires ne sont pas prises en compte dans cette classification. Cette classification se fait après le diagnostic histologique du patient et permet d'effectuer son pronostic (Detterbeck, Boffa, et Tanoue 2009).

La classification pTNM repose sur trois critères :

T = taille et/ou extension de la **T**umeur primaire

N = présence ou absence de ganglions voisins (**N**odules)

M = présence ou absence de **M**étastase(s) à distance

La classification pTNM permet d'évaluer l'avancement des tumeurs et le regroupement de ces catégories donne lieu à une classification selon le stade anatomique. D'après les tableaux 1 et 2, nous distinguons :

- Stade 0 : Cancer in situ (non invasif)
- Stade I : Invasion très localisée, sans métastase à distance
- Stade II : Extension limitée localement et/ou atteinte ganglionnaire satellite minime
- Stade III : Atteinte locale importante et/ou atteinte ganglionnaire satellite majeure
- Stade IV : Tumeur avec métastase(s)

T : Tumeur primaire	
T0	Pas de signe de tumeur primaire
Tis	Carcinome in situ
T1	Diamètre de la tumeur ≤ 3 cm dans son diamètre le plus grand Pas de signe d'invasion au-delà de la bronche lobaire T1a (mi) : adénocarcinome avec invasion minimale T1a : tumeur ≤ 1 cm dans son diamètre le plus grand T1b : tumeur >1 mais ≤ 2 cm T1c : tumeur >2 mais ≤ 3 cm
T2	Diamètre > 3 cm mais ≤ 5 cm ou : -Implique bronche principale indépendamment de la distance de la carène, mais sans la participation de la carène -Envahissement de la plèvre -Associé à une atélectasie ou à une pneumopathie obstructive qui se prolonge dans la région hilare, impliquant une partie ou la totalité du poumon T2a : Tumeur > 3 mais ≤ 4 cm T2b : Tumeur > 4 mais ≤ 5 cm
T3	Tumeur > 5 mais ≤ 7 cm avec envahissement d'une structure adjacente de la paroi thoracique (y compris la plèvre pariétale et les tumeurs de l'apex), nerf phrénique, péricarde pariétal ou nodules tumoraux séparés dans le même lobe.
T4	Tumeur de toutes tailles avec invasion des organes suivants : -Médiastin, diaphragme, cœur, gros vaisseaux, trachée, nerf laryngé, oesophage, corps des vertèbres, carène ou plusieurs nodules tumoraux dans le même lobe.
N : Présence ou absence de ganglions lymphatiques	
N0	Pas d'envahissement des ganglions lymphatiques
N1	Envahissement ipsilatéral des ganglions péribronchiques, hilaires ou intrapulmonaires
N2	Envahissement ipsilatéral des ganglions médiastinaux et/ou sous-carénaux
N3	Envahissement controlatéral des ganglions médiastinaux, hilare et/ou envahissement ipsilatéral ou controlatéral des ganglions scalènes ou supra-claviculaires.
M : Métastases à distance	
M0	Absence de métastase
M1	Présence de métastases à distance : M1a : Nodules tumoraux séparés dans un lobe contro-latéral M1b : Métastase extra-thoracique Simple M1c : Métastases extra-thoraciques multiples dans un ou plusieurs organes

Tableau 1 Huitième classification pTNM des cancers broncho-pulmonaires selon l'UICC (2015). Tableau adapté d'après (Goldstraw et al. 2016).

	N0	N1	N2	N3
T1a ≤ 1 cm	IA1	IIB	IIIA	IIIB
T1b > 1–2 cm	IA2	IIB	IIIA	IIIB
T1c > 2–3 cm	IA3	IIB	IIIA	IIIB
T2a > 3–4 cm	IB	IIB	IIIA	IIIB
T2b > 4–5 cm	IIA	IIB	IIIA	IIIB
T3 > 5–7cm	IIB	IIIA	IIIB	IIIC
T3 structures	IIB	IIIA	IIIB	IIIC
T4 > 7cm	IIIA	IIIA	IIIB	IIIC
T4	IIIA	IIIA	IIIB	IIIC
T2a >3–4 cm	IB	IIB	IIIA	IIIB
T2b >4–5 cm	IIA	IIB	IIIA	IIIB
T4	IIIA	IIIA	IIIB	IIIC
M1a	IVA	IVA	IVA	IVA
M1b	IVA	IVA	IVA	IVA
M1c	IVB	IVB	IVB	IVB

Tableau 2 Correlation entre la classification pTNM et les stades anatomiques(proposition selon la huitième édition). Adaptée d'après (Goldstraw et al. 2016).

4. La carcinogenèse bronchique : un processus multi-étapes

4.1 Mécanisme du développement tumoral

La tumorigenèse chez l'homme est un processus multi-étapes qui peut être initié à la suite de mutations génétiques et/ou épigénétiques entraînant la transformation progressive des cellules humaines normales en cellules cancéreuses (J. Luo, Solimini, et Elledge 2009). Il existe différents types de mutations génétiques: altération du nombre de chromosomes (gains ou pertes), substitutions de base simples, translocation/réarrangements ou intégration de génome viral (Albertson 2006), (Meyerson, Gabriel, et Getz 2010). Durant ce processus, il se produit une activation de gènes dits oncogènes car ils sont indispensables au développement tumoral. La

surexpression de protéines oncogéniques peut être due à une amplification génique, à l'activation de la transcription, à des changements dans la conformation de la chromatine suite à des modifications épigénétiques et à la modification de la stabilité de l'ARN. En conséquence de ces anomalies, les tumeurs peuvent devenir fortement dépendantes, on parle alors d'addiction, de la fonction d'un oncogène appelé « driver oncogene » qui assure leur prolifération et leur survie (Weinstein 2002). Ces anomalies moléculaires peuvent être classées en fonction des cibles thérapeutiques qu'elles impactent. Il peut s'agir d'altérations des récepteurs membranaires, d'altérations des voies de signalisation et/ou d'altérations de facteurs de transcription. En général, plusieurs anomalies peuvent co-exister au sein d'une même tumeur et coopérer pour induire le phénotype tumoral. Parallèlement, on observe la perte de fonction de gènes dits suppresseurs de tumeurs, car ils sont un frein au développement tumoral. Le génome des cellules tumorales humaines révèle généralement une grande instabilité au niveau chromosomique et une instabilité générale au niveau génomique qui se caractérise par l'apparition de cassures simple ou double brins sur l'ADN notamment en raison de l'inactivation de protéines qui détectent et réparent ces dommages sur l'ADN. En outre, les mécanismes cellulaires (notamment l'apoptose) qui habituellement éliminent les cellules avec de l'ADN endommagé sont souvent freinés. Toutes ces altérations aboutissent à une survie et une croissance anarchique des cellules tumorales.

Ainsi, selon le modèle proposé par Hanahan et Weinberg (Figure 3), une cellule tumorale possède six propriétés biologiques principales :

- 1) l'indépendance vis-à-vis des facteurs de croissance
- 2) l'insensibilité vis-à-vis des signaux anti-prolifératifs
- 3) la capacité à échapper à la mort programmée (apoptose)
- 4) un potentiel réplicatif illimité
- 5) la capacité à induire une néo-vascularisation (angiogenèse)
- 6) l'acquisition d'un phénotype invasif et métastatique

Par la suite, d'autres caractéristiques propres à la cellule tumorale ont été ajoutées à ces propriétés. En font partie : la capacité de reprogrammation du métabolisme énergétique de la cellule et l'échappement des cellules tumorales au système immunitaire (Hanahan et Weinberg

2011), au stress métabolique, au stress protéotoxique, au stress mitotique, au stress oxydatif ainsi que la capacité à échapper à la réponse cellulaire aux dommages à l'ADN (J. Luo, Solimini, et Elledge 2009).

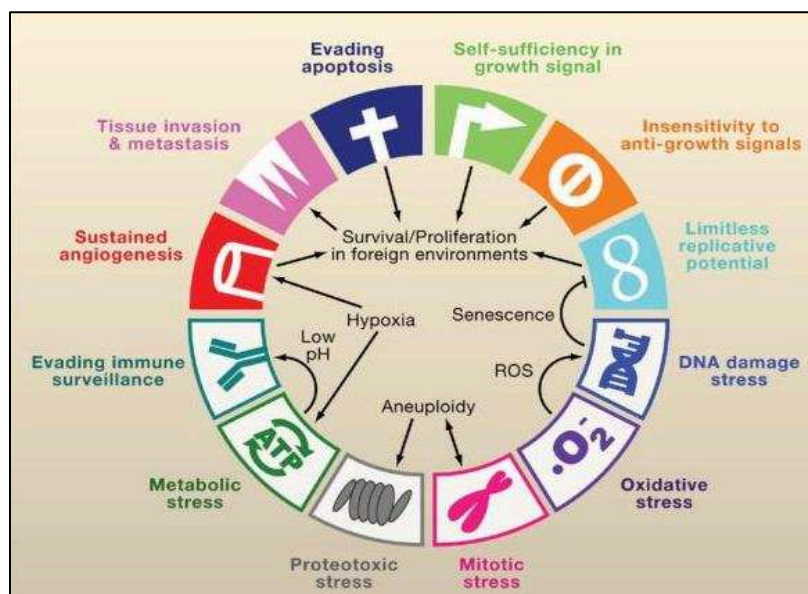


Figure 3 Les propriétés d'une cellule cancéreuse (J. Luo, Solimini, et Elledge 2009).

4.2 Les anomalies moléculaires des CBnPCs

Le cancer broncho-pulmonaire est un processus dégénératif résultant de l'accumulation séquentielle, sur une période relativement longue, de multiples anomalies génétiques, épigénétiques et post-traductionnelles des protéines qui dérèglent par étapes successives (carcinogénèse multi-étape) les mécanismes de contrôle de la croissance des cellules épithéliales de l'arbre bronchique. Sur le plan morphologique, ces anomalies résultent d'une très forte instabilité génétique induisant une transformation progressive de l'épithélium normal bronchique en épithélium hyperplasique, dysplasique puis en carcinome in situ et carcinome invasif (Stephens et al. 2011; Stratton, Campbell, et Futre al 2009). D'une manière générale, les altérations génétiques les plus précoces ne s'accompagnent pas d'anomalies morphologiques. C'est seulement à la suite d'une accumulation d'un nombre critique d'anomalies génétiques que les stades morphologiques précoces sont diagnostiqués (Wistuba et al. 2000). Plusieurs altérations génétiques ont été détectées chez un nombre important de patients atteints de CBnPC. Ces anomalies consistent en des amplifications, translocations ou mutations. Le Tableau 3

résume les anomalies génétiques observées dans les cancers pulmonaires. Plusieurs « screening » ont été effectués afin de caractériser les anomalies génétiques dans les différents sous-types histologiques de cancers bronchiques. D'après les études qui ont été faites, les mutations Kirsten Ras Sarcoma (KRAS) et Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) et les fusions Echinoderm Microtubule-associated protein-Like 4/Anaplastic Lymphoma Kinase (EML4/ALK) sont les mutations les plus fréquentes observées dans les adénocarcinomes pulmonaires. Les amplifications de SRY (Sex determining Region Y)-bOX 2 (SOX2), PI3KA, Platelet-Derived Growth Factor Receptor Alpha (PDGFR α) et du Fibroblast Growth Factor Receptor 1 (FGFR1) ainsi que les mutations des gènes Discoidin Domain Receptor2 (DDR2), AKT1 et NF2 sont les anomalies génétiques les plus fréquentes dans les carcinomes pulmonaires squameux. A part les mutations spécifiques de chaque sous-type histologique, il existe des mutations génétiques communes aux deux sous-types ADC et SCC parmi lesquelles nous citerons : TP53, BRAF, PI3KA, MET et STK11 ainsi que la perte de PTEN et l'amplification de MET. Ainsi, à côté de la classification anatomopathologique, une nouvelle classification des CBnPCs peut être faite sur la base des anomalies génétiques existant dans ces tumeurs. D'ailleurs, Stratton et ses collaborateurs ont commencé à établir une signature qui se base sur les mutations génétiques dans différents cancers (Alexandrov et Stratton 2014).

Genetic abnormality (references)	Gene location	SCC	Adenocarcinoma
TP53 (36, 71)	17p13.1	51%	36%
PI3KCA amplification (51, 52, 54)	3q26.3	33%	6%
SOX2 amplification (23, 24)	3q26.3-q27	23%	Very rare
FGFR1 amplification (24, 25)	8p12	22%	1%
PTEN mutation (36, 61)	10q23.3	10%	2%
MET amplification (34, 35)	7q31.1	3%-21%	3%-21%
PTEN loss (59, 62)	10q23.3	8%-20%	8%-20%
KRAS mutation (36)	12p12.1	6%	21%
Variant III mutation (36)	7p12	5%	Very rare
LKB1 mutation (70)	19p13.3	5%	23%
DDR2 mutation (30)	1q23.3	4%	1%
HER2 overexpression (39-42)	17q11.2-q12, 17q21	3%-5%	5%-9%
PI3KCA mutation (50-52)	3q26.3	3%	3%
BRAF mutation (36, 64)	7p34	2%	1%-3%
EGFR mutation (36)	7p12	<5%	10%-15%
AKT1 mutation (56)	14q32.32	1%	Very rare
MET mutation (36)	7q31.1	1%	2%
HER2 mutation (46, 48, 49)	17q11.2-q12, 17q21	1%	2%
EML4-ALK fusion (66, 67)	2p21, 2p23	1%	2%-7%

Tableau 3 Fréquence des anomalies génétiques dans les CBnPCs.

4.3 Altérations des récepteurs membranaires

FGFR1

Le récepteur FGFR1 est un récepteur transmembranaire à activité tyrosine kinase. Son ligand, le Fibroblast Growth Factor (FGF) se fixe sur le récepteur FGFR1 et active quatre voies de signalisation en aval: la voie phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K), la voie des protéines kinases RAS-RAF-MAPK, la voie STAT et la voie de la phospholipase C γ (Turner et Grose 2010). Weiss et collaborateurs ont montré que la croissance tumorale dépend de l'activation du récepteur FGFR1 (Weiss et al. 2010). Dans les SCCs, la fréquence d'amplification de FGFR1 est de 22%, alors que dans les ADC, elle est beaucoup plus faible (Weiss et al. 2010, Dutt et al. 2011).

DDR2

Le récepteur DDR2 est un récepteur à activité tyrosine kinase. Le collagène se fixe sur le récepteur DDR2 et induit l'activation des voies de prolifération et d'adhésion cellulaires. Le gène DDR2 est muté dans 3,8 % des carcinomes SCC (Cancer Genome Atlas Research Network 2012). Ces mutations peuvent modifier l'activité kinase du récepteur, la liaison du ligand ou sa localisation (Ali et al. 2010, Bargal et al. 2009).

MET

MET est un proto-oncogène qui code pour le récepteur tyrosine kinase transmembranaire du facteur de croissance des hépatocytes dit Hepatic Growth Factor-Scatter Factor (HGF/SF). Dans le cancer du poumon, l'amplification de MET est rare, 2% chez les patients porteurs d'ADC et encore plus faible chez les patients atteints de SCC. L'amplification de MET est à la base de l'activation d'une signalisation ErbB3 qui est un mécanisme de résistance au géfitinib, un inhibiteur pharmacologique de l'activité tyrosine kinase du récepteur EGFR (Engelman et al. 2007). MET peut être un gène aussi muté (1% chez les SCC et 2% chez les ADC) (Forbes et al. 2011; Kong-Beltran et al. 2006). Lutterbatch et collaborateurs ont montré que dans des lignées cellulaires de cancer du poumon EBC-1 et H1993, le gène MET est amplifié. En conséquence, il

est constitutivement activé et déclenche la phosphorylation des voies beta-caténine et p120/D-caténine. Cette étude montre aussi que l'activation de MET est nécessaire à la prolifération et à la survie de ces cellules tumorales (Lutterbach et al. 2007).

EGFR

L'EGFR est surexprimé dans les CBnPCs, plus fréquemment dans les SCCs que dans les ADCs (82% contre 44% respectivement) (Hirsch et al. 2003; Dacic et al. 2006; H. J. Lee et al. 2010; López-Malpartida et al. 2009). Les mutations activatrices de l'EGFR sont présentes dans environ 10%-15% des CBnPCs. Elles sont le plus souvent retrouvées chez la femme, les non-fumeurs (dans 30% des cas), chez les patients d'origine asiatique et dans les ADC (Sharma et al. 2007). Les deux mutations activatrices les plus fréquentes dans les adénocarcinomes pulmonaires sont une délétion touchant l'exon 19 (EGFR-del19) et une mutation au niveau de l'exon 21 (EGFR-L858R) (Pao et Miller 2005) (Shigematsu 2005). Ces mutations induisent une activation constitutive, indépendante du ligand EGF, des voies de signalisation d'aval de l'EGFR, voies de prolifération et de survie cellulaires, et confèrent une dépendance des cellules tumorales à ces signalisations. Cela explique pourquoi les inhibiteurs pharmacologiques ciblant l'activité tyrosine kinase de l'EGFR sont utilisés en première intention chez les patients porteurs d'adénocarcinomes pulmonaires présentant une mutation de l'EGFR. A l'inverse, dans les carcinomes SCC, les mutations activatrices de l'EGFR sont peu fréquentes (<5%). D'ailleurs, des études précliniques suggèrent que les inhibiteurs de l'EGFR réversibles tels que l'erlotinib ou le géfitinib n'auraient pas d'activité significative chez les patients porteurs de SCC contrairement aux patients porteurs d'ADC. Néanmoins, dans 5% des carcinomes SCC, nous observons l'apparition du variant III de l'EGFR (EGFR vIII). Ce variant est une version amplifiée et tronquée de l'EGFR suite à la délétion des exons 2 à 7. Ce variant est dépourvu de l'extrémité extracellulaire de l'EGFR et est donc constitutivement actif (H. Ji et al. 2006).

4.4 Altérations des voies de signalisation

Le gène **PI3KA** peut être muté (20% des CBnPCs avec une fréquence plus élevée chez les patients porteurs de SCC) ou bien amplifié (6,5% SCC et 1,5% ADC). PIK3CA code pour la sous-unité catalytique (p110 α) de la PI3K (Yamamoto et al. 2008; Okudela et al. 2007; Kawano et al. 2007). L'amplification de PI3KCA conduit à l'activation constitutive de la voie PI3K-AKT qui joue un rôle central dans la survie et la prolifération de nombreux cancers (Courtney, Corcoran, et Engelman 2010).

Le gène **PTEN** (Phosphatase TENsin homolog) est un gène suppresseur de tumeur. PTEN code pour une phosphatase qui régule négativement la voie PI3K/AKT. La perte de PTEN conduit à l'activation constitutive de cette voie (Hollander, Blumenthal, et Dennis 2011). La réduction ou la perte d'expression de PTEN a été rapportée dans 70% des CBnPCs (10,2% des carcinomes squameux contre 1,7% des adénocarcinomes) (G. Jin et al. 2010).

La protéine **BRAF** est une sérine/thréonine kinase. Les mutations de BRAF sont associées à une augmentation de son activité kinase conduisant à l'activation constitutive des MAPK2 et MAPK3 (R. J. Shaw et Cantley 2006). Les mutations de braf sont observées dans 2% des patients porteurs de CBnPCs avec une prévalence identique entre adénocarcinomes et carcinomes pulmonaires squameux (Brose et al. 2002; Davies et al. 2002).

ALK est un récepteur membranaire à domaine tyrosine kinase. La translocation d'ALK consiste généralement en une inversion du bras court du chromosome 2, aboutissant à la formation du gène de fusion EML4-ALK qui code pour une protéine kinase ALK chimérique et constitutivement active. Ce gène de fusion a une activité oncogénique puissante dans des modèles animaux et des lignées cellulaires. Cette fusion est rare et se produit dans 2% à 7% des cas de CBnPC, et elle est plus répandue chez les personnes qui ne fument pas ou chez les fumeurs légers et chez les patients atteints d'ADC. Chez les patients porteurs de SCC, la prévalence estimée est de 1% (A. T. Shaw et al. 2009; Soda et al. 2007; Soda et al. 2008).

4.5 Altérations des facteurs de transcription

Le gène suppresseur de tumeur **p53** (situé sur le chromosome 17p13) fonctionne principalement comme un facteur de transcription mais il est aussi impliqué dans le contrôle du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN, la différenciation cellulaire, la mort par apoptose et la sénescence. P53 est le gène suppresseur de tumeur le plus fréquemment inactivé dans les cancers. Il est par ailleurs inactivé dans la moitié des CBPC et dans environ 65% des carcinomes épidermoïdes (Kishimoto et al. 1992).

SOX2 est un facteur de transcription qui est impliqué dans la différenciation épidermoïde de l'oesophage et du poumon. Le gène SOX2 est amplifié dans 23% des cancers pulmonaires squameux (Weiss et al. 2010; Bass et al. 2009; Hussenet et al. 2010). La suppression de SOX2 a plus d'effets sur la prolifération que d'autres gènes. Il a été montré aussi que l'amplification et la surexpression de SOX2 sont impliquées dans le maintien des propriétés de cellules souches dans les carcinomes pulmonaires squameux (Bass et al. 2009; Hussenet et al. 2010). L'expression de SOX2 dans des tumeurs SCC est corrélée avec l'expression des transcrits de TP63 et de la Kératine 6A (KRT6A) qui codent pour les marqueurs de différenciation squameuse (Bass et al. 2009). De plus, une étude montre que dans un modèle murin qui surexprime SOX2 mais ne surexprime pas la kinase LKB1, il y a un développement des tumeurs SCCs (Mukhopadhyay et al. 2014).

5. Prise en charge thérapeutique des CBnPCs

Il existe trois principaux types de traitements du cancer du poumon: la chirurgie, la radiothérapie et les traitements systémiques (ou généraux) comme la chimiothérapie et les thérapies ciblées. Ces options thérapeutiques peuvent être utilisées seules ou en association, en fonction du patient et des caractéristiques de son cancer.

5.1 La chirurgie

La chirurgie est le traitement de référence des CBnPC de stades I et II. Elle peut être utilisée aussi pour les stades IIIA et très rarement pour les stades IIIB. La chirurgie peut être faite si et

seulement si la tumeur est résecable et si le patient peut être opérable. Il existe 2 grands types d'interventions chirurgicales :

- La lobectomie:** elle consiste à enlever le lobe du poumon où siège la tumeur, ainsi que les ganglions correspondants, sans enlever la totalité du poumon.
- La pneumonectomie:** elle consiste à enlever la totalité du poumon où siège la tumeur, ainsi que les ganglions correspondants.

5.2 La radiothérapie

La radiothérapie est un traitement utilisant les rayons X de haute énergie. Les doses habituellement prescrites pour traiter les cancers bronchiques sont de l'ordre de 50 à 70 Grays (Gy). Elles visent à détruire les cellules cancéreuses dans la région malade et à empêcher leur multiplication et leur développement. La radiothérapie est utilisée comme traitement de référence, associée à la chimiothérapie (radiochimiothérapie concomittante) pour les cancers de stade IIIB. Elle peut être utilisée aussi dans le cadre d'un traitement multi-modal pour les stades II et IIIA. La radiothérapie est utilisée comme une alternative à la chirurgie pour les cancers de stades IA et IB dans les cas où l'intervention chirurgicale n'est pas possible.

5.3 La chimiothérapie

Une chimiothérapie est un traitement qui consiste à utiliser des molécules chimiques qui agissent sur les mécanismes de division cellulaire afin de détruire les cellules cancéreuses. Le protocole de chimiothérapie le plus utilisé pour traiter un cancer bronchique est à base de sels de platine. Le cisplatine ou le carboplatine sont habituellement associés à l'un des agents chimiothérapeutiques suivants: Etoposide, Paclitaxel, Docétaxel, Gemcitabine, Vinorelbine ou Pemetrexed. La chimiothérapie est utilisée seule comme traitement de référence pour les cancers de stade IV. Elle est recommandée dans le cadre d'un traitement multimodal dans les stades IIIA et en adjuvant (après la chirurgie) dans les cancers de stade II. La chimiothérapie est aussi utilisée en association à la radiothérapie (radiochimiothérapie concomittante) dans les stades IIIB et peut être également utilisée pour les cancers de stade IB.

5.4 Les thérapies ciblées

Depuis la fin des années 1990, une grande avancée thérapeutique dans le monde des anti-cancéreux a été faite en raison du développement des thérapies dites ciblées (tableau 4). La mise en place de ces thérapies a été permise grâce aux progrès qui ont été faits dans la compréhension des mécanismes moléculaires du développement tumoral. Ces thérapies ont permis d'augmenter la survie des patients tout en évitant dans la mesure du possible les effets secondaires des thérapies conventionnelles. Ces médicaments sont des molécules qui sont dirigées contre des cibles spécifiques, anormalement exprimées ou actives dans les tumeurs, contrairement aux molécules chimiothérapeutiques conventionnelles. Il existe deux grandes familles de thérapies ciblées classées selon leur mode d'action: les anticorps monoclonaux (**Mab**) ou les inhibiteurs enzymatiques (**inib**) qui ciblent des récepteurs à activité enzymatiques ou des enzymes (Fayette, Fleury, et Blay 2008). Par exemple, les anti-angiogéniques bloquent l'angiogenèse tumorale en agissant soit sur le ligand dit Vascular Endothelial Growth FactorA (VEGF-A) ou ses récepteurs à activité tyrosine kinase VEGFRs. Ce sujet sera plus longuement détaillé dans la partie III de cette introduction.

Comme mentionné précédemment, l'EGFR est une autre cible privilégiée des thérapies ciblées utilisées dans le traitement des cancers du poumon. A l'heure actuelle, il existe deux familles de molécules de thérapie ciblée anti-EGFR :

-Les anticorps monoclonaux, représentés par le cetuximab (ERBITUX®) et le panitumumab (VECTIBIX®). Ils se lient au domaine extracellulaire de l'EGFR et empêche la liaison du ligand et donc l'activation du récepteur (Govindan et al. 2011)

-Les inhibiteurs de la tyrosine kinase de l'EGFR (EGFR-TKI), représentés par le gefitinib (IRESSA®) et l'erlotinib (TARCEVA®). Ils sont composés d'un noyau quinazoline qui se fixe au niveau de la poche à ATP de l'EGFR, entre en compétition avec l'ATP et bloque ainsi l'activité kinase du récepteur (Sequist et al. 2007)

Le Cetuximab a été approuvé pour le traitement des cancers colorectaux, du sein et de la tête et du cou. Il est encore en essai clinique de phase III chez les patients porteurs de CBnPCs à cause de ses effets secondaires et notamment de la survenue d'un acné de typerash dans 10% des cas (Pirker et al. 2012). Les seules molécules ayant obtenues l'autorisation pour le traitement des CBnPCs sont le géfitinib et l'erlotinib (INCa 2010b).

Même si la découverte des thérapies anti-EGFR a constitué une grande avancée dans la médecine personnalisée des patients porteurs de CBnPCs, un des problèmes majeurs de ces nouvelles thérapies est le développement d'une résistance au traitement. Cela a conduit au développement d'inhibiteurs qui se fixent de manière irréversible à l'EGFR dits de deuxième (Afatinib, Dacomitinib et Neratinib) et de troisième génération (Rociletinib et Mereletinib), qui sont actuellement en phase d'essai clinique (Minguet, Smith, et Bramlage 2016). De plus, bien que ces thérapies ciblées soient supposées être mieux tolérées par les patients que les chimiothérapies, leurs effets indésirables restent à considérer. Nous prendrons comme exemple le Rocilétinib, un inhibiteur qui se fixe sur l'EGFR muté T790M avec un taux de réponse de 59% chez les patients mutés et 27% chez les patients non mutés. Ces effets indésirables sont essentiellement la diarrhée chez 20 % des patients et l'hyperglycémie chez 22% des patients. Des essais précliniques suggèrent que l'hyperglycémie est due à un métabolite du Rocilétinib.

5.5 Les autres thérapies ciblées

Les thérapies ciblées anti-ALK

Le Crizotinib est un inhibiteur de l'activité tyrosine kinase de ALK (ALK-TKI) qui cible les protéines de fusion de ALK. Le crizotinib a été approuvé en 2013 par la Food and Drug Administration (FDA) comme première ligne de traitement chez les patients CBNPCs avec un réarrangement ALK. Cependant suite à l'apparition de résistance au Crizotinib, d'autres inhibiteurs alternatifs de ALK ont été développés tel que le Ceritinib et l'Alectinib (Minguet, Smith, et Bramlage 2016).

Les inhibiteurs des voies K-RAS

Des thérapies ciblant les voies de signalisation activées en aval de K-Ras sont actuellement en phase d'étude clinique, le selumetinib et le trametinib qui ciblent la voie des MAPK ((Korpanty et al. 2015; Vasan, Boyer, et Herbst 2014) mais également les inhibiteurs de mTOR qui agissent sur la voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR, dont les principales molécules sont le temsirolimus et l'évérolimus (Cheng et al. 2014). Les inhibiteurs de MEK ont été les premiers inhibiteurs sélectifs de la voie MAPK qui ont été étudiés dans des essais cliniques. Le CI-1040 a été le premier inhibiteur à être étudié. Cependant, les essais cliniques ont été arrêtés en phase II à cause de sa faible stabilité métabolique et de sa faible biodisponibilité (Sebolt-Leopold et al. 1999). D'autres inhibiteurs ont été développés comme l'AZD-6244 98 (ARRY-142886) (Yeh et al. 2007) et le PD0325901 (Messersmith et al. 2006) qui sont actuellement en phase II pour le traitement de nombreux types de cancers (sein, poumon, colorectal, foie...). En 2013, le trametinib, un inhibiteur de MEK1 et MEK2, a été d'abord approuvé par la FDA en tant que monothérapie. Ensuite, il a été approuvé en tant que traitement combiné avec le dabrafénib, un inhibiteur de BRAF. Cette combinaison de traitement a amélioré de façon significative la survie globale sans augmentation de la toxicité chez les patients de mélanomes non-métastatiques présentant des mutations BRAFV600E ou V600K (Menzies et Long 2014).

Les immunothérapies : anti PDL1 et anti-PD1

Une nouvelle approche très prometteuse vise à cibler les relations existant entre stroma tumoral et la tumeur elle-même. Les thérapies anti-angiogéniques peuvent constituer une telle approche car elles ont été développées pour cibler les cellules endothéliales des néo-vaisseaux. Mais comme nous le verrons par la suite elles sont aussi capables dans certains cas de cibler les cellules tumorales. Ainsi, de nouvelles stratégies immunothérapeutiques ont été développées bloquant les points de restriction du système immunitaire « immune checkpoints » tels que les anticorps monoclonaux ciblant le récepteur PD-1 ou son ligand PD-L1. L'objectif de ces thérapies serait d'amplifier la réponse immunitaire anti-tumorale chez les patients. Parmi les anticorps anti-PD1, nous citons le nivolumab qui a amélioré la survie d'un an avec un pourcentage de 44 % dans les cancers pulmonaires ADC et SCC (Brahmer et al. 2013). Les anticorps monoclonaux ciblant PD-L1 présentent également une efficacité clinique dans plusieurs types de cancers y compris les CBnPCs. Nous citons à titre d'exemple les anticorps monoclonaux humanisés IgG1-MPDL3280A qui sont en phase 1 d'essais cliniques.(Spigel et al. 2013). D'autre part, l'ipilimumab, un anticorps anti-CTLA 4, est désormais proposé dans le traitement du mélanome métastatique aussi pour renforcer la réponse immunitaire. Il a amélioré la survie globale de 10 mois mais il a été associé avec des effets secondaires tels que l'éruption cutanée, la fièvre, la diarrhée et la thyroïdie, etc..(Hodi et al. 2010).

Spectre d'action	Molécule	Cible	Type de cancer	Phase de développement
Cible unique	Bevacizumab (Avastin)	VEGF-A	Cancer colorectal métastatique, glioblastome, cancer du poumon non à petites cellules et non épidermoïde, cancer du rein métastatique	Approuvé US/UE
	Cetuximab (erbitux)	EGFR	Cancer tête-cou, Cancer colorectal	Approuvé US/UE
	Panitumumab (vectibix)	EGFR	Cancer métastatique colorectal	Approuvé US/UE
	Trastuzumab (herceptin)	HER-2	Cancer du sein et gastrique surexprimant HER-2	Approuvé US/UE
Multi-cibles	Aflibercept	VEGF-A -B, PlGF	Cancer colorectal métastatique	Approuvé US, en attente (UE)
	Axitinib	VEGFR-1-2-3, PDGFR, KIT	Cancer rénal avancé	Approuvé US/UE
	Cédiranib	VEGFR-1-2-3, PDGFR, KIT	Cancer métastatique colorectal Glioblastome récurrent, Cancer de l'ovaire, Cancer du poumon	Phase III
	Indétanib	VEGFR, PDGFR, FGFR	Cancer de l'ovaire, Cancer du poumon non à petites cellules	Phase III
	Pazopanib	VEGFR-1-2-3, PDGFR, KIT	Cancer rénal avancé, sarcome avancé des tissus mous	Approuvé US/UE
	Sorafénib	VEGFR-2-3, Raf, PDGFR, KIT	Carcinome hépatique, Cancer rénal avancé	Approuvé US/UE
	Sunitinib	VEGFR-1-2-3, PDGFR, KIT, FLT3, CSF-1R, RET	Cancer rénal avancé, Cancer du pancréas avancé ou métastatique, Tumeurs neuroendocrines, Tumeurs gastrointestinales	Approuvé US/UE
	Vandétanib	VEGFR-2, EGFR, KIT, RET	Cancer médullaire de la thyroïde	Approuvé US/UE

	Vatalanib	VEGFR-1-2-3, PDGFR, KIT	Cancer colorectal	Phase III
Large spectre	ABT-510	CD36	Cancer de la tête et du cou, myélome, lymphome, cancer du rein, sarcoma, carcinomes non à petites cellules	Phase II
	ATN-161	Intégrines $\alpha\beta3$ et $\alpha\beta1$	Cancer du cerveau et du système nerveux central, cancer du rein	Phase II
	Angiostatine	ATP synthase, NG2, angiomotine, Intégrines $\alpha\beta3$, c-met, annexine II	CBNPC	Phase II
	Cilengitide	Intégrines $\alpha\beta3$ et $\alpha\beta5$	Gliome, glioblastome	Phase III
	Endostatine (endostar)	Intégrines $\alpha\beta3$ et $\alpha\beta1$, nucléoline, caveoline-1, glypicane-1 et -4, MMP-2, VEGFR-2	CBNPC, cancer du sein	phase III/IV
	Lénalidomide (CC-5013; revlimid)	CRBN	Myélome multiple	Approuvé (U.S./E.U.)
	Pomalidomide (CC-4047)	CRBN	Myélome multiple	Phase III
	Thalidomide (thalomid)	CRBN	Myélome multiple	Approuvé (U.S./E.U.)
	TNP-470	MetAp2	Cancer pancréatique	Phase II

Tableau 4 Les différentes thérapies ciblées utilisées à l'heure actuelle dans les CBnPCs adapté de (Limaverde-Sousa, Sternberg, et Ferreira 2014).

PARTIE 2. L'ANGIOGENESE

L'angiogenèse est un processus qui aboutit à la formation de nouveaux vaisseaux à partir de vaisseaux pré-existants, capillaires ou veines.

L'angiogenèse peut se dérouler selon deux mécanismes fondamentaux (Dijke et Arthur 2007)

-Le bourgeonnement (ou sprouting) : par activation des cellules endothéliales qui vont migrer, proliférer et se différencier afin de former un nouveau vaisseau.

-L'intussusception: par élargissement et séparation des vaisseaux déjà formés.

L'angiogenèse assure l'apport en oxygène et en nutriments aux tissus leur permettant de se développer. Ce processus est activé dans l'organisme et peut être à la fois physiologique et pathologique.

1. Angiogenèse physiologique et pathologique

L'angiogenèse est un phénomène rare chez l'adulte parce que l'endothélium est quiescent et les cellules endothéliales se renouvellent très faiblement. Toutefois, l'angiogenèse est un mécanisme indispensable et hautement régulé dans certaines conditions physiologiques comme par exemple dans le tractus génital de la femme au cours du cycle menstruel et pendant la grossesse (au niveau de la glande mammaire, lors de la régénération de l'utérus, de la formation du placenta, lors de la reconstitution menstruelle de l'endomètre, lors de la croissance folliculaire et lors de la formation du corps jaune) (Risau 1997). Elle a également lieu au cours de l'inflammation, des processus de réparation tissulaire, d'ischémie tissulaire et au cours de la croissance des cheveux et du squelette. L'angiogenèse peut être cependant à la base du développement et de la progression de nombreuses pathologies dans le cas d'une vascularisation excessive. Nous distinguons les rétinopathies diabétiques, la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA), l'arthrite rhumatoïde, l'athérosclérose, le psoriasis, l'obésité, la maladie d'Alzheimer et le cancer (Carmeliet 2003). Dans la suite de cette description, je m'axerai sur l'angiogenèse tumorale.

En 1971, Folkman a montré que l'angiogenèse est nécessaire à la croissance des tumeurs solides et au développement de métastases. En effet une tumeur non vascularisée ne peut assurer ses besoins en nutriments et en oxygène. C'est pour cela que le processus de néo-vascularisation tumorale est mis en place. Il est à noter cependant que certaines tumeurs (peau, col utérin, vessie) sont capables de persister des mois ou des années sans acquérir le phénotype angiogénique et vont donc rester sous forme de carcinomes in situ cliniquement indétectables (Chabannes et al. 2001).

L'angiogenèse tumorale, est un processus complexe qui se déroule en plusieurs étapes (Figure 4). Dans une première étape, les cellules tumorales et péri-tumorales associées à la tumeur synthétisent des facteurs angiogéniques (bFGF, VEGF, ...) qui vont stimuler la migration et la prolifération des cellules endothéliales. Dans une seconde étape, les cellules tumorales et endothéliales vont sécréter des enzymes spécifiques (telles que des métalloprotéases matricielles et des activateurs du plasminogène) qui vont activer la dégradation de la membrane basale et de la matrice extra-cellulaire. Cela va permettre alors de libérer des facteurs de croissance comme le FGF ou le VEGF séquestrés dans cette matrice. Dans une troisième étape, il se produit une augmentation de la perméabilité vasculaire sous l'action du VEGF et une formation d'un gel de fibrine, qui vont permettre la prolifération et la migration des cellules endothéliales. Les cellules endothéliales qui prolifèrent migrent alors selon un gradient dicté par les stimuli angiogènes. Dans une quatrième étape, les cellules endothéliales forment de fins prolongements cytoplasmiques et les cellules migrantes s'allongent et s'alignent les unes avec les autres pour former un bourgeon capillaire. Enfin, on observe une fusion des tubules formés, une maturation et une stabilisation des néovaisseaux.

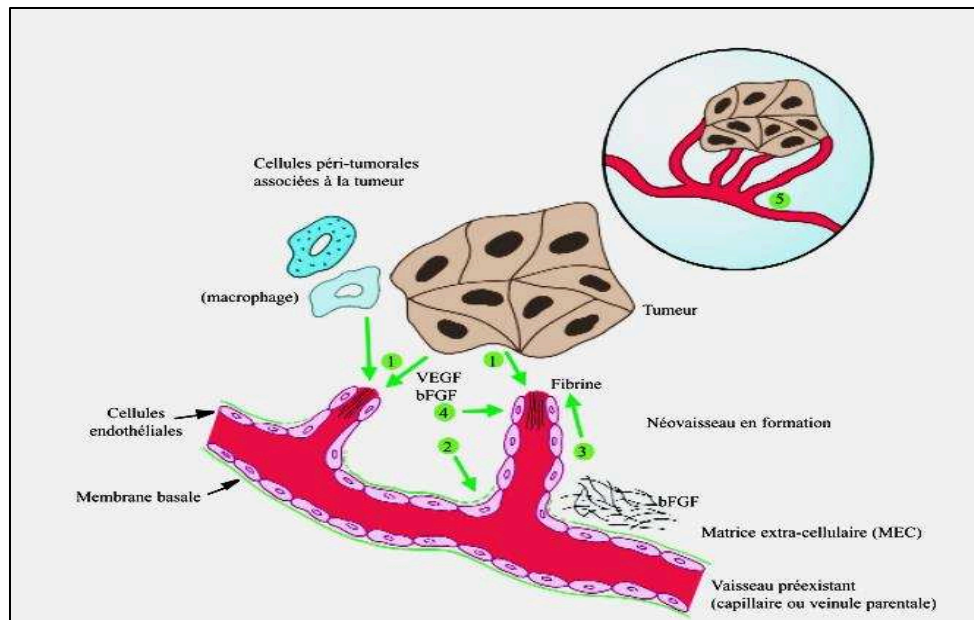


Figure 4 Représentation schématisée des principales étapes de l'angiogenèse (exemple de l'angiogenèse tumorale) (Chabannes2001).

L'angiogenèse est donc finement contrôlée par l'action de plusieurs facteurs endogènes regroupés sous l'appellation de facteurs angiogéniques et divisés en deux catégories, d'une part les facteurs activateurs pro-angiogéniques et d'autre part les facteurs inhibiteurs anti-angiogéniques.

1.1. Les facteurs pro-angiogéniques

Les facteurs pro-angiogéniques stimulent la migration, la prolifération et la différenciation des cellules endothéliales. Ils augmentent la perméabilité vasculaire et ils sont impliqués dans la maturation des vaisseaux. Les principaux facteurs activateurs qui ont été décrits sont: le VEGF, le PDGF (Platelet Derived Growth Factor), le FGF (Fibroblast Growth Factor), le TGF (Transforming Growth Factor), les MMPs (Matrix Metalloproteases), le TNF (Tumour Necrosis Factor) et les angiopoïétines. Le VEGF (description détaillée plus loin dans cette partie) est le facteur le plus étudié et le FGF-2 a été le premier facteur identifié (Yadav et al. 2015).

1.2. Les facteurs anti-angiogéniques

Les facteurs pro-angiogéniques voient leurs effets contre-balancés par ceux des facteurs anti-angiogéniques. C'est cet équilibre qui régule le processus entier d'angiogenèse. Les facteurs anti-angiogéniques inhibent l'angiogenèse en bloquant la prolifération, la migration et la différenciation des cellules endothéliales. Ils diminuent ou empêchent la sécrétion des facteurs angiogènes et ils augmentent la sécrétion des facteurs anti-angiogéniques par un mécanisme de « feed-back » positif. Ils induisent l'apoptose des cellules endothéliales. Les facteurs anti-angiogéniques les plus étudiés sont: les interférons, les interleukines, les TIMPs (Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteases), les angiostatines et les endostatines (Yadav et al. 2015) et la thrombospondine (Dameron et al. 1994).

1.3. Le « switch » angiogénique

Au début de son développement, la tumeur se développe in situ avec une taille inférieure à deux millimètres. Dans ce cas, la tumeur peut satisfaire ses besoins en oxygène et en nutriments par simple diffusion passive. Arrivée à une taille de 1 à 2 mm de diamètre, le processus de nutrition par diffusion passive ne suffit plus au bon développement de la tumeur. La tumeur est en manque d'oxygène et donc un état d'hypoxie cellulaire se crée. Cette hypoxie induit une expression plus importante du facteur de transcription HIF1 α (Hypoxia Inducible Factor) par les cellules tumorales, les cellules endothéliales et les cellules stromales. En conséquence, l'équilibre entre les facteurs pro-et anti-angiogéniques est rompu en faveur des facteurs pro-angiogéniques qui vont activer le processus d'angiogenèse (Bergers et Benjamin 2003). C'est le «switch angiogénique» décrit initialement par Folkman (figure 5) (J. Folkman et Hanahan 1991). Ces facteurs pro-angiogéniques vont aussi interagir avec le micro-environnement tumoral. Ainsi, ils vont attirer des cellules myéloïdes sur le site de la tumeur, où ces cellules vont se différencier en macrophages associés aux tumeurs. Ces macrophages vont permettre de créer un microenvironnement inflammatoire riche en cytokines et en agents pro-angiogéniques que les cellules tumorales vont utiliser pour promouvoir leur propre croissance (Weis et Cheresh 2011; Tobelem 2008). D'autres cellules dérivées de la moelle osseuse telles que des précurseurs hématopoïétiques, des neutrophiles, des mastocytes ou des monocytes, jouent aussi un rôle au

cours de l'angiogenèse tumorale en favorisant la sécrétion de molécules pro-angiogéniques (Qian et Pollard 2010). Enfin, les fibroblastes du tissu stromal infiltrant aussi les tumeurs et induisent le recrutement de cellules progénitrices endothéliales sécrétant des facteurs pro-angiogéniques (Joyce et Pollard 2009). Le micro-environnement tumoral amplifie donc le « switch » angiogénique mais aussi, comme nous le verrons plus loin dans cette introduction, participe à la résistance des tumeurs aux traitements anti-angiogéniques (Ferrara 2010).

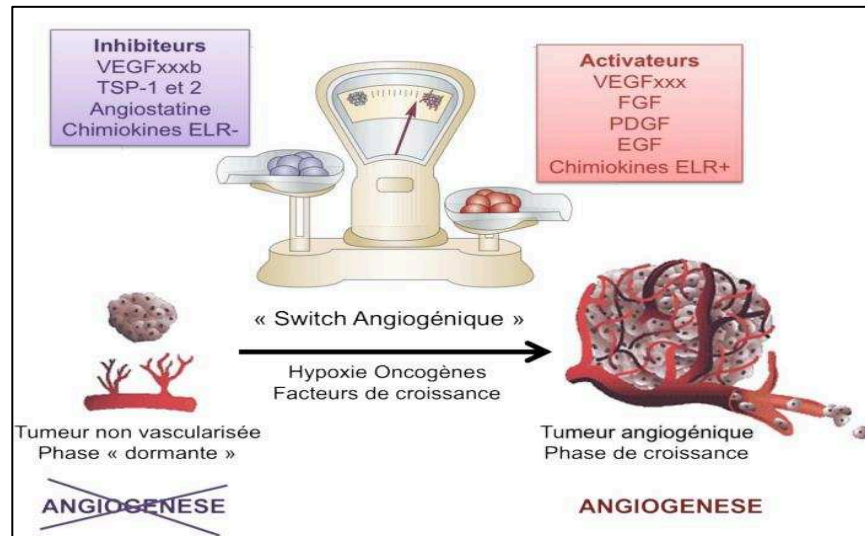


Figure 5. Le « switch angiogénique » est nécessaire pour la croissance tumorale.

1.4. Caractéristiques des vaisseaux tumoraux

Parallèlement à la rupture de l'équilibre entre les facteurs pro-versus anti-angiogéniques, l'angiogenèse tumorale se traduit aussi par la formation de vaisseaux tumoraux anormaux. Ainsi, les vaisseaux qui irriguent les tumeurs présentent des caractéristiques structurales et fonctionnelles différentes de celles des vaisseaux normaux (figure 6 et tableau 5).

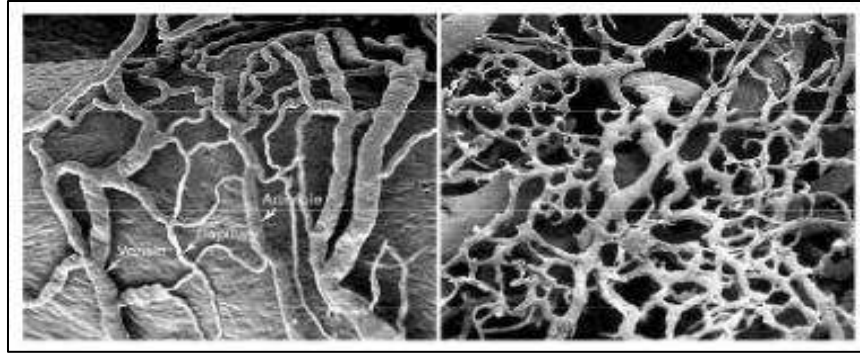


Figure 6. Comparaison de l'aspect de vaisseaux sanguins normaux et tumoraux dans une xénogreffe de tumeur humaine chez la souris nude observés par microscopie électronique à balayage. Les vaisseaux normaux sont organisés en capillaires et veines alors que les vaisseaux tumoraux forment un réseau vasculaire anarchique complètement désorganisé (McDonald et Choyke 2003).

Les vaisseaux tumoraux présentent une vascularisation désordonnée, fragile, lâche et les arborisations sont irrégulières. Le diamètre est irrégulier. La membrane basale est discontinue et parfois absente. Les jonctions entre les cellules endothéliales sont lâches. L'endothélium est discontinu et perméable avec absence de péricytes. Les vaisseaux tumoraux sont immatures avec une pression élevée et un débit sanguin faible. Cette vascularisation anarchique favorise un état hypoxique chronique des tumeurs à l'origine d'une amplification du switch angiogénique. Elle est aussi responsable de la très faible perfusion des tumeurs notamment par rapport à l'accès des thérapies anti-tumorales de type chimiothérapies.

Vascularisation normale adulte	Néovascularisation tumorale
Quiescence	Remodelage permanent
Arborescence organisée, hiérarchisée	Réseau anarchique, excès de communicantes et d'anastomoses
Diamètre régulier	Diamètre irrégulier
Débit régulier, équilibre des échanges gazeux et ioniques	Débit turbulent, chaotique, présence de régions hypoxiques et hyperacides
Pression interstitielle faible	Pression intratumorale élevée
Vaisseaux matures	Vaisseaux immatures
Tonus vaso-actif régulé	Perte du tonus vaso-actif
Présence de péricytes organisés	Absence de péricytes
Endothélium continu, étanche	Endothélium fenestré, discontinu, perméable
Membrane basale continue	Membrane basale discontinue ou absente
Cellules endothéliales bien différenciées	Mosaïque de cellules endothéliales et de cellules tumorales
Jonctions interendothéliales serrées	Jonctions interendothéliales lâches
Autonomie de survie des cellules endothéliales	Survie dépendante du VEGF
Récepteurs au VEGF en nombre normal	Récepteurs au VEGF en nombre augmenté

Tableau 5 : Comparaison de l'aspect morphologique de vaisseaux sanguins normaux et tumoraux (Tobelem 2008).

2. Les acteurs de l'angiogenèse : un jeu connecté entre ligands, récepteurs et co-récepteurs

Malgré l'implication à ce jour de plus d'une cinquantaine de facteurs de croissance différents au cours du processus d'angiogenèse tumorale, le VEGF et ses récepteurs, les VEGFRs, sont considérés comme des éléments moléculaires essentiels à ce processus au sein des facteurs activateurs (Bergers et Benjamin 2003).

2.1 La famille des ligands VEGF

La famille des VEGFs est constituée de 7 glycoprotéines de 40 KDa : le VEGF-A, le VEGF-B, le VEGF-C, le VEGF-D, le VEGF-E, le VEGF-F et le PlGF (Placental Growth Factor). Le VEGF-E et VEGF-F sont les membres les plus rares de la famille retrouvés chez le parapoxvirus 1 et dans le venin de serpent respectivement. Ils appartiennent tous à la sous-famille des PDGFs de la superfamille des facteurs à domaine « cystine-knot ». Tous les membres de cette superfamille se caractérisent par la présence de huit résidus cystéine conservés formant la structure typique « cystine-knot » (deux cystéines liées par liaison S-S). La complexité de cette famille est accrue par épissage alternatif (VEGF-A, VEGF-B et PlGF) mais aussi par des modifications post-traductionnelles (VEGF-A, VEGF-C et VEGF-D) (Ferrara 2010) (Koch et al. 2011a). Ces VEGFs exercent différentes fonctions biologiques en se liant avec une haute affinité à trois récepteurs à activité tyrosine kinase, les VEGFR-1-3 (figure 7) (Eichmann et Simons 2012) et à leurs co-récepteurs les NRP-1-2 (Grünewald et al. 2010).

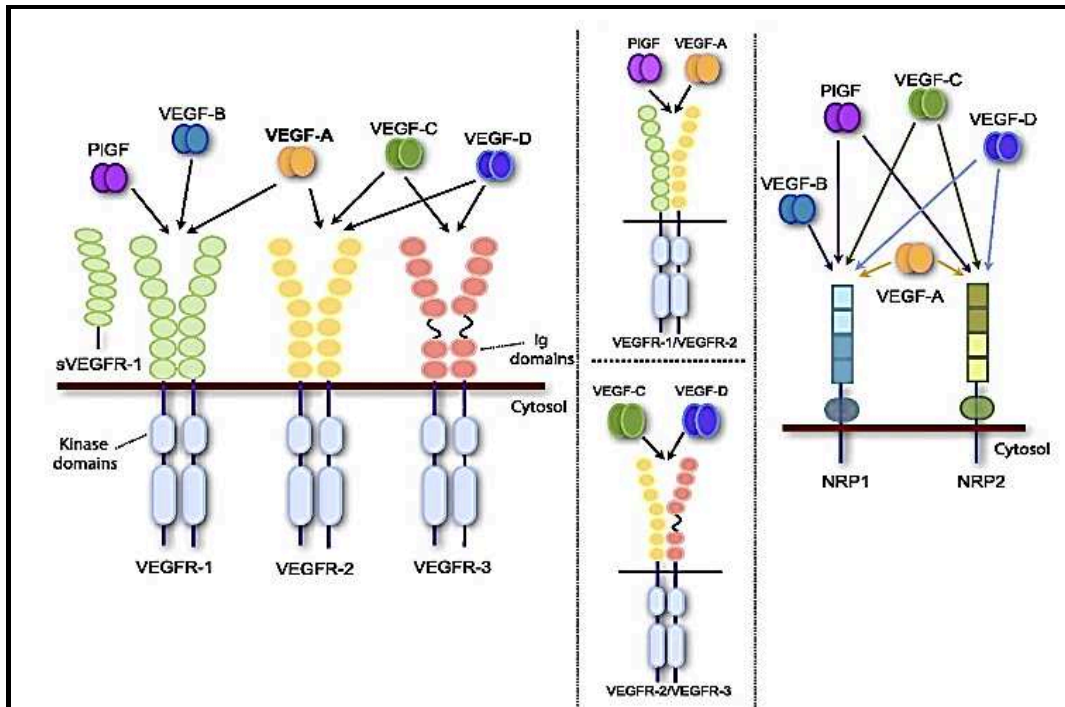


Figure 7. Les membres de la famille du VEGF (A-B-C-D et PIGF) et ses récepteurs VEGFR-1,2,3 et NRP-1,2) (Ruiz de Almodovar et al. 2009). VEGF-A se lie sur les récepteurs VEGFR-2 (nommé encore KDR/Flk-1) et VEGFR-1 (Flt-1). VEGF-C et VEGF-D se lient sur les récepteurs VEGFR-2 et VEGFR-3 (Flt4). PIGF et VEGF-B se lient uniquement sur le récepteur VEGFR-1. VEGF-A et PIGF peuvent également se lier à des complexes de récepteurs hétérodimères formés par VEGFR-1 et VEGFR-2. De même, VEGF-C et VEGF-D sont connus pour lier des hétérodimères formés par le VEGFR-2 et VEGFR-3. Enfin, les neuropilines NRP-1 et NRP-2 peuvent agir en tant que co-récepteurs pour certains complexes VEGF-VEGFR et sont capable de moduler l'activation du VEGFR et leur signalisation. VEGF-A et tous les membres de la famille se lient à la fois aux NRP-2 et NRP-1, sauf VEGF-B qui ne se lie pas à la NRP-1.

2.1.1. Le VEGF-A

Le VEGF-A, connu aussi sous le nom de VEGF, a été découvert par Senger et al. comme étant le Vascular Permeability Factor (VPF) (Senger et al., s. d.). Le VEGF-A est le membre de la famille des VEGF le plus étudié et le mieux caractérisé. Le VEGF-A est un facteur clé dans l'angiogenèse physiologique et tumorale. Le VEGF-A est essentiel pour la formation des vaisseaux sanguins au cours de l'embryogenèse précoce. Son importance au cours du développement physiologique est attestée par le fait qu'une diminution de 50% de son expression est létale au stade embryonnaire (Eichmann et Simons 2012). De plus, sa

surexpression de deux à trois fois entraîne des anomalies sévères dans le développement du cœur et une mort embryonnaire (Miquerol, Langille, et Nagy 2000).

Quelques semaines après la naissance, l'expression du VEGF-A diminue dans la plupart des tissus et reste faible dans les organes adultes, exceptés le plexus choroïde cérébral, les alvéoles pulmonaires, les glomérules rénaux ou le cœur. Son expression est augmentée durant certains processus physiologiques (cicatrisation) et pathologiques. Il est sécrété par divers types cellulaires, tels que les cellules vasculaires au niveau de l'aorte, les kératinocytes, ou les macrophages (Holmes et Zachary 2005). Malgré la complexité du processus d'angiogenèse tumorale et le nombre grandissant de facteurs impliqués, il apparaît que le VEGF-A est un régulateur crucial de ce processus. D'ailleurs son expression, tant sur le plan de son ARNm ou de sa protéine, augmente dans la plupart des tumeurs. De plus, une augmentation de ses taux plasmatiques est détectée chez les patients atteints de cancer (Ferrara 2004a). Pour médier ses activités biologiques, il se fixe sur des récepteurs trans-membranaires à activité tyrosine kinase parmi lesquels on citera le VEGF-R2 ou KDR (Kinase-insert Domain-containing Receptor) et le VEGF-R1 ou Flt-1. Le VEGF-A peut aussi interagir avec des co-récepteurs membranaires tels que les neuropilines (NRP-1 et NRP-2) et les intégrines (Judah Folkman 2007).

2.1.2. Les fonctions biologiques du VEGF-A

Sur le plan biologique, le VEGF-A est un facteur de survie. Il active la prolifération de plusieurs types cellulaires parmi lesquels nous citerons les cellules endothéliales, les cellules de la rétine (Guerrin et al. 1995), les cellules du canal pancréatique (Öberg-Welsh et al. 1997) ou les cellules de Schwann (Sondell, Lundborg, et Kanje 1999). Le VEGF-A est un facteur de protection neuronale (Lambrechts et al. 2003). Il participe aussi au processus inflammatoire, stimule la vasodilatation et augmente la perméabilité vasculaire (figure 8) (Yihai Cao 2014). Dans le cadre de la promotion des cancers, si ses principaux effets consistent en l'induction de la prolifération, de la survie, de la migration des cellules endothéliales et le recrutement des progéniteurs endothéliaux, il est aussi capable d'exercer une fonction autocrine sur les cellules tumorales qui expriment à leur surface les récepteurs VEGFR-1, VEGFR-2 et/ou leurs co-récepteurs NRP-1 et NRP-2, comme les cellules cancéreuses pulmonaires (Alevizakos, Kaltsas, et Syrigos 2013; Goel et Mercurio 2013a). Si on a longtemps pensé que cette boucle autocrine était une boucle

conditionnant la survie et la prolifération des cellules tumorales, des données récentes suggèrent que le rôle du VEGF-A dans ce contexte est plus compliqué qu'initialement envisagé.

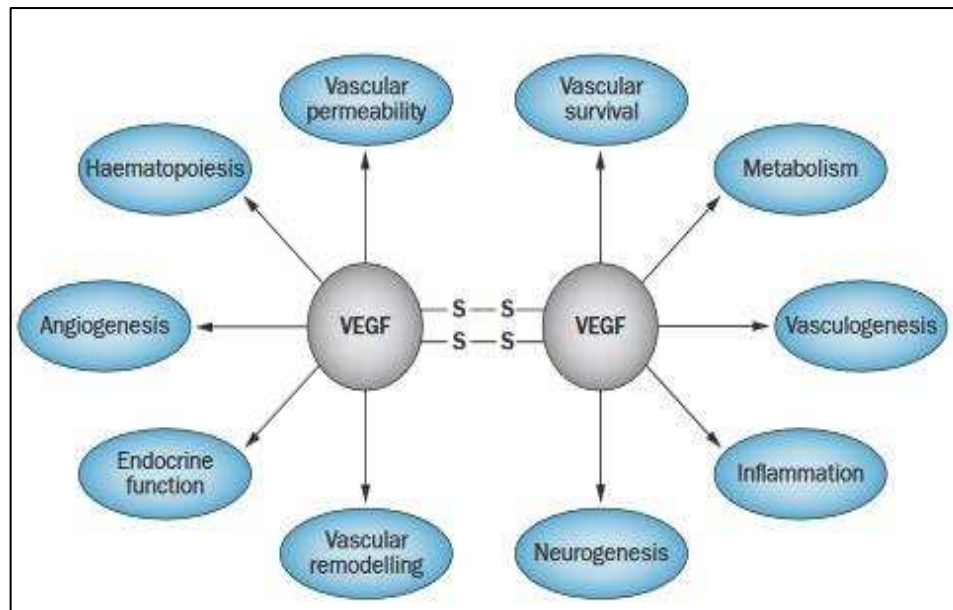


Figure 8. Les fonctions physiologiques et pathologiques du VEGF au cours de l'embryogenèse et dans les tissus adultes (Yihai Cao 2014).

2.1.3. Régulation du VEGF-A

Le *vegfa* est régulé à toutes les étapes concevables de l'expression des gènes (Arcondéguy et al. 2013a). Il est ainsi régulé : (1) au niveau transcriptionnel, mais aussi (2) au niveau post-transcriptionnel via un contrôle de l'épissage alternatif de son ARN pré-messager, (3) au niveau de la stabilité de son ARNm et (4) au niveau de la traduction de son ARNm.

Régulation transcriptionnelle

Le gène *vegfa* humain est situé sur le chromosome 6 à 6p21.3 (Vincenti et al. 1996). Il comprend huit exons et sept introns et s'étend sur environ 14 kb (Tischer et al. 1991). La séquence promotrice du gène *vegfa* représente 1,2 kb chez la souris et le rat (Shima et al. 1996), alors qu'une région de 2,36 kb est critique dans le gène humain (Buteau-Lozano et al. 2002). Ce promoteur est dépourvu d'une séquence consensus pour une boîte TATA, mais il contient

plusieurs sites consensus de liaison pour des régulateurs transcriptionnels, y compris AP1, AP2 et SP1, des régulateurs dépendants de facteurs de croissance, de cytokines, d'hormones, de l'activation de gènes oncogènes et suppresseurs de tumeur (Pagès et Pouyssegur 2005).

L'hypoxie est le mécanisme le plus étudié parmi les facteurs qui régulent l'expression du VEGF-A (Shweiki et al. 1992). Plus précisément, l'hypoxie régule la transcription mais aussi la stabilité et la traduction de l'ARNm du VEGF-A (Dor, Porat, et Keshet 2001). Le vegf-a possède dans son promoteur un élément HRE (Hypoxia Response Element) (Forsythe et al. 1996). En réponse à l'hypoxie, le facteur de transcription HIF-1 se fixe sur HRE et active la transcription du vegf-a (Forsythe et al. 1996). Le facteur de transcription HIF-1 est un hétérodimère composé de deux sous-unités protéiques: la sous-unité HIF-1 α (présente à un taux faible dans le cytoplasme car elle est dégradée par le protéasome) et la sous-unité HIF-1 β (présente de façon constitutive dans le noyau). En conditions normoxiques, HIF-1- α est hydroxylé et fixe ensuite la protéine pVHL (Von Hippel-Lindau). Ce complexe est ensuite dégradé par le protéasome. À l'inverse, en conditions hypoxiques, HIF-1 α n'est pas hydroxylée. La protéine s'accumule alors dans le noyau où elle forme un hétérodimère avec HIF-1 β . Ce dimère se fixe sur les HRE et active la transcription du vegf-a. Le VEGF-A est stimulé aussi par plusieurs facteurs de croissance tels que: l'EGF (Epidermal Growth Factor), le TGF α et le TGF β , l'IGF-1 (Insulin Growth Factor 1), le FGFb et le PDGF. Des cytokines inflammatoires (IL-1 α , IL-1 β , IL-6) induisent aussi l'expression du VEGF-A (Ferrara et Davis-Smyth 2011). Les hormones, la mutation de certains oncogènes tels que Ras (Okada et al. 1998; Milanini et al. 1998) et la voie de signalisation Wnt (X. Zhang, Gaspard, et Chung 2001) ont aussi un rôle dans la régulation de l'expression du VEGF-A.

Régulations post-transcriptionnelles

A côté de la régulation transcriptionnelle, l'expression du vegf-a est contrôlée au niveau de la traduction de son ARNm mais aussi de la stabilité de son ARNm. La stabilité de l'ARNm vegf-a est principalement régulée par des séquences présentes au niveau de l'extrémité 3'-UTR, que sont les séquences ARE (AU-Rich Element) (Barreau, Paillard, et Osborne 2005; Gingerich, Feige, et La Marre 2004). En conditions normoxiques, ces séquences sont la cible de protéines telles que AUF1 ou la tristetraproline (TTP) qui vont déstabiliser l'ARNm vegf-a via le recrutement de la machinerie de dégradation des ARNs (Bernstein et Ross 1989; DeMaria et Brewer 1996; Gorgoni et Gray 2004; Stoecklin et al. 2003; T. Zhang et al. 2002). A l'inverse, en conditions hypoxiques, ces mêmes séquences contribuent à la stabilisation de l'ARNm vegf-a en permettant la liaison de protéines telles que HuR, hnRNPL, PAIP2 (Poly(A)-Binding Interacting Protein 2) (C. Onesto et al. 2006).

Le vegf-a est aussi hautement régulé par l'épissage alternatif de son pré-ARNm qui génère des isoformes dénommées VEGF_{xxx} où le xxx désigne le nombre d'acides aminés dans la protéine mature (figure 9) (Arcondéguy et al. 2013b). Nous pouvons distinguer quatre isoformes différentes ayant respectivement 121, 165, 189, and 206 acides aminés (VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉, VEGF₂₀₆) (Keith A. Houck et al. 1991; Tischer et al. 1991). VEGF₁₆₅ est l'isoforme prédominante. Des variants d'épissage plus rares ont été décrits comprenant les VEGF₁₄₅ (Poltorak et al. 1997), VEGF₁₈₃ (Jingjing et al. 1999) ou VEGF₁₆₂ (Lange et al. 2003). Comme le montre la figure 9, les 5 premiers exons ainsi que l'exon 8 sont conservés dans toutes les isoformes. La génération des différentes isoformes du VEGF-A résulte alors de l'inclusion et/ou exclusion des exons 6a, 6b ou 7. Ainsi, le VEGF₁₈₉ ne possède pas les résidus codés par l'exon 6b, le VEGF₁₆₅ ceux codés par l'exon 6 et le VEGF₁₂₁ ceux codés par les exons 6 et 7. Il existe aussi les formes longues de VEGF, les L-VEGFs. Elles sont initiées au codon CUG présent dans le domaine 5'UTR de l'ARN du messenger du vegf-a. Ce codon contient des séquences IRES (Intra Ribosomal entry site) qui permettent l'initiation de la traduction du VEGF même en condition de stress cellulaire telles que l'hypoxie (Huez et al. 2001; Meiron et al. 2001; Tee et Jaffe 2001; Rosenbaum-Dekel et al. 2005).

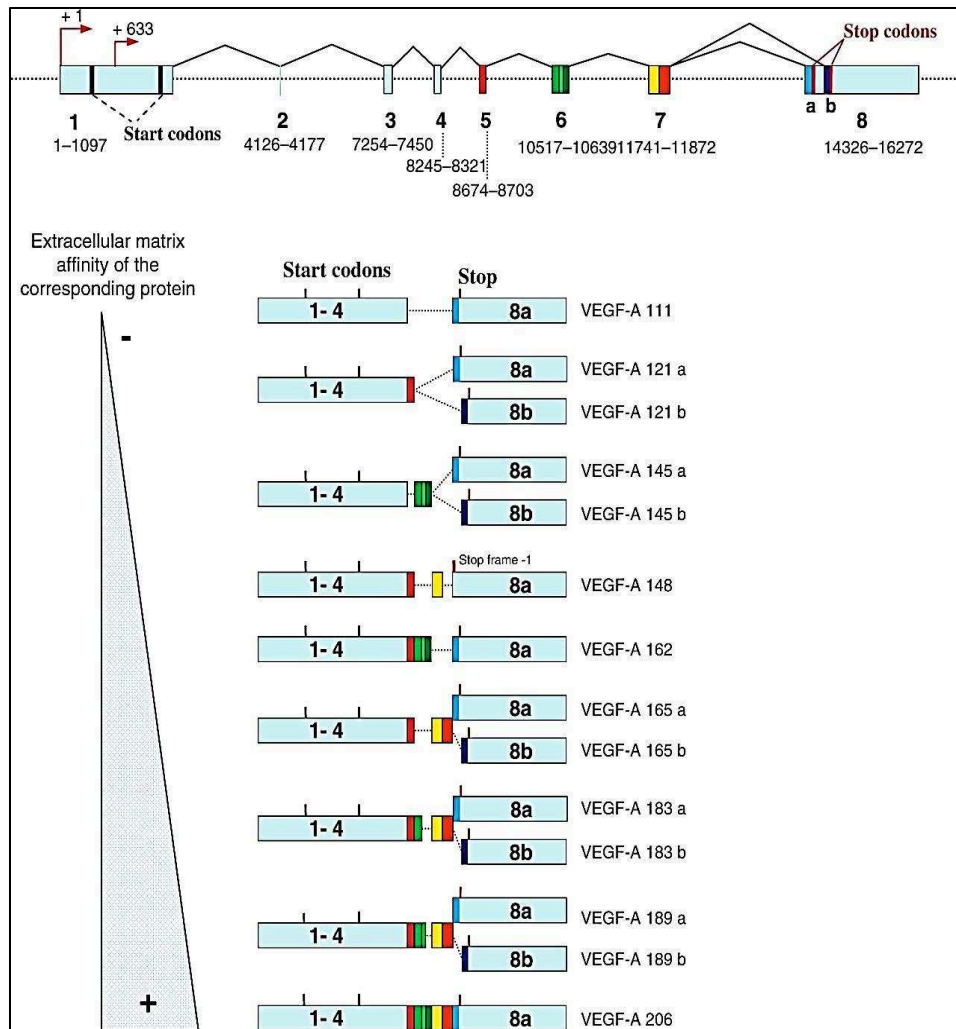


Figure 9. Structure du gène du VEGF-A humain et des différents isoformes de la famille du VEGF-A. Le gène VEGF-A est constitué de huit exons et sept introns. Le gène du vegf-a est hautement régulé par l'épissage alternatif de son pré-ARNm. Toutes les isoformes actuellement décrites contiennent les exons 1-5. Selon la présence des exons 8a ou 8b, nous distinguons la famille des VEGF pro- angiogéniques : VEGF-Axxx et la famille des anti-angiogéniques : VEGF-Axxxb, respectivement. Les exons 6 et 7 codent pour des domaines de liaison à l'héparine responsables de la diffusibilité et de l'affinité à la matrice extracellulaire (Arcondéguy et al. 2013b).

Les exons 6a et 7 du vegf-a codent pour des séquences hautement conservées riches en résidus basiques et qui possèdent une affinité pour l'héparine. La présence ou l'absence de ces résidus va donc conférer une biodisponibilité différente aux isoformes du VEGF-A (Vempati, Popel, et Mac Gabhann 2011). Le domaine de liaison à l'héparine codé par l'exon 6 détermine la liaison à la matrice extracellulaire (MEC). Les isoformes possédant ce domaine, VEGF-A₁₄₅, VEGF-A₁₈₉ et

VEGF-A₂₀₆, sont donc fortement séquestrées dans la MEC (figure 10). Les isoformes du VEGF-A retenues à la MEC constituent un réservoir à partir duquel elles peuvent être rapidement libérées en réponse aux héparinases, héparane sulfate ou aux enzymes protéolytiques telles que la plasmine ou l'uPA (Urokinase-type Plasminogen Activator) (K. A. Houck et al. 1992; Plouët et al. 1997). VEGF-A₁₆₅ ayant uniquement l'exon 7 a une diffusibilité intermédiaire avec 50-70% de liaison à la MEC. Le VEGF-A₁₂₁ qui ne contient aucun des exons 6 et 7 est complètement diffusible (Nathalie Ortega, 1999). L'épissage alternatif du vegf-a contribue donc à la formation d'un gradient de VEGF-A essentiel au processus de néovascularisation tumorale. Les isoformes les plus diffusibles agissent au niveau des sites distaux pour promouvoir le recrutement vasculaire, alors que celles associées à la membrane cellulaire et à la matrice extracellulaire agissent en favorisant l'expansion locale des capillaires (Grunstein et al. 2000) (figure 10).

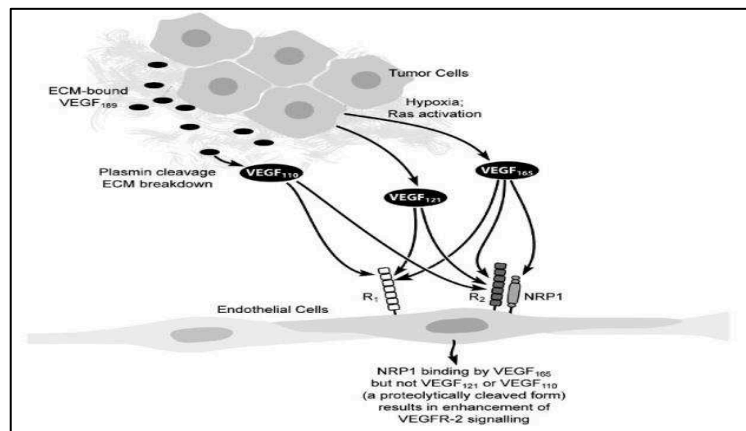


Figure 10. Les différentes isoformes du VEGF-A et leur interaction avec la MEC et les VEGFRs. Les isoformes VEGF₁₂₁ et VEGF₁₆₅ sont les isoformes diffusibles du VEGF-A, qui sont libérées par les cellules et qui peuvent se lier aux VEGFR-1 et VEGFR-2. Le VEGF₁₆₅ mais pas le VEGF₁₂₁ se lie aux neuropilines NRP-1 et NRP-2. Le VEGF₁₈₉ devient actif et diffusible suite à son clivage de la MEC au niveau de son extrémité C terminale (Ferrara 2004a).

En plus des isoformes VEGF_{xxx}, nous distinguons les isoformes VEGF_{xxx}b (figure 9). Les isoformes VEGF_{xxx}b sont issues d'un épissage alternatif au niveau d'un site d'épissage distal (DSS) situé à 66 nucléotides en aval du site d'épissage proximal (PSS) sur l'exon 8, ce qui va aboutir à l'excision de l'exon 8a et l'inclusion de l'exon 8b (David O. Bates et al. 2002). Ces deux épissages génèrent des isoformes qui ont la même taille et la même affinité pour les

VEGFRs mais qui diffèrent uniquement par les six derniers acides aminés de l'extrémité C-terminale. Les VEGF_{xxx} ont une extrémité C-terminale Cys–Asp–Lys–Pro–Arg–Arg (CDKPRR) tandis que les VEGF_{xxx}b ont une extrémité C-terminale Ser–Leu–Thr–Arg–Lys–Asp (SLTRKD) (Ladomery, Harper, et Bates 2007). L'isoforme VEGF₁₆₅b a été la première isoforme identifiée et des études ultérieures ont décrit l'existence d'autres isoformes telles que VEGF-A₁₂₁b, VEGF-A₁₈₃b, VEGF-A₁₄₅b (Perrin et al. 2005) et VEGF₁₈₉b (Miller-Kasprzak et Jagodziński 2008). Cette différence en C-ter modifie la structure tertiaire de la protéine (Cui et al. 2004). Ainsi, le résidu Cys-160 qui forme une liaison disulfure avec le résidu Cys-146 dans l'exon 7 dans le cas des isoformes VEGF_{xxx}, se trouve remplacé par un résidu acide (Asp) dans les isoformes VEGF_{xxx}b. D'autre part, dans les isoformes VEGF_{xxx}b, les deux arginines hautement chargées présentes en C-terminal des isoformes VEGF_{xxx} sont remplacées par un résidu lysine et un résidu acide aspartique. La substitution d'une proline par une arginine contribue également à une modification profonde de la relation structure-fonction de ces isoformes, notamment leur capacité à lier les neuropilines. De plus, l'isoforme VEGF₁₆₅b n'est pas capable de lier l'héparine, malgré la présence de l'exon 7, suggérant une implication directe de l'exon 8a ou une fonction inhibitrice de l'exon 8b dans cette interaction (Delcombel et al. 2012). Ainsi, en comparaison avec les isoformes VEGF_{xxx}, les isoformes VEGF_{xxx}b ont une biodisponibilité et une activité différentes. Les isoformes VEGF_{xxx}b ont d'abord été décrits comme des isoformes ayant une activité anti-angiogénique sur les cellules endothéliales capables d'antagoniser les fonctions des isoformes VEGF_{xxx} (David O. Bates et al. 2002). Cependant, Catena et collaborateurs ont ensuite montré que les VEGF_{121/165}b ne sont pas des isoformes anti-angiogéniques, mais ils sont plutôt faiblement angiogéniques. Ils favorisent ainsi la croissance tumorale et l'angiogenèse dans des modèles in vivo d'ADC (A549) et de prostate (PC-3) (Catena et al. 2010).

2.2 Les récepteurs du VEGF

Les récepteurs du VEGF, VEGFRs (Vascular Growth Factor Receptors), sont des récepteurs à activité tyrosine kinase. On trouve les VEGFR-1 ou Flt-1 (Fms-Like Tyrosine kinase 1), VEGFR-2 ou KDR et VEGFR-3 ou Flt-4 (Fms-Like Tyrosine kinase-4). Ce dernier est un récepteur des VEGF-C et VEGF-D mais pas du VEGF-A.

Les récepteurs VEGFR-1 et VEGFR-2 sont composés d'un domaine extracellulaire constitué de sept domaines immunoglobulines-like liant les ligands VEGF, d'un domaine transmembranaire et d'un domaine tyrosine kinase intracellulaire. Les récepteurs VEGFR-1 et VEGFR-2 sont exprimés principalement par les cellules endothéliales mais aussi par d'autres types cellulaires et notamment certaines cellules cancéreuses. Le VEGFR-3 est exprimé à la surface des cellules endothéliales lymphatiques (Koch et al. 2011a). Suite à la fixation du ligand, les récepteurs VEGFR se dimérisent. Ces dimères sont par la suite stabilisés par des liaisons homotypiques entre les domaines extra-cellulaires Ig-G-like. Ces liaisons servent à stabiliser la liaison du ligand au dimère de récepteurs. Par exemple, en absence de ligand, des forces répulsives exercées par les domaines Ig-like 7 et 4 du VEGFR-2 assurent une faible activité basale du récepteur. Le maintien d'une conformation rigide va permettre de positionner correctement le domaine kinase intracellulaire du dimère de récepteur actif. Ceci va engendrer l'activation de l'activité catalytique tyrosine kinase, les dimères vont ainsi s'auto-phosphoryler au niveau de plusieurs résidus tyrosine spécifiques localisés dans le domaine intracellulaire juxtamembranaire, le domaine kinase et l'extrémité C-terminale du récepteur pour assurer la transduction du signal (figure 11). De ce fait, une variété de molécules sont recrutées vers le dimère de VEGFR, créant un large complexe moléculaire appelé signalosome capable d'activer en aval la cascade de transduction du signal.

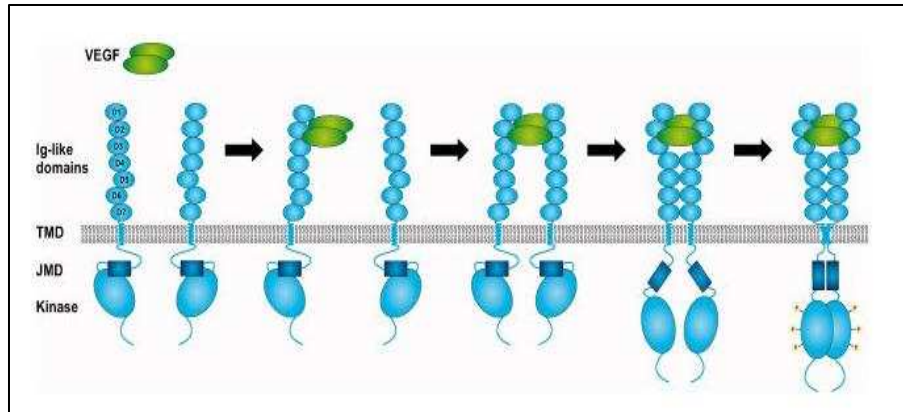


Figure 11. Représentation schématique du mécanisme d'activation des VEGFRs. Un dimère de VEGF lié de manière covalente (vert) se lie au VEGFR (bleu clair et foncé) conduisant à la dimérisation de deux monomères du récepteur. Des interactions supplémentaires entre les domaines de type Ig 4 et 7, les domaines transmembranaires et les domaines juxtamembranaires (bleu foncé) stabilisent le complexe VEGF/VEGFR résultant en une activation du domaine intracellulaire et l'autophosphorylation des résidus tyrosine requis pour la signalisation en aval (Stuttfield et Ballmer-Hofer 2009).

VEGFR-1

La protéine humaine VEGFR-1 est constituée de 1338 acides aminés. Avant toute modification post-traductionnelle, le polypeptide VEGFR-1 est d'environ 150 kDa (Shibuya et al. 1990; Vries et al. 1992a). Après sa synthèse, il est rapidement glycosylé et son poids moléculaire atteint 170 kDa. D'autres glycosylations ont ensuite lieu avant que le récepteur VEGFR-1 ne soit exprimé à la surface cellulaire en tant que protéine mature de 180 à 185 kDa (Vries et al. 1992b; Shibuya et al. 1990). Seule cette forme mature est auto-phosphorylée en réponse aux ligands du VEGFR-1. Des études ont montré que les trois premiers domaines de type Ig sont essentiels pour la liaison du ligand, et le quatrième est important pour la dimérisation du récepteur (Blechman et al. 1995). Le 2^{ème} domaine Ig est la région de liaison directe pour le VEGF-A (T Davis-Smyth et al. 1996; Terri Davis-Smyth, Presta, et Ferrara 1998). La région intracellulaire du VEGFR-1 comporte un domaine à activité tyrosine kinase et une région carboxy-terminale en aval du domaine kinase (Zhou 1993). Le VEGFR-1 est exprimé par les cellules endothéliales (Vries et al. 1992b; Jakeman et al. 1992), les ostéoblastes, les monocytes, les macrophages, les péricytes, les trophoblastes, les cellules rénales (Grosskreutz et al. 1999; Sawano et al. 2001; Schwartz et al. 2010; T. Takahashi et al. 1995) et les cellules souches hématopoïétiques. Le VEGFR-1 est

impliqué dans la migration et la différenciation des monocytes (Barleon et al. 1996) et dans la migration et l'invasion des cellules cancéreuses (Wey et al. 2005). L'expression du VEGFR-1 est augmentée pendant l'angiogenèse et en conditions hypoxiques (Gerber et al. 1997).

Le VEGFR-1 se lie au VEGF-A, VEGF-B et PlGF avec une grande affinité. Cependant, le VEGFR-1 a une faible activité tyrosine kinase en comparaison avec le VEGFR-2 (Ferrara et Davis-Smyth 2011). Le VEGFR-1 peut s'hétérodimériser avec le VEGFR-2 pour former un complexe de plus forte affinité que les homodimères VEGFR-1 (Neagoe 2005). Le VEGFR-1 existe également sous des formes tronquées solubles, car dépourvues de leur domaine transmembranaire et intracytoplasmique. Ces formes solubles peuvent provenir de l'épissage alternatif du pré-ARNm du VEGFR-1 ou du clivage protéolytique du récepteur VEGFR-1. Le poids moléculaire des formes solubles sVEGFR-1 varie en fonction des types cellulaires. Ainsi, ont été décrites des formes migrant à 60 kDa chez la souris (Ambati et al. 2006), à 110 kDa dans les cellules endothéliales de la veine ombilicale (HUVEC) et les cellules endothéliales de la microvasculature au niveau du derme HDMEC (C. Hornig et al. 2000; Richard L. Kendall, Wang, et Thomas 1996) ou à 120–130 kDa dans les cellules de mélanomes COLO-800 (Carsten Hornig et al. 2000). Nous détaillerons longuement le rôle de ses formes solubles du VEGFR-1 dans la partie III.

VEGFR-2

Le récepteur VEGFR-2 est une glycoprotéine de 200 kDa exprimée dans les cellules souches hématopoïétiques (Katoh et al. 1995), dans les cellules de la rétine, les cellules musculaires lisses (CML) (Grosskreutz et al. 1999, Ishida et al. 2001), dans les ostéoblastes et les cellules du canal pancréatique. Le VEGFR-2 régule la migration, la prolifération et la survie des cellules endothéliales. Il est indispensable au cours du développement embryonnaire (Shalaby et al. 1995). Des études ont démontré son rôle dans la lymphangiogenèse (Nagy et al. 2002). VEGFR-2 interagit avec le VEGF-A, le VEGF-C et le VEGF-D. Malgré le fait que le VEGFR-2 fixe le VEGF-A avec une affinité inférieure au VEGFR-1, il reste le récepteur principal qui engendre les effets mitogéniques et angiogéniques du VEGF-A dans les cellules endothéliales (Judah

Folkman 2007). Une forme soluble endogène du VEGFR-2 a également été détectée dans les plasmas humain et murin (Ebos et al. 2004).

2.3 Les co-récepteurs NRP-1 et NRP-2

Le VEGF-A se fixe non seulement sur ses récepteurs RTK, VEGFR-1 et VEGFR-2, mais il interagit aussi avec des co-récepteurs dépourvus d'activité tyrosine kinase que sont les neuropilines (NRP-1 et NRP-2) (Soker et al. 1998; Poltorak et al. 1997). Les NRPs ont un rôle important dans l'angiogenèse physiologique et pathologique (Staton et al. 2007). Les NRP-1 et NRP-2 sont des glycoprotéines transmembranaires de 120-130 KDa possédant un domaine N terminal large (840 acides aminés) et des domaines transmembranaires et cytoplasmiques beaucoup plus petits de 25 et 40 acides aminés respectivement (Pellet-Many et al. 2008). Le domaine extracellulaire est divisé en trois domaines : le domaine A constitué de deux unités a1/a2, le domaine B constitué de deux unités b1/b2 et le domaine C impliqué dans l'oligomérisation du récepteur (figure 12). Alors que la NRP-1 existe sous une forme transmembranaire, la NRP-2 existent sous deux formes, les isoformes NRP-2a et NRP-2b, qui sont issues d'un épissage alternatif. La NRP-2a est abondante dans le plasma, le foie et les poumons, et elle est peu exprimée dans les muscles squelettiques alors que pour la NRP-2b, c'est l'inverse (Rossignol, Gagnon, et Klagsbrun 2000). Les NRPs existent aussi sous quatre formes de NRP-1 solubles appelées sNRP-1 (s12NRP-1, s11NRP-1, sIIINRP-1 et sIVNRP-1) et sous une forme sNRP-2 (s9NRP-2) (Cackowski et al. 2004; Rossignol, Gagnon, et Klagsbrun 2000).

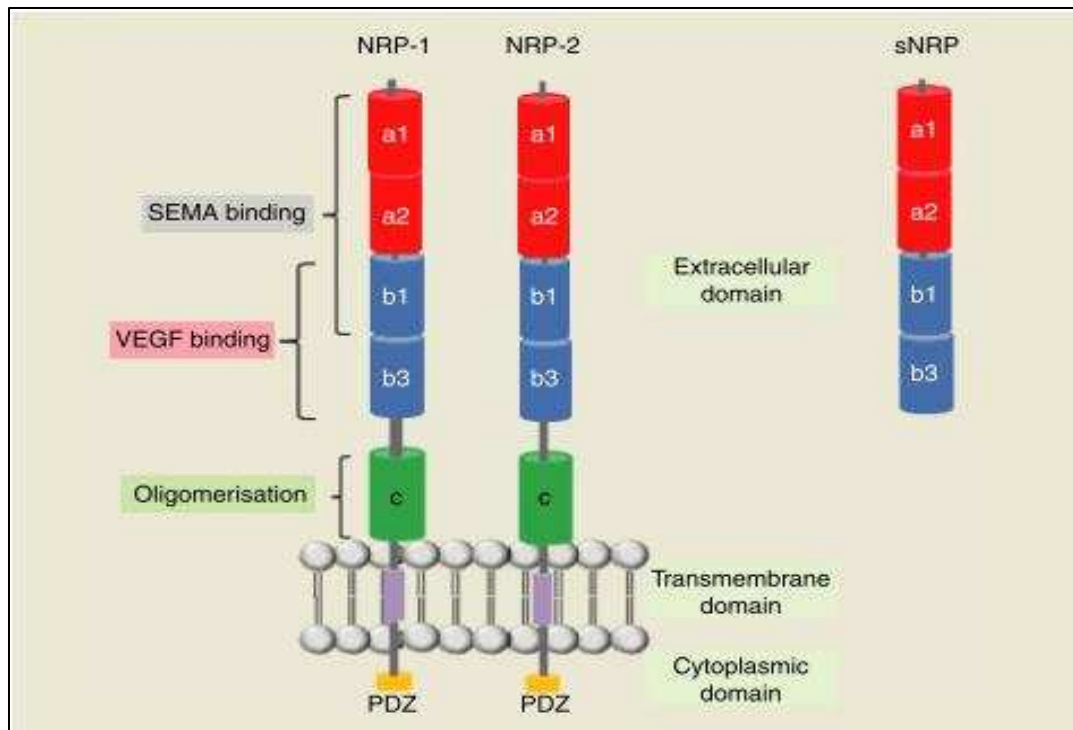


Figure 12. La famille neuropilines et leurs ligands. Les sémaphorines de classe 3 et les VEGFs se lient aux NRP-1 et NRP-2 avec des spécificités et des affinités différentes. Le domaine cytoplasmique des plexines contient deux blocs d'homologie partagée avec des protéines GTPase. Les formes solubles de NRP, sNRP, ne possèdent que le domaine extracellulaire (Wild et al. 2012).

Les NRPs interagissent avec deux types de ligands: les sémaphorines de troisième classe et les VEGFs. Les ligands de la NRP-1 sont les VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, PlGF-2, HGF, SEMA3A, SEMA3B et SEMA3C. Les ligands de la NRP-2 sont les VEGF₁₆₅, VEGF₁₄₅, VEGF-C, VEGF-D, HGF, SEMA3B, SEMA3C et SEMA3F (Geretti, Shimizu, et Klagsbrun 2008). Les différents ligands se fixent sur les domaines A et/ou B des neuropilines avec une spécificité différente entre la NRP-1 et la NRP-2. La SEMA se fixe à la fois sur le domaine A par son extrémité N-terminale et sur le domaine B par son extrémité C-terminale. Seules les isoformes du VEGF-A qui possèdent dans leur séquence la partie codée par les exons 7 et 8 et possédant une Arg/Lys en C-terminal sont capable d'interagir avec les NRPs (Parker et al. 2012). Récemment, un rôle de l'exon 5 du VEGF-A a aussi été impliqué dans la liaison à la neuropiline-1 (Delcombel et al. 2012).

2.4 Les intégrines: structure et fonction de nouveaux partenaires d'interface

Si le VEGF agit principalement par le VEGFR-2, cela ne l'empêche pas de contrôler l'activité fonctionnelle des intégrines. En effet, le VEGF₁₆₅ semble capable d'activer plusieurs intégrines impliquées dans l'angiogenèse, $\alpha V\beta 3$, $\alpha V\beta 5$, $\alpha 5\beta 1$ et $\alpha 2\beta$ dans les cellules endothéliales (Byzova et al. 2000). Les intégrines sont des récepteurs transmembranaires hétérodimériques constitués de deux sous-unités α et β qui relient la MEC au cytosquelette. Chez les mammifères, il existe 18 sous-unités alpha et huit sous-unités β dont l'assemblage donne lieu à 24 intégrines différentes (figure 13). Chaque sous-unité est constituée d'un grand domaine extracellulaire, d'un domaine transmembranaire unique et d'un court domaine cytoplasmique (à l'exception de l'intégrine $\beta 4$) qui est dépourvu d'activité enzymatique et est capable d'interagir avec de nombreuses protéines intracellulaires (Aplin et al. 2001; Askari et al. 2009; Z.-X. Luo et al. 2007; Bennett, Berger, et Billings 2009). Les intégrines interagissent avec un grand nombre de protéines de la MEC parmi lesquelles on peut citer: les protéines de la matrice osseuse, les collagènes, la fibronectine, le fibrinogène, les laminines, les thrombospondines ou la vitronectine. Cela confère aux intégrines un rôle primordial dans le contrôle de l'adhésion des cellules à la MEC. Les intégrines sont impliquées aussi dans d'autres fonctions physiologiques comme la migration cellulaire, la prolifération, la différenciation ou l'apoptose.

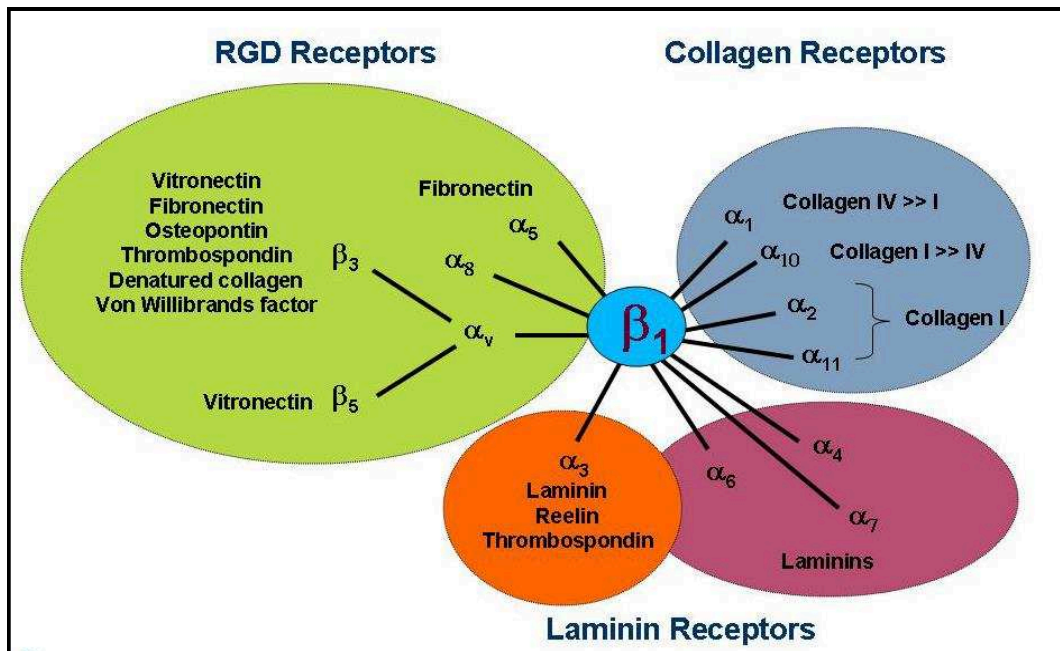


Figure 13. Les récepteurs intégrines et leurs ligands. La famille des intégrines peut être divisée en trois sous-groupes : le sous-groupe des β_1 , α_v et β_2 . Les intégrines β_1 et α_v sont exprimées de façon ubiquitaire alors que le sous-groupe des intégrines β_2 est sélectivement exprimé dans les leucocytes. Des différences d'assemblage entre les sous-unités α et β forment des hétérodimères de récepteurs d'intégrines : les récepteurs RGD, les récepteurs aux collagènes et les récepteurs laminines (Lal 2009).

L'activation des intégrines peut contrôler la migration des cellules et l'agrégation plaquettaire. Finalement, la perte ou le gain d'expression de certaines intégrines, leur dérégulation ou encore la modification de leurs ligands extracellulaires sont à la base de certaines pathologies tels que le syndrome LAD (Leuocyte Adhesion Deficiency), la dystrophie musculaire congénitale (Mayer et al. 1997) ou encore le développement tumoral et la formation de métastases (Schneider, Amend, et Weilbaecher 2011; White et al. 2004).

3. Signalisations dépendantes des récepteurs VEGFR : cellules endothéliales, des cibles majeures

Le VEGF-A se fixe sur la partie N-terminale extra-cellulaire du domaine des récepteurs VEGFRs entraînant ainsi la dimérisation des récepteurs et la formation d'homo- ou d'hétéro-dimères. La dimérisation s'accompagne d'un changement conformationnel dans le domaine intracellulaire conduisant à un transfert d'un groupement phosphate de l'ATP vers un résidu tyrosine du dimère ce qui va induire l'activation du domaine tyrosine kinase des récepteurs par auto- ou trans-phosphorylation. Les résidus tyrosine phosphorylés vont servir de sites d'ancrage pour des protéines adaptatrices à domaine SH2 (Src homology domain 2) qui vont pouvoir ensuite recruter d'autres protéines agissant en cascade pour stimuler différentes voies de signalisation intracellulaires (Lemmon et Schlessinger 2010). Les cellules endothéliales représentent un des modèles d'étude majeurs de la signalisation dépendante des VEGFRs.

3.1 Signalisation dépendante du récepteur VEGFR-1

Le VEGFR-1 est un récepteur avec une très faible activité tyrosine kinase malgré sa forte affinité de liaison au VEGF-A (Shinkai et al. 1998). Cette faible activité a été expliquée par la présence d'une séquence inhibitrice (Ito et al. 1998). Six sites de phosphorylation en C-terminal ont été identifiés et comprennent les tyrosines Tyr⁷⁹⁴, Tyr¹¹⁶⁹, Tyr¹²¹³, Tyr¹²⁴², Tyr¹³²⁷ et Tyr¹³³³ (figure 14). Les sites de phosphorylation (Tyr1213/Tyr1242) sont considérés comme des sites majoritaires et les sites (Tyr1327/Tyr1333) sont considérés comme des sites minoritaires de phosphorylation (Ito et al. 1998). Ces sites ont des spécificités qui dépendent des ligands du VEGFR-1. Ainsi, il a été montré que la liaison du VEGF₁₆₅ à ce récepteur induit une phosphorylation du résidu Tyr1213, alors que la liaison du PlGF induit une phosphorylation au niveau de la Tyr1309 (Autiero et al. 2003). Les sites de phosphorylation du VEGFR-1 peuvent servir comme sites d'ancrage à plusieurs molécules adaptatrices telles que PI3Kinase (Igarashi et al. 1998). Dans les monocytes, le VEGF-B et le PlGF activent en aval plusieurs voies de signalisation telles que les voies des MAPKs (Mitogen-Activated Protein Kinase), PI3K/AKT et la voie p38MAPK (Tchaikovski, Fellbrich, et Waltenberger 2008). In vitro, le VEGFR-1 affecte aussi la migration des cellules endothéliales à travers la modulation de la réorganisation des

filaments d'actine par l'activation de p38 MAPK et de la paxilline (Kanno et al. 2000). Bien que peu décrites jusqu'à présent, des modifications post-traductionnelles autres que des phosphorylations sont aussi capables de moduler l'activité du VEGFR-1. Ainsi, l'histone méthyl transférase SMYD3 méthyle la lysine 831 du domaine kinase du VEGFR-1, ce qui stimule l'activité kinase du récepteur «in vitro» et «in vivo» (Kunizaki et al. 2007).

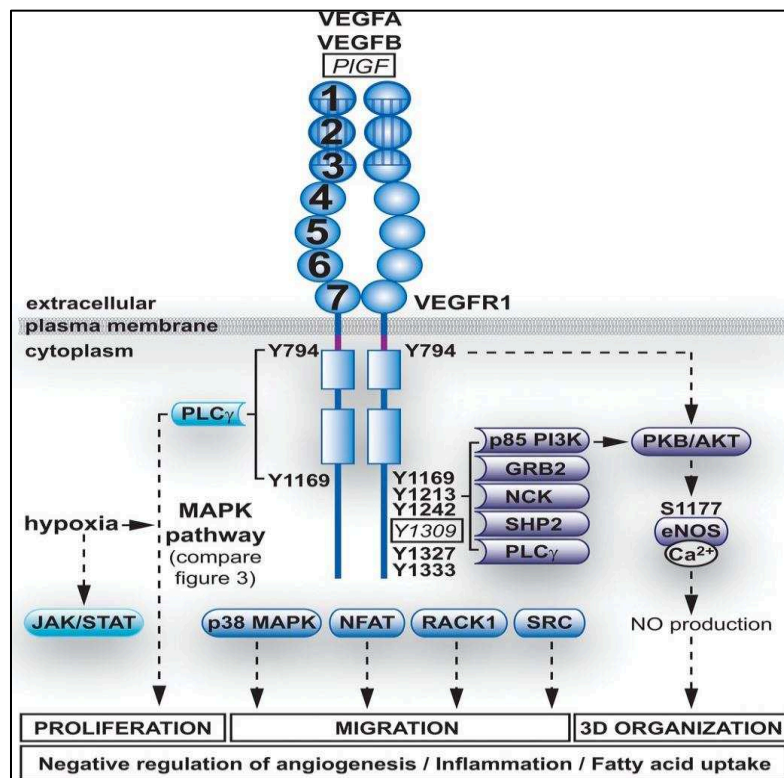


Figure 14 Représentation schématique des sites de phosphorylation (indiqués par des numéros) et des voies de signalisation d'aval du récepteur VEGFR-1. Les cercles hachurés représentent les domaines de liaison des ligands. Le résidu Tyr1309 est phosphorylé uniquement suite à la fixation du PlGF. L'absence de résidus phospho-tyrosine dans le domaine kinase ainsi que la présence d'une séquence inhibitrice dans le domaine juxta-membranaire pourraient expliquer la faible activité kinase du VEGFR-1. Le recrutement de protéines adaptatrices (forme en fusée) au niveau de certains sites de phosphorylation déclenche l'activation de molécules de signalisation en aval (ovales), conduisant à des réponses biologiques spécifiques (Koch et al. 2011).

3.2 Signalisation dépendante du VEGFR-2

Le VEGFR-2 est le récepteur principal médiant les activités angiogéniques sur les cellules endothéliales. Il est en effet fortement exprimé à la surface de ces cellules ainsi qu'à la surface des progéniteurs endothéliaux circulants. Bien que le VEGFR-2 possède une affinité plus faible pour le VEGF-A que le VEGFR-1, son activité tyrosine kinase en réponse aux ligands est plus robuste. Les sites majeurs de phosphorylation du récepteur VEGFR-2 sont la tyrosine 951 (Tyr951) située dans le domaine « insert-kinase », les tyrosines (Tyr1054 et Tyr1059) situées dans le domaine kinase et les tyrosines (Tyr1175, Tyr1214) situées dans le domaine C terminal (T. Takahashi 2001; Matsumoto et al. 2005). La phosphorylation des tyrosines Tyr1054 et Tyr1059 est nécessaire pour obtenir une activité kinase maximale (T. Takahashi 2001). Les principales voies de signalisation activées en aval sont les voies des MAP kinases (ERK, PI3K/AKT, Src et Rac). Elles sont différenciellement activées en fonction des résidus phosphorylés. D'autres sites de phosphorylation ont été également identifiés parmi lesquels nous citerons les tyrosines Tyr1305, Tyr1309 et Tyr1319 (figure 15) (Matsumoto et al. 2005)

La **Tyrosine 1175 (Tyr1175)** est impliquée dans l'activation de la prolifération des cellules endothéliales (Tomoko Takahashi et al. 2001). Elle est indispensable à l'action du VEGF-A sur le développement vasculaire. La mutation de ce site est létale chez la souris à un stade embryonnaire précoce parce qu'elle induit des défauts vasculaires similaires à ceux des souris *vegfr-2/-* (Sakurai et al. 2005). La phosphorylation de ce résidu permet la liaison aux protéines adaptatrices PLC, SHB (SH2-domain-containing adaptor protein B) (Holmqvist et al. 2004) et SHC (Srchomology and Collagen Homology-related adaptor protein) (Warner et al. 2000). SHB recrutée se lie ensuite à FAK (Focal Adhesion Kinase) (Holmqvist et al. 2003). Cette liaison active la voie PI3K/AKT/PKB ainsi que le substrat de la FAK, paxilline (Parsons 2003; Abedi et Zachary 1997). De plus, la migration cellulaire est régulée par IQGAP1 (Ras GTPase-Activating-like Protein), qui se lie sur le récepteur phosphorylé et active Rac 1 en inhibant l'activité de GTPases (Guanosine TriPhosphate hydrolases) (Hart et al. 1996). IQGAP1 co-localise avec le VEGFR-2 phosphorylé au niveau du front de migration des cellules endothéliales (Yamaoka-Tojo et al. 2004). La prolifération des cellules endothéliales induite par le VEGF-A passe aussi par la voie Ras-Raf-MEK-ERK (Meadows, Bryant, et Pumiglia 2001). Pour activer

cette voie, le site phosphorylé sur Tyr1175 de VEGFR-2 se lie à SHC ou GRB2 qui recruterait à son tour SOS (Warner et al. 2000; Kroll et Waltenberger 1997). Cependant, l'interaction directe de VEGFR-2 avec GRB2 reste actuellement encore controversée.

En dehors de la phosphorylation de sa tyrosine 1175, le VEGFR-2 peut être phosphorylé sur sa tyrosine1214 (Tyr1214). Cette phosphorylation induit une activation séquentielle de la protéine CDC42 (Cell Division Cycle 42) qui est responsable du remodelage de l'actine stimulé par le VEGF-A (Lamalice et al. 2004). p38-MAPK peut induire aussi la phosphorylation de la protéine de stress thermique HSP27 (Heat Shock Protein 27), une protéine chaperonne qui régule positivement le réarrangement de l'actine et la migration sous l'effet du VEGF-A (McMullen et al. 2005; Rousseau et al. 1997). Un autre site de phosphorylation important est la **tyrosine 951 (Tyr951)** qui est le site de fixation de la protéine adaptatrice TSAd (T-Cell-Specific Adaptator) nommée aussi VRAP (VEGF Receptor-Associated Protein). Le VEGF-A stimule la formation de complexes entre TSAD et SRC et la signalisation Tyr951-TSAd régule la migration des cellules endothéliales (Matsumoto et al. 2005).

Tout comme le VEGFR-1, le VEGFR-2 est enfin capable d'être méthylé sur de multiples résidus Arginine et Lysine, incluant le résidu lysine 1041. Cette méthylation est indépendante de la liaison du ligand VEGF-A mais elle augmente la phosphorylation sur résidu tyrosine et l'activité kinase du récepteur en présence de ligand (Hartsough et al. 2013).

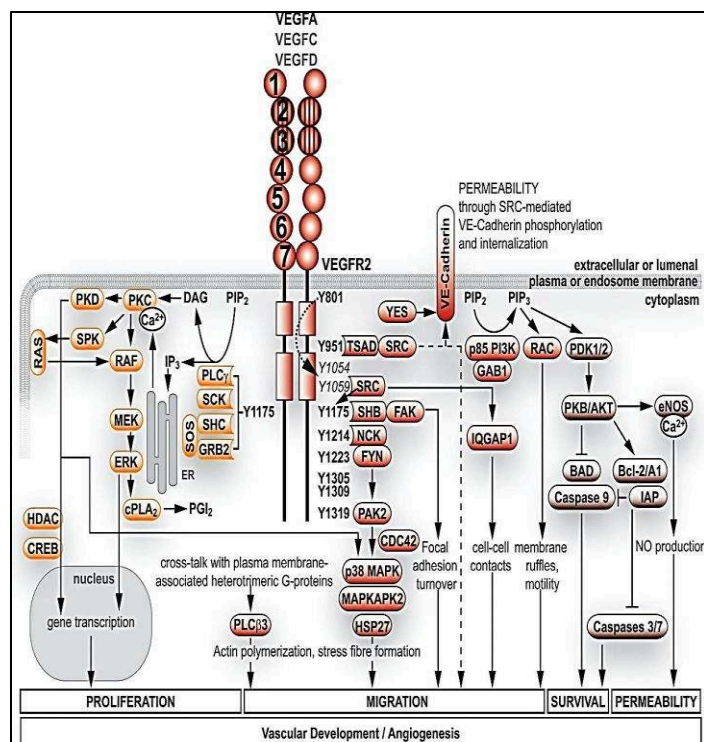


Figure 15. Représentation schématique des sites de phosphorylation (indiqués par des numéros) et des voies de signalisation d'aval du récepteur VEGFR-2. Suite à la fixation du VEGF-A aux domaines extracellulaires de type Ig 2 et 3 du VEGFR-2 (cercles hachurés), des protéines adaptatrices (forme de fusée) sont recrutées vers les sites de phosphorylation (indiqués par des numéros) dans le domaine intracellulaire du VEGFR-2 afin d'activer plusieurs voies de signalisation en aval (formes ovales). Le réseau complexe des voies intracellulaires de transduction du signal contribue aux réponses biologiques telles que la prolifération, la migration, la survie et la perméabilité cellulaires (Koch et al. 2011a).

3.3 Signalisation dépendante des neuropilines

Les NRPs sont considérées comme des co-récepteurs qui lient des ligands extracellulaires avec une affinité élevée et qui interagissent avec des récepteurs transmembranaires (par exemple, le VEGFR-2 ou les plexines). Néanmoins, il a aussi été montré que le VEGF-A peut aussi activer les voies de MAP kinases (ERK et AKT) indépendamment des VEGFRs en se fixant sur les NRPs dans les cellules cancéreuses MCF-7 et 786-O (Y. Cao et al. 2012). Toutefois, le rôle des NRPs n'est pas encore totalement défini dans les cellules endothéliales et dans d'autres types cellulaires. Soker et collaborateurs ont identifié la NRP-1 comme un co-récepteur qui lie le VEGF-A avec une haute affinité dans les cellules endothéliales. La signalisation activée par le VEGF₁₆₅ via la NRP-1 se ferait par la formation de complexes ternaires entre le VEGF₁₆₅, NRP-1 et VEGFR-2 (Soker et al. 1998; Gluzman-Poltorak et al. 2000). Contrairement au VEGF₁₆₅, le

VEGF₁₂₁, ne possède pas l'exon 7. Il peut se fixer à la NRP-1 mais ne permet pas la formation du complexe ternaire (Pan et al. 2007; Shraga-Heled et al. 2007). Les résidus d'acides aminés en C-terminal du récepteur (SEA) se lient directement avec le domaine PDZ (PSD-95/Dlg/ZO-1) des protéines (GIPC)/synectin (Cai et Reed 1999). Cette liaison permet l'établissement d'interactions entre le domaine cytoplasmique des NRPs et des molécules de signalisation intracellulaires (Cai et Reed 1999; Prahst et al. 2008). La co-expression de NRP-1 avec le VEGFR-2 améliore la signalisation du VEGFR-2. Cet effet stimulateur repose sur la stabilisation du récepteur à la membrane plutôt que sur l'augmentation de l'affinité intrinsèque du VEGF-A pour son récepteur (Gelfand et al. 2014). En effet, la formation du complexe NRP-1-VEGFR-2 stabilise le VEGFR-2 à la surface cellulaire et le rend moins sujet à une endocytose et donc en mesure d'augmenter la durée et l'amplitude du signal transduit. Il semblerait que la NRP-1 ne soit pas essentielle pour l'induction des réponses biologiques médiées par le VEGF-A, mais qu'elle soit plutôt nécessaire à l'activation optimale des voies de signalisation stimulées par le VEGF-A, et à une fonction maximale dans le cas de certains processus biologiques, en particulier la migration cellulaire.

3.4 Signalisation dépendante des intégrines

Les intégrines sont impliquées dans une signalisation bi-directionnelle. Cela veut dire qu'elles sont capables d'émettre des signaux de l'extérieur vers l'intérieur de la membrane plasmique « signalisation outside-in » ou bien de l'intérieur vers l'extérieur de la membrane plasmique « signalisation inside-out » (Hynes 2002; Longhurst et Jennings 1998) (figure 16). Dans la signalisation « outside-in » qui est une signalisation classique à tous les récepteurs, les intégrines fixent leurs ligands présents au niveau de la MEC et s'agrègent pour former des « clusters » ou des plaques d'adhérences focales. Ainsi, les intégrines recrutent des protéines du cytosquelette telles que la taline ou la vinculine pour constituer des réseaux de filaments d'actine. A part son rôle dans l'adhérence et dans le remodelage de la matrice, les intégrines activées recrutent des tyrosine kinases cytosoliques, comme la FAK (Focal Adhesion Kinase), SRC et CSK qui vont déclencher des voies de signalisation telles que les voies PI3kinase/AKT et Ras/MAP-kinase (Stawowy et al. 2005). Ces voies de signalisations intracellulaires activées vont augmenter l'affinité de l'intégrine pour son ligand extracellulaire. C'est ce que l'on appellera signalisation « inside-out ». Plusieurs récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) s'associent aux intégrines, et

cette association est essentielle pour la régulation de l'activité kinase de ces récepteurs (Somanath, Ciocea, et Byzova 2009). Le VEGF-A apparaît capable de favoriser les connections entre les voies de signalisation dépendantes des VEGFR et des intégrines dans les cellules endothéliales. Ainsi, le VEGFR-2 activé par son ligand active de multiples intégrines via la voie PI3K/AKT (Byzova et al. 2000). A l'inverse, les intégrines peuvent conditionner l'activation des VEGFR, comme montré pour l'intégrine $\alpha\beta_3$ qui forme un complexe avec le récepteur VEGFR-2 et stimule sa phosphorylation (Soldi et al. 1999). De la même façon, la phosphorylation du VEGFR-2 est augmentée lorsque les cellules endothéliales sont étalées sur des protéines de la MEC telles que la vitronectine et le fibrinogène, qui sont des ligands pour les intégrines $\alpha\beta_3$ (Plow et al. 2000).

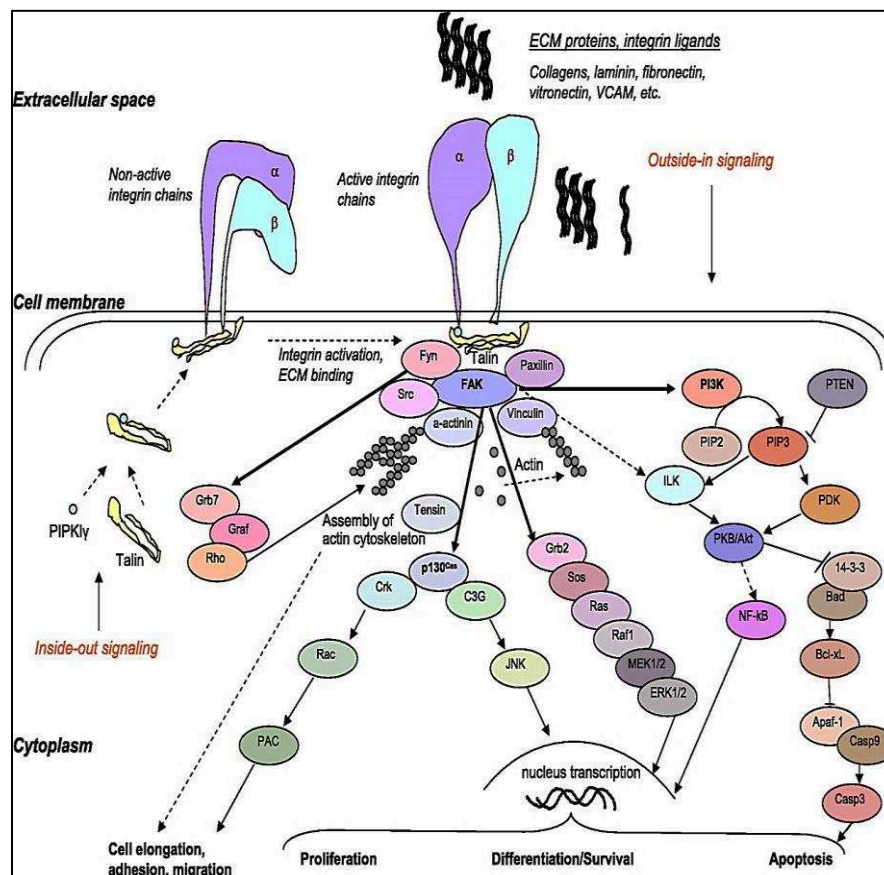


Figure 16. L'activation et la signalisation bi-directionnelle « inside-out » et « outside-in » des intégrines (Patsenker et Stickel 2011).

4. Signalisation autocrine et intracrine des VEGFRs : une expression tumorale de ces récepteurs et de leurs co-récepteurs

A côté de la signalisation bien décrite de l'axe VEGF-A/VEGFRs au niveau des cellules endothéliales, des études ont aussi rapporté un rôle autocrine/intracrine de cet axe au niveau des cellules tumorales. Ces études se basent sur l'existence des VEGFR et de leur co-récepteurs à la surface et en intra-cellulaire dans différents types de cancers dont les cancer pulmonaires, colorectaux, etc....comme le montre le tableau 5 (Goel et Mercurio 2013b).

De façon intéressante, les hauts niveaux de VEGFR-1 et de NRP-1 ont été corrélés avec une mauvaise survie chez les patients porteurs de cancer du sein (Ghosh et al. 2008). D'autre part, le VEGFR-1 a été décrit comme marqueur prédictif de risque de récurrences locales et de métastases dans le cancer du sein (Dales et al. 2003). De plus, les patients porteurs de CBnPCs expriment de hauts niveaux de VEGFR-2 et de NRP-1 qui sont corrélés avec une progression et le développement de métastases dans ces cancers (Ding et al. 2014). Masood et collaborateurs ont montré que les mélanomes, le cancer de l'ovaire et le cancer du pancréas co-expriment le VEGF-A, ses récepteurs VEGFR-1/2 et qu'une boucle autocrine VEGF-A/VEGFR est activée dans ces cancers. Cela est tout à fait en accord avec le dogme selon lequel la boucle autocrine dépendante des VEGF-A/VEGFR dans les tumeurs promeut la prolifération, la survie, la migration et l'invasion des cellules tumorales (Perrot-Applanat et Di Benedetto 2012; Medinger, Fischer, et Tzankov 2010). Cependant, des études ont montré un rôle plus complexe de cette boucle autocrine. Ainsi, dans les glioblastomes, il a été montré que le VEGF₁₆₅ prévient l'invasion tumorale et la transition mésenchymateuse en activant une boucle MET/VEGFR-2 (Lu, et al. 2012).

Récepteur	Cancer
VEGFR-2	Vessie, cerveau, sein, cervical, colon, endométrial, gastrique, tête et cou, hépatocellulaire, poumon , mélanome, myélome multiple, leucémies myéloïdes œsophageal, ovarien, pancréatique et prostatique, carcinome rénal, et thyroïdien.
VEGFR-1	Vessie, cerveau, sein, colon, tête et cou, poumon , mélanomes, mésothéliome, leucémies myéloïdes, œsophageal, ovarien, pancréatique et prostatique.
NRP-1	Cerveau, sein, colon, poumon , mélanome, ovarien, pancréatique et prostatique.
NRP-2	Vessie, sein, colon, poumon , mélanome, ovarien, pancréatique, prostatique et rénal.

Tableau 5 Expression tumorale des différents récepteurs VEGFR-1, VEGFR-2, NRP-1 et NRP-2 dans les cancers (Goel et Mercurio 2013b).

4.1 Signalisations intracrine et autocrine du VEGFR-1

Le VEGFR-1 est un récepteur beaucoup plus complexe que les autres car il existe sous différentes et nombreuses formes. En effet, à part les variants solubles du VEGFR-1 dont je reparlerai, cinq variants intra-cellulaires ont été décrits et regroupés sous la dénomination iVEGFR-1 (figure 17). Ces isoformes dérivent de l'utilisation de sites alternatifs d'initiation de la transcription au niveau des séquences introniques du *vegfr-1* (intron 15, 18 ou 21) conduisant à la synthèse d'isoformes protéiques tronquées ayant perdu leur domaine extra-cellulaire mais conservant tout ou partie de leur domaine kinase (Mezquita et al. 2010; Mezquita et al. 2014). Dans les cellules de cancer du sein MDA-MB-231, Mezquita et ses collaborateurs ont identifié cinq isoformes de VEGFR-1 intracellulaires, dénommées en fonction de l'intron à partir duquel elles sont initiées, i_{15} VEGFR-1, i_{15as} VEGFR-1, i_{18} VEGFR-1, i_{21} VEGFR-1 et i_{21as} VEGFR-1. Parmi les iVEGFR-1s, le variant i_{21} VEGFR-1 a été impliqué dans la signalisation intracrine du VEGFR-1 dans ces cellules. Plus précisément, il a été montré que ce variant formait un complexe avec la kinase SRC qui est alors phosphorylée sur sa tyrosine 418. Le mécanisme impliqué dans l'activation de SRC par le i_{21} VEGFR-1 reste jusqu'alors inconnu (Mezquita et al. 2010).

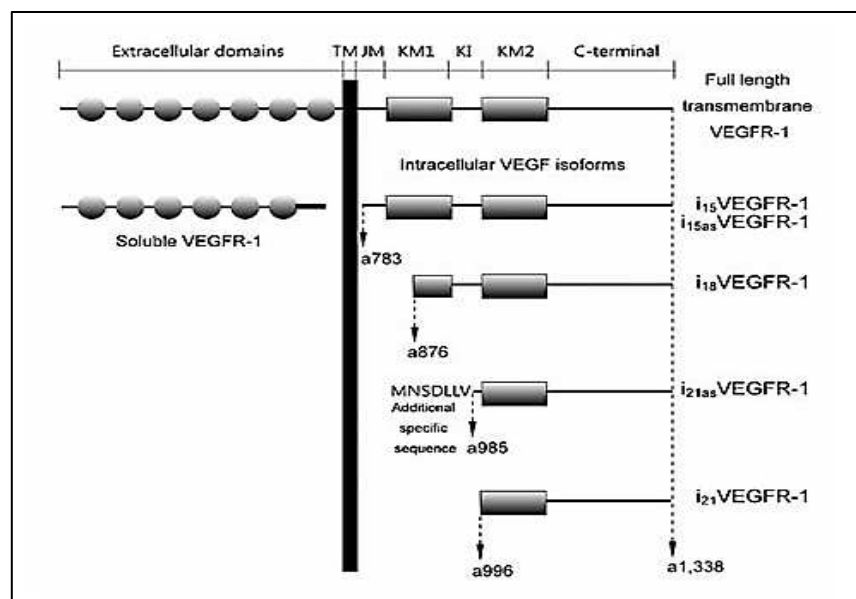


Figure 17 Représentation schématique du VEGFR-1, sVEGFR-1 et des différentes isoformes intracellulaires du VEGFR-1. L'isoforme i15-VEGFR-1 possède tous les domaines intracellulaires. L'isoforme i18-VEGFR-1 est constituée d'une partie du domaine de liaison à l'ATP, le domaine kinase, le domaine phosphotransférase, et la queue C-terminale. L'isoforme i21-VEGFR-1 possède le domaine phosphotransférase et la queue C-terminale. L'isoforme i21as-VEGFR-1 possède le domaine phosphotransférase, ainsi que onze acides aminés du domaine kinase, la séquence MNSDLLV et la queue C-terminale (Mezquita et al. 2010).

A côté de ces variants intracellulaires, des rôles autocrine et intracrine du VEGFR-1 ont aussi été décrits. Ainsi, dans les tumeurs de la peau, une boucle autocrine dépendante du VEGFR-1 et la NRP-1 synergise avec la voie de l'EGFR pour activer la signalisation dépendante des kinases ERKs et promouvoir la tumorigénèse (Lichtenberger et al. 2010). De plus, Lee et collaborateurs ont retrouvé une expression intracellulaire au niveau de l'enveloppe nucléaire du VEGFR-1, dans les cellules de cancer du sein MDA-MB-231 et MCF-7 ainsi que dans les tumeurs primaires mammaires. Ce VEGFR-1 intra-cellulaire assurerait la survie de ces cellules cancéreuses de façon VEGF-dépendante et cela en activant la voie AKT (T.-H. Lee et al. 2007). Une autre étude a montré que le VEGFR-1 et le VEGF-A sont exprimés en intracellulaire dans le cytoplasme et sur la membrane nucléaire dans les cellules du cancer colorectal. Le VEGFR-1 endogène jouerait un rôle très important dans l'activation des voie AKT et ERK médiée par le VEGF intracellulaire (Bhattacharya et al. 2016). Ces données suggèrent donc que le VEGF-A est capable de former un complexe VEGF-VEGFR-1 en intracellulaire qui contrôlerait une boucle intracrine de survie dans les cellules tumorales. L'existence de cette signalisation intracrine pourrait être

potentiellement très importante notamment concernant l'échappement aux thérapies anti-angiogéniques se basant sur l'utilisation d'anticorps ciblant les ligands tels que l'Avastin^R.

4.2 Signalisations intracrine et autocrine du VEGFR-2

La fixation du VEGF-A au niveau du récepteur VEGFR-2 induit son internalisation par endocytose (Nakayama et al. 2013). L'internalisation du récepteur induit sa dégradation rapide par le protéasome et les lysosomes et donc régule négativement son activité de récepteur tyrosine-kinase (Goh et Sorkin 2013). En parallèle, Warren et collaborateurs ont montré que le VEGFR-2 pourrait activer aussi des signalisations intracrines indépendantes du ligand et de l'activité tyrosine kinase du récepteur. En effet, les espèces réactives oxygénées (ROS), générées par l'hyperglycémie, vont activer la phosphorylation du VEGFR-2 intracellulaire localisé au niveau du Golgi. Les SRCs kinases sont ensuite recrutées pour activer le VEGFR-2. Cela induit une diminution du VEGFR-2 membranaire et donc une plus faible disponibilité du récepteur VEGFR-2 à la membrane qui par conséquent est suivi d'une plus faible réponse aux stimuli angiogéniques (Warren et al. 2014). Dans les CBnPCs, l'existence d'une boucle autocrine dépendante du VEGFR-2 a récemment été décrite via la démonstration que le VEGF-A stimule sa propre traduction par un mécanisme mettant en jeu l'activation du récepteur VEGFR-2 et la voie mTOR (Chatterjee et al. 2013). Dans les gliomes, une boucle autocrine VEGF-A/VEGFR-2/neuropiline-1 induit la survie de cellules possédant des caractéristiques de cellules souches (Hamerlik et al. 2012). De façon importante, cet effet est induit par une signalisation intracytoplasmique du VEGFR-2. Le rôle d'une boucle autocrine dépendante du VEGF-A, impliquant la signalisation VEGFR-2 et NRP-1, a aussi été mis en évidence dans le maintien et le renouvellement de cellules souches cancéreuses dans les cancers de la peau (Beck et al. 2011), mais aussi dans l'initiation du processus invasif de transition épithélio-mésenchymateuse (EMT). Ainsi, l'expression du VEGF-A et de ses récepteurs augmente dans les cellules de carcinomes coliques se dé-différenciant et le VEGF-A induit une EMT de cellules épithéliales normales et de cellules de carcinomes différenciées (Mak et al. 2010).

Finalement, l'un des mécanismes proposés pour expliquer la contribution d'une boucle autocrine/intracrine VEGF-A/VEGFRs dans l'initiation tumorale serait qu'elle est capable de réguler la taille du réservoir de cellules souches et leur renouvellement dans les tumeurs. Dans ce

contexte, il a été proposé que les signalisations dépendantes du VEGFR-1 ou VEGFR-2 pourraient conditionner la prolifération et le phénotype cellules souches, respectivement. Cela pourrait aussi dépendre de la présence simultanée ou non des deux récepteurs VEGFR-1 et VEGFR-2 à la surface de la cellule, de même que de la présence ou non de leurs co-récepteurs neuropiline, voir même des autres partenaires potentiels (autres récepteurs à activité tyrosine kinase, intégrines).

4.3 Signalisation autocrine dépendante des neuropilines et des intégrines

Comme nous l'avons vu, les cellules tumorales expriment aussi les NRP-1 et -2. La surexpression de la NRP-1 stimule la prolifération des tumeurs et elle est associée avec l'invasion et le mauvais pronostic dans plusieurs cancers tels que les cancers gastro-intestinaux, du poumon, des ovaires, les gliomes, les ostéosarcomes et les mélanomes (tableau 6) (Kawakami et al. 2002; Klagsbrun, Takashima, et Mamluk 2002; Bagri, Tessier-Lavigne, et Watts 2009). Dans les cancers, plusieurs études suggèrent aussi que la signalisation du VEGF-A via les NRPs peut se faire indépendamment du VEGFR-1 ou du VEGFR-2 (Soker et al. 1998; Wang et al. 2003). Ainsi, le VEGF₁₆₅ inhibe l'apoptose dans la lignée de cancer du sein humain MDA-MB-231, qui exprime la NRP-1 mais pas le VEGFR-2 (Bachelder et al. 2001). Parmi les effets du VEGF-A indépendants des VEGFR-1/VEGFR-2 mais mettant en jeu les NRPs qui ont été rapportés, on trouve aussi l'activation d'une voie de signalisation dépendante de la NRP-1 et de l'oncogène RAS dans les carcinomes rénaux (Y. Cao et al. 2012) ou une boucle dépendante des protéines NRP-2/Bmi-1/IGF1R dans les cancers prostatiques agressifs (Goel et al. 2012). De manière intéressante, il apparaît que les intégrines sont aussi capables de lier les NRPs dans les cellules tumorales. Ainsi, dans les cellules de cancer pancréatique, l'intégrine $\beta 1$ forme des complexes avec la NRP-1 qui modulent la survie, la croissance et le potentiel invasif des cellules tumorales (Fukasawa, Matsushita, et Korc 2007). Dans les cellules de cancers mammaires, la neuropiline-2 liée au VEGF-A interagit avec l'intégrine $\alpha 6 \beta 1$ conduisant à l'activation de FAK, à la formation d'adhésions focales et à la modification de la polymérisation de l'actine (Goel et al. 2012).

PARTIE 3. LES VARIANTS SOLUBLES DU VEGFR-1: UN ROLE COMPLEXE DANS L'ANGIOGENESE ET AU COURS DU DEVELOPPEMENT TUMORAL

Dans ce chapitre, je décrirai la structure, la fonction et la régulation des variants solubles du VEGFR-1 regroupés sous le terme générique de sVEGFR-1. Nous détaillerons aussi leurs mécanismes de biogenèse, leurs mécanismes d'action ainsi que leurs fonctions physiologiques et pathologiques.

1. Variants solubles du VEGFR-1: entre épissage et clivage protéolytique

Les variants regroupés sous l'appellation générique de sVEGFR-1 peuvent être générés soit par épissage alternatif du pré-ARNm du *vegfr-1* ou par clivage protéolytique du récepteur mature VEGFR-1.

1.1 Isoformes épissées de type sVEGFR-1 : sVEGFR-1-i13 le chef de file

Quatre variants issus de l'épissage alternatif du pré-ARNm du *vegfr-1* ont été décrits (Richard L. Kendall, Wang, et Thomas 1996) ; (figure 18). Ces variants possèdent le même site d'initiation de la transcription que le VEGFR-1. Alors que l'ARNm du VEGFR-1 contient 30 exons, les sVEGFR-1s ne partagent que les premiers exons. Le nombre de ces exons en commun varie entre 13 et 15 selon le variant sVEGFR-1 en question. La transcription du sVEGFR-1 est ensuite interrompue par l'ajout d'une séquence poly-(A) ce qui engendre des variants d'épissages plus courts que le VEGFR-1 total.

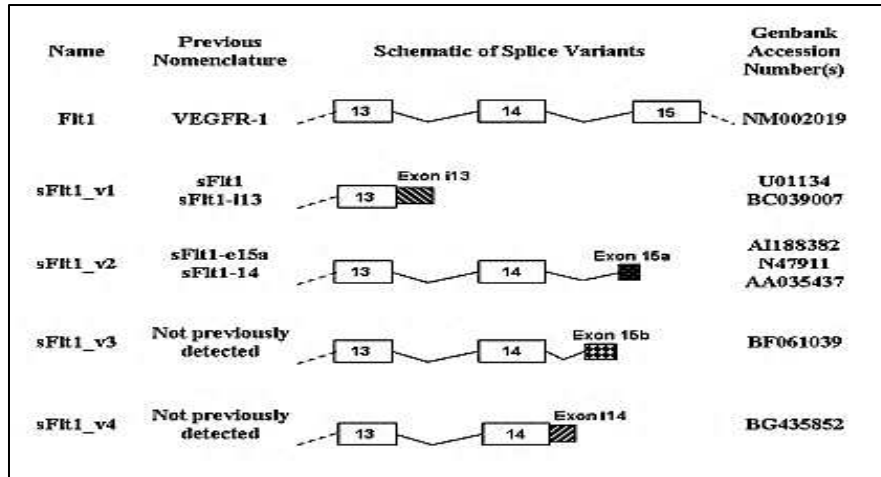


Figure 18. Les différents variants d'épissage du sVEGFR-1 (Heydarian et al. 2009).

Le **sVEGFR-1_v1**, initialement découvert en 1993 par Kendal et collaborateurs comme une protéine de 100 kDa majoritaire dans l'endothélium, est le variant nommé sVEGFR-1-i13. Il résulte de l'inclusion d'une partie de l'intron 13 suivie d'une polyadénylation. Ce variant est dépourvu des exons 14 à 30 et représente le variant le plus court (Richard L. Kendall, Wang, et Thomas 1996). Les sVEGFR-1-i13 humain et murin contiennent les six premiers domaines de type Ig correspondant aux 1657 acides aminés du récepteur VEGFR-1. L'extrémité C-terminale du sVEGFR-1-i13 est constituée de 31 acides aminés uniques (Figures 19 et 20). Elle est hautement conservée chez les mammifères et ne diffère qu'au niveau de deux acides aminés entre l'homme et la souris (Szalai et al. 2015). Le sVEGFR-1-i13 est dépourvu des domaines transmembranaires et intracellulaires du récepteur VEGFR-1.

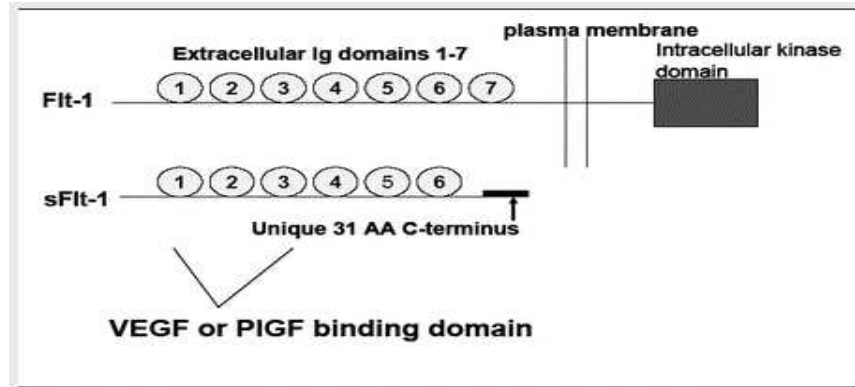


Figure 19 Structure protéique du VEGFR-1 et du sVEGFR-1-i13 (adapté de Wellesley, MA. 2004).

- **Le sVEGFR-1_v2**, initialement découvert par Thomas et al en 2007, est le sVEGFR-1-e15a qui contient un nouvel exon terminal dénommé exon 15a et dérivé d'une séquence intronique. Ce variant inclut donc les premiers 14 exons et une extension spécifique (C. P. Thomas et al. 2009).
- **Le sVEGFR-1_v3**, initialement découvert par Heydarian et al en 2009, est le sVEGFR-1-e15b. Il contient lui aussi un nouvel exon terminal dénommé exon 15b et dérivé d'une séquence intronique. Ce variant inclut les premiers 14 exons et une extension spécifique différente du variant v2 (Heydarian et al. 2009).
- **Le sVEGFR-1_v4**, initialement découvert par Heydarian et al en 2009, correspond au sVEGFR-1-i14. Il résulte d'une perte d'un site d'épissage entraînant une extension de 270 bp de l'exon 14 suivie par une polyadénylation. Ce variant ne contient pas les exons de 15 à 30 (Heydarian et al. 2009).

Dans ces 3 derniers cas, l'extension du cadre de lecture est faible (93, 84 et 33bp) et la protéine est modifiée après l'acide aminé 706, ce qui conduit à une protéine tronquée entre les 2 derniers domaines de type Ig. Ces variants contiennent une extrémité C-terminale de 31, 28 et 13 acides aminés respectivement (Figure 20; Szalai et al. 2015). En comparaison, le sVEGFR-1-i13 diverge du VEGFR-1 après l'acide aminé 657.

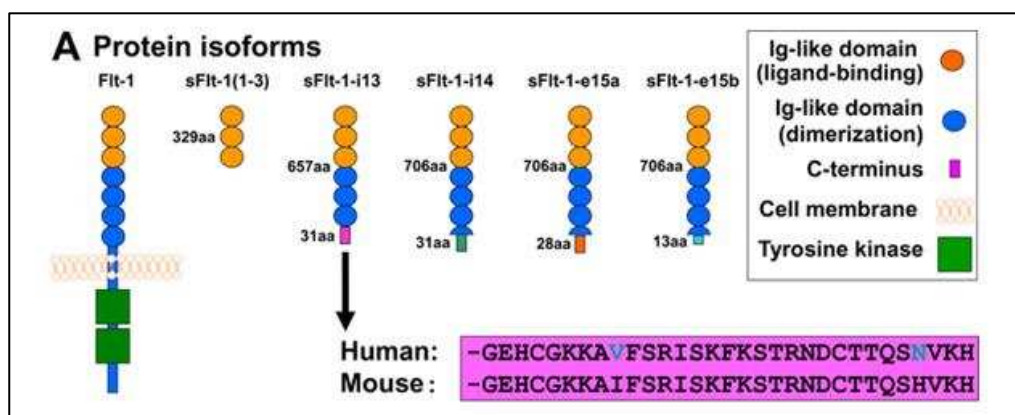


Figure 20 Représentation schématique des différents isoformes protéiques du sVEGFR-1 (Szalai et al. 2015). L'extrémité C-terminale très conservée du sVEGFR-1-i13 est alignée entre l'homme et la souris.

Il est intéressant ici de mentionner que bien que dénommés solubles, ces variants d'épissage sont d'abord synthétisés au niveau intra-cellulaire. Ils sont donc aussi à rapprocher de la nouvelle famille de formes intra-cellulaires du VEGFR-1 décrite par Mezquita et collaborateurs dont nous avons précédemment parlé. Ces isoformes dérivent de l'utilisation de sites alternatifs d'initiation de la transcription conduisant à la synthèse d'isoformes protéiques tronquées ayant perdu leur domaine extra-cellulaire mais conservant tout ou partie de leur domaine kinase (Mezquita et al. 2010; Mezquita et al. 2014)

Mécanismes de sécrétion des variants d'épissage sVEGFR-1

A l'heure actuelle, le mécanisme impliqué dans la sécrétion des sVEGFR-1s n'est pas élucidé. Les protéines de la famille ARF (ADP-Ribosylation Factor) appartiennent à la superfamille Ras des petites GTPases. Elles régulent le trafic vésiculaire en recrutant des protéines au niveau de la surface membranaire (D'Souza-Schorey et Chavrier 2006). Rab11 est un membre de la famille des protéines Rab. Elle est localisée dans les endosomes et elle est impliquée dans la voie de recyclage dans les cellules de mammifères (Ullrich et al. 1996; Ren et al. 1998; Choudhury et al. 2002). Jung et al ont étudié le transport intra-cellulaire du sVEGFR-1-i13 à travers le réticulum endoplasmique (RE) et l'appareil de Golgi (Balch 1994; Balch 1994; Schekman et Orci 1996). Dans cette étude, ils montrent que le traitement avec la bréfeldine A (BFA), un inhibiteur de la dégradation lysosomale, bloque le transport extracellulaire du sVEGFR-1-i13 et favorise une accumulation accrue du variant sVEGFR-1-i13 dans les cellules HUVECs. En outre, cette étude

montre que l'expression ectopique de formes mutantes de ARF1, ARF6 et RAB11 ainsi que la neutralisation de ces GTPases par ARN interférence bloquent la sécrétion de sVEGFR-1-i13 dans des conditions normoxiques mais aussi hypoxiques. Ces résultats suggèrent que ARF1 joue un rôle important dans le transport du sVEGFR-1-i13 du RE vers l'appareil de Golgi. RAB11 est ensuite nécessaire pour le transport du sVEGFR-1-i13 de l'appareil de Golgi vers la membrane plasmique. Finalement, il est exocyté par un mécanisme mettant en jeu la protéine ARF6 (figure 21) (Jung et al. 2012).

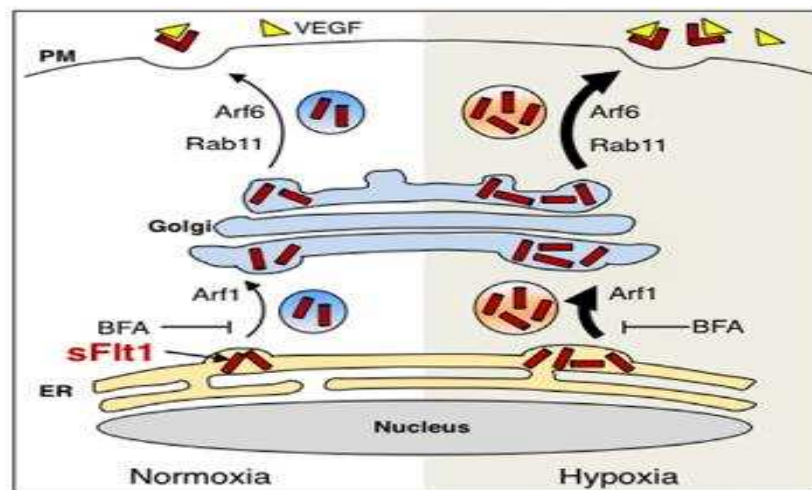


Figure 21. Représentation schématique du mécanisme de sécrétion du sVEGFR-1-i13. Suite à sa synthèse, il est transporté du réticulum endoplasmique vers l'appareil de Golgi puis il est ensuite sécrété à l'extérieur de la cellule par exocytose. Ce mécanisme est contrôlé par l'activité des GTPases ARF1, ARF6 et Rab11 (Jung et al. 2012).

1.2 sVEGFR-1 : une forme clivée du VEGFR-1

A côté de l'épissage alternatif, le deuxième mécanisme de biogenèse du sVEGFR-1 est le clivage protéolytique du récepteur VEGFR-1 mûre. Il a été décrit que les récepteurs transmembranaires subissent un clivage au niveau de leur domaine extracellulaire qui est régulé par des « sheddases » comme par exemple les protéines de la famille ADAM. Ce clivage va générer des formes solubles des récepteurs transmembranaires qui auront des fonctions antagonistes à celles du récepteur. Ce premier clivage peut être suivi par un deuxième clivage, cette fois intramembranaire et régulé par des γ -sécrétases. Ce second clivage peut entraîner une activation ou inhibition des voies de signalisation intracellulaires (Lichtenthaler, Haass, et Steiner 2011). Il a

été montré que le clivage du domaine extracellulaire du VEGFR-1 est effectué suite à l'activation de PKC et par l'intermédiaire d'une famille de métalloprotéases/tumor necrosis factor- α -converting enzyme (ADAM/TACE) dans les cellules leucémiques (H. Fan et Derynck 1999). Dans ces cellules, ce clivage est suivi par un clivage intra-membranaire médié par les γ -secretase/presenilin générant un fragment intracellulaire de VEGFR-1 de 60 kDa (Rahimi, Golde, et Meyer 2009). Parallèlement, une autre étude a montré que les protéines ADAM impliquées dans le clivage du VEGFR-1 sont ADAM10 et ADAM 17 dans les cellules HUVEC et HEK293 (Figure 22) (Raikwar, Liu, et Thomas 2014).

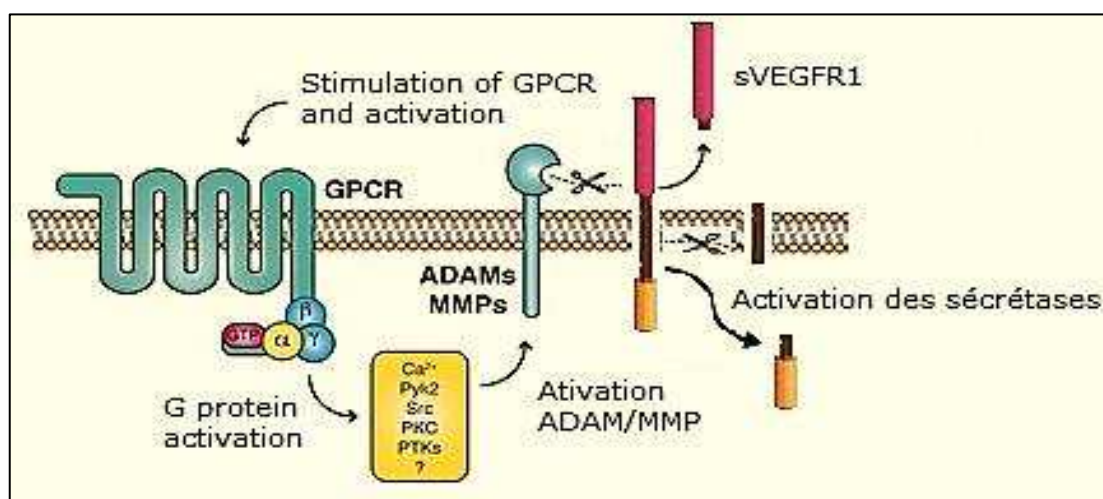


Figure 22. Mécanismes moléculaires du clivage protéolytique du VEGFR-1.

Le système uPA/uPAR (urokinase Plasminogen Activator Receptor) a aussi été impliqué dans la régulation de l'angiogenèse par des mécanismes de clivage protéolytique et par activation de voies de signalisations intracellulaires (Binder, Mihaly, et Prager 2007; D'Alessio et Blasi 2009; Ulisse et al. 2009). Une étude a montré que le sVEGFR-1 augmente dans le surnageant des cellules U87MG, 4910 et HMEC transfectées par le plasmide bi-cistronique codant à la fois uPA et uPAR. Cette étude montre aussi que le mécanisme moléculaire par lequel le sVEGFR-1 est généré est un clivage protéolytique. En effet, puPA/pPAR stimule la production de TIMP1. La sécrétion de TIMP1 est médiée par la production des métalloprotéases de type MMP7 et l'activation de la phosphorylation de récepteur VEGFR-1 au niveau de sa tyrosine Tyr1213 (Raghu et al. 2012).

2. Régulation de l'expression des variants solubles sVEGFR-1

A l'heure actuelle, il existe peu d'études ayant investigué les mécanismes et voies de signalisation moléculaires régulant l'épissage du VEGFR-1. La majorité des études ont été réalisées dans les cellules endothéliales et concernent le variant sVEGFR-1-i13.

2.1 Régulation par les ligands : VEGF-A et PlGF

Dans les cellules endothéliales vasculaires humaines, Saito et Ahmad ont montré que le VEGF-A mais pas le PlGF augmente l'expression du sVEGFR-1-i13 (Ahmad et al., 2011; Saito et al. 2013). Le mécanisme moléculaire par lequel le VEGF-A régule l'expression du sVEGFR-1-i13 met en jeu l'activation du récepteur VEGFR-2, de la protéine kinase C (PKC) et de la MAP kinase kinase MEK (Saito et al. 2013). Ces résultats suggèrent que le VEGF-A pourrait exercer un rétro-contrôle négatif en générant du sVEGFR-1-i13 qui comme nous le verrons ensuite joue le rôle d'un « VEGFR-trap » empêchant ainsi la fixation du VEGF-A sur son récepteur et l'activation des voies de signalisation intracellulaires en aval (Shakil Ahmad et al. 2011; Barleon, Siemeister, et al. 1997). De plus, le VEGF-A stimule aussi la production de sVEGFR-1-i13 dans des explants placentaires humains (S. Ahmad 2004). En accord avec un rôle important du VEGF-A dans le contrôle de l'expression du sVEGFR-1-i13 in vivo, il a été récemment montré dans un modèle de souris gestantes que l'augmentation locale de VEGF-A au niveau de l'endomètre est responsable de l'augmentation placentaire et sérique de sVEGFR-1-i13 détectées au cours de la prééclampsie (X. Fan et al. 2014). Il est à noter que le VEGF-A peut aussi réguler le clivage protéolytique du VEGFR-1 pour générer des formes solubles. Ainsi, dans les lymphomes, le VEGF-A active la voie PKC et les métalloprotéases ADAM responsables du clivage du domaine extracellulaire du VEGFR-1 générant ainsi le sVEGFR-1. Cette étude montre que ce mode de régulation ne se passe pas dans les cellules endothéliales HUVEC. Les mécanismes contrôlant l'expression du sVEGFR-1 par le VEGF-A pourraient donc varier d'un type cellulaire à l'autre (Rahimi, Golde, et Meyer 2009).

2.2 Régulation par d'autres facteurs de croissance

D'autres facteurs de croissance ont aussi été décrits comme modulant l'expression du sVEGFR-1-i13. Ainsi, lors de la différenciation des cellules dendritiques immatures en monocytes, l'IL4 et le GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor) stimulent l'expression du sVEGFR-1-i13 par un mécanisme mettant en jeu p38 MAPK (Xia et al. 2016). Dans les cellules murines endothéliales progénitrices EPC, la cytokine TNFSF15 (Tumor Necrosis Factor Superfamily 15) promeut simultanément la dégradation protéasomale du VEGFR-1 total et la production du sVEGFR-1-i13 par un mécanisme nécessitant l'activation de PKC, SRC et ERK1/2 (Qi et al. 2013).

2.3 Régulation par l'hypoxie

Un des régulateurs majeurs de l'expression du VEGF-A est le taux d'oxygène. Il n'est donc pas étonnant que l'expression du sVEGFR-1-i13 soit aussi régulée par le taux d'oxygène. Ainsi, plusieurs études ont montré que l'hypoxie stimule la sécrétion du sVEGFR-1-i13 dans les cellules endothéliales (Xiong et al. 2009; C. P. Thomas et al. 2009; Boeckel et al. 2011). Cependant, une autre étude montre que dans les cellules HMECs, l'hypoxie diminue l'expression des transcrits sVEGFR-1-i13. Le mécanisme impliqué est l'épissage alternatif puisqu'il n'y a pas de variations au niveau de l'expression protéique et ARNm du récepteur VEGFR-1 (Ikeda et al. 2011). Malgré le fait que l'hypoxie augmente l'expression du VEGF-A, cette étude montre que le VEGF-A ne stimule la production du sVEGFR-1-i13 qu'à des doses très élevées de l'ordre de 100 ng/ml dans les cellules HMECs.

Il a été montré aussi que les monocytes et les macrophages sécrètent du sVEGFR-1-i13 en conditions hypoxiques. La sécrétion du sVEGFR-1-i13 se fait indépendamment du facteur HIF-1 α mais de façon dépendante du facteur HIF-2 α dont la stabilisation augmente la sécrétion du sVEGFR-1 (Roda et al. 2012). Dans les cellules trophoblastiques, une autre étude a aussi identifié des miARNs, les miR-517a/b et miR-517c, comme des régulateurs positifs de l'expression du sVEGFR-1-i13 (Anton et al. 2015). Dans ces cellules, miR-517a/b et miR-517c sont régulés positivement par l'hypoxie mais aussi par la cytokine TNFSF15 dont nous avons vu

précédemment qu'elle contrôle l'expression du sVEGFR-1-i13. Dans les cytotrophoblastes, l'hypoxie stimule aussi la production du variant sVEGFR-1-e15a (C. P. Thomas et al. 2009).

2.4 Regulation par la protéine Jumonji Domain containing-protein 6 (JMJD6)

La protéine JMJD6 appartient à une famille d'enzymes contenant le domaine JmjC. Ces enzymes jouent un rôle crucial dans le contrôle de l'expression des gènes en agissant en tant qu'hydroxylases ou déméthylases. La réaction d'hydroxylation est dépendante de la concentration en oxygène et donc l'activité de JMJD6 est largement inhibée en conditions hypoxiques. De façon intéressante, il a été montré que JMJD6 interagit et hydroxyle le facteur d'épissage U2AF65 dans les cellules endothéliales (Webby et al. 2009) mais aussi interagit avec les facteurs d'épissage de la famille des protéines SR (Heim et al. 2014). En accord avec une fonction de JMJD6 dans l'angiogenèse, l'intégrité endothéliale est sévèrement impactée dans les souris *jmjd6 +/-* et ce phénotype résulte d'une augmentation de l'expression du sVEGFR-1-i13 (Boeckel et al. 2011). Dans les cellules endothéliales, la neutralisation de *Jmjd6* par ARN interférence augmente l'expression du sVEGFR-1-i13. Au niveau moléculaire, les auteurs montrent que U2AF65 interagit avec l'ARNm sVEGFR-1-i13 et avec JMJD6 (Boeckel et al. 2011). Une étude très récente montre d'ailleurs que U2AF65 et JMJD6 co-localisent et interagissent dans les placentas pré-éclamptiques, et corrèle la perte d'expression de JMJD6 avec l'augmentation de sVEGFR-1-i13 dans ces placentas (Palmer et al. 2016). De façon intéressante, TNFSF15 diminue aussi l'expression de JMJD6 dans les cellules endothéliales progénitrices, ce qui pourrait expliquer son effet positif sur l'expression du sVEGFR-1-i13 (Qi et al. 2013).

2.5 Régulation par la voie de signalisation NOTCH1

La famille du gène notch est hautement conservée chez les mammifères et elle code pour des récepteurs transmembranaires parmi lesquels nous listerons: NOTCH1, NOTCH2, NOTCH3 et NOTCH4. Les ligands de NOTCH sont des protéines transmembranaires de deux classes: les ligands « Jagged » (JAG) : JAG1 et JAG2 et les ligands « Delta-like » (DLL) :DLL1 , DLL3 et DLL4. Lors de l'activation par le ligand, le domaine intra-cellulaire de NOTCH est clivé par les gamma-sécrétases et il transite vers le noyau pour activer la transcription (Kopan et Ilagan 2009). Récemment, il a été montré qu'un variant tronqué de NOTCH1 qui interfère avec JAG1 et JAG2 réduisait la signalisation NOTCH1, inhibait l'angiogenèse dans deux modèles d'angiogenèse, tumorale et rétinienne, et réduisait la croissance tumorale (Kangsamaksin et al. 2015). De façon intéressante, la neutralisation de la signalisation JAG augmente spécifiquement l'expression du sVEGFR-1-i13.

3. Mécanismes moléculaires d'action des sVEGFR-1

Les interactions moléculaires des sVEGFR-1 avec les ligands de la famille du VEGF sont similaires à celles du VEGFR-1 en raison de la conservation des six premiers domaines de type Ig et en particulier de la conservation du deuxième et du troisième domaine qui sont impliqués dans la liaison au VEGF-A ,VEGF-B et PlGF (Barleon, Totzke, et al. 1997; Fuh, Garcia, et de Vos 2000). La liaison avec la NRP-1 est médiée principalement par le biais des troisième et quatrième domaines Ig (Fuh, Garcia, et de Vos 2000). Le quatrième domaine est aussi responsable de l'homodimérisation sVEGFR-1/VEGFR-1 et de l'hétérodimérisation sVEGFR-1/VEGFR-2 (Barleon, Totzke, et al. 1997; Cébe-Suarez, Zehnder-Fjällman, et Ballmer-Hofer 2006). Ainsi, il a été postulé que les sVEGFR-1 agissent par l'intermédiaire de deux mécanismes moléculaires : le premier mécanisme consiste en la séquestration des ligands tels que le VEGF-A ou « VEGF-trap » et le deuxième mécanisme repose sur leurs hétérodimérisations avec les récepteurs VEGFR-1/VEGFR-2 membranaires pour former des dimères à activité de dominants négatifs (figure 23) (Richard L. Kendall, Wang, et Thomas 1996; Shakil Ahmad et Ahmed 2004).

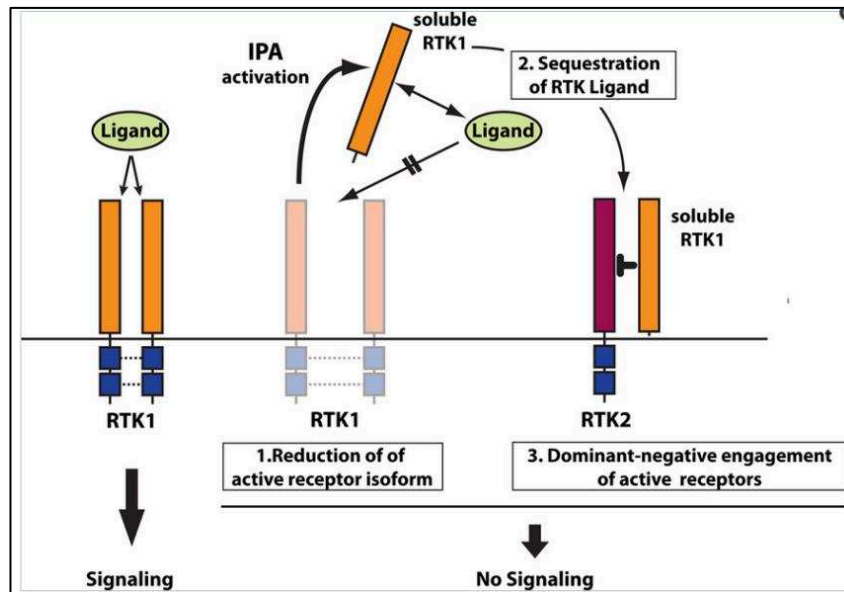


Figure 23. Mécanismes moléculaires médiant les fonctions des sVEGFR-1.

3.1 Séquestration du VEGF-A

Dans les cellules HUVEC, il a été montré que la protéine recombinante sVEGFR-1 entre en compétition avec le VEGF-A et agit comme un antagoniste en inhibant son activité mitogène (Richard L. Kendall, Wang, et Thomas 1996). En théorie, les interactions moléculaires du sVEGFR-1 avec les ligands de la famille du VEGF devraient être similaires à celles du VEGFR-1 en raison de la conservation des six premiers domaines de type Ig. Ainsi, il a été montré in vitro que le sVEGFR-1 peut se lier au VEGF-A sous forme de monomère, dimère et multimère (figure 24) en formant des complexes de poids moléculaires variant entre 115-145 kDa (R L Kendall et Thomas 1993; C. Hornig et al. 2000), 220-230 kDa (R L Kendall et Thomas 1993; C. Hornig et al. 2000) et 600-700 kDa (Banks et al. 1998) respectivement. Cela suggère que le VEGF-A induit la dimérisation ou la multimérisation du sVEGFR-1.

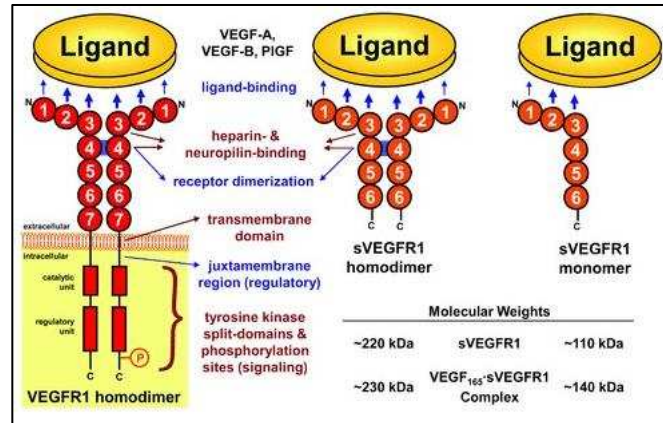


Figure 24. Structures protéiques du VEGFR-1 et du sVEGFR-1. Le sVEGFR-1 a la même affinité que le VEGFR-1 pour lier le VEGF-A et peut lier le VEGF-A sous forme monomérique ou dimérique.

3.2 Hétérodimérisation avec les récepteurs VEGFR

Le deuxième mécanisme moléculaire adopté par les sVEGFR-1s pour inhiber la signalisation dépendante du VEGF-A est la formation d'homo- ou hétéro-dimères avec les récepteurs VEGFR. Le sVEGFR-1 forme ainsi des complexes de faible affinité avec le VEGFR-2. Ces complexes sont ensuite stabilisés en réponse à la fixation du VEGF-A constituant un complexe ternaire VEGF-A/VEGFR-2/sVEGFR-1 (Wu et al. 2010).

3.3 sVEGFR-1-i13: un ligand de l'intégrine β 1

Parallèlement à sa liaison aux récepteurs VEGFR, il a aussi été montré que le sVEGFR-1-i13 pouvait être un ligand pour l'intégrine α 5 β 1 (Orecchia et al. 2003b). En effet, dans cette étude, les auteurs montrent que le sVEGFR-1-i13 déposé dans la matrice extracellulaire (MEC) par les cellules endothéliales en culture s'associe à l'intégrine α 5 β 1 (Orecchia et al. 2003b). Les auteurs ont ensuite montré que le sVEGFR-1-i13 promeut l'adhésion, la migration et l'étalement des cellules endothéliales par un mécanisme mettant en jeu cette interaction. Cette étude est en accord avec d'autres études qui ont montré que le sVEGFR-1-i13 est présent dans la MEC de la rétine humaine dans des modèles in vivo (Witmer et al. 2002). De façon intéressante, ni le VEGF-A, ni le PlGF n'entre en compétition avec le sVEGFR-1-i13 pour l'adhésion des cellules

endothéliales, suggérant que des sites différents pour la liaison au ligand et à l'intégrine existent. Par la suite, il a été montré que c'est le domaine de type Ig 2 du sVEGFR-1-i13, contenant aussi les sites de fixation aux facteurs de croissance, qui est impliqué dans la liaison à l'intégrine (Soro et al. 2008a). Cependant, un peptide mimant le domaine 2 est capable de lier l'intégrine $\alpha 5\beta 1$, mais pas le VEGF-A, et d'induire la tubulogenèse in vitro et la néoangiogenèse in vivo dans le modèle de cornée de lapin (Soro et al., 2008). Les fonctions angiogéniques du peptide sont inhibées en présence de bevacizumab, un anti-VEGF-A, ou de sunitinib, un inhibiteur de l'activité tyrosine kinase des VEGFR, suggérant que les effets de ce peptide mimant le sVEGFR-1-i13 avec l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ nécessitent l'activation simultanée de la signalisation VEGF-A/VEGFR.

4. Fonctions biologiques des sVEGFR-1

4.1 Statut différentiel des sVEGFR-1 dans les tissus

Les sVEGFR-1 sont sécrétés par plusieurs types cellulaires parmi lesquels nous citerons les cellules endothéliales (Karumanchi et Bdolah 2004), les cellules musculaires lisses (Sela et al. 2008), les monocytes et les macrophages (Karumanchi et Bdolah 2004), les trophoblastes du placenta (Karumanchi et Bdolah 2004) ou les cellules tubulaires proximales de l'épithélium rénal (Kim et al. 2005). Chaque type cellulaire peut exprimer de façon différentielle chaque variant sVEGFR-1. Par exemple, les cellules du muscle lisse expriment majoritairement le sVEGFR-1-i14 alors que les cellules endothéliales expriment majoritairement le sVEGFR-1-i13 (Sela et al. 2008). Les sVEGFR-1 sont aussi exprimés par plusieurs types d'organes et leur niveau d'expression est variable selon les organes considérés. Par exemple, le taux global de sVEGFR-1 est quarante fois plus important dans le placenta que dans les autres organes comme le coeur, les reins, les poumons. De plus, dans le placenta, le sVEGFR-1 représente 95 % du VEGFR-1 exprimé et plus précisément c'est la forme sVEGFR-1-e15a (sVEGFR-1-v2) qui est la plus abondante. Dans la plupart des organes, la fraction de sVEGFR-1 par rapport au VEGFR-1 total oscille entre 20-37%, représentant par exemple 31% dans le poumon avec une prédominance du variant sVEGFR-1-i13 dans ce tissu (figure 25). Dans les cellules endothéliales microvasculaires du cerveau, la forme la plus abondante est l'isoforme sVEGFR-1-

i13 qui représente 75% par rapport aux autres variants. L'expression des variants sVEGFR-1-v3 et sVEGFR-1-v4 est relativement faible dans tous les tissus et le variant sVEGFR-1-v3 (sVEGFR-1-ex15b) n'est pas détectable dans la plupart des organes (C. Hornig et al. 2000).

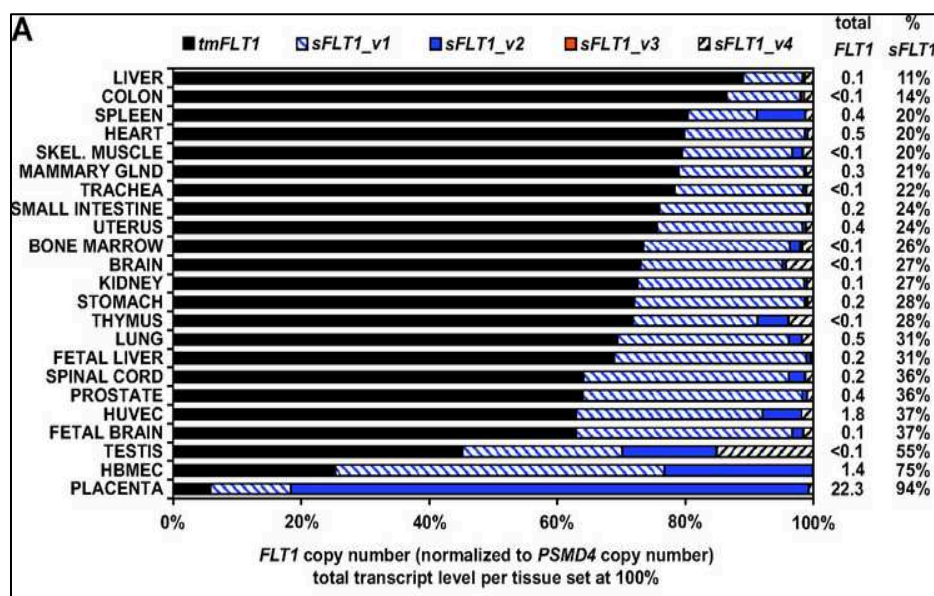


Figure 25. Expression de l'ARNm VEGFR-1 et des différents transcrits sVEGFR-1 dans différents organes.

La détection des variants sVEGFR-1 dans une variété d'organes et de tissus indique donc un rôle de ces variants dans ces tissus. En accord, plusieurs fonctions physiologiques et pathologiques ont été attribuées aux sVEGFR-1s que je détaillerai dans les paragraphes suivants.

4.2 Fonctions vasculaires des sVEGFR-1

Sur la base de ses partenaires moléculaires, il apparaît donc que le rôle du sVEGFR-1 sur la fonction vasculaire est plus complexe que celui envisagé dans un premier temps. Ainsi, de nombreuses études ont décrit une fonction anti-angiogénique du sVEGFR-1 via l'inhibition de la signalisation VEGF-A/VEGFR ou la capture du VEGF-A (R L Kendall et Thomas 1993; Wu et al. 2010). Ces effets ont été validés dans différents modèles dans lesquels l'administration exogène de sVEGFR-1 par thérapie génique ou protéique a démontré des effets anti-angiogéniques et notamment dans le contexte de la croissance tumorale (Kishuku et al. 2010;

Verrax et al. 2011; Goldman et al. 1998a). Un effet anti-angiogénique physiologique du sVEGFR-1 est aussi attesté dans la cornée. En effet, le sVEGFR-1 est crucial pour le maintien de la non-vascularisation cornéenne nécessaire à la clarté optique. Parmi de nombreuses molécules anti-angiogéniques (angiostatine, endostatine, etc.) présents dans la cornée, lui seul est nécessaire pour inhiber les effets pro-angiogéniques du VEGF-A (Ambati et al. 2006; Ambati et al. 2007). Plus récemment, il a été proposé que le sVEGFR-1 pourrait jouer un rôle essentiel pour maintenir l'intégrité vasculaire dans le placenta au cours de la grossesse en séquestrant l'excès de VEGF-A maternel (Fan et al., 2014). De plus, le sVEGFR-1 possède un rôle anti-oedème, en interférant avec la perméabilité vasculaire du VEGF-A médiée par l'intermédiaire des récepteurs VEGFR-1 et VEGFR-2 (Olsson et al. 2006; Kumai et al. 2007).

A l'inverse de sa fonction anti-angiogénique, il apparaît aussi que le sVEGFR-1 active l'adhésion et la migration des cellules endothéliales via son interaction avec l'intégrine $\alpha 5\beta 1$. Ainsi, l'activation de Rac1 et de différents substrats de la PKC tels que la radixin impliqués dans la motilité cellulaire, mais pas la phosphorylation de la Focal Adhesion Kinase (FAK), a été observée en réponse à l'adhésion des cellules endothéliales sur le sVEGFR-1, et cette réponse nécessite l'activation du VEGFR-2 (Orecchia et al. 2013). Les auteurs proposent que la présence de sVEGFR-1 dans la MEC pourrait « shifter » la signalisation classique intégrine $\alpha 5\beta 1$ vers un phénotype plus dynamique. En accord, un gradient pérircellulaire de sVEGFR-1 améliorant la morphogénèse et le bourgeonnement vasculaires a été décrit (Kearney 2004). De plus, l'expression de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ est aussi augmentée au cours du bourgeonnement des vaisseaux angiogéniques (Parsons-Wingerter et al. 2005). Ces résultats pourraient permettre d'expliquer : **(1)** pourquoi les souris homozygotes pour une délétion restreinte au domaine kinase intracellulaire du VEGFR-1, donc exprimant le sVEGFR-1, ont un développement correct des vaisseaux (Hiratsuka et al. 1998), à l'inverse des souris homozygotes VEGFR-1 $-/-$ qui meurent in utero à E8.5/E9 (Fong et al. 1995) ; et **(2)** pourquoi l'ajout de sVEGFR-1 recombinant dans des cultures de cellules souches dérivées des souris homozygotes VEGFR-1 $-/-$ in vitro restaure partiellement le phénotype mutant (excès de prolifération des cellules endothéliales et désorganisation des vaisseaux) (Roberts et al. 2004).

En résumé, selon les circonstances, le sVEGFR-1 se comporte comme un régulateur positif ou négatif de la fonction vasculaire. Ces fonctions antagonistes du sVEGFR-1 sont tout à fait nouvelles pour le VEGFR-1 mais elles ont été déjà montrées pour d'autres facteurs solubles tels que l'endostatine. L'endostatine est un fragment protéique de 20 kDa qui est issu du collagène de type XVIII. Cette protéine a des fonctions anti-angiogéniques quand elle est sous une forme soluble et angiogéniques quand elle interagit avec les intégrines $\alpha\beta3$ et les $\alpha\beta5$, médiant ainsi des effets d'adhésion et de migration dans les cellules endothéliales (Rehn 2001).

4.3 Autres fonctions du sVEGFR-1

Comme nous l'avons vu, le sVEGFR-1 est sécrété par de nombreux types cellulaires. Ses effets ne sont donc pas restreints au système vasculaire. Par exemple, il possède des fonctions anti-inflammatoires car il empêche l'activation et la migration des monocytes et des macrophages dépendantes des voies VEGF/VEGFR-1 (Tsao et al. 2007).

4.4 Fonctions pathologiques du sVEGFR-1

4.4.1 sVEGFR-1 et prééclampsie

La prééclampsie est une complication survenant au troisième trimestre de la grossesse spécifique à la gestation humaine. Elle est secondaire à une dysfonction placentaire qui est responsable de la libération dans la circulation maternelle de diverses substances responsables d'une activation, voire d'une lésion de l'endothélium maternel, avec pour conséquences une hypertension artérielle, une néphropathie glomérulaire et une augmentation de la perméabilité vasculaire. Il a été bien montré que les niveaux plasmatiques/sériques de sVEGFR-1, et plus précisément ceux des variants sVEGFR-1-i13 et sVEGFR-1-e15a augmentent chez la mère environ 5 semaines avant l'apparition des symptômes (Levine et al. 2004). En accord avec un rôle du sVEGFR-1 dans la prééclampsie, l'élimination extracorporelle de sVEGFR-1 chez les patientes prééclamptiques améliorent les symptômes (Thadhani et al. 2011). Dans ce contexte, le variant sVEGFR-1-e15a apparaît être le variant majoritairement impliqué dans cette pathologie (Sela et al. 2008; Szalai et al. 2015). Les facteurs régulant la production du sVEGFR-1 dans la prééclampsie sont l'hypoxie, le stress oxydatif mais aussi l'excès de VEGF-A au niveau de l'endomètre (Maynard et al. 2003; Levine et al. 2004; Fan et al., 2014).

4.4.2 sVEGFR-1 et autres maladies vasculaires

La cicatrisation cutanée nécessite la formation de nouveaux capillaires. Il a été montré une augmentation localisée de l'expression du sVEGFR-1 chez des patients présentant des défauts de cicatrisation (Eming et al. 2004). Une augmentation de taux circulants de sVEGFR-1 a aussi été détectée chez des patients présentant une hypertension artérielle pulmonaire idiopathique (Malhotra et al. 2013) ou un syndrome de détresse respiratoire (Wada et al. 2013) et corrélée au pronostic chez ces patients. Ces deux pathologies sont associées à des anomalies de la perméabilité vasculaire. Une des complication dans les modèles ischémiques de maladies artérielle périphériques (PAD) est la perturbation de l'angiogenèse. Dans ce contexte, les études sur les causes de la réponse angiogénique réduite chez les patients diabétiques ont mis l'accent sur une altération de la libération des cellules endothéliales progénitrices de la moelle osseuse (Loomans et al. 2004) et sur une fonction défectueuse des cellules progénitrices (Loomans et al.

2004; Tepper et al. 2002). Hazarika et collaborateurs ont étudié l'implication du sVEGFR-1 dans la dérégulation de l'angiogenèse chez les patients porteurs de diabète sucré (Hazarika et al. 2007). Cette étude montre que, bien que les niveaux de VEGF-A et de VEGFR-2 sont augmentés dans les souris diabétiques en réponse à l'ischémie, il y a une augmentation de l'expression à la fois du sVEGFR-1 et du VEGFR-1. Ces résultats suggèrent que l'augmentation du sVEGFR-1 diminue la disponibilité du VEGF-A et perturbe la signalisation VEGF/VEGFR impliquant donc une angiogenèse réduite post-ischémique.

4.4.3 sVEGFR-1 et cancers

De façon importante, la surexpression du sVEGFR-1 au niveau plasmatique, sérique ou intratumoral a été rapportée dans de nombreux cancers tels que les cancers colorectaux, du sein, les glioblastomes, le cancer du rein, les mélanomes, les leucémies, le cancer hépatocellulaire, le cancer de la tête et du cou et les cancers du poumon (tableau 6). Ces résultats indiquent une dérégulation de l'expression du sVEGFR-1 dans les tumeurs. Cependant, peu d'études se sont intéressées aux types de variants sVEGFR-1 exprimés dans ces cancers. De plus, un certain nombre d'études a corrélié l'expression du sVEGFR-1 avec un mauvais pronostic. Cela implique des fonctions sans doute plus complexes que ses seules fonctions anti-angiogéniques dans les tumeurs. Elles pourraient dépendre du type tumoral mais aussi du type de sVEGFR-1 généré, par exemple tronqué versus épissé.

Cancer	Publication	Type d'échantillons	Pronostic
Colorectal	Yamaguchi, 2007	Tissus	bon
Sein	Toi, 2002	Sérum	non significatif
Glioblastome	Lamszus, 2003	Sérum	mauvais
Rénal	Harris, 2001	Sérum	mauvais
Mélanome	Ruffini, 2011	Tissus	mauvais
Leucémie	Wierzbowska, 2003	Plasma	mauvais
Foie	Nagaoka, 2009	Sérum	mauvais
Tête et cou	Kulapaditharom, 2012	Sérum	mauvais
Lung	Ihan et al, 2004	Sérum	mauvais
Pancréas	Chang et 2008	sérum	mauvais

Tableau 6 Surexpression du sVEGFR-1 au niveau protéique dans différents types de cancers.

Concernant les fonctions biologiques du sVEGFR-1 dans les tumeurs, plusieurs études réalisées dans des modèles murins de mélanome, cancer du poumon, fibrosarcome ou glioblastome ont montré que la surexpression du sVEGFR-1 dans les cellules tumorales inhibe la croissance tumorale et que cette surexpression prolonge la survie des souris (Goldman et al. 1998a; Takayama et al. 2000; Shiose et al. 2000). Ces effets ont été corrélés avec une inhibition de l'angiogenèse tumorale. En accord avec un tel rôle, dans une étude portant sur les cancers du sein, une faible expression du sVEGFR-1 a été associée à un mauvais pronostic (Bando et al. 2005). Certains modèles tumoraux tels que les cellules hématopoiétiques malignes ou les cellules NALM6 provenant de patients de leucémie aigue lymphoblastique produisent du sVEGFR-1 qui se lie au VEGF-A avec une forte affinité comme dans le cas des HUVECs (Inoue et al. 2000). Dans la mesure où cette signalisation autocrine du VEGF-A a été impliquée dans la survie de ces cellules tumorales, le sVEGFR-1 en inhibant cette signalisation pourrait induire la mort cellulaire. De façon très récente, une étude montre que le sVEGFR-1 induit une mort non-apoptotique in vitro en agissant directement sur les cellules cancéreuses ovariennes ou

colorectales mais induit aussi une régression tumorale in vivo dans un modèle murin de xénogreffe dérivée de cellules de carcinome ovarien (Miyake et al. 2016). Dans ces tumeurs, un effet anti-angiogénique mais aussi inhibiteur de la prolifération cellulaire est observé. Ruffini et collaborateurs montrent aussi que des cellules de mélanomes produisent du sVEGFR-1-i13 dans la matrice extracellulaire. Le sVEGFR-1-i13 induit l'adhésion de ces cellules par un mécanisme dépendant de l'activation de la voie VEGF-A/VEGFR-2 (Ruffini et al. 2011).

Les fonctions biologiques du sVEGFR-1 dans les cancers pourraient aussi dépendre de l'équilibre entre sVEGFR-1 et autres facteurs angiogéniques exprimés dans les tumeurs tels que le VEGF-A. Par exemple, une étude faite par Toi et collaborateurs montre que quand le taux de sVEGFR-1 est 10 fois plus élevé que celui du VEGF-A cela est corrélé avec un meilleur pronostic (Toi et al. 2002). Ainsi, dans certains cas, le ratio sVEGFR-1:VEGF-A est celui qui est utilisé pour déterminer le pronostic des patients atteints de cancer. Par exemple, dans les gliomes, le cancer de sein, le cancer du pancréas et le cancer leucémique, un ratio faible de sVEGFR-1:VEGF-A dans le sérum, le plasma ou les extraits de tumeurs est corrélé avec des grades plus hauts des tumeurs, une survie moindre des patients et/ou une réponse plus faible aux thérapies (Chang et al. 2008; Lamszus et al. 2003; Bando et al. 2005; Aref et al. 2005). Chez des patients atteints de différents types de cancers de poumon, Ilhan et collaborateurs ont montré que des hauts niveaux de sVEGFR-1 et de VEGF-A sont corrélés avec un très mauvais pronostic et des stades très avancés (Ilhan, Ilhan, et Deveci 2004). Dans cette étude, les taux de VEGF-A plasmatiques sont significativement corrélés avec la production de leucocytes et la vitesse de sédimentation. Etant donné que l'interaction du VEGF-A avec les cellules sanguines favorise l'angiogenèse tumorale (Dvorak et al. 1995; Verheul et al. 1997; Pinedo et al. 1998; Salven, Orpana, et Joensuu 1999; Yamamoto et al. 2008), cette étude suggère que dans les cancers du poumon les hauts niveaux de VEGF-A et de sVEGFR-1 sont des marqueurs d'angiogenèse tumorale. Dans les glioblastomes, les hauts niveaux de sVEGFR-1 sont corrélés avec des tumeurs hautement vascularisées. Cela a été justifié par le fait que malgré que les taux de sVEGFR-1 sont élevés dans ces tumeurs, ils ne sont pas suffisamment hauts pour capter tout

le VEGF-A qui serait quand même capable de déclencher la néovascularisation de ces tumeurs (Lamszus et al. 2003).

Finalement, le sVEGFR-1 et le VEGF-A pourraient aussi jouer un rôle dans la progression des cancers et le développement de métastases. En effet, dans le cas du cancer du sein métastatique ganglionnaire, les taux du VEGF-A et du sVEGFR-1 sont trois fois et deux fois plus élevés respectivement. Cette même étude montre aussi une corrélation significative entre les taux de sVEGFR-1 et la taille des tumeurs. Des concentrations moyennes de sVEGFR-1 sont corrélées avec des tumeurs de taille comprises entre 20 et 50 mm (Thielemann et al. 2013). Dans les mélanomes, il a aussi été montré une diminution du niveau d'expression du sVEGFR-1 dans les métastases cutanées comparativement aux tumeurs primaires (Ruffini et al., 2011). Ces études suggèrent donc que la modulation de l'expression du sVEGFR-1 pourrait aussi influencer l'envahissement de la matrice extracellulaire et le processus métastatique des cellules tumorales.

PARTIE 4. LES THERAPIES ANTI-ANGIOGENIQUES DANS LE TRAITEMENT DU CANCER

Dans ce chapitre, nous allons décrire les différentes thérapies anti-angiogéniques utilisées dans le traitement des cancers ainsi que les limitations de ces thérapies en terme de résistance et de biomarqueurs prédictifs de réponse.

1. Généralités sur les thérapies anti-angiogéniques

Le concept de traitement du cancer par les thérapies anti-angiogéniques a été initié par Judah Folkman. Ce concept est basé sur l'inhibition de la néovascularisation dans les tumeurs conduisant à la régression de la tumeur (Judah Folkman 2010). Comme nous l'avons vu, la majorité des vaisseaux au sein de la tumeur n'est pas stabilisée par des péricytes. Par conséquent, les vaisseaux tumoraux sont des vaisseaux immatures, perméables et tortueux qui sont constitutivement stimulés par les facteurs de croissance comme le VEGF-A pour survivre et se développer. A contrario, les vaisseaux tumoraux situés sur la périphérie de la tumeur sont des vaisseaux matures stabilisés par des péricytes qui ne sont donc pas dépendants du VEGF-A pour leur croissance. Par conséquent, après traitement par les thérapies anti-angiogéniques, les vaisseaux qui résistent sont les vaisseaux matures possédant un meilleur rendement de perfusion. Dans ce contexte, en plus de leur effet anti-angiogénique, Rakesh Jain a lancé le concept de normalisation des vaisseaux tumoraux par les thérapies anti-VEGF, basé sur le fait qu'elles améliorent transitoirement le flux sanguin dans la tumeur et par ce biais la délivrance des agents chimiothérapeutiques (Jain 2001; Jain 2005). La normalisation des vaisseaux a été observée aussi bien dans des modèles animaux que dans des essais pré-cliniques dans lesquels les thérapies anti-angiogéniques améliorent aussi l'efficacité de la radiothérapie (Duda, Jain, et Willett 2007).

Le VEGF-A est un facteur-clé essentiel pour le processus néo-angiogénique tumoral. Les premières stratégies thérapeutiques anti-angiogéniques ont donc visé à neutraliser les voies de

signalisation du VEGF-A, en impactant soit sur le VEGF-A lui même ou ses récepteurs (figure 26). Dans cette partie, je détaillerai certaines de ces thérapies.

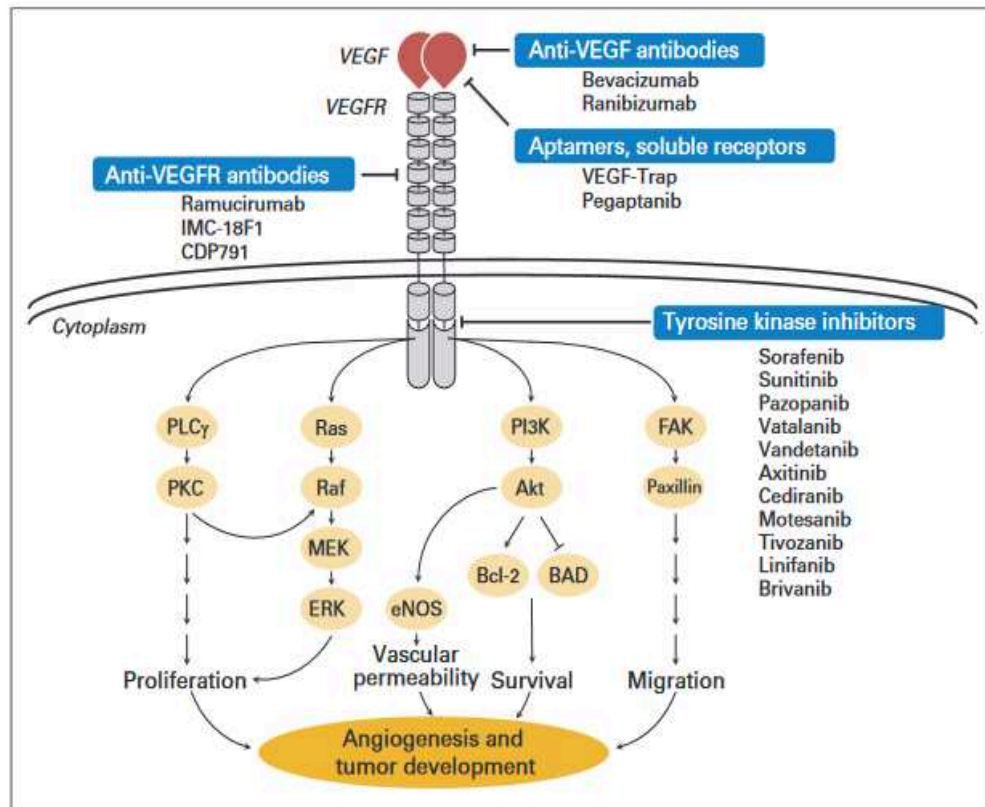


Figure 26. Différents types de thérapies anti-angiogéniques. Les principales stratégies anti-angiogéniques consistent soit à cibler le ligand VEGF-A afin d'inhiber sa fixation sur ses récepteurs (bevacizumab, Ranibizumab), soit à cibler les récepteurs du VEGF et cela de deux manières différentes : soit en ciblant la partie extracellulaire des récepteurs (Ramucirumab), soit en inhibant le domaine tyrosine kinase afin d'empêcher l'activation du récepteur (Sunitinib, Sorafénib, etc..) (Koo et al. 2012).

2. Les thérapies anti-VEGF-A

2.1 Les anticorps monoclonaux anti-VEGF-A

Le chef de file de ces agents est le bevacizumab (BVZ, Avastin®, Genentech). Cet agent est un anticorps monoclonal recombinant humanisé qui est capable de lier spécifiquement le VEGF-A avec une très grande affinité l'empêchant ainsi d'interagir avec ses récepteurs (VEGFRs) mais pas avec les neuropilines. Cet anticorps comprend la structure consensus IgG1 humaine, des régions de liaison à l'antigène (93%) et 6 régions déterminant la complémentarité provenant d'un anticorps monoclonal murin (7%). Le bevacizumab est caractérisé par une clairance assez lente et une longue demi-vie d'environ 20 jours (Ferrara 2004b).

Dans des essais cliniques de phases II et III chez les patients porteurs de cancer colorectal métastatique (CRC), le traitement avec le bevacizumab en association avec l'agent chimiothérapeutique 5-fluorouracile (5-FU) a donné des résultats sur la survie non observés depuis vingt ans. En effet, la combinaison du bevacizumab avec le 5-FU augmente la survie sans progression de 4 mois et la survie globale de 5 mois par rapport au traitement 5-FU seul (Hurwitz et al. 2004). Le bevacizumab a été le premier traitement anti-angiogénique approuvé par la FDA et l'EMA (European Medicines Agency) en 2004. Par la suite, l'efficacité du bevacizumab a été montrée dans de nombreux essais cliniques et dans plusieurs autres cancers métastatiques (D. H. Johnson et al. 2004; Martin Reck et al. 2009; Patel et al. 2009) tels que les CBnPCs (Herbst, Onn, et Sandler 2005; Hicklin et Ellis 2005; Sandler et al. 2006).

Dans les CBnPCs, Johnson et collaborateurs ont effectué une étude randomisée de phase II comparant un doublet d'agents chimiothérapeutiques (carboplatine/paclitaxel) versus mêmes agents chimiothérapeutiques combinés au bevacizumab (D. H. Johnson et al. 2004). De façon très intéressante, cette étude clinique montre que les patients traités avec le bevacizumab ont une meilleure réponse au traitement, une plus lente progression de la tumeur et une amélioration de 3 mois en terme de survie (17,7 mois vs 14,9 mois) en comparaison avec des patients de stades avancés traités uniquement avec des chimiothérapies. Par contre, un fait majeur a été soulevé

dans cette étude qui est le taux élevé d'hémorragies fatales survenant chez les patients atteints de carcinomes pulmonaires squameux. Cette observation a été à la base de l'exclusion des patients porteurs de carcinomes pulmonaires squameux des études cliniques sur le bevacizumab (Meert et al. 2002). Par la suite, plusieurs études de phase III ont été initiées pour étudier l'efficacité du bevacizumab chez les patients porteurs de cancer du poumon. L'étude ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group) réalisée en 2006 est une très large étude randomisée sur des patients CBNPCs de stades IIIB-IV non squameux traités avec le carboplatine et le paclitaxel combinés ou non au bevacizumab. Cette étude a montré une amélioration significative du taux de réponse, de la survie sans progression et de la survie globale chez les patients ayant reçu le bevacizumab. En se basant sur ces données, la FDA a approuvé l'utilisation du bevacizumab dans le traitement des CBNPCs avancés de type histologique non squameux en 2006 (Sandler et al. 2006). L'étude AVAiL (Avastin in Lung trial) est une autre étude de phase III qui a montré que le traitement au bevacizumab combiné au cisplatine et au gemcitabine aboutit à une amélioration moins importante mais significative de la survie sans progression et du taux de réponse, mais sans aucun effet sur la survie globale. Des effets secondaires ont été aussi observés tels que: l'hypertension, la protéinurie et les hémorragies (Martin Reck et al. 2009). Plus récemment, une autre étude importante de phase III a été faite, AVAPERL, dans laquelle les patients ont d'abord été traités par une combinaison cisplatine/permetrexed/bevacizumab et ensuite par le bevacizumab combiné ou non au permetrexed. Cette étude a montré une amélioration qui n'est pas significative dans la survie sans progression et la survie globale des patients (Barlesi et al. 2014; Rittmeyer et al. 2013).

En parallèle à son efficacité clinique, le bevacizumab peut causer des effets secondaires tels que la diarrhée, l'hypertension, l'apparition d'évènements thrombo-emboliques, des problèmes de cicatrisation, l'hémorragie et les perforations de l'intestin (Gressett et Shah 2009). En 2011, une méta-analyse s'appuyant sur 16 études cliniques a étudié le risque de mortalité suite au traitement avec le bevacizumab. Cette étude incluait des patients porteurs de cancer colorectal, de CBNPC, de cancer du sein, de cancer rénal, de cancer pancréatique et de cancer de prostate. De façon très importante, cette étude a montré une augmentation du risque de survenue d'évènements entraînant la mort (FAE, Fatal Adverse Event) chez les patients traités au

bevacizumab par rapport à la chimiothérapie utilisée seule (Ranpura, Hapani, et Wu 2011). Ces effets secondaires pourraient être dus au traitement de longue durée. Par contre, il a été démontré aussi que l'arrêt du traitement pouvait re-stimuler la vascularisation tumorale dans des modèles in vivo alors qu'un traitement prolongé prévient cet effet (Mancuso et Sternberg 2006). Nous pouvons donc en conclure que la durée du traitement par le bevacizumab est un facteur très important qui conditionne la réponse. Il est donc crucial de trouver un bon équilibre entre la durée du traitement et les effets secondaires qui suppriment le bénéfice du traitement.

D'autres études de phase II sont en cours aux EU dans d'autres cancers tels que le mélanome, le cancer de la tête et du cou, le cancer hépatique et le cancer leucémique. D'autre part, le bevacizumab n'est plus utilisé chez les patients ayant des événements trombo-emboliques, des perforations intestinales, des hémorragies, des métastases cervicales et des lésions intra-thoraciques.

2.2 L'Aflibercept: un VEGF-trap ou "Decoy receptor"

L'Aflibercept (Sanofi-Aventis et Regeneron Pharmaceuticals) est un récepteur leurre ou « decoy receptor » qui inhibe l'angiogenèse par ciblage du VEGF-A, VEGF-B et du PlGF. C'est une protéine de fusion recombinante constituée du second domaine d'Ig du VEGFR-1 et du troisième domaine Ig du VEGFR-2 fusionnés à la région constante (Fc) d'une IgG1 humaine (figure 27). L'aflibercept a une plus grande affinité que les VEGFR et que le bevacizumab pour le VEGF-A (Holash et al. 2002). En dépit de quelques données prometteuses dans les essais cliniques de phase précoce dans divers types de tumeurs, l'Aflibercept n'a montré son efficacité que dans les cancers colorectaux métastatiques. De façon surprenante, malgré tous les espoirs basés sur ses propriétés anti-angiogéniques, l'Aflibercept n'a pas réussi à améliorer la survie en combinaison avec la chimiothérapie dans les essais cliniques de phase III randomisés effectués dans le cancer de la prostate, les CBnPCs, le cancer du pancréas ou dans les cancers pancréatiques (Van Cutsem et al. 2012a; Leighl et al. 2010).

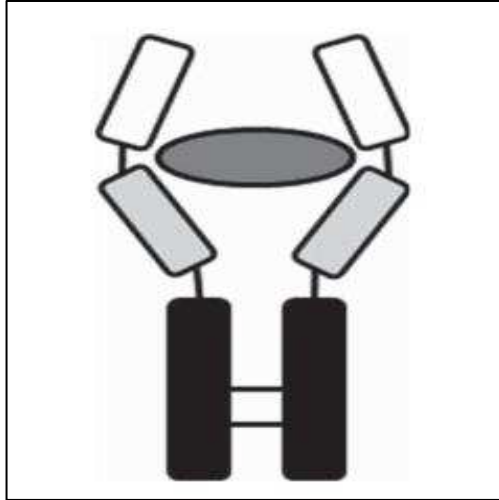


Figure 27. Structure schématique de l'Aflibercept. L'Aflibercept est une protéine recombinante produite par la fusion du domaine 2 de type Ig du VEGFR-1 (rectangle blanc), du domaine 3 de type Ig du VEGFR-2 (rectangle gris) et de la région charnière du domaine Fc de l'immunoglobuline humaine IgG1 (rectangle noir). Ces domaines de VEGFR lient les ligands VEGF-A, VEGF-B et le PlGF représentés par un ovale gris.

3. Les thérapies anti-VEGFR

Le bevacizumab est utilisé en première ligne de traitement pour traiter les patients porteurs de CBnPCs. Parallèlement, d'autres thérapies anti-angiogéniques ont été développées dans le but de cibler les récepteurs du VEGF. Nous distinguerons deux catégories : la première est celle des inhibiteurs pharmacologiques du domaine à activité tyrosine kinase et la deuxième catégorie est celle des anticorps bloquants dirigés contre le domaine extracellulaire du récepteur. Le tableau 7 récapitule les différentes thérapies anti-angiogéniques existant ainsi que leur spectre d'utilisation.

	Approuvé par FDA	Approuvé par MEA	Traitements
<u>Bevacizumab</u>			
Cancer colorectal métastatique	2004 première ligne 2006 deuxième ligne	2005 première et deuxième ligne	Avec chimiothérapie en première et deuxième ligne
CBNPC	2006	2007	Avec chimiothérapie en première ligne
Carcinome rénal	2009	2005	Avec Interféron
Cancer des ovaires	2014 pour les tumeurs résistantes récurrente, non approuvé pour les tumeurs sensibles récurrentes et en première ligne de traitement	2012 en première ligne de traitement et pour les tumeurs sensibles récurrentes. 2014 tumeurs résistantes récurrentes	Avec chimiothérapie
Cancer du sein	Retiré	2009	Avec chimiothérapie
<u>Régorafénib</u>			
Cancer colorectal métastatique réfractaire	2013	2013	Monothérapie, réfractaire
<u>Ramucirumab</u>			
Cancer de l'estomac ou gastro-oesophagien	2014	2014	Refractaire avec ou sans chimiothérapie
CBNPC	2014	2014	Refractaire avec chimiothérapie
Cancer colorectal métastatique	2015	Pas approuvé	Refractaire avec chimiothérapie
<u>Sorafénib</u>			
Cancer hépatique	2007	2006	Monothérapie, première ligne
Cancer rénal	2005	2006	Monothérapie, première ligne
Cancer de la thyroïde différencié	2013	2014	Refractaire à l'iode radioactif
<u>Sunitinib</u>			
Cancer rénal	2006	2007	Monothérapie, première ligne de traitement

Tumeur pancréatique neuroendocrine	2011	2010	monothérapie, tumeurs pancréatique, neuroendocrine très différenciées
<u>Pazopanib</u>			
Cancer rénal	2009	2009	Monothérapie, deuxième ligne de traitement
Sarcome	2012	2012	Monothérapie
<u>Axitinib</u>			
Cancer rénal	2012	2012	Monothérapie, deuxième ligne de traitement
<u>Vandétanib</u>			
Cancer médullaire de la thyroïde	2011	2012	Tumeur de la thyroïde non résecable, localement avancée, métastatique médullaire
<u>Lenvatinib</u>			
Cancer de la thyroïde	2015	2015	Cancer de la thyroïde réfractaire à l'iode radioactif et différenciée locale ou métastatique
<u>Nintedanib</u>			
CBNPC	Non approuvé	2014	CBNPC localement avancée et métastatique, deuxième ligne de traitement
<u>Aflibercept</u>			
Cancer colorectal	2012	2013	Deuxième ligne
<u>Cabozantinib</u>			
Cancer rénal	2016	2016	Patients porteurs de cancer rénal avancé ayant été traité avant par une thérapie AAG
Cancer de la thyroïde	2012	-	Pour les patients inopérables par chirurgie

Tableau 7 Les thérapies anti-angiogéniques approuvés par la FDA et/ou la MEA dans différents cancers.

3.1 Les inhibiteurs du domaine tyrosine kinase des récepteurs du VEGF-A

Les inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase des Récepteurs à Activité Tyrosine Kinase (RTKs) dont font partie les VEGFRs sont de petites molécules qui vont agir en aval de la transduction du stimulus angiogénique en inhibant l'activité des récepteurs. Ils sont divisés en trois catégories différentes selon leur mécanisme d'action. Les inhibiteurs tyrosines kinases de classe 1 reconnaissent la conformation active du récepteur et bloquent le site de fixation de l'ATP en mimant les liaisons hydrogènes normalement formées entre le récepteur et l'ATP empêchant ainsi son activation (J. Zhang, Yang, et Gray 2009). Le sunitinib est un exemple des inhibiteurs de classe 1 des récepteurs VEGFR-1-3. Il agit aussi sur les récepteurs PDGFR- α/β , KIT, FLT3 (Fms-related Tyrosine kinase 3), CSF-1R (Colony Stimulating Factor-1 récepteur) et RET (Faivre et al. 2007).

Les VEGFR-TKI de classe 2 reconnaissent la forme inactive du récepteur et se fixent sur une poche hydrophobe contenant un motif DFG qui est adjacente au site de fixation de l'ATP. Ils rentrent indirectement en compétition avec l'ATP. Ce domaine est responsable du transfert du groupement phosphate sur le substrat de la kinase. La poche hydrophobe se forme lorsque la boucle d'activation des récepteurs est en conformation DFG-out. La présence des VEGFR-TKIs de classe 2 inhibe la signalisation en empêchant le passage de la conformation DFG-out à DFG-in. Le sorafénib est un exemple de VEGFR-TKI de classe 2 qui bloque la phosphorylation des récepteurs VEGFR, PDGFR, Raf et KIT (LNJohnson 2009). Les VEGFR-TKI classe 3 sont des inhibiteurs "covalents". Cette classe d'inhibiteurs forme des liaisons covalentes irréversibles entre leurs groupements électrophiles et des résidus cystéines du domaine kinase des VEGFRs. Cela permet de bloquer la fixation de l'ATP et donc d'empêcher l'activation du récepteur (Kwak et al. 2005). Le vandetanib (ZD6474, Zactima, AstraZeneca) est un exemple parfait de cette classe et cet inhibiteur inhibe les VEGFR et EGFR (Morabito et al. 2009). Suite aux succès obtenus avec le bevacizumab, différentes études de phase III ont été lancées pour identifier des VEGFR-TKI utilisables pour le traitement des patients porteurs de CBnPCs. Malheureusement, malgré les nombreuses études faites sur des inhibiteurs différents tels que le sorafénib, le cédiranib, le motesanib ou l'axitinib, aucun bénéfice en terme d'amélioration de la survie des

patients n'a été observé en comparaison des thérapies standard (Goss et al. 2010; G. Scagliotti et al. 2010; Paz-Ares et al. 2012; G. V. Scagliotti et al. 2012).

Le cédiranib (Recentin ; AstraZeneca) est un TKI qui inhibe les récepteurs VEGFR-1-3, PDGFR-a/b, FGFR1 et c-kit (Wedge et al. 2005). Dans une étude de phase II/III, les patients atteints de CBnPCs avancés traités avec le cédiranib, le carboplatine et le paclitaxel ont une meilleure survie sans progression par rapport aux patients traités avec la chimiothérapie seule. Cependant, pour des raisons de toxicité, cette étude a été arrêtée (Goss et al. 2010). De même, une autre étude de phase III comparant patients porteurs de CBnPCs traités par le cédiranib combiné au carboplatine et au paclitaxel aux patients traités uniquement par la chimiothérapie a aussi été arrêtée en raison d'une augmentation significative d'effets indésirables tels que l'hypertension, l'anorexie et la diarrhée sans amélioration de survie (Laurie et al. 2012). Les résultats de la majorité des essais de phase III qui ont évalué des agents anti-angiogéniques utilisés en deuxième ligne de traitement ont aussi été décevants (Martin Reck et al. 2014; Boer et al. 2011; J. S. Lee et al. 2012; Herbst et al. 2010; Paz-Ares et al. 2012; Natale et al. 2011; G. V. Scagliotti et al. 2012; Herbst et al. 2011; Ramlau et al. 2012). Ainsi, à ce jour, aucun TKI ciblant les VEGFRs n'a été approuvé pour le traitement des patients porteurs de CBnPCs réfractaires ou en rechute.

Cependant, il y a eu des progrès récents avec des inhibiteurs multi-kinases tel que le nintédanib. Le nintédanib est un inhibiteur des récepteurs VEGFR-1-3, PDGF-a/b et FGFR1-3. Le nintédanib est le premier inhibiteur anti-angiogénique qui a montré une amélioration de survie chez les patients porteurs d'adénocarcinomes pulmonaires (Kwak et al. 2005). En effet, dans les essais cliniques, cet inhibiteur a montré des effets anti-tumoraux et anti-angiogéniques importants (Ellis et al. 2010; Doebele et al. 2012; M. Reck et al. 2011). Le sunitinib et le sorafénib, eux-aussi des inhibiteurs multi-kinases, sont utilisés en première et en deuxième ligne de traitement chez les patients porteurs de carcinomes rénaux métastatiques respectivement.

3.2 Autres inhibiteurs pharmacologiques

Le semaxanib (également connu sous le nom semaxinib ou SU5416) est un inhibiteur puissant et sélectif des récepteurs VEGFR-1 et VEGFR-2 qui a démontré des effets anti-angiogéniques dans des modèles in vitro et in vivo (O'Donnell et al. 2005; Hoff et al. 2006). Cet inhibiteur n'a pas été encore approuvé par la FDA. A part le sémamaxanib, le Ki8751 est un inhibiteur des récepteurs VEGFR-2 et PDGFR qui a un effet anti-tumoral dans des modèles in vivo de xénogreffes de souris nudes de gliomes, de carcinomes de l'estomac, de mélanomes, de cancer du colon et de cancers du poumon. Malgré le fait que c'est un inhibiteur très puissant, le KI8751 n'est pas encore approuvé par la FDA (Kubo et al. 2005).

3.3 Les anticorps monoclonaux anti-VEGFR

Le ramucirumab (IMC-1121B, ImClone Systems, New York , NY) est un anticorps monoclonal humain de type IgG1 qui se lie avec une grande affinité au domaine extra-cellulaire du VEGFR-2. Le ramucirumab et sa version murine, DC-101, ont été conçus pour se lier à un épitope du VEGFR- 2 impliqué dans la liaison du récepteur à son ligand VEGF-A (Lu et al. 2002). De façon très intéressante, le ramucirumab a été approuvé par la FDA en tant que monothérapie aussi bien qu'en association avec une chimiothérapie dans différents cancers métastatiques tels que: le cancer de l'estomac, le cancer gastro-œsophagien (GE), le cancer colorectal et les CBnPCs (Calvetti et al. 2015). Contrairement au bevacizumab qui est utilisé en première ligne de traitement dans les cancers CBnPCs non squameux, le ramucirumab en combinaison avec le docetaxel est utilisé pour traiter les patients porteurs de CBnPC squameux et non squameux sans risque d'hémorragies fatales (Britten et al. 2007).

4. Les thérapies ciblant les co-récepteurs

4.1 Ciblage thérapeutique des neuropilines

Les Anticorps monoclonaux

Des anticorps monoclonaux ciblant les domaine $\alpha 1/\alpha 2$ (anti-NRP-1A) ou le domaine $\beta 1/\beta 2$ (anti-NRP-1B) de la neuropiline-1 ont été développés par la société Genentech. Ces anticorps diminuent la migration induite par le VEGF-A dans les cellules HUVEC et inhibent la formation de tumeur dans des modèles animaux (Mani et al. 2008). Ces anticorps ont été utilisés aussi en combinaison avec des thérapies ciblant le VEGF-A et ont ralenti significativement la croissance tumorale dans des modèles animaux (Huang 2011). Des anticorps monoclonaux ciblant les domaines $\beta 1/\beta 2$ de la neuropiline-2 ont récemment été développés. Ces anticorps diminuent le nombre de vaisseaux intra-tumoraux, de métastases dans les ganglions lymphatiques sentinelles dans des modèles de xénogreffes murines (Yaqoob et al. 2012). Le MNRP-1685 est un anticorps humain anti-NRP-1 qui inhibe la fixation du VEGF-A à la NRP-1. En conséquence, cet anticorps diminue les effets de migration cellulaire et d'angiogenèse médiés par le VEGF-A in vitro et in vivo. De façon intéressante, cet anticorps est en phase I d'essais clinique seul ou en association avec le bevacizumab, avec ou sans paclitaxel, pour le traitement de tumeurs solides avancées (Patnaik et al. 2014).

Les peptides

Le screening de banques de peptides capables de reconnaître spécifiquement certaines cellules cancéreuses a permis l'identification de séquences d'acides-aminés liant spécifiquement les neuropilines. En effet, des études ont évoqué des peptides capables de pénétrer dans la tumeur et de lier spécifiquement les intégrines humaines et la neuropiline-1 (Teesalu et al. 2009). Cette capacité à pénétrer dans les tumeurs par endocytose permet de les coupler à d'autres agents thérapeutiques pour améliorer leur efficacité, ou de les coupler à des agents permettant d'améliorer la visualisation des tumeurs en imagerie médicale (Sugahara et al. 2010). Depuis, d'autres peptides liant spécifiquement la neuropiline-1 ont été décrits dans différents modèles de

cellules cancéreuses in vitro. Le peptide ATWLPPR (A7R) empêche la fixation du VEGF₁₆₅ sur la neuropiline-1 dans les cellules endothéliales. Ces effets sont confirmés dans des modèles de xénogreffes du cancer du sein, MDA-MB-231, empêchant alors la croissance et l'angiogenèse tumorales (Binétruy-Tournaire et al, 2000). Par ailleurs, l'EG00229 est une petite molécule non peptidique qui bloque la fixation du VEGF₁₆₅ sur la neuropiline-1 et ceci a comme conséquence l'inhibition de la phosphorylation du VEGFR-2, l'inhibition de la migration des cellules endothéliales et la diminution de la viabilité dans la lignée d'adénocarcinome pulmonaire A549. Cette molécule augmente l'activité cytotoxique du paclitaxel et du 5-FU (Jarvis et al. 2010).

4.2 Ciblage thérapeutique de la β 1 intégrine

Les Anticorps monoclonaux

Les stratégies qui ciblent les intégrines β 1, en particulier l'intégrine α 5 β 1, inhibent la progression tumorale dans des modèles précliniques. Le volociximab, un anticorps monoclonal dirigé contre l'intégrine α 5 β 1, inhibe l'angiogenèse et empêche la croissance tumorale (Bhaskar et al. 2007). Un essai clinique de phase I chez des patients atteints de tumeurs malignes solides avancées a montré que le volociximab est bien toléré et peut avoir une efficacité clinique. Le volociximab est actuellement en essai clinique de phase II pour des tumeurs solides telles que les mélanomes (Cranmer, Bedikian, et Ribas 2005) et le cancer pancréatique (Valle et al. 2016). Le 339.1, un autre anticorps inhibiteur de l'intégrine β 1, affecte de façon significative in vitro et in vivo de la croissance du cancer du sein (Bhaskar et al. 2007).

Les peptides

L'ATN-161 est un inhibiteur peptidique de l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$ qui bloque la croissance tumorale et le développement des métastases dans le cancer du sein dans les modèles in vivo (Khalili et al. 2006). Dans les modèles murins de cancer du colon développant des métastases dans le foie, le traitement avec l'inhibiteur ATN-161 associé au 5-FU réduit significativement la croissance tumorale et les métastases hépatiques par rapport aux deux traitements utilisés seuls (Stoeltzing et al. 2003). ATN-161 a été testé chez des patients atteints de tumeurs solides avancées et est bien toléré dans un tiers des patients (Cianfrocca et al. 2006).

4.3 Autres thérapies anti-angiogéniques

Vers une médecine personnalisée: les miARNs

La première preuve que des miARNs sont impliqués dans la régulation de l'angiogenèse au cours du développement vasculaire a été décrit dans les cellules HUVECs in vitro et in vivo transfectées par des ARNi ciblant Dicer (Kuehbach et al. 2007). En outre, il a été montré que la réponse de l'endothélium vasculaire à des stimuli angiogéniques est modulée par certains miARNs, qui peuvent être soit pro-angiogéniques ou anti-angiogéniques. Dans ce contexte, différentes stratégies thérapeutiques ont été mises en place pour inhiber l'expression des miARNs in vivo et sont actuellement en cours d'évaluation dans des modèles précliniques (Anand 2013). Parmi ces stratégies, nous citerons particulièrement les antagomirs qui sont une classe d'oligonucléotides modifiés chimiquement et qui forment des ARN simples brins complémentaires aux cibles des miRNA et qui sont capables d'inhiber les miARN endogènes (Esau et al. 2004; Krützfeldt et al. 2007; Krützfeldt et al. 2005). Les Locked Nucleic Acid (LNA-) antimirs sont des oligonucléotides ARN anti-sens dans lesquels le fragment ribose d'un nucléotide LNA est modifié pour augmenter la stabilité et la spécificité (Elmén et al. 2008). Les MiR-éponge sont des transgènes inhibiteurs des miARN qui expriment un ARNm qui contient plusieurs sites de liaison en tandem pour un miARN endogène. Ils sont ainsi en mesure d'interagir de manière stable avec le miARN correspondant et d'empêcher son association avec les cibles endogènes (Esau et al. 2004). Le miR-Mask est un simple brin oligonucléotide anti-sens qui est parfaitement complémentaire aux sites de liaison du miARN situés dans l'extrémité

3' UTR de l'ARNm cible. Le miR-Mask est donc capable de masquer l'accès des miRNA à ses sites de liaison sur l'ARNm cible et donc altère sa fonction inhibitrice (Esau et al. 2004).

A l'inverse, il existe des stratégies destinées à rétablir les niveaux de miARN, comme les miARN mimics. Elles sont basées sur l'utilisation d'oligonucléotides double brin synthétiques qui miment les miARNs endogènes et sont transformés dans la cellule lorsqu'ils sont transfectés (A. G. Bader et al. 2011). Les vecteurs d'expression de ces miARNs sont construits avec des promoteurs qui peuvent permettre l'expression de certains miARNs de façon spécifique dans les tumeurs et dans les tissus (J. Ji et al. 2009). Par exemple, le MRX34, un liposome qui a été développé par la société Mirna Therapeutics et qui mime les fonctions de miR-34. MRX34 induit une régression complète de la tumeur dans des modèles orthotopiques de carcinomes hépatocellulaires de souris (Andreas G. Bader 2012). Ces résultats ont été à la base d'un essai clinique de phase I pour évaluer la sécurité des MRX34 chez les patients atteints de cancer primitif du foie ou ceux avec des métastases hépatiques d'autres cancers.

5. Les limitations des thérapies anti-angiogéniques

À côté des effets indésirables dont nous avons déjà parlé, la principale limite à l'utilisation des thérapies anti-angiogéniques repose sur l'apparition des résistances et l'absence de biomarqueurs prédictifs de réponse permettant de sélectionner les patients à traiter.

5.1 Résistance aux thérapies anti-angiogéniques

Le succès initial des thérapies anti-angiogéniques a été suivi par l'échec de ces traitements dans la production de réponses cliniques durables. Bien que les patients porteurs de certains types de cancers sont d'emblée réfractaires aux thérapies anti-angiogéniques, la majorité des patients porteurs de cancer répondent à ces thérapies mais échappent rapidement au traitement. La résistance aux thérapies est devenue une limite pratique au développement de médicaments. Ce concept d'échappement se base soit sur l'apparition d'une mutation ou bien sur la mise en place par les cellules tumorales de mécanismes de résistance suite au traitement. Ces observations mettent en évidence l'importance de trouver des marqueurs permettant de prédire la réponse et d'anticiper l'apparition de ces résistances.

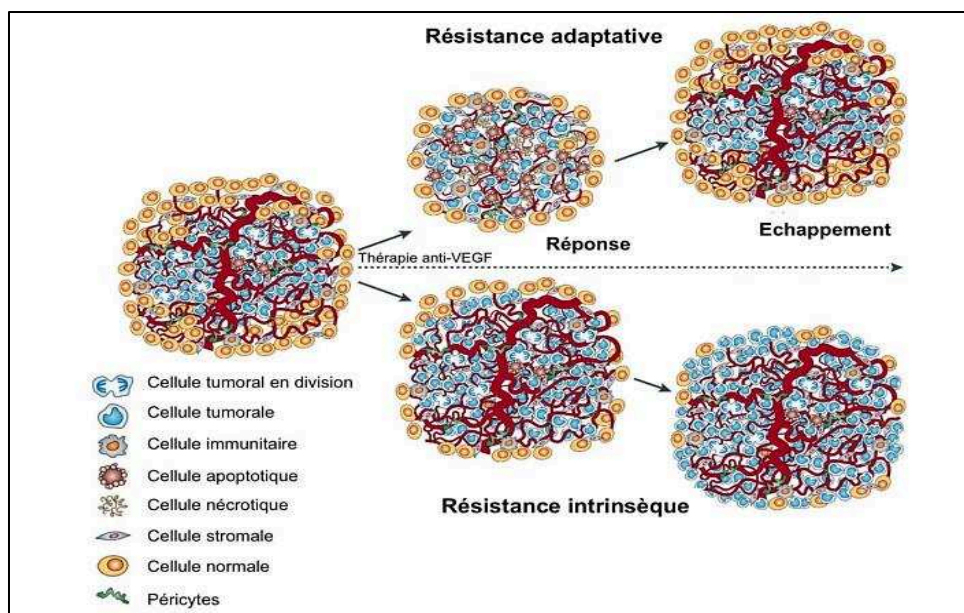


Figure 28. Les deux modes de résistance aux traitements anti-angiogéniques (Bergers G et Hanahan D, Nature Reviews Cancer, 2008).

Dans le cas d'une résistance innée ou intrinsèque, la tumeur est insensible et ne répond pas au traitement. Par conséquent, la tumeur continue à se développer sans aucun bénéfice des thérapies anti-angiogéniques (figure 28). Plusieurs mécanismes ont été décrits pour expliquer l'existence des résistances innées aux traitements parmi lesquels je citerai brièvement : la pré-existence de signaux pro-angiogéniques redondants, la pré-existence de cellules inflammatoires infiltrantes qui protègent les vaisseaux, l'hypo-vascularité des tumeurs dont la croissance est indépendante de l'angiogenèse et le statut invasif et métastatique préexistants. A côté des résistances innées, les tumeurs développent aussi des résistances acquises. Après une phase de réponse au traitement, la tumeur s'adapte progressivement au traitement et reprend sa croissance et son développement. Il existe au moins quatre mécanismes distincts adoptés par les tumeurs s'agissant d'une résistance acquise aux thérapies anti-angiogéniques. Je citerai : (1) l'activation et/ou la régulation positive de voies de signalisation pro-angiogéniques alternatives au sein de la tumeur ; (2) le recrutement des cellules dérivées de moelle osseuses ; (3) l'augmentation de la couverture péricytaire conduisant à des vaisseaux plus matures donc plus résistants ; (4) l'augmentation de la capacité invasive des cellules tumorales et le piégeage lysosomal des thérapies (figure 29).

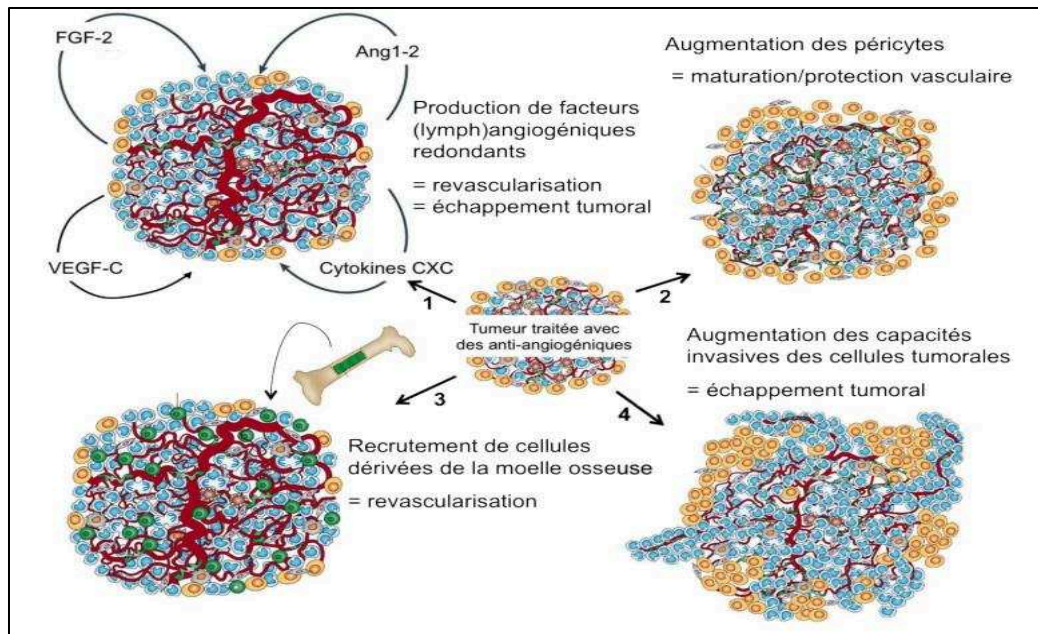


Figure 29. Les différents mécanismes de résistance acquise aux traitements anti-angiogéniques.

Nous pouvons observer sous traitement une production de facteurs (lymph)-angiogéniques redondants qui vont favoriser la (lymph)-angiogenèse tumorale indépendamment du facteur ciblé par la drogue. Nous observons aussi une augmentation du recrutement des péricytes et une maturation vasculaire. D'autre part, nous observons sous traitement une augmentation de l'hypoxie intra-tumorale. Cette augmentation induit la surproduction de plusieurs cytokines (VEGF, SDF-1) qui favorise le recrutement de cellules dérivées de la moelle osseuse. Enfin, nous observons sous traitement une augmentation des capacités de migration et d'invasion des cellules tumorales (Bergers et Hanahan 2008).

Je détaillerai ci-dessous certains des mécanismes de résistance aux thérapies anti-angiogéniques décrits notamment dans les cancers du poumon.

5.1.1 Activation de voies de signalisation alternatives : rôle du stroma

Suite au blocage de la voie de signalisation dépendante du VEGF-A, d'autres facteurs pro-angiogéniques sont sécrétés afin de déclencher une néo-vascularisation tumorale indépendante du VEGF-A. Ces facteurs de croissance peuvent être sécrétés par des cellules tumorales, mais aussi par des cellules du micro-environnement tumoral telles que des cellules dérivées de moelle osseuse (BMDC), des macrophages associés à la tumeur (TAM), des fibroblastes associés à la tumeur (TAF) ou des cellules du tissu sain (Leite de Oliveira, Hamm, et Mazzone 2011). Les péricytes produisent des facteurs paracrines comme le VEGF-A qui vont assurer la survie des cellules endothéliales. Les tumeurs avec une forte proportion de péricytes développent une résistance intrinsèque (Casanovas 2011; Darland et al. 2003; Bergers et Benjamin 2003). Dans un modèle de xénogreffe de souris dérivées d'un adénocarcinome pulmonaire humain, il a été montré que les péricytes recrutés induisent l'expression de l'EGF, conduisant à un remodelage vasculaire et à une résistance à la thérapie anti-angiogénique (Cascone et al. 2011; Casanovas 2011). De plus, certaines tumeurs traitées avec une thérapie anti-VEGF peuvent surmonter l'inhibition par régulation positive du PDGF-C dans des fibroblastes associés à des tumeurs, augmentant la proportion des péricytes vasculaires et favorisant ainsi la résistance aux thérapies anti-VEGF (Crawford et al. 2009; di Tomaso et al. 2009). En réponse au pazopanib dans les cancers du poumon, la diminution des niveaux plasmatiques de sVEGFR-2 et d'IL-4 a été corrélée avec une diminution du volume tumoral (Nikolinakos et al. 2010). Ces résultats suggèrent que l'inhibition des facteurs pro-angiogéniques redondants au VEGF-A pourrait être une bonne stratégie pour contre-carrer la résistance induite par la sécrétion de ces facteurs pro-angiogéniques. Cependant, compte tenu du nombre important de facteurs impliqués et de la grande diversité des modèles tumoraux à prendre en considération, cette approche bien qu'elle soit très intéressante, pourrait être très difficile à mettre en place.

5.1.2 Vascularisation par co-option vasculaire

A part l'angiogenèse, il existe plusieurs types de vascularisation adoptés par les tumeurs pour se développer tels que la « vasculogeno mimicry » ou la co-option vasculaire qui ont déjà été citées dans l'introduction. Dans les CBnPCs, le rôle de la « vasculogeno mimicry » reste peu élucidé à

l'heure actuelle. La co-option vasculaire est un processus dans lequel les cellules malignes se développent autour des vaisseaux normaux pré-existants afin d'assurer leur apport en oxygène et en nutriments sans déclencher le processus angiogénique (Holash et al. 2002). Pezzella et ses collègues ont montré que certains CBnPCs n'ont pas les caractéristiques morphologiques de néoangiogenèse, et se développent par co-option vasculaire à partir des vaisseaux sanguins pulmonaires pré-existants. Ces tumeurs non angiogéniques ont été caractérisées comme des tumeurs à croissance rapide.

5.1.3 Hypoxie

Les thérapies anti-angiogéniques induisent souvent de l'hypoxie tumorale. Récemment, le facteur (HIF)-1 α a été impliqué dans la résistance aux thérapies anti-angiogéniques. Des essais cliniques et pré-cliniques en phase II montrent que la mauvaise réponse au traitement bevacizumab combiné à la radiothérapie corrèle avec une augmentation du facteur HIF-1 (Kim et al. 2005). Piao et ses collègues ont rapporté les effets du bevacizumab par rapport au sunitinib dans un modèle de gliome orthotopique (Piao et al. 2012). Ils ont constaté que le traitement au bevacizumab prolonge significativement la survie par rapport aux témoins non traités ou bien traités par le sunitinib seul. Cet effet pourrait être expliqué par la diminution de la vascularisation de la tumeur observée après bevacizumab, associée à un retard dans la survenue de l'hypoxie et de l'infiltration de cellules myéloïdes. Ces résultats fournissent une perspective intéressante sur différents types de thérapies anti-angiogéniques, ce qui suggère que le degré d'hypoxie induite par un agent donné peut être un facteur plus important que le nombre de cibles.

5.1.4 Apparition d'un phénotype invasif dans les tumeurs

Certaines études précliniques indiquent que les thérapies anti-VEGF donnent lieu à des tumeurs plus invasives et induisent le développement des métastases notamment pulmonaires (Pàez-Ribes et al. 2009; Cooke et al. 2012; Lu et al. 2012; Sennino et al., 2012). D'autre part, Ebos et collaborateurs ont montré que l'administration de sunitinib avant ou après la résection de la tumeur primaire augmente l'incidence des métastases et conduit à une diminution de la survie globale par rapport au contrôle (Ebos et al. 2009). Dans la même étude, le traitement des souris

avec le sunitinib, avant ou après l'injection intraveineuse de cellules tumorales, favorise également le développement de métastases et induit une diminution de la survie globale par rapport aux contrôles (Ebos et al. 2009). L'ensemble de ces études démontrent donc bien l'impact des thérapies anti-angiogéniques sur les cellules tumorales aussi.

5.2 Absence de biomarqueurs prédictifs de réponse

A l'heure actuelle sur la base de nombreux essais cliniques établis, plusieurs biomarqueurs ont été proposés et investigués mais malheureusement aucun biomarqueur prédictif de réponse robuste pour les thérapies anti-angiogéniques n'a été validé. La validation de biomarqueurs est sans doute une nécessité dans la mesure où elle permettra aux oncologues de sélectionner les patients éligibles aux traitements, de choisir les doses optimales de traitement, et de prédire l'efficacité clinique du traitement et cela reste à l'heure actuelle un défi non relevé. Il est important de noter qu'il existe différents types de biomarqueurs qui pourraient être des marqueurs circulants ou bien intra-tumoraux que je détaillerai dans cette partie. Ces biomarqueurs doivent être testés dans des fluides dont le prélèvement est peu invasif et avec des techniques de détection simples afin de pouvoir les proposer aux services hospitaliers.

5.3 Les biomarqueurs circulants

Plusieurs facteurs angiogéniques circulants ont été quantifiés dans le plasma ou le sérum des patients afin d'essayer de corréliser leur expression avec une réponse aux traitements. Le VEGF-A étant un facteur clé pour la vascularisation tumorale, la plupart des études l'ont privilégié par rapport aux autres facteurs angiogéniques potentiels. Il a été déjà décrit que les hauts niveaux plasmatiques de VEGF-A sont corrélés avec un mauvais pronostic. Les données concernant les niveaux de VEGF-A avant traitements par anti-angiogéniques sont très hétérogènes (Zhu et al. 2012). Une étude a montré que les patients porteurs de CBnPC ayant un haut niveau de VEGF-A répondraient mieux au bevacizumab (Dowlati et al. 2008). Cependant, après traitement au bevacizumab, le VEGF-A est capté entièrement ou en partie par l'anticorps ce qui rend son dosage dans le plasma difficile à interpréter. En outre, une méta-analyse récente effectuée à partir des données des essais de phase III chez des patients porteurs de cancers colorectaux, pulmonaires et rénaux confirme que les niveaux plasmatiques de VEGF-A avant traitement au

bevacizumab sont un marqueur pronostique mais pas prédictif de réponse (Lambrechts et al. 2013). Toutefois, un test ELISA mesurant les taux plasmatiques des petites isoformes du VEGF-A (VEGF₁₁₁ et VEGF₁₂₁) a montré une corrélation entre les hauts niveaux de VEGF₁₂₁ et une meilleure survie sans progression et survie globale après traitement par bevacizumab dans les cancers du sein, du pancréas et dans les cancers gastriques. Cela n'est cependant pas observé dans les cancers du poumon, colorectaux et rénaux (Lambrechts et al. 2013). Le VEGF₁₂₁ pourrait donc être un biomarqueur potentiel de réponse au traitement bevacizumab dans certains cancers (Lambrechts et al. 2013). Dans les cancers colorectaux traités par le bevacizumab les niveaux plasmatiques du PIGF augmentent et corréler avec un bon pronostic (Willett et al. 2009). Chez les patients porteurs de glioblastomes traités avec le cédratinib, les hauts niveaux de PIGF et de FGF sont corrélés avec une meilleure survie (Batchelor et al. 2010).

Mise à part les VEGF et facteurs de croissance circulants, les variants solubles des récepteurs VEGFR-1, VEGFR-2 et neuropiline-1 ont été aussi investigués comme biomarqueurs potentiels de réponse aux thérapies anti-angiogéniques. Par exemple, dans les CBnPCs, de bas niveaux plasmatiques de sVEGFR-2 et sVEGFR-3 avant traitement prédisent une meilleure survie sans progression au cédiranib (Addison et al. 2015). De façon très intéressante, de nombreuses études ont quantifié les taux plasmatiques et/ou sériques de sVEGFR-1 avant et/ou après traitement aux thérapies anti-angiogéniques. Il apparaît dans ces études que les niveaux plasmatiques de sVEGFR-1 sont inversement corrélés à la réponse au bevacizumab ou aux VEGFR-TKI dans les cancer colorectaux (vandetanib plus cetuximab/irinotecan), hépatocellulaires (cediranib), les sarcomes (sorafenib), les cancer du sein ou les cancers du poumon (Zhu et al. 2013; Meyerhardt et al. 2012a). Dans les cancers rénaux, de hauts niveaux sériques de sVEGFR-1 corréler avec une mauvaise réponse au bevacizumab (Harris et al. 2001). Chez les patients porteurs de cancers colorectaux avancés traités avec du bevacizumab en combinaison avec des agents chimiothérapeutiques, les hauts niveaux de sVEGFR-1 et les bas niveaux de VEGF-A corréler avec une vascularisation anormale dans les tumeurs. Ces patients présentent moins d'effets secondaires mais ils répondent moins à la combinaison bevacizumab/irradiation (Duda et al. 2010). Une autre étude dans les cancers du poumon avancés de type non squameux montre aussi que de hauts niveaux de sVEGFR-1 et de PIGF avant traitement corréler avec un mauvais pronostic. Après traitement, bien que le niveau de PIGF reste élevé, le niveau de sVEGFR-1

diminue transitoirement (Rebecca S. Heist et al. 2015a). Dans les cancers du sein triple négatif, le traitement par bevacizumab augmente les niveaux plasmatiques de sVEGFR-1, et la régression tumorale est associée avec les bas niveaux de sVEGFR-1 avant traitement (Tolaney et al., 2015). De façon importante, ces effets corrèlent avec la maturité vasculaire, notamment le recrutement de péricytes, indiquant une relation entre expression de sVEGFR-1 et normalisation vasculaire au cours de la réponse tumorale aux thérapies anti-angiogéniques. Dans l'ensemble, ces études soulignent le rôle potentiel du sVEGFR-1 en tant que biomarqueur de résistance intrinsèque ou acquise aux thérapies anti-angiogéniques. (Willett et al. 2009; Zhu, Sahani, Duda, Tomaso, et al. 2009; Kopetz et al. 2010).

5.4 Les biomarqueurs intra-tumoraux et dans le microenvironnement tumoral

A côté des biomarqueurs circulants, d'autres études ont mesuré les niveaux d'expression intra-tumoraux des VEGFRs ou des neuropilines. Des niveaux d'expression faibles du récepteur VEGFR-1 ou du co-récepteur NRP-1 semblent prédire une réponse plus importante au bevacizumab. Une expression limitée favorise une augmentation de la survie sans progression et/ou une augmentation de la survie globale dans différents types de cancers (Jubb et al. 2011; Lurje et al. 2010; Van Cutsem et al. 2012b). Dans les cancers colorectaux métastatiques, une étude australienne a montré une association entre de bas niveaux d'expression du VEGFR-1 et une meilleure survie en réponse au bevacizumab (étude AGITG MAX, Price et al., 2011). Dans l'étude AVAGAST, une série de 700 patients porteurs de cancers gastriques, de faibles niveaux intra-tumoraux de NRP-1 ont été associés avec une meilleure survie des patients traités par le bevacizumab (Van Cutsem et al. 2012b). Enfin, de nombreuses études se sont penchées sur l'impact des polymorphismes génétiques impliquant par exemple le VEGF-A, le VEGFR-1 ou le VEGFR-2 dans la réponse aux thérapies anti-angiogéniques (Lambrechts et al. 2013). Dans les cancers du rein métastatiques, il a été montré qu'un polymorphisme du VEGFR-1 affectant la tyrosine 1213 aboutit à une augmentation de l'expression du VEGFR-1 couplée à une diminution de sa signalisation et cela est significativement corrélé avec la progression tumorale (Beuselinck et al. 2014).

6. Vers une combinaison de biomarqueurs pour prédire la réponse aux thérapies anti-angiogéniques

Sur la base des résultats des études cliniques, Lambrechts et collaborateurs ont proposé un modèle décrivant le profil de patients susceptibles de répondre ou résister au traitement par bevacizumab (Figure 30; Lambrechts et al. 2013). Dans ce modèle, Lambrechts propose que les patients « répondeurs » devraient être ceux ayant de hauts niveaux de VEGF₁₂₁ et par conséquent ceux dont les vaisseaux sont dépourvus d'une couche de péricytes et donc plus sensibles au bevacizumab. Ces patients seraient aussi définis par de bas niveaux de VEGFR-1 intra-tumoral, de bas niveaux plasmatiques de sVEGFR-1 et une faible présence des macrophages. En contre partie, le profil des tumeurs résistantes au bevacizumab serait : de hauts niveaux des isoformes VEGF₁₆₅ et de VEGF₁₈₉ associés à une maturité vasculaire (couverture péricytaire, haut indice de perfusion), de hauts niveaux de VEGFR-1 et NRP-1 intra-tumoraux et de hauts niveaux de sVEGFR-1. En outre, ces tumeurs présenteraient une infiltration importante du micro-environnement tumoral par des macrophages, des fibroblastes et/ou des cellules myéloïdes sécrétant de nombreuses molécules pro-angiogéniques telles que l'interleukine-8 (IL-8), le bFGF, le PDGF-B, le PDGF-C, le VEGF-C et le VEGF-D. D'autre part, Bates et collaborateurs ont montré que des hauts niveaux de VEGF_{165b} en réponse au bevacizumab dans les cancers colorectaux métastatiques limitent la réponse au traitement. Ainsi, ils proposent que le ratio VEGF_{165b}:VEGF_{total} pourrait être utilisé en tant que biomarqueur prédictif de réponse au bevacizumab dans ce type de cancer (D. O. Bates et al. 2012).

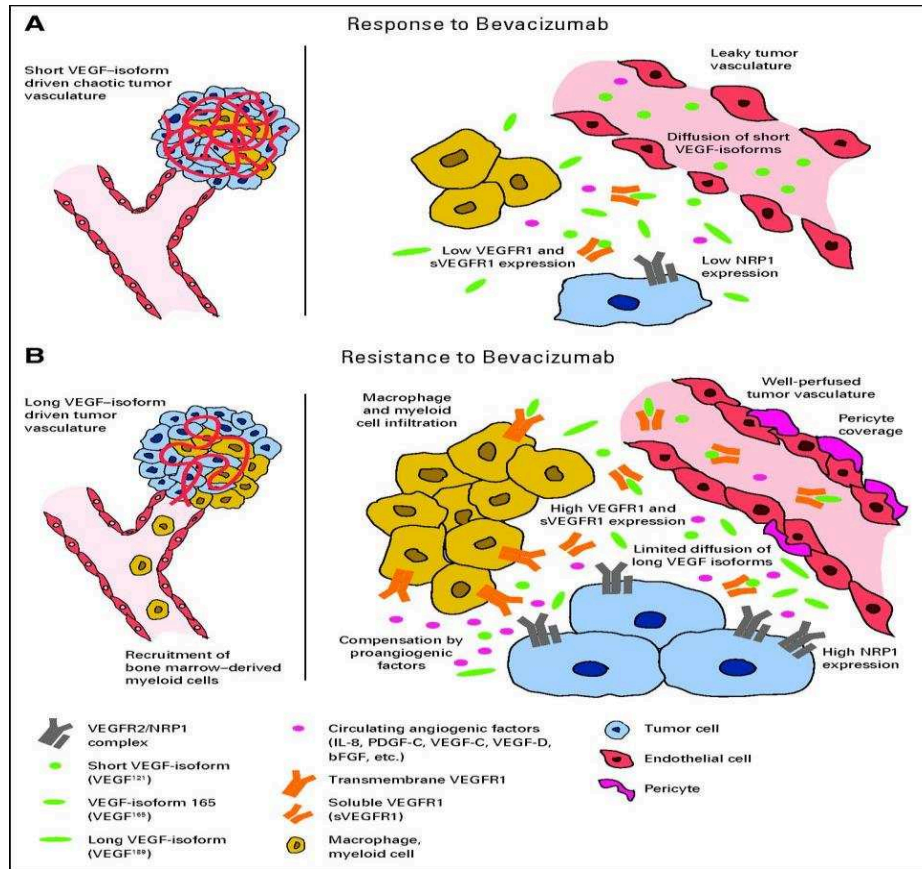


Figure 30. Modèles prédictifs de réponse ou de résistance au Bevacizumab. Ce modèle décrit les différents niveaux d'expression des isoformes du VEGF-A et de ses récepteurs et co-récepteurs. Comme décrit dans le texte, ces niveaux d'expression ont été proposés comme biomarqueurs prédictifs de réponse ou de résistance au bevacizumab (d'après Lambrechts et al., 2013).

Objectifs des travaux de thèse

Objectifs des travaux de thèse

La découverte des thérapies ciblées a été une grande avancée dans la médecine personnalisée des patients porteurs de CBnPCs. Ces thérapies ont permis d'augmenter la survie des patients tout en évitant dans la mesure du possible les effets secondaires des thérapies conventionnelles. Pourtant, malgré une augmentation de la survie sans progression chez les patients porteurs d'adénocarcinomes pulmonaires présentant une mutation de l'EGFR (L858R et Del19) traités aux EGFR-TKI, 25% échappent au traitement (Oxnard et al. 2011). De plus, 4 à 10 % des patients porteurs de CBNPC et ayant un EGF muté acquièrent une résistance primaire (Costa et al. 2007) et plus de 50% des patients développent des résistances acquises (Cortot et Jänne 2014). Quand aux patients porteurs de carcinomes pulmonaires squameux, le cas est plus complexe. Ainsi ces patients ne sont pas éligibles aux thérapies anti-EGFR parce qu'ils ne présentent pas ou très rarement de mutations activatrices ou des amplifications de l'EGFR. Ces patients ne peuvent pas être traités non plus par des thérapies anti-angiogéniques tel que le bevacizumab parce qu'ils développent des hémorragies fatales. Cela relève l'importance de trouver des biomarqueurs prédictifs de réponse afin de pouvoir sélectionner les patients susceptibles de bénéficier de ces traitements. Des études récentes ont donné un nouvel espoir aux patients porteurs de carcinomes pulmonaires squameux avec le développement du Ramucirumab qui a obtenu l'AMM en 2015 pour des études cliniques en phase III. Ces données soulignent donc le besoin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans la réponse des carcinomes pulmonaires squameux aux thérapies anti-angiogéniques. Ceci est d'autant plus important que les carcinomes pulmonaires squameux et les adénocarcinomes pourraient se comporter différemment en ce qui concerne la signalisation VEGF/VEGFR. En accord avec cette idée, de hauts niveaux d'expression du VEGF-A et de ses récepteurs VEGFR-1 et VEGFR-2 corrélaient avec une meilleure survie sans progression dans les carcinomes pulmonaires squameux, mais pas dans les adénocarcinomes. Aucune association significative n'est retrouvée entre ces marqueurs et la densité microvasculaire dans ces tumeurs, indiquant un effet de l'association VEGF/VEGFR-1/VEGFR-2 indépendant des cellules endothéliales (Pajares et al. 2012). Ces résultats, suggérant un rôle bénéfique d'une boucle autocrine dépendante du VEGF-A dans les

carcinomes pulmonaires squameux, ont été confirmés récemment dans une modèle murin. En effet, les tumeurs squameuses échappent aux thérapies inhibant la signalisation VEGFR-2 en activant notamment les voies ERK et AKT, alors que les adénocarcinomes pulmonaires répondent à ces thérapies (Larrayoz et al. 2014). Ces résultats valident donc l'existence d'une boucle autocrine dépendante du VEGF-A dans les tumeurs pulmonaires. Les conséquences de cette boucle pourraient être différentes selon le sous-type histologique tumoral considéré. Il est à noter que les bases moléculaires de cette différence restent largement méconnues.

Dans notre équipe, un des axes de recherche vise à mieux comprendre le rôle de l'épissage alternatif des acteurs de la voie VEGF-A/VEGFR dans la progression et la réponse aux thérapies anti-angiogéniques dans le cancer du poumon. En effet, un certain nombre d'arguments existe en faveur de ce rôle. Par exemple, Lambrechts et collaborateurs ont décrit que les niveaux plasmatiques du variant d'épissage VEGF₁₂₁ étaient prédictifs d'une meilleure réponse au bevacizumab dans les cancers du sein, du pancréas et de l'estomac, mais pas dans les cancers colorectaux et pulmonaires (Lambrechts et al. 2013). Cependant, l'implication de tels ou tels variants d'épissage et surtout leur mécanisme d'action dans la réponse aux thérapies anti-angiogéniques demeurent méconnus voir controversés (cas du VEGF_{165b}) et pourrait largement dépendre du contexte tumoral mais aussi dans le contexte des cancers du poumon du type histologique considéré.

Au laboratoire, nous avons pu montrer que l'épissage du VEGF-A en faveur de l'expression du variant anti-angiogénique VEGF_{165b} est régulé par le facteur de transcription E2F-1 et la protéine SR SRSF2 conduisant à un effet anti-angiogénique dans des modèles de xénogreffes dérivés d'adénocarcinomes pulmonaires chez la souris (Merdzhanova et al., 2010). Dans ce contexte, au cours de ma thèse, j'ai participé à une étude montrant que l'isoforme VEGF_{165b} mais pas l'isoforme VEGF₁₆₅ s'accumule en réponse aux thérapies anti-angiogéniques (bevacizumab) et active une signalisation autocrine dépendante des récepteurs VEGFR-1 et VEGFR-2 mais aussi de l'intégrine β 1 dans des modèles d'adénocarcinomes pulmonaires. De façon importante, nous montrons que cette signalisation contribue à l'émergence de cellules plus invasives et par ce biais à la résistance aux thérapies anti-angiogéniques (Travaux de thèse d'Asma Boudria ; article annexe 1).

Ces résultats nous ont incité à poursuivre la caractérisation du rôle de ces évènements d'épissage dans nos modèles d'étude et notamment en ce qui m'a concerné dans le modèle des carcinomes pulmonaires squameux. En effet, avant mon arrivée au laboratoire, aucun projet n'avait été mené dans l'équipe sur des modèles cellulaires de carcinomes pulmonaires squameux. Sur la base des travaux du laboratoire et de la littérature, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle l'épissage alternatif du VEGFR-1 pourrait jouer un rôle dans la réponse au traitement dans les modèles de carcinomes pulmonaires squameux et contribuer à leur résistance et aux effets secondaires très sévères observés dans les patients porteurs de ce sous-type histologique en particulier.

Sur la base de nos hypothèses de travail, les objectifs de ma thèse étaient d'analyser: **(1)** les effets des thérapies anti-angiogéniques sur l'expression du sVEGFR-1, et plus particulièrement celle du variant sVEGFR-1-i13 exprimé dans le poumon, dans plusieurs lignées cellulaires dérivées de carcinomes pulmonaires squameux en comparaison des adénocarcinomes in vitro et dans des modèles murins ; **(2)** le statut du sVEGFR-1-i13 chez des patients porteurs de carcinomes pulmonaires squameux et d'adénocarcinomes et de corrélérer ce statut avec les paramètres clinico-pathologiques ; **(3)** les facteurs impliqués dans la régulation post-transcriptionnelle et post-traductionnelle de l'expression du sVEGFR-1-i13 ; **(4)** les conséquences biologiques découlant de l'expression du sVEGFR-1 en réponse aux thérapies anti-angiogéniques dans nos modèles d'étude ; **(5)** les mécanismes moléculaires mis en jeu ainsi que les partenaires moléculaires du sVEGFR-1.

Résultats

Le sVEGFR-1-i13, un variant de l'épissage alternatif du VEGFR-1, exerce une double fonction dans la progression et la réponse aux thérapies anti-angiogéniques des carcinomes pulmonaires squameux

Chérine Abou Faycal, Elisabeth Brambilla, Jackeline Agorreta, Anthony Lucas, Pedro Miguel Lacal, Luis Montuenga, Ruben Pio, Sylvie Gazzeri et Béatrice Eymin.

I- Présentation de l'étude

En 1993, Kendall et collaborateurs ont découvert le sVEGFR-1-13, une forme soluble du VEGFR-1 résultant d'un épissage alternatif du VEGFR-1 (R L Kendall et Thomas 1993). Le sVEGFR-1-i13 se lie au VEGF-A mais aussi au PlGF, un autre membre de la famille du VEGF. Les études initialement faites concernant le rôle du sVEGFR-1 dans l'angiogenèse ont décrit plusieurs mécanismes d'action par lesquels le sVEGFR-1 exercerait plutôt des fonctions anti-angiogéniques dans les cellules endothéliales (Richard L. Kendall, Wang, et Thomas 1996). Cependant, un nouveau rôle du sVEGFR-1-i13 a été identifié dans l'adhésion et la migration des cellules endothéliales suite à son interaction avec une intégrine configurant ainsi des fonctions pro-angiogéniques (Orecchia et al. 2003b). Ces données montrent clairement que le sVEGFR-1 pourrait avoir un rôle plus complexe que celui envisagé jusqu'alors dans l'angiogenèse. De plus, d'autres travaux ont identifié un rôle du sVEGFR-1 dans les cellules tumorales (Ruffini et al., 2011 ; Miyake et al., 2016). En accord, des études ont montré que le sVEGFR-1-i13 est aussi exprimé par les cellules tumorales et son expression est corrélée avec un mauvais pronostic et une mauvaise réponse aux traitements anti-angiogéniques (Lamszus et al. 2003; Ruffini et al. 2011; Ilhan, Ilhan, et Deveci 2004). Le sVEGFR-1 a été analysé dans de nombreux modèles tumoraux mais pas chez les patients porteurs de cancers pulmonaires squameux. Ces patients présentent un profil très particulier de réponse aux thérapies anti-angiogénique et sont exclus de

tout type de cohorte. Cela est dû au fait qu'ils présentent des complications (hémorragies pulmonaires) au cours des essais cliniques utilisant du bevacizumab. Dans cette étude, nous avons donc porté un intérêt particulier au rôle des variants solubles du VEGFR-1 dans la progression et la réponse aux thérapies des carcinomes pulmonaires squameux.

II- Résultats

Les thérapies anti-angiogéniques augmentent l'expression du sVEGFR-1-i13 in vitro et in vivo

Nous avons analysé les niveaux d'expression protéique (intra-cellulaire et extra-cellulaire) du sVEGFR-1 dans quatre lignées cellulaires dérivées de carcinomes pulmonaire squameux (MGH7, H2170, H157 et CALU-1) traitées avec le bevacizumab. Nous montrons que le bevacizumab augmente l'expression du sVEGFR-1 sécrété dans le surnageant et augmente aussi son expression protéique intra-cellulaire d'une manière dose-dépendante. Nous avons étendu notre étude et nous avons mesuré les niveaux des transcripts svegfr1-i13 en réponse au bevacizumab. De façon très intéressante, nous montrons que le bevacizumab augmente les niveaux des transcripts svegfr1-i13 mais pas les niveaux des transcripts vegfr-1. Ces résultats montrent que le bevacizumab régule l'épissage alternatif du vegfr-1 en faveur du svegfr1-i13 dans les lignées de carcinomes pulmonaires squameuses. Sur la base de ces résultats, nous avons confirmé l'augmentation de l'expression du sVEGFR-1-i13 dans deux lignées de carcinomes pulmonaires squameuses (MGH7 et H2170) traitées par les VEGFR-TKI (sémoxanib et KI8751). Ces expériences ont été aussi effectuées dans des lignées d'adénocarcinomes pulmonaires (H358, H1299 et A549) et dans des cellules endothéliales (HUVEC, HMEC). De façon très intéressante, nous ne retrouvons pas d'augmentation des niveaux de sVEGFR-1-i13 dans les modèles d'adénocarcinomes pulmonaires en réponse aux mêmes thérapies anti-angiogéniques. Afin de confirmer ces résultats in vivo, nous avons analysé les niveaux intra-tumoraux du sVEGFR-1-i13 sur des coupes de tumeurs SCC ou ADC murines provenant de souris traitées ou non par des thérapies anti-angiogéniques (sunitinib, DC101). De façon intéressante, nous confirmons in vivo que les thérapies anti-angiogéniques augmentent l'expression du sVEGFR-1-i13 dans les

carcinomes squameux et pas les adénocarcinomes. Ces résultats sont la première démonstration que les thérapies anti-angiogéniques augmentent les niveaux d'expression du sVEGFR-1-i13 dans les carcinomes pulmonaires squameux in vitro et in vivo.

Le sVEGFR-1-i13 est régulé par VEGF₁₆₅ et par SOX2

Dans les cellules endothéliales, il a été déjà montré que le VEGF₁₆₅ augmente l'expression des transcrits sVEGFR-1-i13 (Saito et al. 2013). Afin de vérifier si cela est vrai aussi dans les cellules de carcinomes pulmonaires squameux, nous avons surexprimé le VEGF₁₆₅ en utilisant un plasmide qui code spécifiquement pour cette protéine. Ainsi, nous avons montré par western blot et par RT-qPCR que cette surexpression augmente les niveaux des transcrits svegfr1-i13 ainsi que les niveaux protéiques intra-cellulaires et sécrétés du sVEGFR-1-i13 dans les lignées MGH7 et H2170. L'augmentation des niveaux protéiques de sVEGFR-1-i13 a été confirmée après traitement par la protéine recombinante VEGF₁₆₅. Il a été déjà décrit que le VEGF₁₆₅ active le facteur de transcription SOX2 (Foshay et Gallicano 2008, 2012) et une autre étude montre que SOX2 régule le sVEGFR-1-i13 (J.-L. Thomas et al. 2013). Nous nous sommes donc demandés si SOX2 était nécessaire pour la régulation du sVEGFR-1-i13 médiée par le VEGF₁₆₅. Nous montrons que la neutralisation de SOX2 prévient l'augmentation d'expression du sVEGFR-1-i13 en réponse au VEGF₁₆₅. Ces résultats suggèrent que le VEGF₁₆₅ augmente l'expression de sVEGFR-1-i13 par l'intermédiaire de SOX2 dans les SCCs.

Le sVEGFR-1-i13 régule la prolifération des cellules de carcinomes pulmonaires squameuses en réponse aux thérapies anti-angiogéniques

Nous avons ensuite cherché à caractériser l'effet biologique des différentes thérapies anti-angiogéniques (bevacizumab, sémoxanib et KI8751) dans les quatre lignées de carcinomes pulmonaires squameux (MGH7, H157, H2170 et CALU-1) par un test de viabilité cellulaire, par un test de clonogénicité ainsi que par western blot. Nous avons identifié des cellules présentant un niveau de sensibilité et d'activation des voies de signalisation VEGFR différent en réponse à ces traitements. Afin d'investiguer le rôle du sVEGFR-1-i13 dans ce contexte, nous avons sélectionné ensuite une lignée résistante aux thérapies AAG, la lignée MGH7, et une lignée sensible, la lignée H2170. Afin d'analyser les effets du sVEGFR-1-i13 en réponse aux

traitements anti-angiogéniques ou non dans ces cellules, nous l'avons soit neutralisé par ARNi, soit surexprimé par transfection avec un plasmide spécifique. De façon très intéressante, nous montrons : (1) que le sVEGFR-1-i13 active les récepteurs VEGFR-1/VEGFR-2s, stimule la prolifération cellulaire et induit la formation de colonies en soft agar dans les cellules MGH7 alors qu'il exerce des effets inverses en inhibant l'activité des VEGFRs et en induisant l'apoptose dans les cellules H2170 ; (2) que le sVEGFR-1-i13 est impliqué dans la réponse différentielle des cellules MGH7 et H2170 aux thérapies anti-angiogéniques.

L'intégrine $\beta 1$ est impliquée dans les fonctions différentielles du sVEGFR-1-i13

Sur la base de ces résultats, nous avons cherché à savoir pourquoi il existe un différentiel de réponse entre les lignées MGH7 et H2170. Nous avons émis l'hypothèse d'une interaction du sVEGFR-1-i13 avec des partenaires différents. Dans ce cadre, il a été montré que le sVEGFR-1-i13 pouvait interagir avec l'intégrine $\beta 1$ et activer la migration et la prolifération dans les cellules endothéliales (Orecchia et al. 2003b). Nous montrons que les cellules MGH7 expriment un très haut niveau d'intégrine $\beta 1$ alors que son niveau est très faible dans les cellules H2170. De plus, nous montrons que la neutralisation de l'intégrine $\beta 1$ dans les cellules MGH7 inhibe l'activation des VEGFR et induit l'apoptose de ces cellules en réponse aux thérapies anti-angiogéniques. A l'inverse, la surexpression de l'intégrine $\beta 1$ réactive la signalisation VEGFR et prévient la survenue de l'apoptose des cellules H2170 en réponse au traitement. Finalement, des expériences d'immunoprécipitation du VEGFR-2 indiquent que le sVEGFR-1-i13 co-immunoprécipite avec le VEGFR-2 et l'intégrine $\beta 1$ dans les cellules MGH7, alors qu'il co-immunoprécipite uniquement avec le VEGFR-2 dans les cellules H2170. Ces résultats identifient l'intégrine $\beta 1$ comme un partenaire biologique critique du sVEGFR-1-i13 en réponse aux thérapies anti-angiogéniques dans les carcinomes pulmonaires squameux.

De hauts niveaux de sVEGFR-1-i13 sont corrélés avec des stades avancés chez les patients porteurs de SCC

Comme les patients porteurs de carcinomes pulmonaires squameux ne sont pas traités avec les thérapies anti-angiogéniques, nous avons analysé par immunohistochimie les niveaux intra-tumoraux du sVEGFR-1-i13 dans des coupes de tissus issues de patients CBnPCs non traités. Nous avons observé que les hauts niveaux de sVEGFR-1-i13 corrèlent avec les stades pTNM avancés III/IV uniquement chez les patients SCC et pas chez les patients ADC. De plus, les hauts niveaux de sVEGFR-1-i13 et de VEGF₁₆₅ corrèlent avec des hauts niveaux de p-VEGFR-1-Tyr1213 chez ces patients.

III-Conclusion

Nous montrons pour la première fois que les thérapies anti-angiogéniques augmentent les niveaux d'expression du sVEGFR-1-i13 dans des modèles cellulaires dérivés de carcinomes pulmonaires squameux mais pas dans les adénocarcinomes pulmonaires in vitro et in vivo. Le sVEGFR-1-i13 est régulé par le variant d'épissage du VEGF-A, VEGF₁₆₅, mais aussi par le facteur de transcription SOX2. De plus, nous montrons que le sVEGFR-1-i13 régule de façon différentielle une voie de signalisation dépendante des VEGFR-1/VEGFR-2 et de l'intégrine $\beta 1$ pour médier des effets opposés, prolifération ou apoptose. Finalement, nous montrons que de hauts niveaux intra-tumoraux de sVEGFR-1-i13 corrèlent avec des stades avancés III/IV dans les patients non traités porteurs de SCC et pas les patients porteurs d'ADC. Ces résultats suggèrent que les hauts niveaux de sVEGFR-1-i13 pourraient limiter la réponse des patients porteurs de SCC aux traitements anti-angiogéniques mais aussi que le sVEGFR-1-i13 pourrait être impliqué dans la progression des SCCs. Cette étude nous amène à proposer un profil potentiel de patients SCC éligible aux thérapies anti-angiogéniques. Ces patients possèderaient de hauts de niveaux de VEGFR-2, de bas niveaux de sVEGFR-1-i13, VEGF₁₆₅ et intégrine $\beta 1$. De plus, ces résultats suggèrent que la combinaison des inhibiteurs de $\beta 1$ intégrine aux thérapies anti-angiogéniques pourrait être intéressante pour limiter les effets secondaires tels que les hémorragies.

IV- Article

sVEGFR-1-i13, a splice variant of VEGFR-1, exhibits contrasting functions during the progression and response to anti-angiogenic therapies of squamous cell lung carcinoma

Cherine Abou Faycal^{1,2}, Elisabeth Brambilla^{1,2,3}, Jackeline Agorreta^{4,5}, Anthony Lucas^{1,2}, Pedro Miguel Lacal⁶, Luis Montuenga^{4,5}, Ruben Pio^{4,7}, Sylvie Gazzeri^{1,2} and Beatrice Eymin^{1,2*}.

¹INSERM U1209, UMR CNRS5309, Grenoble, 38041, France.

²Université Grenoble Alpes, Institut Albert Bonniot, Grenoble, 38041, France.

³Grenoble Hospital Albert Michallon, Grenoble, 38042, France

⁴Program in Solid Tumors and Biomarkers (CIMA) and Navarra Institute for Health Research (IdiSNA), 31008, Pamplona, Spain

⁵University of Navarra, School of Medicine, Department of Histology and Pathology, 31008, Pamplona, Spain

⁶Istituto Dermopatico de ll'Immacolata IRCCS, Laboratory of Molecular Oncology, Rome, Italy

⁷University of Navarra, School of Sciences, Department of Biochemistry and Genetics, 31008, Pamplona, Spain

Running title: sVEGFR-1, tumor progression and anti-angiogenics

Abstract

While lung adenocarcinoma (ADC) patients can benefit from anti-angiogenic therapies, patients with squamous cell lung carcinoma (SCC) cannot. The reasons for this discrepancy remain largely unknown and predictive biomarkers are urgently needed. The soluble VEGF receptor-1 intron 13, namely sVEGFR-1-i13, is a truncated splice variant of the cell membrane-spanning VEGFR-1 that is devoid of its transmembrane and tyrosine kinase domains. In endothelial cells, sVEGFR-1-i13 exhibits distinct functions. Hence, it inhibits cell proliferation and acts as an anti-angiogenic factor by counteracting VEGF-A/VEGFR signaling, but it also promotes cell adhesion and migration through interaction with $\beta 1$ integrin. By contrast, its role on tumor cells themselves remains unknown. In this study, we found that anti-angiogenic therapies increase the levels of sVEGFR-1-i13 in SCC cell lines and NCTU-induced SCC murine tumorgrafts but not in ADC models, by a mechanism involving the VEGF₁₆₅ splice variant. In SCC models, we further unraveled an original $\beta 1$ integrin/VEGFR signaling network by which sVEGFR-1-i13 controls tumor cell fate in an opposite way, triggering either proliferation or apoptosis, in response to anti-angiogenic therapies. Finally, we reported that high levels of sVEGFR-1-i13 correlate with advanced pTNM stages in SCC patients only, thereby supporting a role of the sVEGF1-i13/VEGFR autocrine loop in SCC progression also. Our results are the first evidence that alternative splicing of vegfr-1 pre-mRNA controls the progression and the response to anti-angiogenic therapies of SCC. Our data might help to understand why some SCC patients do not respond to these treatments, as well as to identify SCC patients eligible for these therapies.

Introduction

Lung cancer is the most commonly diagnosed cancer that accounts for approximately 17% of new cancer diagnoses worldwide. It also bears the highest mortality rate among all cancers. Of these lung cancers, over 85% are classified as non-small cell lung cancer (NSCLC) with 50% of adenocarcinoma (ADC) and 30% of squamous cell carcinoma (SCC)¹. In pre-clinical mouse models, we previously showed that anti-angiogenic treatments correlate with disease progression and tumor growth in SCC but not in ADC tumors². In addition, squamous patients exhibited severe complications and fatal haemorrhages upon treatment with bevacizumab, a humanized anti-VEGF-A monoclonal antibody, or sorafenib, a VEGFR tyrosine kinase inhibitor, restricting the administration of these treatments to non squamous patients^{3,4}. Therefore, in NSCLC, the efficacy and safety of anti-angiogenic therapies appear to be closely associated with the histological sub-type. To date, the molecular bases of such differential response are not known and there are no validated biomarkers to select SCC patients eligible for these therapies.

Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 (VEGFR-1) is a tyrosine kinase receptor for members of the vascular endothelial growth factor (VEGF) family. In addition to the transmembrane isoform of VEGFR-1, different cell types, including endothelial cells, produce extra-cellular forms of VEGFR-1, generally referred as sVEGFR-1, that are devoid of VEGFR-1 transmembrane and tyrosine kinase domains. At the functional level, it is a widely held view that circulating truncated sVEGFR-1s negatively regulate endothelial cells proliferation and inhibit angiogenesis by sequestering VEGF-A or by acting as dominant negative via heterodimerization with membrane-spanning VEGFR-1 and VEGFR-2⁵. Consistently, it has been shown that sVEGFR-1 inhibits tumor neovascularization, growth and metastasis in several mice tumor

models^{6,7,8}. In addition, low expression of sVEGFR-1 has been associated with a poor prognosis in breast cancer⁹. Moreover, high levels of circulating sVEGFR-1 post bevacizumab treatment or before starting bevacizumab plus chemotherapy were associated with low tumor blood perfusion and worse survival in patients with triple negative breast cancers and NSCLCs, respectively^{10,11}. As a whole, these data led to the proposal that plasmatic sVEGFR-1 may serve as a predictive biomarker of response to anti-angiogenic therapies. However, other data have complexified this simple scheme. Hence, it has also been shown that sVEGFR-1 promotes the adhesion and migration of endothelial cells through its interaction with $\alpha 5\beta 1$ integrin and the activation of VEGFR-2 signaling^{12,13}. In addition, high rather than low levels of sVEGFR-1 have been reported in melanoma¹⁴. Moreover, sVEGFR-1 was very recently shown to trigger non-apoptotic cell death of ovarian and colorectal cancer cell lines¹⁵, indicating that sVEGFR-1, beside its role on endothelial cells, may also impact on tumor cells themselves. Importantly, it is known for a long time that sVEGFR-1 truncated isoforms can come from protease cleavage and ectodomain shedding of membrane VEGFR-1, but also from VEGFR-1 pre-mRNA alternative splicing that generates sVEGFR-1 splice variants with a specific C-terminal part¹⁶. Up to now, the molecular mechanisms and upstream signals that contribute to the generation of sVEGFR-1, as well as the characterization, if they exist, of specific functions of sVEGFR-1 splice variants, remain poorly understood, notably in cancer.

In this study, using both cellular and murine models, we asked whether anti-angiogenic therapies impact on VEGFR-1 pre-mRNA splicing in NSCLC. Our data highlight sVEGFR-1-i13, a splice variant of VEGFR-1 retaining intron 13, as a crucial mediator of tumor progression and response to anti-angiogenic therapies in squamous cell lung carcinoma. In this setting, we characterized a

β 1 integrin/VEGFR autocrine loop by which sVEGFR-1-i13 differentially control tumor cell fate, either proliferation or apoptosis, in response to anti-angiogenic therapies. These results might help to understand why some SCC patients present severe complications as well as might help to select SCC patients eligible for anti-angiogenic treatments.

Materials and Methods

Cells, Cell Culture and Reagents

Squamous lung carcinoma cell lines (MGH7, H2170, UN-SCC680), adenocarcinoma cell lines (H358, H1299, A549, UN-ADC12) and Calu-1 were cultured in 5% CO₂ at 37°C in RPMI-1640 medium and Mac Coy medium respectively. The medium was supplemented with 2mM L-glutamine and 10% (v/v) Fetal Calf Serum (FCS) as described previously¹⁷. HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) were cultured in EGM-2 BulletKit (CC-3156 & CC-4176, Lonza). HMEC-1 (Human dermal Microvascular Endothelial Cells) were cultured in 5% CO₂ at 37°C in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) supplemented with 2mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate and 10% (v/v) FCS. bevacizumab (Avastin®) was provided by Roche/Genentech. VEGFR-2 kinase inhibitor KI8751 (cat#676484) was from Calbiochem. VEGFR-1/R2 kinase inhibitor SU5416 (cat#S8442) was purchased from Sigma-Aldrich. The human recombinant VEGF-A ligands rhVEGF₁₆₅ (cat#293-VE) and rhVEGF₁₂₁ (cat#4644-VS) were supplied by R&D Systems and rhVEGF₁₈₉ (cat#CRV114A) by Cell Sciences. The rhVEGFR-1/Flt-1 Fc Chimera (cat#321-FL) was obtained from R&D Systems. (R)-N4-Hydroxy-N1-[(S)-2-(1H-indol-3-yl)-1-methylcarbamoyl-ethyl]-2-isobutylsuccinamide (GM-6001) was from Enzo Life Sciences. The plasmids used in this study were: pcDNA3.1, pcDNA3.1-VEGF₁₆₅ (kindly provided by Prof. David Bates, University of Nottingham, UK), pBLAS-Control and

pBLAS49.2/sVEGFR-1 encoding sVEGFR-1-i13 were previously described^{12,13}. Transfections of plasmid DNA were performed using X-tremeGENE 9 (Roche), according to the manufacturer's instructions. Cells were analyzed 48hours after transfection.

Patients and Tissue Samples

Seventy seven human non-small cell lung carcinomas (NSCLC) and 17 matched normal lung parenchymas were included in this study. Tumors consisted of 41 adenocarcinomas and 36 squamous cell lung carcinomas (Table 1). Tumor tissues and normal lung parenchyma taken away from the bulk of the tumor were collected from resection of lung tumors, and stored for scientific research in a biological resource repository (Centre de Ressources Biologiques, CHU Albert Michallon, Grenoble Hospital). National ethical guidelines were followed. All patients enrolled in this trial provided written informed consent. Tissue banking and research conduct was approved by the Ministry of Research (approval AC-2010-1129) and by the regional IRB (CPP 5 Sud Est). For histological classification, tumor samples were fixed in formalin, and diagnosis was made on paraffin-embedded material using the WHO VIIth classification of lung criteria. For each case, one section from the most representative block was chosen. These sections always contained more than 70% of tumor cells.

RNA Interference and Morpholinos

The two siRNA specifically targeting sVEGFR-1-i13 were: sVEGFR-1-i13(1) sense, 5'-U AACAGUUGUCUCAUAUC-3'; anti-sense, 5'-UGAUAUGAGACAACUGUUA-3' and sVEGFR-1-i13(2) sense, 5'-UCUCGGAUCUCCAAAUUU-3'; anti-sense, 5'-U AAAUUUGGAGAUCCGAGA-3'. The sequences for SOX2 siRNA were designed as sense, 5'-AAAGGCUGGAAGUCAGCACUAAUUU-3'; and anti-sense, 5'-AAAAAUUAGUGCUGACUCCAGCUU-3'. Transfection of siRNA oligonucleotide duplexes was performed using Jet Prime reagent (Ozyme) according to the manufacturer's protocol. β 1 integrin silencing was performed using SMART pool siGENOME ITGB1 siRNA (M-004506-00-0020, Thermoscientific Dharmacon). Transfection of smartpools was performed using Oligofectamine RNAiMax (Invitrogen). The scrambled siRNA oligonucleotides used as a control for all RNA interference experiments were as follows: forward 5'-UCGGCUCUUACGCAUUCAATT-3' and reverse 5'-CAAGAAAGGCCAGUCCAAGTT-3'. Cells were analysed 72 h post-transfection. Morpholino oligos were obtained from Gene Tools and resuspended in sterile water as a 200 μ M stock solution. Sequences of control and sVEGFR-1-i13 (MoFL2) morpholino oligos were as follow: 5'- GATCCATCCCTCTGTTAAGACCTAG-3' and 5'- TTTTGTGTCAGTGCTCACCTCTGA-3', respectively. For delivering, MGH7 or H2170 cells were seeded at 0.5×10^6 cells/well in 6-well plates for 24h, treated with 10 μ M of control or MoFL2 morpholino, then scraped using a rubber blade scraper and transferred to another culture plate. Cells were analyzed at 24h, 48h and 72h after transfection.

Apoptosis, Cell Proliferation, Clonogenic and Soft Agar assays

Apoptosis was evaluated by scoring the percentage of apoptotic nuclei on 200 cells after staining with Hoescht-33258 (Calbiochem). Detection of active caspase-3 was performed by flow cytometry after cell fixation in Cytofix/Cytoperm™ (Becton Dickinson) and labelling with the phycoerythrin-conjugated monoclonal active caspase-3 antibody (PharMingen Becton Dickinson), as described by the manufacturer. Samples were analysed using an Accuri C6 flow cytometer running BD Accuri CFlow Plus Analysis software. Cell proliferation was measured using an MTS assay (Promega). Briefly, 10^5 cells/well were seeded in 96-well plates for 24h. Then, cells were treated either with increasing concentrations of SU5416, KI8751, bevacizumab, rhVEGF₁₂₁, rhVEGF₁₆₅, rhVEGF₁₈₉ or rh sVEGFR-1 for 96h. The absorbance was recorded at 490nm using a 96-well plate reader. All the experiments were done in quadruplicate and repeated at least three times. For clonogenic assays, 4×10^2 MGH7 or 8×10^2 H2170 cells were seeded in a 6-well culture plate for 24h. Cells were then treated with either KI8751 (0.2 or 0.5 μ M), SU5416 (0.1 or 0.5 nM) or bevacizumab (1 or 10 μ g/ml) and incubated in a CO₂ incubator at 37 °C for 2 weeks until cells gave rise to substantial colonies. Clones were fixed with 4% paraformaldehyde and stained with 0.5% crystal violet for 30 min. Plates were rinsed with water and left for drying at room temperature. Counting of clones was done using a stereomicroscope. For soft agar assays, 0.5×10^6 MGH7 or H2170 cells were plated in 6-well plates for 24h and treated with either 1ng/ml rhVEGF₁₆₅ or rh sVEGFR-1 in RPMI supplemented with 1% FCS. After 72h of treatment, cells were trypsinized and counted. 3×10^3 MGH7 cells or 10^4 H2170 cells were resuspended in RPMI-1640, 10%FCS and 0.3% agar, then plated on a previously coated RPMI-1640 layer supplemented with 10% FCS and 0.6% agar in 12-wells culture plates. Quadruplicate

cultures were established for each experiment. Plates were incubated at 37° C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ and colonies were counted after 4 weeks under light microscopy.

ELISA Assays

For the detection of sVEGFR-1/sFlt1 in supernatants or cell pellets, ELISA assays were performed in duplicate in 96-well plates using a Quantikine sVEGFR-1 kit (R&D Systems). Manipulations were carried out according to manufacturer's instructions. Briefly, 1.5×10^6 cells/well were seeded in 6-well plates and treated or not for different times. The concentration of sVEGFR-1 in the supernatants or the cellular pellets was calculated from the absorbance value compared to the standard curve and expressed in pg/ml or pg/ 10^6 cells, respectively. ELISA assays for the detection of VEGF₁₆₅ and pan-VEGF-A were performed using the Quantikine VEGF₁₆₅ kit from R&D Systems and the human VEGF-A developmental kit from PeproTech (cat#900-K10), respectively. ELISA assays were performed in duplicate in 96-well plates starting from 500µg or 100µg of total protein extract/well for VEGF₁₆₅ or pan-VEGF-A measurement, respectively. The final concentration was calculated from the absorbance value compared to the standard curve and expressed in pg/mg of total protein extracts.

RNA Extraction, Reverse Transcription and Real-Time qPCR Analysis

Total RNA was extracted using the High Pure RNA Isolation Kit (Roche Diagnostics) according to the manufacturer's protocol. RNA concentration and integrity was determined using a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (Labtech). Then, 1 µg of total RNA was subjected to Reverse Transcription using iScript RT supermix (Bio-Rad). Quantitative RT-PCR (qRT-PCR) was performed using iTaq® qPCR Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad). The primer sequences used were as follows: sVEGFR-1-i13: 5'-AGGGGAAGAAATCCTCCAGA-3'(forward) and 5'-CAACAAACACAGAGAAGG-3'(reverse); sVEGFR-1-e15a: 5'-ACACAGTGGCCATCAGCAGTT -3'(forward) and 5'-CCCGGCCATTTGTTATTGTTA-3'(reverse); sVEGFR-1-i14: 5'-ACAACAAGAGCCTGAACTGTA-3'(forward) and 5'-ATAACAAATGGCCGGGCATGG-3'(reverse); VEGFR-1(1): 5'-AGGGGAAGAAATCCTCCAGA-3' (forward) and 5'-CGTGCTGCTTCCTGGTCC-3'(reverse); VEGFR-1(2): 5'-ACCGAATGCCACCTCCATG-3'(forward) and 5'-AGGCCTTGGGTTTGCTGTC-3'(reverse); VEGFR-2: 5'-TCAAAGGAGAAGCAGAGC-3'(forward) and 5'-GCACTCTTCCTCCAAGTCCAATA-3'(reverse); NRP-1: 5'-ACACCTGAGCTGCGGACTTT-3'(forward) and 5'-GGCCTGGTCGTCATCACA-3'(reverse); NRP-2: 5'-GCGCAAGTTCAAAGTCTCCT-3'(forward) and 5'-TCACAGCCCAGCACCTC-3'(reverse); GAPDH: 5'-CGAGATCCCTCCAAAATCAA-3'(forward) and 5'-ATCCACAGTCTTCTGGGTGG-3'(reverse). Relative gene expression was calculated, for each sample, as the ratio of specific target gene to GAPDH gene (reference gene), thus normalizing the expression of target gene for sample-to-sample differences in RNA input.

Antibodies and Immunoblotting

Immunoblotting experiments were performed as previously described¹⁸. Equal amounts of protein extracts were separated by SDS-PAGE, transferred to PVDF membranes and probed with the indicated antibodies. The antibodies used were: anti-VEGFR-2 (mAB2479, clone 55B11), anti-actin (mAB8456), anti-alpha-p38 MAPK-Thr180/Tyr182 (mAB4511, clone D3F9), anti-AKT (mAB9272), anti-phospho-AKT-Ser473 (mAB4060, clone D9E), anti-active caspase-3 (mAB9661), anti-phospho-ERK1/2-Thr202/Tyr204 (mAB9106) and anti-p44/42 MAPK (ERK1/2) (mAB9102) from Cell Signaling, anti-VEGF₁₆₅ (Covalab), anti-neuropilin-1 (Abcam), anti-neuropilin-2 (clone C-9, sc-13117) and anti-tubulin (clone B-5-1-2, sc-23948) from Santa Cruz, anti-SOX2 (AB5603) and anti-phospho-VEGFR-1-Tyr1213 (cat#07-758) from Millipore, anti-phospho-VEGFR-2-Tyr1214 (44-1052) from Invitrogen, anti-phospho-VEGFR-2-Tyr1054/1059 (ab5473) and anti-neuropilin-1 (ab81321) from Abcam. Antibodies targeting β 1 integrin were kindly provided by Dr. Corinne Albiges-Rizo (Institute For Advanced Biosciences, Grenoble).

Immunoprecipitation Experiments

MGH7 or H2170 cells treated or not with bevacizumab (10 μ g/ml) for 72 hours or with 1 ng/ml rhVEGF₁₆₅ or rhVEGFR-1 for 24 hours were lysed on ice using RIPA buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris HCl pH 8, 0.1% SDS, 1% Nonidet P40, 0.5% Na deoxycholate) supplemented with proteases and phosphatase inhibitors and 5 mM sodium molybdate (Sigma Aldrich) in order to enhance the cross-linking of VEGFR-1/VEGFR-2 containing complexes. An amount of 500 μ g of total protein extracts were pre-cleared for 1 hour in the presence of a mixture of protein A-magnetic beads and incubated overnight at 4°C, together with protein A beads, with an anti-

VEGFR-2 antibody (55B11, Cell Signaling) in order to immunoprecipitate total VEGFR-2. An irrelevant mouse (PP54, Millipore) or rabbit (PP64, Millipore) IgG was used as control for immunoprecipitation.

Immunohistochemistry

Immunohistochemical analysis was carried out on formalin-fixed and paraffin-embedded tissue sections. Briefly, seven-micrometer sections were dehydrated in toluene and rehydrated in graded ethanol solutions. Endogenous peroxidase activity was blocked by immersion in H₂O₂ solution. The antigen immunoreactivity was enhanced by microwaving the sections for 3 x 5 minutes in citrate buffer, pH 6. Then, a classical three step immunohistochemical method was applied. Incubation with the primary antibody at 4°C overnight (for manual technique) or for 1 hour at 37°C-42°C on autostainer (Ventana Medical International, Inc.) was followed by exposure to HRP-coupled secondary antibody, and then by DAB substrate-chromogen system (K3767, DAKO). The negative control involved omission of the primary antibody and incubation with immunoglobulins of the same species and isotype. Immunohistochemistry was performed using an anti-VEGF₁₆₅ antibody raised against the six terminal amino acids (CDKPRR sequence) and a sixteen amino acids sequence targeting terminal part of VEGF₁₆₅ encompassing exons 7 and 8a. This antibody was engineered in the laboratory together with the Covalab society (Villeurbanne). The specific anti-sVEGFR-1-i13 was generated against a peptide mapping in the unique C-terminus¹². The other antibodies used for immunohistochemistry were: anti-phospho-VEGFR-1(Tyr1213) (Millipore) and anti-VEGFR-1 (sc-316, Santa Cruz). Immunostainings were evaluated independently by two observers who were blind to all clinicopathological data. For immunostaining evaluation, a score (0-300) was established by multiplying the percentage of labelled cells (0 to 100%) by the staining intensity (0, null; 1, low; 2, moderate; 3, strong). Scores obtained for alveolar type II pneumocytes and bronchial cells in normal lung tissues taken at distance from the tumor were considered as normal scores for adenocarcinoma and squamous cell carcinoma, respectively. Indeed, bronchial

basal cells are considered as candidate cancer stem cells for squamous cell lung carcinoma, basaloids and small cell lung carcinoma, while type II pneumocytes club-cells are considered as bronchiolo-alveolar carcinoma stem cells (BASC). According to median scores in normal tissues and to the histograms of distribution, tumors were sub-divided in two classes for sVEGFR-1-i13 (class 0: low ≤ 100 ; class 1: high > 100). The staining scores were compared in different categories using Fisher's exact test and a Mann-Whitney test. All tests were two-tailed and p values < 0.05 were considered significant. The statistical analyses were performed using Statview software (Abacus Concepts).

Subcutaneous Tumorgrafts Samples

Sections from UN-SCC680 and UN-ADC12 subcutaneous tumorgrafts embedded in paraffin were recovered from previous experiments ² and stained for sVEGFR-1-i13, VEGF₁₆₅, P-VEGFR-1(Tyr1213) or VEGFR-1. For quantification of sVEGFR-1-i13 staining, sections were scanned using a ZEISS AxioImager M2 automated slide scanner with 5X magnification and the images were analyzed using Image J software. Threshold values were adjusted until masked brown pixels correlates with positive immunostaining or with total area of the digitized tissue. The percentage of positive areas was then calculated for each staining.

Results

Anti-angiogenic therapies induce the accumulation of sVEGFR-1-i13 in squamous lung carcinoma but not in lung adenocarcinoma models

In order to analyze the impact of anti-angiogenic treatments on sVEGFR-1 protein expression in NSCLC tumor cells, we first quantified its level in the supernatants of SCC and ADC cell lines exposed to various anti-angiogenic therapies including bevacizumab or to two VEGFR tyrosine kinase inhibitors (TKI), namely KI8751 and SU5416. Using ELISA assay, we showed that sVEGFR-1 protein level increases in a dose dependent manner in response to these treatments in SCC cell lines (Figures 1A and 1B). Similar variations were observed on cell extracts (Figure 1C). In contrast, secreted sVEGFR-1 level did not vary or even decreased in ADC cell lines treated in the same conditions (Supplementary Figure 1A). These results indicated that both extra- and intra-cellular levels of sVEGFR-1 are up-regulated by anti-angiogenic therapies in SCC cell lines. To go further, we used the MGH7 and H2170 cells as they exhibited the most robust variations in all conditions. svegfr-1 may come from protease cleavage and ectodomain shedding of membrane VEGFR-1, but also from vegfr-1 pre-mRNA alternative splicing. Up to now, at least four alternatively spliced VEGFR-1 transcripts have been described, namely svegfr-1-i13, svegfr-1-i14, svegfr-1-e15a and svegfr-1-e15b which are all common through to exon 13 but differ in their unique C-terminus (Supplementary Figure 2A)¹⁹. Among these splice variants, svegfr-1-i13, the VEGFR-1 splice variant retaining part of intron 13, appears to be the most widely detectable in a vast majority of tissues⁵. Therefore, to test whether anti-angiogenic therapies affect the expression of vegfr-1splice variants in SCC cell lines, we performed RT-qPCR by using specific primers that allow to distinguish between each splice variant as well as

full-length VEGFR-1 mRNA (Supplementary Table 1). Interestingly, we observed a significant increase of sVEGFR-1-i13 mRNA level in response to bevacizumab (Figure 1D), SU5416 and KI8751 (Figure 1E) treatments. In contrast, sVEGFR-1-e15a and sVEGFR-1-i14 mRNA levels were not significantly affected in MGH7 or H2170 cells treated with SU5416 or bevacizumab (Supplementary Figures 2B and 2C). However, we noticed an increase of sVEGFR-1-e15a mRNA level in H2170 cells treated with KI8751 (Supplementary Figure 2C). We never detected sVEGFR-1-e15b transcript in our cells whatever the conditions. To confirm these results, we took advantage of an antibody directed against the unique 31 C-terminal amino acids of sVEGFR-1-i13. By western blotting, we found an accumulation of sVEGFR-1-i13 protein upon anti-angiogenic treatments in both MGH7 and H2170 cell lines (Figures 1F and 1G). In this setting, we noticed that SU5416, a dual VEGFR-1/VEGFR-2 TKI, and KI8751, a VEGFR-2 TKI, were more efficient in accumulating sVEGFR-1-i13 in MGH7 and H2170 cells, respectively. Importantly, and consistent with the results obtained in ELISA assays (Supplementary Figure 1A), neither bevacizumab, SU5416 or KI8751 increased sVEGFR-1-i13 protein and mRNA levels in the three lung adenocarcinoma cell lines (Supplementary Figures 1B and 1C). Rather, in most conditions, sVEGFR-1-i13 protein expression significantly decreased upon treatment. In addition, KI8751 or SU5416 never increased sVEGFR-1-i13 protein level in HUVEC (Supplementary Figures 3A and 3B) or HMEC (Supplementary Figures 3C and 3D) endothelial cells. However, we observed that bevacizumab reproducibly increases extra-cellular sVEGFR-1 and intra-cellular sVEGFR-1-i13 protein levels in HMEC cells (Supplementary Figures 3A and 3C), suggesting that primary and immortalized endothelial cells might differentially respond to bevacizumab treatment. Overall, these data indicated that anti-angiogenic therapies increase sVEGFR-1-i13 expression in SCC but not in ADC cell lines.

To go further, we took advantage of two mouse tumorgraft models carried out with ADC or SCC cells derived from chemically-induced tumors. In these models, we previously demonstrated a differential impact of anti-angiogenic therapies, with treatment with sunitinib, a VEGFR TKI, or DC101, a murine anti-VEGFR-2 antibody. It was associated with disease progression and induction of tumor cell proliferation in SCC tumors, whereas in ADC tumors treated in the same conditions, vascular trimming was accompanied by tumor stabilization². Importantly, by performing immunohistochemistry using the anti-sVEGFR-1-i13 specific antibody, we observed an accumulation of sVEGFR-1-i13 in SCC tumorgrafts treated with sunitinib or DC101 compared to untreated tumorgrafts (Figure 2A). In contrast, this increase was not detected in ADC tumorgrafts treated in the same conditions (Figure 2B). In addition, in vitro, both KI8751 and SU5416 treatments increased sVEGFR-1-i13 protein expression in SCC (Figure 2C) but not in ADC (Figure 2D) murine cells. Taken together, these results are the first evidence that anti-angiogenic therapies increase sVEGFR-1-i13 expression in squamous cell lung carcinoma but not in lung adenocarcinoma.

VEGF₁₆₅ protein is required for sVEGFR-1-i13 accumulation upon treatment

It was previously shown that VEGF-A specifically up-regulates sVEGFR-1-i13 expression in human vascular endothelial cells²⁰. To test the role of VEGF-A in our cellular models, we first transfected MGH7 and H2170 cells with a plasmid encoding VEGF₁₆₅. The expression of both sVEGFR-1-i13 protein (Figure 3A, upper panels) and mRNA (Figure 3A, lower panels) levels was up-regulated in cells overexpressing VEGF₁₆₅ compared to cells transfected with a control vector. In addition, when MGH7 or H2170 cells were treated with the different recombinant

splice variants of VEGF-A, namely rhVEGF₁₂₁, rhVEGF₁₆₅ and rhVEGF₁₈₉, we observed that sVEGFR-1-i13 protein level significantly increases in cellular extracts of cells treated with rhVEGF₁₆₅ only (Figure 3B). Furthermore, and in agreement with these results, treating MGH7 or H2170 cells with bevacizumab (Figure 3C) or VEGFR-TKI (Figure 3D) induced intra-cellular accumulation of VEGF₁₆₅ protein. Importantly, VEGF₁₆₅ accumulation was also observed in the SCC murine tumorgrafts treated with sunitinib or DC101 (Figure 3E). As a whole, these data highly supported a role of VEGF₁₆₅ as an upstream regulator of sVEGFR-1-i13 in SCC tumor models treated with anti-angiogenic therapies.

sVEGFR-1-i13 regulates a VEGF₁₆₅/VEGFR autocrine loop in SCC cells and tumors

We previously demonstrated that squamous lung carcinoma patients express VEGFR-1, VEGFR-2 and their co-receptors neuropilin-1 (NRP-1) and neuropilin-2 (NRP-2)²¹. Consistently, MGH7 and H2170 cells exhibited detectable amounts of VEGFR-1 and VEGFR-2 receptors at both mRNA and protein levels (data not shown and Figure 4C). Of note, VEGFR-2 was more expressed in H2170 cells than in MGH7 cells. Therefore, we postulated that sVEGFR-1-i13 may regulate an autocrine loop in SCC tumor cells. To test this hypothesis, MGH7 or H2170 cells were transfected with a plasmid encoding sVEGFR-1-i13, the supernatants served to stimulate naïve cells. As detected by ELISA assay, sVEGFR-1-i13 protein level significantly increased in the supernatant of MGH7 and H2170 cells transfected with the sVEGFR-1-i13 encoding plasmid compared to cells transfected with a control plasmid (Figure 4A, left panels). More importantly, sVEGFR-1-i13 containing supernatants were found to increase or decrease the cellular proliferation of MGH7 or H2170 cells, respectively (Figure 4A, right panels). To confirm the role

of sVEGFR-1-i13 on cell proliferation, we transfected cells with a control or a splice site-blocking morpholino that was previously shown to induce a switch from full-length VEGFR-1 to sVEGFR-1-i13 mRNA²². Re-directing the splicing toward sVEGFR-1-i13 increased the proliferation of MGH7 cells but decreased those of H2170 cells (Figure 4B). Moreover, using soft agar assays, we showed that recombinant sVEGFR-1 stimulates the formation of MGH7-derived colonies (Supplementary Figure 4A). Of note, the same tendency was observed upon rhVEGF₁₆₅ treatment in these cells. In contrast, recombinant sVEGFR-1 significantly decreased the number of H2170-derived colonies compared to control (Supplementary Figure 4B). Altogether, these data provided the first evidence that sVEGFR-1-i13 controls the proliferation of SCC tumor cells but exhibits positive or negative control according to the cellular model.

To study the molecular mechanisms involved in this contrasting response, we looked at the VEGFR-1/VEGFR-2 signaling pathways. Using immunoblotting in cells transfected with the sVEGFR-1-i13 encoding plasmid (Figure 4C) or exposed to recombinant sVEGFR-1 (Supplementary Figure 4C), we found an accumulation of P-VEGFR-1(Tyr1213), P-VEGFR-2(Tyr1054-1059) and P-VEGFR-2(Tyr1214) proteins levels in MGH7 cells. In contrast, a decrease of P-VEGFR-1(Tyr1213), P-VEGFR-2(Tyr1054-1059) and P-VEGFR-2(Tyr1214) proteins levels was depicted in H2170 cells (Figure 4C and Supplementary Figure 4C). In these cells, sVEGFR-1-i13 triggered apoptosis as detected by caspase-3 activation. Interestingly, the differential activation of VEGFR-1/VEGFR-2 receptors and the subsequent stimulation of cell proliferation or apoptosis were confirmed in MGH7 or H2170 cells either transfected with a plasmid encoding VEGF₁₆₅ (Figures 4D and 4E) or treated with rhVEGF₁₆₅ (Supplementary Figures 4 D-F). In these conditions, rhVEGF₁₂₁ or rhVEGF₁₈₉ had no significant effects (Supplementary Figures 4 D-F). More importantly, we found that the specific knock-down of

sVEGFR-1-i13 prevents the activation of VEGFR-1 in response to rhVEGF₁₆₅ in MGH7 cells (Figure 4F), thereby indicating that sVEGFR-1-i13 is required for VEGF₁₆₅ function in this setting. Taken together, these data provide the first demonstration that sVEGFR-1-i13 regulates VEGFR-1/VEGFR-2 signaling pathways in SCC tumor cells. In this setting, they highlight a positive and negative function of sVEGFR-1-i13 on VEGFR signaling that controls cell fate in an opposite manner.

The above results prompted us to analyze the status of sVEGFR-1-i13 in a retrospective cohort of 77 NSCLCs patients including 41 lung adenocarcinomas and 36 squamous cell lung carcinomas, in which the status of VEGF₁₆₅, P-VEGFR-1(Tyr1213), VEGFR-1 and VEGFR-2 proteins were already known. Of note, we were not able to detect P-VEGFR-2(Tyr1214) owing to the lack of specific antibodies useful for IHC. In normal lung, a moderate diffuse cytoplasmic staining of sVEGFR-1-i13 was observed in hyperplastic type II pneumonocytes and bronchial basal cells (mean score=100; Figure 5A). Interestingly, we also observed a nuclear staining of sVEGFR-1-i13 in these cells (mean score=50). This nuclear staining was never observed in endothelial cells or macrophages. Compared to normal lung tissues, when both cytoplasmic and nuclear stainings were considered, we observed that 38%(29/77) of NSCLC have high (class 1) sVEGFR-1-i13 protein expression including 44% (16/36) of SCC (Table 1, Figures 5A and 5B), while 11% (4/36) of SCC exhibited undetectable level of sVEGFR-1-i13. Importantly, an association between high scores of sVEGFR-1-i13, advanced pTNM III/IV stages (Table 2, p=0.05) and high levels of P-VEGFR-1(Tyr1213) protein (Figure 5C; p=0.005) was observed in SCC patients. In contrast, no significant association was found in ADC patients (Table 2 and Figure 5C). In SCC patients, we also noticed that high levels of VEGF₁₆₅ were associated with high scores of P-VEGFR-1(Tyr1213) (p=0.004, data not shown) or sVEGFR-1-i13 although this

last association did not reach significance ($p=0.09$, data not shown). Overall, these results strongly supported the existence of a VEGF₁₆₅/sVEGFR-1-i13/VEGFR-1 signaling cross-talk in squamous cell lung carcinoma patients that could contribute to a more aggressive phenotype.

Anti-angiogenic therapies impact on the VEGF₁₆₅/sVEGFR-1-i13/VEGFR signaling network in SCC models

Then, we investigated the role of sVEGFR-1-i13 in the response of SCC to anti-angiogenic therapies. MGH7 cells are more resistant to anti-angiogenic agents than H2170, as evidenced by increased cell viability (Figure 6A) and colony formation (Figure 6A) upon treatment. In agreement with these results, a sustained activation of VEGFR-1 and VEGFR-2 was observed when MGH7 cells were treated either with bevacizumab (Figure 6C) or SU5416 (Figure 6D). In SU5416-treated cells, such activation was associated with the activation of P-AKT on its Ser473 residue, that was consistent with the results we previously obtained in murine SCC680 cell line upon treatment with sunitinib². In contrast, in H2170 cells, a decrease of VEGFR-1 and VEGFR-2 phosphorylation was observed following treatment with bevacizumab (Figure 6C) and KI8751 or SU5416 (Figure 6E). This was correlated with a decrease of P-AKT(Ser473) protein level as well as with an activation of caspase-3 in KI8751-treated cells (Figure 6E). Importantly, the knock-down of sVEGFR-1-i13 by using specific siRNA prevented the accumulation of P-VEGFR-1(Tyr1213) and P-VEGFR-2(Tyr1214) proteins in MGH7 cells treated with bevacizumab or SU5416 (Figure 7A) leading to apoptosis (Figure 7B), whereas in H2170 cells exposed to bevacizumab or KI8751, down-regulation of sVEGFR-1-i13 led to the accumulation

of P-VEGFR-1(Tyr1213) and P-VEGFR-2(Tyr1214) and prevented caspase-3 activation (Figure 7C).

Interestingly, we confirmed some of these data in murine tumorgrafts models. Indeed, an increase of P-VEGFR-1(Tyr1213) staining was found in sunitinib-treated compared to PBS-treated SCC tumorgrafts (Supplementary Figure 5A). Moreover, an accumulation of both P-VEGFR-1(Tyr1213) and P-VEGFR-2(Tyr1214) proteins was also observed in UN-SCC680 murine cells upon treatment with SU5416 (Supplementary Figure 5B). In contrast, and again consistent with distinct responses to anti-angiogenic therapies of SCC and ADC histological subtypes, a decrease of phosphorylated VEGFR-1 and VEGFR-2 products was detected in murine lung adenocarcinoma ADC12 cells treated in the same conditions (Supplementary Figure 5B). As a whole, these results demonstrate that anti-angiogenic therapies regulate a VEGF₁₆₅/sVEGFR-1-i13/VEGFR autocrine loop in squamous lung carcinoma that contributes to a contrasting response to these therapies.

Existence of across-talk between sVEGFR-1-i13 and β 1 integrin in response to anti-angiogenic therapies

It has been shown that sVEGFR-1-i13 is part of the extracellular matrix through its ability to interact with β 1 integrin¹². In endothelial cells, such interaction activates several pathways involving PKC, Rac1 and VEGFR-2 signaling, thereby promoting endothelial cell adhesion and migration¹³. Therefore, we postulated that β 1 integrin may be involved in the differential effects mediated by sVEGFR-1-i13 in SCC cells treated with anti-angiogenic therapies. Interestingly,

MGH7 cells expressed high levels of $\beta 1$ integrin compared to H2170 cells (Figure 8A). In these cells, the knock-down of $\beta 1$ integrin prevented the activation of VEGFR-1 and VEGFR-2 receptors upon treatment with SU5416 or bevacizumab (Figure 8B, compare lanes 3 and 7 or 4 and 8) and led to apoptosis as detected by activation of caspase-3. Importantly, the neutralization of $\beta 1$ integrin also significantly inhibited the ability of recombinant sVEGFR-1 to activate VEGFR-1 and VEGFR-2 in these cells, thereby indicating the requirement of $\beta 1$ integrin for the effects of sVEGFR-1 in these cells (Supplementary Figure 6A). In contrast, overexpressing $\beta 1$ integrin in H2170 cells triggered the accumulation of P-VEGFR-1(Tyr1213), P-VEGFR-2(Tyr1214) and P-VEGFR-2(Tyr1054/1059) proteins upon treatment with bevacizumab (Figure 8C, compare lanes 2 and 4) or KI8751 (Figure 8D, compare lanes 6 and 8) and inhibited apoptosis. Interestingly, we reproducibly observed a slight increase of sVEGFR-1-i13 protein expression in cells overexpressing $\beta 1$ integrin. More importantly, by performing co-immunoprecipitation experiments, we further showed that bevacizumab stimulated the formation of complexes between VEGFR-2, $\beta 1$ integrin and sVEGFR-1-i13 in MGH7 cells (Figure 8E). In H2170 cells, bevacizumab increased the formation of complexes between VEGFR-2 and sVEGFR-1-i13 (Figure 8F). In addition, we showed that sVEGFR-1-i13 co-immunoprecipitates with VEGFR-2 and $\beta 1$ integrin in MGH7 cells exposed to rh VEGF₁₆₅ or to rh sVEGFR-1 (Supplementary Figure 6B). In H2170 cells, complexes between VEGFR-2 and sVEGFR-1-i13 were also detected upon similar treatments (Supplementary Figure 6C). Taken together, these results demonstrated for the first time that sVEGFR-1-i13 belongs to VEGFR-2/ $\beta 1$ integrin complexes in SCC tumor cells treated with anti-angiogenic therapies. Moreover, they support a

role of $\beta 1$ integrin in the contrasting response, proliferative versus anti-proliferative, mediated by sVEGFR-1-i13 in response to these therapies in SCC tumor cells.

Discussion

Generation of splice variants that contain introns appears to be a general feature of cancer cells. As an example, intron retention was recently found to affect several transcripts in lung adenocarcinoma²³. Up to date, only a few data exist concerning the roles of such splice variants in response to targeted therapies²². In this study, we identify sVEGFR-1-i13, a splice variant of VEGFR-1 retaining intron 13, as a marker of both progression and response to anti-angiogenic treatments in squamous cell lung carcinoma but not in lung adenocarcinoma. Various studies previously demonstrated a correlation between high sVEGFR-1 plasma/serum levels in breast, colon, rectal or advanced hepatocellular carcinoma and the poor response to anti-angiogenic therapies, which was associated with the dysregulation of vascular function as evidenced by insufficient vascular network or decreased vascular permeability^{10,24,25,26,27,28}. Here, we highlight a new role for a sVEGFR-1 splice variant in cancer, through the demonstration that sVEGFR-1-i13 is also able to regulate a $\beta 1$ integrin-dependent VEGFR autocrine loop that controls the fate of tumor cells, either proliferation/survival or death, in response to anti-angiogenic therapies (Figure 9).

To our knowledge, nothing is known regarding the molecular mechanisms that regulate the expression of VEGFR-1 splice variants in cancerous cells. Hence, several clinical trials previously reported variation in circulating levels of sVEGFR-1 following anti-angiogenic therapies^{10,25,26,27,28}, but none of them investigated intra-tumoral levels, or pointed out to a specific mechanism for sVEGFR-1 generation. In this study, we show that anti-angiogenic

therapies increase the intra-tumoral level of the sVEGFR-1-i13 splice variant in squamous cell lung carcinoma and we also provide a molecular mechanism by which anti-angiogenic therapies control sVEGFR-1-i13 expression. In endothelial cells, it was previously shown that the expression of sVEGFR-1-i13 is up-regulated by VEGF-A^{20,29}, hypoxia³⁰ or by decreased expression of the oxygen-sensing hydroxylase JMJD6^{31,32}. In squamous cell lung carcinoma, we show that VEGF₁₆₅ controls the expression of sVEGFR-1-i13 upon anti-angiogenic treatments. It remains to be determined whether it might also control the expression of sVEGFR-1 splice variant in other tumor types. Beside VEGF-A, we also studied whether hypoxia or JMJD6 regulate sVEGFR-1-i13 expression, but we did not find any significant effect either in control or treated cells (data not shown), suggesting that both mechanisms are not involved in our cellular models. In endothelial cells, it was also recently shown that inhibition of NOTCH signaling by a NOTCH1 decoy variant increased sVEGFR-1-i13 level³³. Interestingly, in human squamous cell lung cancer, inhibitory alterations of NOTCH signaling are frequent (Wang et al., 2011; Cancer Genome Atlas Research Network 2012). Therefore, based on our results, it is tempting to speculate that the regulation of sVEGFR-1-i13 expression in squamous cell lung carcinoma might involved inhibition of NOTCH signaling. We also obtained preliminary evidence that β 1 integrin signaling pathway regulates sVEGFR-1-i13 in our cells (Figure 8). These data are intriguing as they suggest that an interplay between tumor cells and the extracellular matrix may control sVEGFR-1-i13 expression through β 1 integrin sensing. Such an interplay may be consistent with previous observations demonstrating that mechanical stretches suppress the secretion of sVEGFR-1 in human chondrocytes³⁴, as well as that changes in the mechanical properties of the extracellular matrix regulate alternative splicing in endothelial cells³⁵. In this setting, it was proposed that this regulatory mechanism could act through a direct activation of

integrin signaling pathways. Therefore, such a cross-talk between $\beta 1$ integrin and splicing in tumor cells warrants deepened investigations.

Beside the effects of anti-angiogenic therapies on sVEGFR-1-i13 expression level, our data also provide the first evidence of a differential pattern of its expression in NSCLC. Importantly, we found a significant correlation between high intra-tumoral levels of sVEGFR-1-i13, P-VEGFR-1(Tyr1213) and advanced pTNM stages in SCC patients only. These data are thus consistent with our in vitro data showing proliferative and pro-survival effects of sVEGFR-1-i13 in MGH7 cells through activation of VEGFR signaling pathway. Such a role of sVEGFR-1-i13 as a marker of progression of squamous lung carcinoma was unexpected. Hence, sVEGFR-1 in general is mainly considered as an anti-angiogenic factor and a tumor suppressive protein through its ability to sequester VEGF-A or to form inactive heterodimers with VEGFR-1 or VEGFR-2 receptor^{5,16}. Consistently, delivery of sVEGFR-1 by gene electrotransfer in mice inhibited solid tumor growth and angiogenesis⁷. In addition, in a model of human fibrosarcoma cells, sVEGFR-1 inhibited tumor growth and metastasis, an effect attributable to its paracrine inhibition of tumor angiogenesis⁶. However, other studies have challenged this simplistic view by demonstrating that sVEGFR-1 is able to stimulate endothelial cell adhesion and migration through its interaction with $\alpha 5\beta 1$ integrin¹², as well as is able to act on ovarian and colorectal cancer cells to promote non-apoptotic death¹⁵. Here, we demonstrate that the expression of $\beta 1$ integrin together with that of VEGFR-1 and VEGFR-2 determines whether sVEGFR-1-i13 activates or inhibits VEGFR signaling pathway to control the fate of tumor cells. Of note, we also confirmed these contrasting effects using recombinant sVEGFR-1 protein in our cellular models. Therefore, beside sVEGFR-1-i13, other VEGFR-1 splice variants and/or even sVEGFR-1 generated by proteolysis might

also differentially regulate such a network. As a whole, these data highly support a dual contribution of sVEGFR-1 in general during tumor development, with either tumor promoting or inhibiting functions, that could be largely dependent on the tumor context. These results might help to explain why some tumors such as melanoma express high intra-tumoral levels of sVEGFR-1-i13¹⁴. In addition, it is worth to notice that the 5-year survival rate of lymph node-negative NSCLC patients who overexpress $\alpha 5\beta 1$ integrin is significantly worse than that of individuals with NSCLC displaying normal $\alpha 5\beta 1$ expression³⁶. Moreover, increased $\alpha 5\beta 1$ levels significantly correlated with lymph node metastasis of NSCLC³⁷. Therefore, it remains to be determined whether sVEGFR-1-i13 together with $\beta 1$ integrin might also play a role in the metastatic process of squamous cell lung carcinoma.

To a clinical point of view, our observation that anti-angiogenic therapies up-regulate sVEGFR-1-i13 in SCC but not in ADC cells might also offer a plausible explanation for the adverse events presented by SCC patients in the clinic. Hence, squamous cell lung carcinoma patients are not eligible for bevacizumab treatment as they exhibit fatal haemorrhages and severe complications that are not observed in lung adenocarcinoma patients treated with the same therapies. In this setting, it is important to notice that treated SCC patients show hypertension and proteinuria, clinical symptoms similar to those of preeclampsia, a pregnancy disorder in which overproduction of sVEGFR-1 is a major determinant of the vascular dysfunction³⁸. In addition, our results might help to select SCC patients eligible for these therapies. This is of critical importance as ramucirumab, an anti-VEGFR-2 antibody, was recently approved for second-line therapy in stage IV SCC based on results from the REVEL trial³⁹. Based on our results, one might speculate that SCC patients exhibiting high level of VEGFR-1 and VEGFR-2 and low

levels of sVEGFR-1-i13 and $\beta 1$ integrin (H2170-like phenotype) would better respond to ramucirumab than those expressing high basal levels of VEGFR-1, sVEGFR-1-i13 and $\beta 1$ integrin (MGH7-like phenotype). Very interestingly, a phase II clinical trial previously noticed a relationship between decreased circulating sVEGFR-1 level and better outcome in advanced hepatocellular cancer patients treated with ramucirumab²⁸. In addition, we propose that therapeutic strategies aimed at combining anti-angiogenic agents and $\beta 1$ integrin antagonists might synergize in SCC patients, allowing to decrease the dose of anti-angiogenics used and consequently their side effects. This is consistent with the previous observation done by Carbonell and colleagues in bevacizumab-resistant human glioma showing that OS2966, an inhibitory $\beta 1$ integrin antibody, potentiates bevacizumab treatment⁴⁰. As a whole, our results pave the way for new therapeutic opportunities and predictive markers in squamous cell lung carcinoma patients for whom the therapeutic arsenal remains poor compared to lung adenocarcinoma patients.

Acknowledgements

This work was supported by the Comité Départemental Isère de la Ligue Nationale contre le Cancer, by the INCa/DHOS (Appel d'Offre Recherche Translationnelle 2010), by the Fondation de France (Projet Grande Ampleur 2011), by ROCHE fellowship (Bourse de Recherche Fondamentale), by the Fondation ARC pour la Recherche Contre le Cancer and by Fonds de dotation AGIR pour les Maladies Chroniques. Cherine Abou Faycal was supported by the Ligue Nationale Contre Le Cancer.

Legends to the figures

Figure 1. Anti-angiogenic therapies up-regulate sVEGFR-1-i13 expression in squamous cell lung carcinoma cell lines. MGH7, H2170 or Calu-1 SCC cell lines were treated with the indicated concentrations of bevacizumab ($\mu\text{g/ml}$) for 72 hours (A, C, D, F) or with the indicated concentrations (μM) of KI8751 or SU5416 for 24 hours (B, E, G). (A, B, C) ELISA assays for quantification of sVEGFR-1 protein level in the supernatants (A, B) or the cell pellets (C) were performed. The means $\pm$ SD of three independent experiments are illustrated. Statistical analyses were performed using a student non paired t test (* $p<0.05$; ** $p<0.01$). (D, E) RT-qPCR analyses were performed to quantify sVEGFR-1-i13 and VEGFR-1 mRNA levels. GAPDH was used as an internal control. The means $\pm$ SD of three independent experiments are illustrated. Statistical analyses were performed using a student non paired t test (* $p<0.05$; ** $p<0.01$). (F, G) Western-blotting analyses of sVEGFR-1-i13. Actin was used as a loading control. Histograms showing the quantification $\pm$ SD of signals obtained on western-blot for at least 3 distinct experiments are presented. Statistical analyses were performed using a student non paired t test (* $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$).

Figure 2. Antiangiogenic treatments up-regulate sVEGFR-1-i13 in murine SCC tumorgrafts. (A, B) Left panels: representative immunostainings from paraffin-embedded sections of UN-SCC680(A) or UN-ADC12 (B) tumorgrafts having received (Sunitinib, DC-101) or not (PBS, IgG) the indicated anti-angiogenic agents. Negative immunostaining (irrelevant IgG, negative control) is also shown. Right histograms: automatic quantification of tumor cell

immunostaining as described in the materials and methods section for each condition. The mean $\pm$ SD of 6 mice per condition is presented. (C, D) Murine squamous cell lung carcinoma UN-SCC680 and lung adenocarcinoma UN-ADC12 cells were treated with the indicated concentrations of KI8751 or SU5416 for 24 hours. Western blot analysis of sVEGFR-1-i13 was performed. Actin was used as a loading control. Lower panels: histograms showing the quantification $\pm$ SD of signals obtained on western-blot for 3 distinct experiments are presented. Statistical analyses were performed using a student non paired t test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

Figure 3. VEGF₁₆₅ splice variant regulates sVEGFR-1-i13 expression in SCC cell lines. (A) MGH7 and H2170 cells were transfected with pcDNA3 or pcDNA3-VEGF₁₆₅ plasmid for 48 hours. Upper panels: western-blot analyses of VEGF₁₆₅ and sVEGFR-1-i13 were performed. Actin was used as a loading control. Lower panels: RT-qPCR analyses of sVEGFR-1-i13 and VEGFR-1 mRNA levels as indicated. GAPDH was used as an internal control. (B) Cells were treated or not (Co) with 1 ng/ml of either rhVEGF₁₂₁, rhVEGF₁₆₅ or rhVEGF₁₈₉ during 24 hours as indicated. ELISA assays for quantification of sVEGFR-1 in the cell pellets were performed. The means $\pm$ SD of three independent experiments are illustrated. Statistical analyses were performed using a student non paired t test (* $p < 0.05$). (C, D) MGH7 or H2170 cells were treated or not with the indicated concentrations of bevacizumab for 72 hours (C) or KI8751 or SU5416 for 24 hours (D). Western blottings of VEGF₁₆₅ are illustrated. Actin was used as a loading control. (E) Representative immunostainings of VEGF₁₆₅ in paraffin sections from UN-SCC680 tumorgrafts treated (sunitinib, DC101) or not (PBS, IgG) with the indicated anti-angiogenic agents.

Figure 4. sVEGFR-1-i13 plays distinct autocrine functions in SCC cell lines. (A) MGH7 and H2170 cells were transfected during 48 hours with a control plasmid (control) or the pBLAS/SF9 plasmid encoding sVEGFR-1-i13 (sVEGFR-1-i13). Left panels: quantification by ELISA of secreted sVEGFR-1-i13 in the supernatants of MGH7 or H2170 cells transfected with either control or SF9 plasmid. The mean $\pm$ SD of three independent experiments is illustrated. Right panels: cell number ($\times 10^6$) was estimated following trypan blue staining in MGH7 or H2170 cells cultured during 48 hours in the presence of the supernatants obtained from control cells (control) or from cells transfected with the plasmid encoding sVEGFR-1-i13 (sVEGFR-1-i13). The mean $\pm$ SD of three independent experiments is illustrated. Statistical analyses were performed using a student non paired t test (* $p < 0.05$). (B) Cell number ($\times 10^6$) was estimated following trypan blue staining in MGH7 or H2170 cells transfected for the indicated times with either control (MoC) or sVEGFR-1-i13 (MoFL2) morpholino. The mean $\pm$ SD of three independent experiments is illustrated. Lower panel: RT-qPCR analysis was performed to quantify sVEGFR-1-i13 and VEGFR-1 mRNA levels in MGH7 cells. GAPDH was used as an internal control. (C) Western blot analyses of the indicated proteins were performed in MGH7 and H2170 cells transfected for 48 hours with a control (Co) or sVEGFR-1-i13 encoding plasmid (sVEGFR-1-i13). Actin was used as a loading control. (D, E) Western blot analyses for the quantification of the indicated proteins in MGH7 (D) or H2170 (E) cells transfected for 48 hours either with a control plasmid (pcDNA3) or a plasmid encoding VEGF₁₆₅ (VEGF₁₆₅). Apoptosis was quantified by counting apoptotic H2170 cells after Hoechst staining. The mean $\pm$ SD of 3 independent experiments is presented (E, lowerpanel). (F) Upper panel: Western blot analysis for the detection of P-VEGFR-1(Tyr1213) protein in MGH7 cells transfected for 72 hours either with mismatch or sVEGFR-1-i13 siRNA and treated or not (Co) with 1 ng/ml rhVEGF₁₆₅ as

indicated. Actin was used as a loading control. Lower panel: RT-qPCR analysis of sVEGFR-1-i13 and VEGFR-1 transcripts in H2170 cells transfected with either mismatch or sVEGFR-1-i13 siRNA as indicated. GAPDH was used as an internal control.

Figure 5. sVEGFR-1-i13 is differentially expressed in NSCLCs. (A) Representative sVEGFR-1-i13 immunostainings from paraffin-embedded sections of normal lung tissues (upper panel: alveolus; lower panel: bronchus) as well as of two lung adenocarcinomas or two well-differentiated squamous cell lung carcinomas. Scores are indicated for each case. (B) Distribution of scores after immunostaining of sVEGFR-1-i13 in lung adenocarcinoma (upper panel) or squamous cell lung carcinoma (lower panel) patients. Histograms represent either nuclear (white bars), cytoplasmic (black bars) or additive (nuclear+cytoplasmic; hatched bars) scores for each tumor case. (C) Distribution of the sVEGFR-1-i13 scores according to the P-VEGFR-1(Tyr1213) scores in lung adenocarcinoma and squamous cell lung carcinoma. Statistical analyses were performed using a non parametric Mann-Whitney statistical test.

Figure 6. Identification of two differential patterns of response to anti-angiogenic therapies.

(A) 96 hour MTS proliferative assays were performed in MGH7 and H2170 cells treated or not with increasing concentrations of SU5416, KI8751 or bevacizumab as indicated. The mean $\pm$ SD of three independent experiments are presented. (B) Clonogenic assays were performed in MGH7 and H2170 cells treated or not for 30 days with the indicated concentrations of bevacizumab (BVZ), KI8751 or SU5416 as indicated. (C, D, E) Western blot analyses were performed for the detection of the indicated proteins in MGH7 or H2170 cells treated or not

during 72 hours with bevacizumab (C), or during 24 hours with the indicated concentrations (μM) of KI8751 or SU5416 (D, E). Actin was used as a loading control.

Figure 7. sVEGFR-1-i13 is required for modulation of VEGFR signaling in response to anti-angiogenic therapies. (A, B) MGH7 cells were transfected during 72 hours with either mismatch or sVEGFR-1-i13 siRNA and treated or not with 10 $\mu\text{g/ml}$ bevacizumab (BVZ) or were transfected during 48 hours with either mismatch or sVEGFR-1-i13 siRNA and treated or not for 24 additional hours with 10 μM SU5416. (A) Western blot analyses of the indicated proteins were performed. Actin was used as a loading control. (B) Apoptosis was evaluated by counting apoptotic cells after Hoechst staining in mismatch (black bars) or sVEGFR-1-i13 (white bars) transfected cells. The mean $\pm$ SD of three independent experiments is presented. (C) Same experiments as in (A) were performed in H2170 cells treated or not with 10 $\mu\text{g/ml}$ bevacizumab (BVZ) or 10 μM KI8751 for 24 hours.

Figure 8. Beta 1 integrin is a critical determinant of sVEGFR-1-i13 differential functions in SCC cells. (A) Western blot analysis for detection of beta 1 integrin was performed in MGH7 or H2170 cells as indicated. Actin was used as a loading control. (B) Western blot experiments for the detection of the indicated proteins were performed in MGH7 cells transfected during 48 hours with either mismatch or beta 1 integrin siRNA as indicated and treated or not (Co) for 24 additional hours with 10 μM KI8751 or 10 μM SU5416 or in MGH7 cells transfected during 72 hours with either mismatch or beta 1 integrin siRNA in the presence or absence of 10 $\mu\text{g/ml}$ bevacizumab. Actin was used as a loading control. (C, D) Western blot analyses of the indicated

proteins were performed in H2170 cells transfected for 48 hours with a control plasmid (pEGFPC1) or a plasmid encoding beta 1 integrin (pEGFPC1-beta 1) and treated (+) or not (-) with 10 μ g/ml bevacizumab (C) or 10 μ M KI8751 (D) as indicated. Actin was used as a loading control. (E, F) VEGFR-2 protein was immunoprecipitated using an anti-VEGFR-2 antibody (clone 55B11) from total protein extracts obtained from MGH7 (E) or H2170 (F) cells treated for 72 hours or not with 10 μ g/ml bevacizumab as indicated. IgG was used as an irrelevant antibody. The presence of VEGFR-2, beta 1 integrin or sVEGFR-1-i13 protein in the immunoprecipitates was assessed by western blotting. Input represents 10% of the immunoprecipitates.

Figure 9. An hypothetical model for the functions of sVEGFR-1-i13 in the response of SCC tumor cells to anti-angiogenic therapies. In SCC tumor cells expressing high level of beta 1 integrin (MGH7-like phenotype), anti-angiogenic therapies promote a sVEGFR-1-i13 increase that leads to activation of a beta 1 integrin-dependent VEGFR-1/VEGFR-2 autocrine loop that contributes to tumor cell proliferation and survival. In contrast, we identify one phenotype (H2170-like phenotype) in which anti-angiogenic therapies induce a sVEGFR-1-i13-dependent apoptosis of tumor cells, owing to the low expression of beta 1 integrin. In that case, sVEGFR-1-i13 heterodimerizes with VEGFRs and prevent their activation. We propose that this last phenotype might represent a subclass of SCC patients who could be more responsive to anti-angiogenic treatments than the others.

Supplementary Legends

Supplementary Figure 1. sVEGFR-1-i13 does not accumulate in lung adenocarcinoma cell lines treated with anti-angiogenic therapies. (A, B, C) H358, H1299 and A549 lung adenocarcinoma cell lines were treated or not (Co) for 24 hours with 10 μ M KI8751 or 10 μ M SU5416 or for 72 hours with 10 μ g/ml bevacizumab as indicated. (A) Extra-cellular levels of sVEGFR-1 were quantified by ELISA assay in the supernatants. (B) Western blot analysis for the detection of sVEGFR-1-i13 was performed. Actin was used as a loading control. (C) RT-qPCR analyses of VEGFR-1 (black bars) or sVEGFR-1-i13 (white bars) mRNA level were performed. GAPDH was used as an internal control.

Supplementary Figure 2. Anti-angiogenic treatments do not regulate all the VEGFR-1 splice variants. (A) Schematic representation of the full-length VEGFR-1 transcript as well as of the different sVEGFR-1 splice variants. (B, C) RT-qPCR analyses for the specific detection of sVEGFR-1-e15a and sVEGFR-1-i14 transcripts together with the full-length VEGFR-1 transcript in MGH7 (B) or H2170 (C) cells treated or not (Co) with 10 μ M SU5416 or 10 μ M KI8751 for 24 hours or with 10 μ g/ml bevacizumab for 72 hours as indicated. GAPDH was used as an internal control.

Supplementary Figure 3. sVEGFR-1-i13 does not accumulate in human endothelial cells. (A, B, C, D) HUVEC or HMEC endothelial cells treated or not for 24 hours with KI8751 or SU5416, or for 72 hours with bevacizumab at the indicated concentrations. (A, C) Extra-cellular sVEGFR-

1 level was quantified by ELISA assay in the supernatants of HUVEC (A) or HMEC (C) cells treated or not with the indicated antiangiogenic therapies. (B, D) Western blot analysis for the quantification of sVEGFR-1-i13 in HUVEC (B) or HMEC (D) cells. Actin was used as a loading control.

Supplementary Figure 4. Recombinant VEGF₁₆₅ and sVEGFR-1 proteins regulate VEGFR signaling pathway as sVEGFR-1-i13 in MGH7 or H2170 cells. (A, B) Fourteen days soft agar assays were performed in MGH7 (A) or H2170 (B) cells treated or not (control) with 1 ng/ml rhVEGF₁₆₅ or 1 ng/ml sVEGFR-1 recombinant ligand. Upper panels: representative illustrations of colonies in each condition. Lower panels: quantification of the number of clones per condition. The means $\pm$ SD of three independent experiments are presented. Statistical analyses were performed using a student non paired t test (* $p < 0.05$). (C) Western blot analyses of the indicated proteins were performed in MGH7 and H2170 cells either treated or not (Co) during 72 hours with 1 ng/ml sVEGFR-1 recombinant ligand. Actin was used as a loading control. (D) MGH7 or H2170 cells were treated or not (Co) for 72 hours with 1 ng/ml of the indicated rhVEGFs. Western blotting of the indicated proteins. Actin was used as a loading control. (E) A 96 hours MTS assay for quantification of cellular viability was performed in MGH7 or H2170 cells treated or not with increasing amounts of rhVEGF₁₂₁ (white circles), rhVEGF₁₆₅ (black squares) or rhVEGF₁₈₉ (white triangles) as indicated. The mean $\pm$ SD of 3 independent experiments is illustrated. (F) H2170 cells were treated or not (Co) for 72 hours with 1 ng/ml of the indicated rhVEGFs. Apoptosis was quantified by counting apoptotic H2170 cells after

Hoechst staining for each condition. The mean $\pm$ SD of 3 independent experiments is presented. A western blot of active caspase-3 is also shown.

Supplementary Figure 5. The VEGFR autocrine loop is active in SCC tumorgrafted models. (A) Immunohistochemical staining was performed on paraffin-embedded sections obtained from the same tumorgraft experiments than in Figure 2. Representative immunostainings of P-VEGFR-1(Tyr1213) are presented. One example is illustrated for each condition. (B) Western-blotting of the indicated proteins in UN-SCC680 or UN-ADC12 murine cells treated or not with the indicated concentrations of KI8751 or SU5416 for 24 hours. Actin was used as a loading control.

Supplementary Figure 6. Recombinant VEGF₁₆₅ and sVEGFR-1 also recapitulates the effects of sVEGFR-1-i13 on the VEGFR/ β 1 integrin network. (A) Western blot analyses of the indicated proteins were performed in MGH7 cells transfected for 72 hours with either mismatch or β 1 integrin siRNA as indicated and treated (+) or not (-) with 1 ng/ml sVEGFR-1 recombinant ligand. (B, C) VEGFR-2 protein was immunoprecipitated using an anti-VEGFR-2 antibody (clone 55B11) from total protein extracts obtained from MGH7 (B) or H2170 (C) cells treated for 24 hours or not (Ctrl) with either 1 ng/ml rhVEGF₁₆₅ or 1 ng/ml sVEGFR-1 recombinant ligand as indicated. IgG was used as an irrelevant antibody. The presence of VEGFR-2, β 1 integrin or sVEGFR-1-i13 protein in the immunoprecipitates was assessed by western blotting. Input represents 10% of the immunoprecipitates.

References

- 1 Heist, R. S., Sequist, L. V. & Engelman, J. A. Genetic changes in squamous cell lung cancer: a review. *J Thorac Oncol***7**, 924-933, doi:10.1097/JTO.0b013e31824cc334 (2012).
- 2 Larrayoz, M. et al. Contrasting responses of non-small cell lung cancer to antiangiogenic therapies depend on histological subtype. *EMBO Mol Med***6**, 539-550, doi:10.1002/emmm.201303214 (2014).
- 3 Johnson, D. H. et al. Randomized phase II trial comparing bevacizumab plus carboplatin and paclitaxel with carboplatin and paclitaxel alone in previously untreated locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol***22**, 2184-2191, doi:10.1200/JCO.2004.11.022 (2004).
- 4 Scagliotti, G. & Govindan, R. Targeting angiogenesis with multitargeted tyrosine kinase inhibitors in the treatment of non-small cell lung cancer. *Oncologist***15**, 436-446, doi:10.1634/theoncologist.2009-0225 (2010).
- 5 Kendall, R. L., Wang, G. & Thomas, K. A. Identification of a natural soluble form of the vascular endothelial growth factor receptor, FLT-1, and its heterodimerization with KDR. *Biochem Biophys Res Commun***226**, 324-328, doi:10.1006/bbrc.1996.1355 (1996).
- 6 Goldman, C. K. et al. 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**, 8795-8800 (1998).
- 7 Verrax, J. et al. Delivery of soluble VEGF receptor 1 (sFlt1) by gene electrotransfer as a new antiangiogenic cancer therapy. *Mol Pharm***8**, 701-708, doi:10.1021/mp100268t (2011).

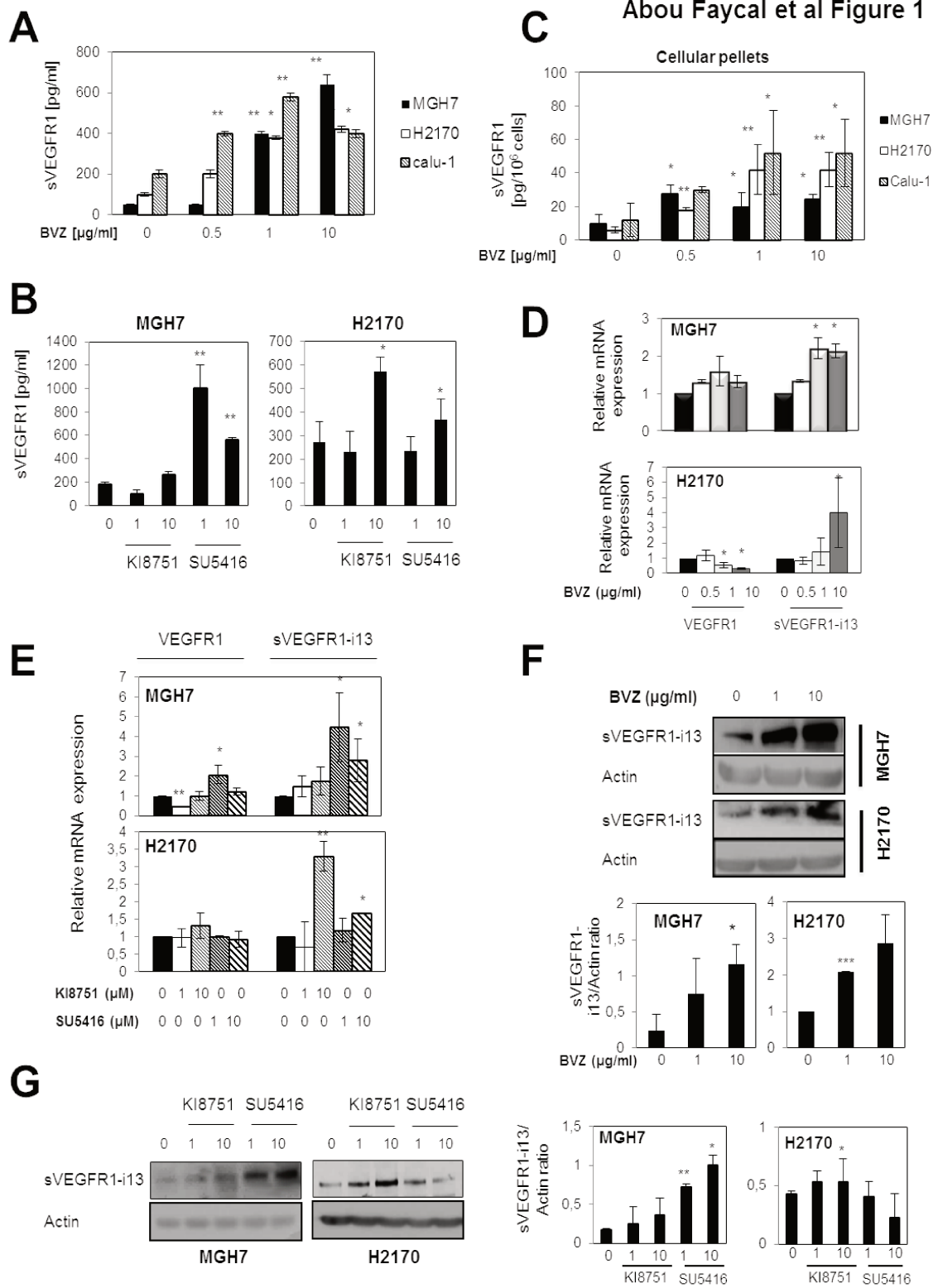
- 8 Owen, L. A. et al. Morpholino-mediated increase in soluble Flt-1 expression results in decreased ocular and tumor neovascularization. *PLoS One***7**, e33576, doi:10.1371/journal.pone.0033576 (2012).
- 9 Bando, H. et al. Association between intratumoral free and total VEGF, soluble VEGFR-1, VEGFR-2 and prognosis in breast cancer. *Br J Cancer***92**, 553-561, doi:10.1038/sj.bjc.6602374 (2005).
- 10 Tolaney, S. M. et al. Role of vascular density and normalization in response to neoadjuvant bevacizumab and chemotherapy in breast cancer patients. *Proc Natl Acad Sci U S A***112**, 14325-14330, doi:10.1073/pnas.1518808112 (2015).
- 11 Heist, R. S. et al. Improved tumor vascularization after anti-VEGF therapy with carboplatin and nab-paclitaxel associates with survival in lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A***112**, 1547-1552, doi:10.1073/pnas.1424024112 (2015).
- 12 Orecchia, A. et al. Vascular endothelial growth factor receptor-1 is deposited in the extracellular matrix by endothelial cells and is a ligand for the alpha 5 beta 1 integrin. *J Cell Sci***116**, 3479-3489, doi:10.1242/jcs.00673 (2003).
- 13 Orecchia, A. et al. Endothelial cell adhesion to soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 triggers a cell dynamic and angiogenic phenotype. *FASEB J***28**, 692-704, doi:10.1096/fj.12-225771 (2014).
- 14 Ruffini, F. et al. Expression of the soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 in cutaneous melanoma: role in tumour progression. *Br J Dermatol***164**, 1061-1070, doi:10.1111/j.1365-2133.2010.10200.x (2011).
- 15 Miyake, T. et al. Soluble VEGF receptor 1 (sFLT1) induces non-apoptotic death in ovarian and colorectal cancer cells. *Sci Rep***6**, 24853, doi:10.1038/srep24853 (2016).

- 16 Kendall, R. L. & Thomas, K. A. Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 10705-10709 (1993).
- 17 Merdzhanova, G. et al. E2F1 controls alternative splicing pattern of genes involved in apoptosis through upregulation of the splicing factor SC35. *Cell Death Differ* **15**, 1815-1823, doi:cdd2008135 [pii] 10.1038/cdd.2008.135 (2008).
- 18 Salon, C. et al. E2F1 induces apoptosis and sensitizes human lung adenocarcinoma cells to death-receptor-mediated apoptosis through specific downregulation of c-FLIP(short). *Cell Death Differ* **13**, 260-272, doi:4401739 [pii] 10.1038/sj.cdd.4401739 (2006).
- 19 Wu, F. T. et al. A systems biology perspective on sVEGFR-1: its biological function, pathogenic role and therapeutic use. *J Cell Mol Med* **14**, 528-552, doi:10.1111/j.1582-4934.2009.00941.x (2010).
- 20 Saito, T. et al. VEGF-A induces its negative regulator, soluble form of VEGFR-1, by modulating its alternative splicing. *FEBS Lett* **587**, 2179-2185, doi:10.1016/j.febslet.2013.05.038 (2013).
- 21 Lantuejoul, S. et al. 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**, 336-347, doi:10.1002/path.1367 (2003).
- 22 Vorlova, S. et al. Induction of antagonistic soluble decoy receptor tyrosine kinases by intronic polyA activation. *Mol Cell* **43**, 927-939, doi:10.1016/j.molcel.2011.08.009 (2011).

- 23 Zhang, Q. et al. The global landscape of intron retentions in lung adenocarcinoma. *BMC Med Genomics***7**, 15, doi:10.1186/1755-8794-7-15 (2014).
- 24 Thomas-Schoemann, A. et al. Soluble VEGFR-1: a new biomarker of sorafenib-related hypertension (i.e., sorafenib-related is the compound adjective?). *J Clin Pharmacol***55**, 478-479, doi:10.1002/jcph.429 (2015).
- 25 Meyerhardt, J. A. et al. Phase I study of cetuximab, irinotecan, and vandetanib (ZD6474) as therapy for patients with previously treated metastatic colorectal cancer. *PLoS One***7**, e38231, doi:10.1371/journal.pone.0038231 (2012).
- 26 Duda, D. G. et al. Plasma soluble VEGFR-1 is a potential dual biomarker of response and toxicity for bevacizumab with chemoradiation in locally advanced rectal cancer. *Oncologist***15**, 577-583, doi:10.1634/theoncologist.2010-0029 (2010).
- 27 Willett, C. G. et al. Efficacy, safety, and biomarkers of neoadjuvant bevacizumab, radiation therapy, and fluorouracil in rectal cancer: a multidisciplinary phase II study. *J Clin Oncol***27**, 3020-3026, doi:10.1200/JCO.2008.21.1771 (2009).
- 28 Zhu, A. X. et al. A phase II and biomarker study of ramucirumab, a human monoclonal antibody targeting the VEGF receptor-2, as first-line monotherapy in patients with advanced hepatocellular cancer. *Clin Cancer Res***19**, 6614-6623, doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-1442 (2013).
- 29 Ahmad, S. et al. Autocrine activity of soluble Flt-1 controls endothelial cell function and angiogenesis. *Vasc Cell***3**, 15, doi:10.1186/2045-824X-3-15 (2011).
- 30 Thomas, C. P. et al. A recently evolved novel trophoblast-enriched secreted form of fms-like tyrosine kinase-1 variant is up-regulated in hypoxia and preeclampsia. *J Clin Endocrinol Metab***94**, 2524-2530, doi:10.1210/jc.2009-0017 (2009).

- 31 Boeckel, J. N. et al. Jumonji domain-containing protein 6 (Jmjd6) is required for angiogenic sprouting and regulates splicing of VEGF-receptor 1. *Proc Natl Acad Sci U S A***108**, 3276-3281, doi:10.1073/pnas.1008098108 (2011).
- 32 Palmer, K. R. et al. Jumonji Domain Containing Protein 6 Is Decreased in Human Preeclamptic Placentas and Regulates sFLT-1 Splice Variant Production. *Biol Reprod***94**, 59, doi:10.1095/biolreprod.115.134460 (2016).
- 33 Kangsamaksin, T. et al. NOTCH decoys that selectively block DLL/NOTCH or JAG/NOTCH disrupt angiogenesis by unique mechanisms to inhibit tumor growth. *Cancer Discov***5**, 182-197, doi:10.1158/2159-8290.CD-14-0650 (2015).
- 34 Beckmann, R. et al. Mechanical forces induce changes in VEGF and VEGFR-1/sFlt-1 expression in human chondrocytes. *Int J Mol Sci***15**, 15456-15474, doi:10.3390/ijms150915456 (2014).
- 35 Bordeleau, F. et al. Tissue stiffness regulates serine/arginine-rich protein-mediated splicing of the extra domain B-fibronectin isoform in tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A***112**, 8314-8319, doi:10.1073/pnas.1505421112 (2015).
- 36 Adachi, M. et al. Significance of integrin alpha5 gene expression as a prognostic factor in node-negative non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res***6**, 96-101 (2000).
- 37 Han, J. Y. et al. Immunohistochemical expression of integrins and extracellular matrix proteins in non-small cell lung cancer: correlation with lymph node metastasis. *Lung Cancer***41**, 65-70 (2003).
- 38 Jain, R. K. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science***307**, 58-62, doi:10.1126/science.1104819 (2005).

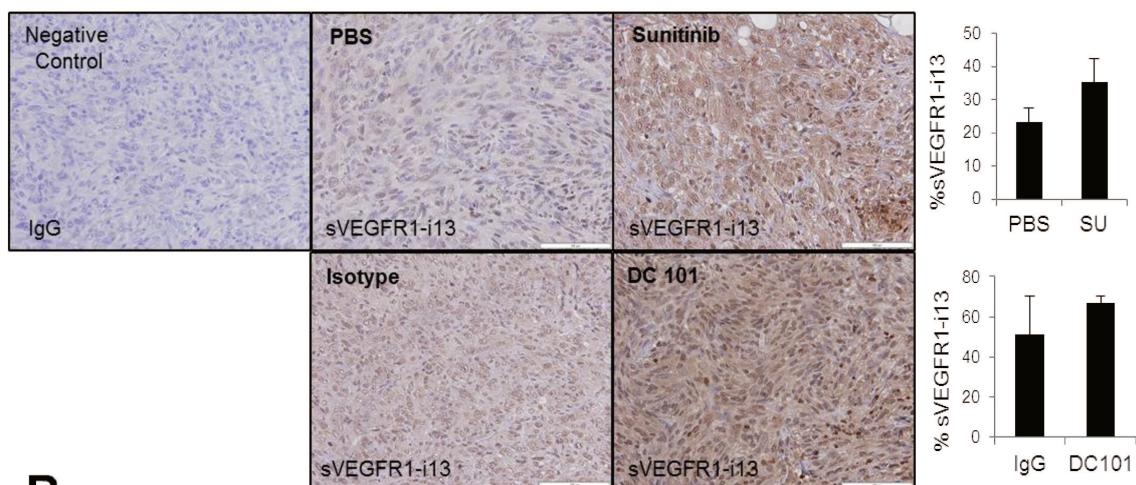
- 39 Garon, E. B. et al. Ramucirumab plus docetaxel versus placebo plus docetaxel for second-line treatment of stage IV non-small-cell lung cancer after disease progression on platinum-based therapy (REVEL): a multicentre, double-blind, randomised phase 3 trial. *Lancet***384**, 665-673, doi:10.1016/S0140-6736(14)60845-X (2014).
- 40 Carbonell, W. S., DeLay, M., Jahangiri, A., Park, C. C. & Aghi, M. K. beta1 integrin targeting potentiates antiangiogenic therapy and inhibits the growth of bevacizumab-resistant glioblastoma. *Cancer Res***73**, 3145-3154, doi:0008-5472.CAN-13-0011 [pii] 10.1158/0008-5472.CAN-13-0011.



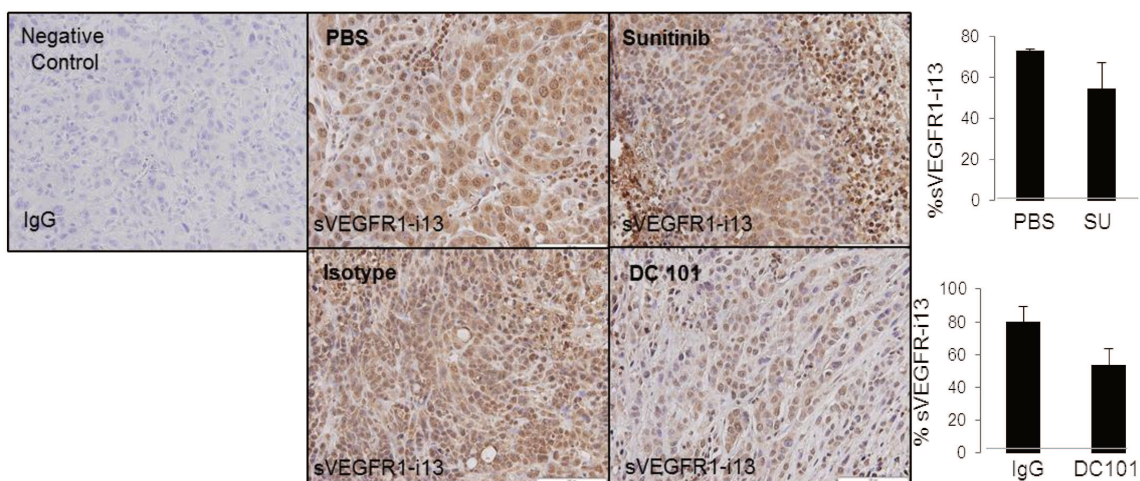
A

UN-SCC680

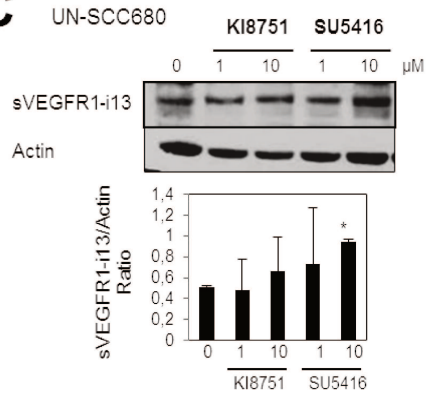
Abou Faycal et al Figure 2

**B**

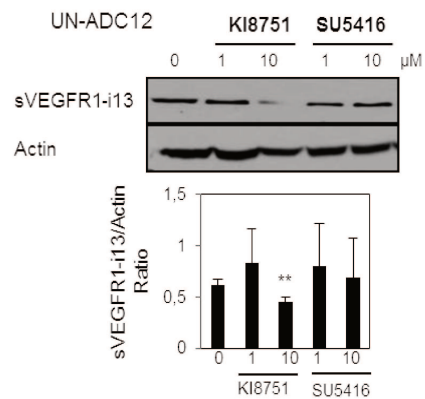
UN-ADC12

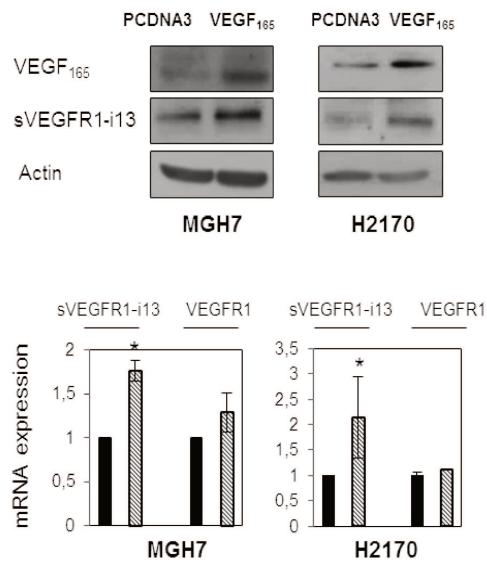
**C**

UN-SCC680

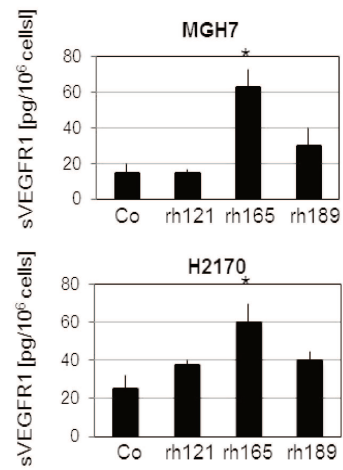
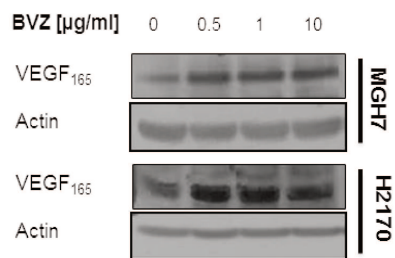
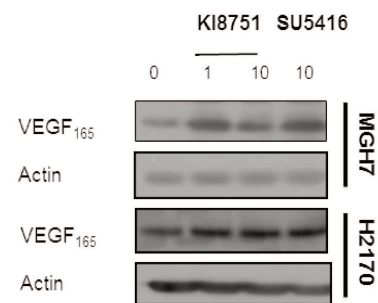
**D**

UN-ADC12

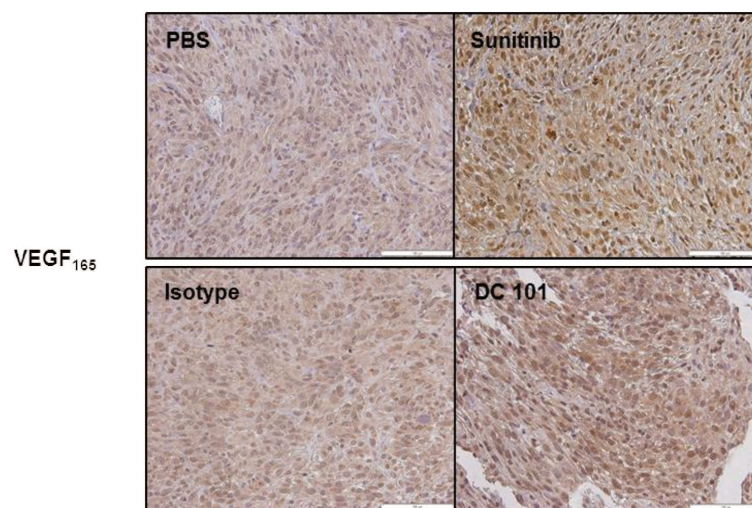


A**B**

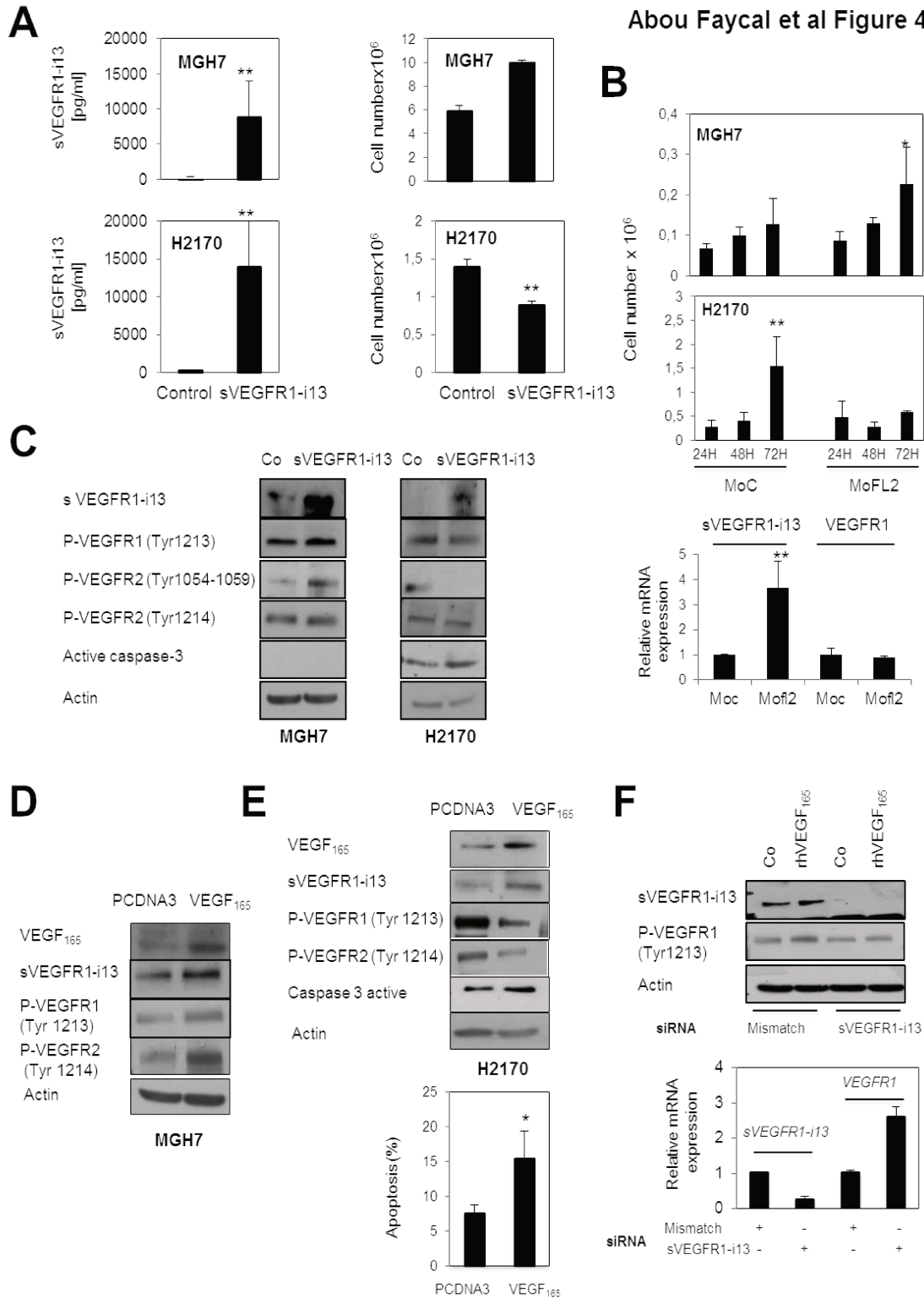
Abou Faycal et al Figure 3

**C****D****E**

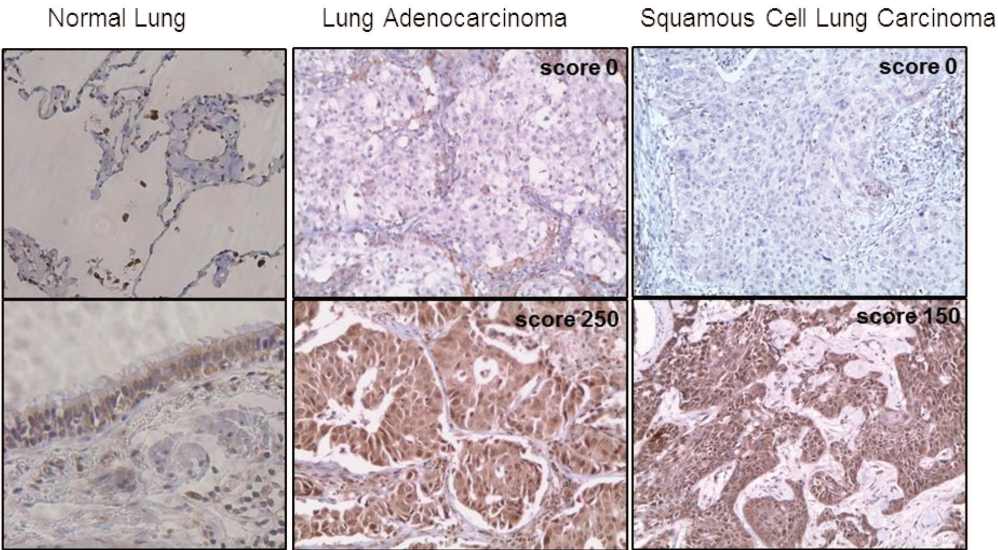
UN-SCC680



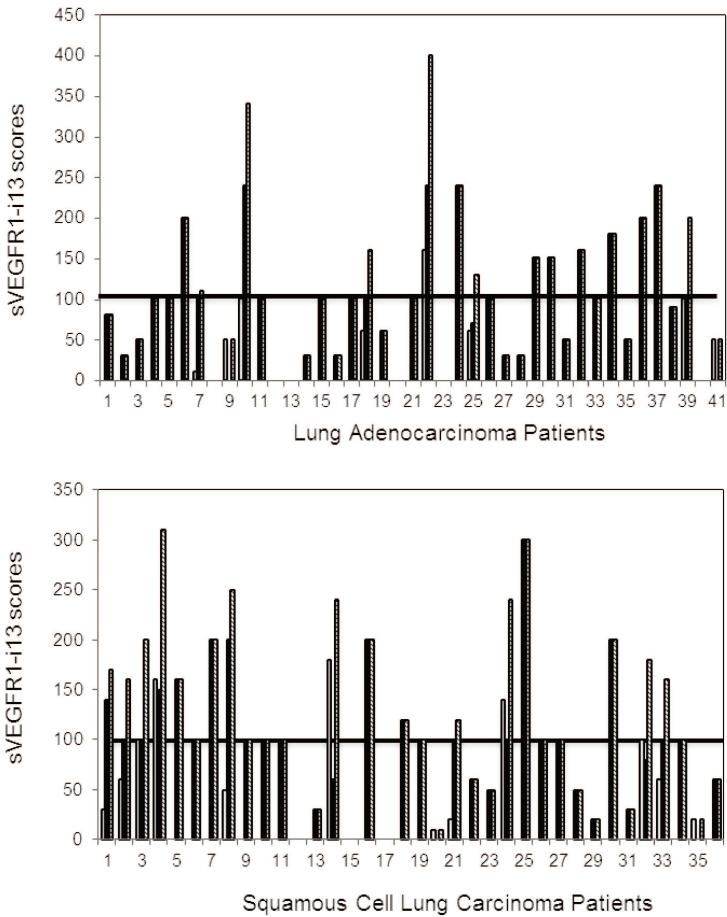
Abou Faycal et al Figure 4



A

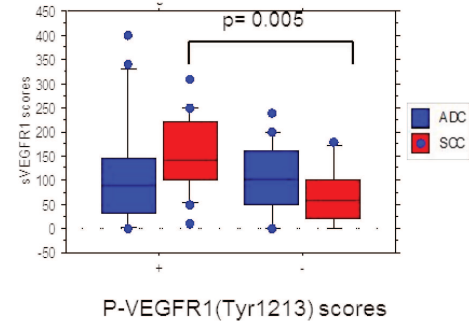


B



Cut-off

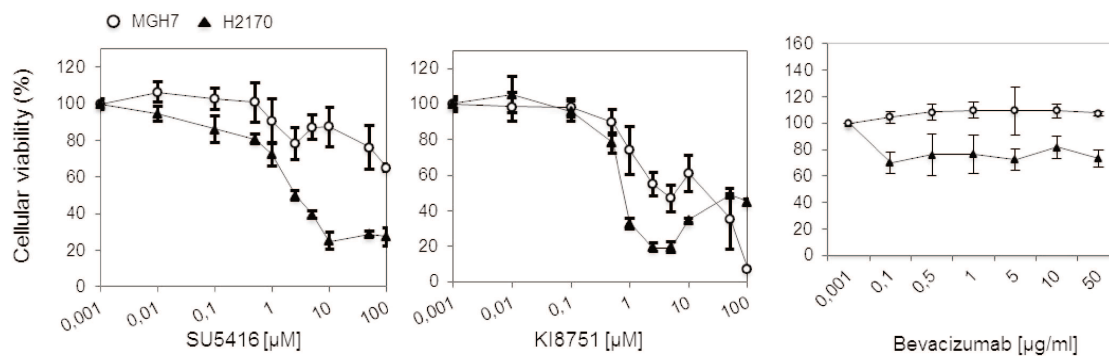
C



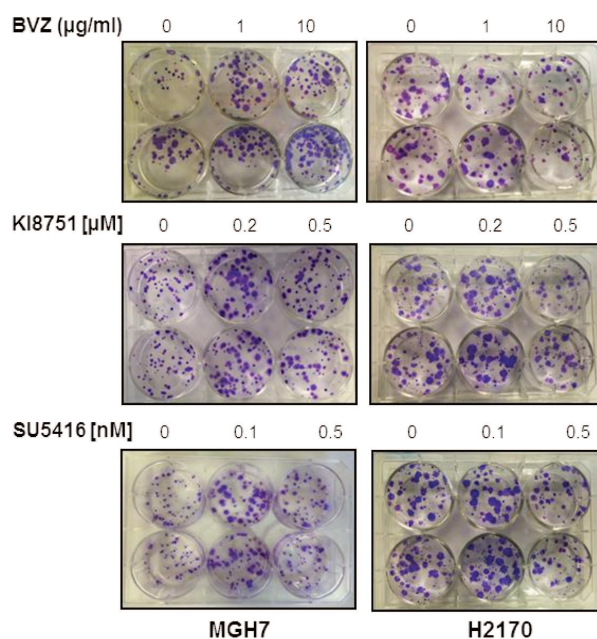
Cut-off

A

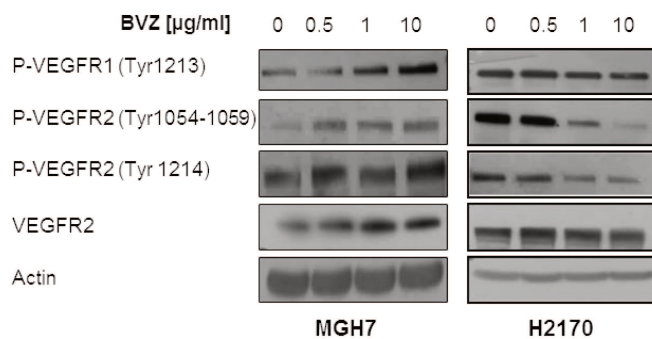
Abou Faycal et al Figure 6



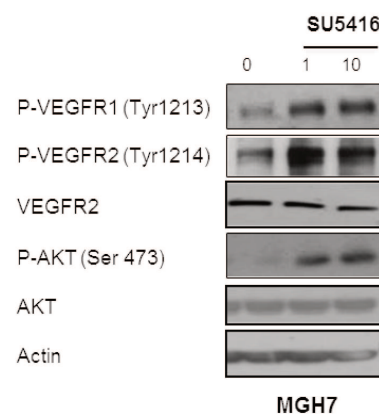
B



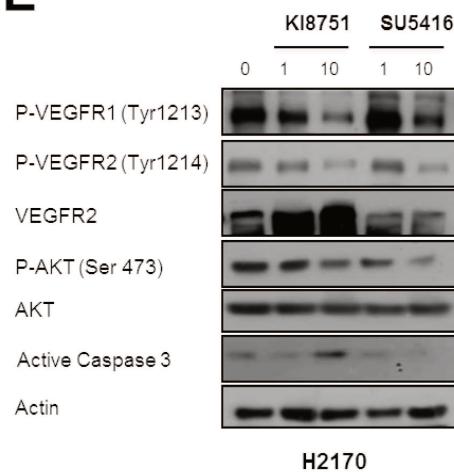
C



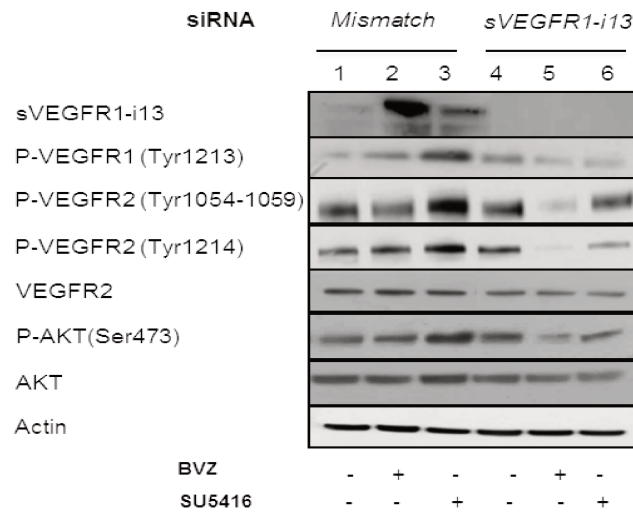
D



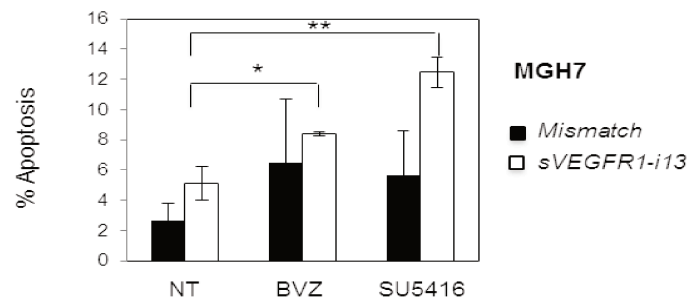
E



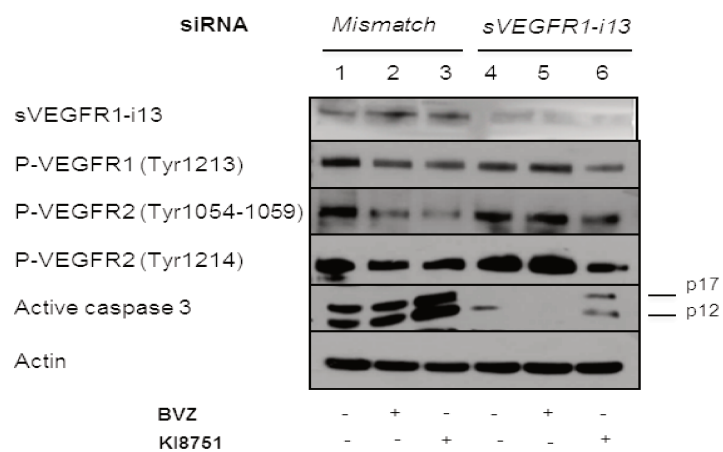
A



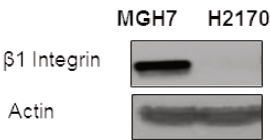
B



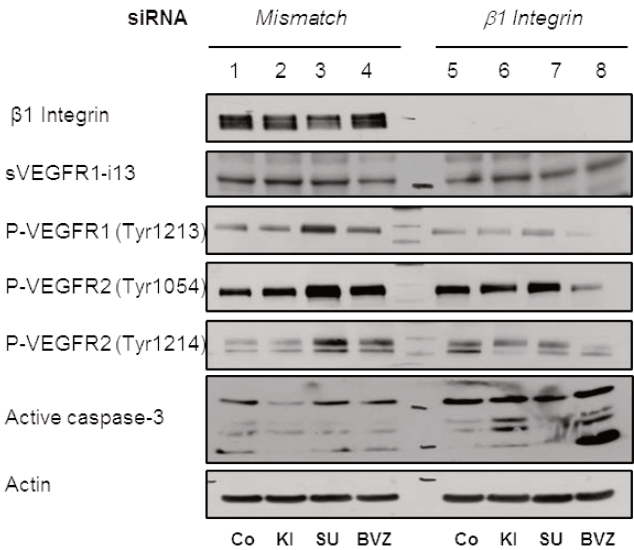
C



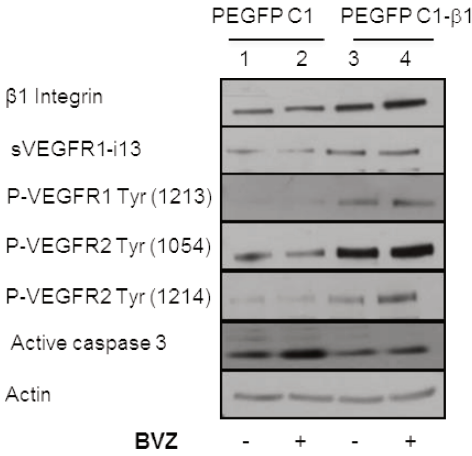
A



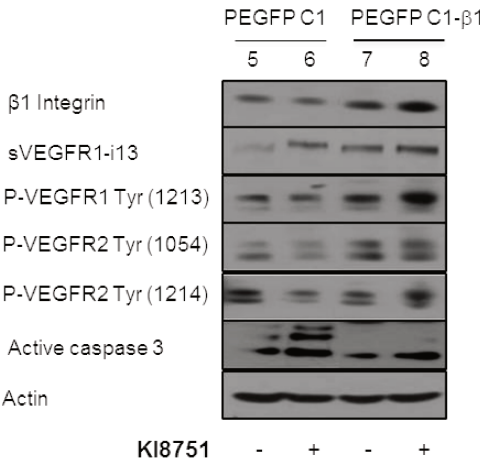
B



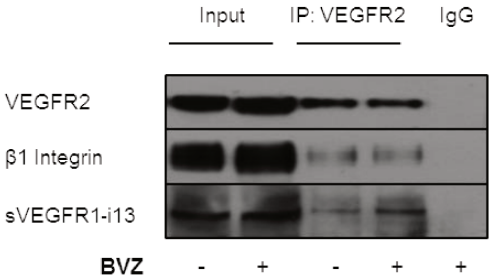
C



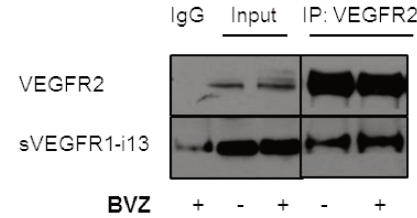
D

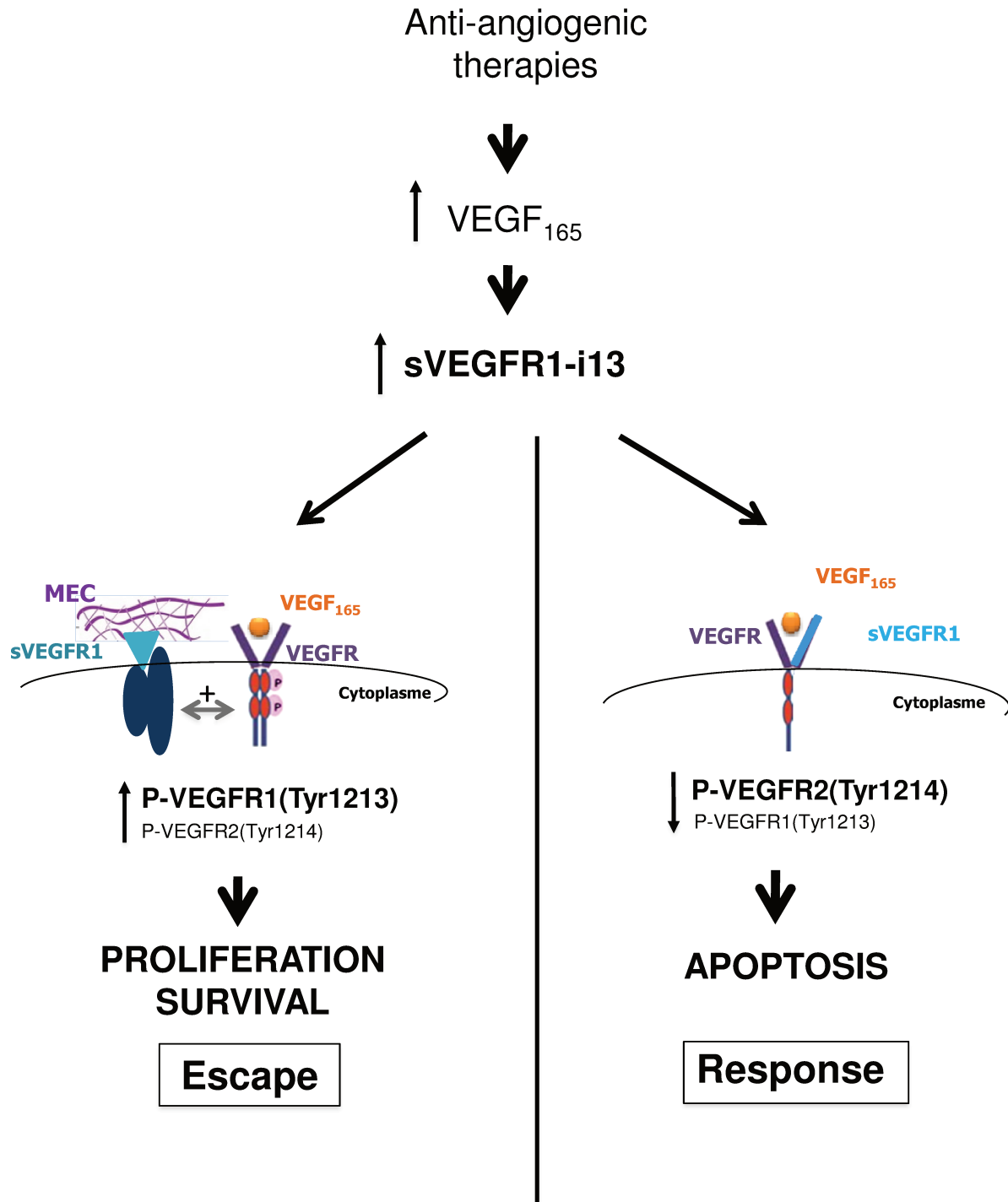


E



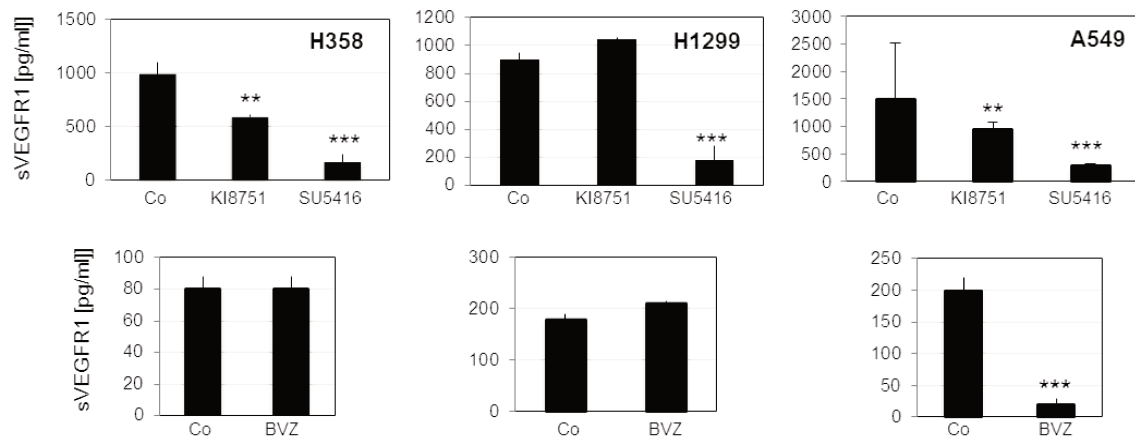
F



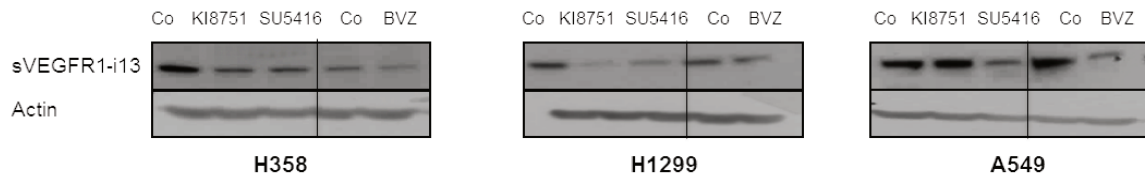


Abou Faycal et al Supplementary Figure 1

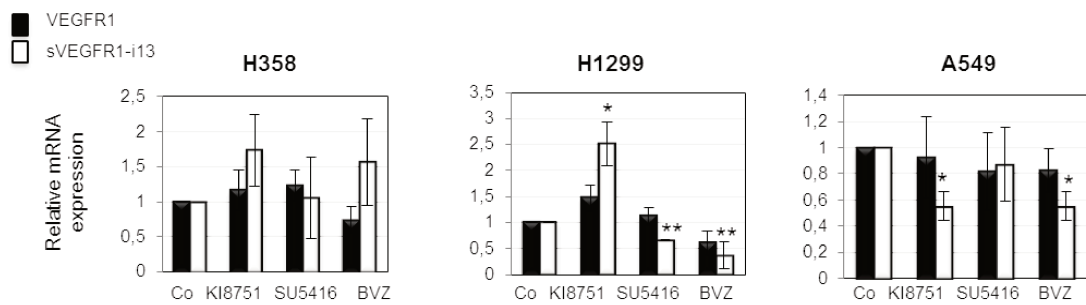
A



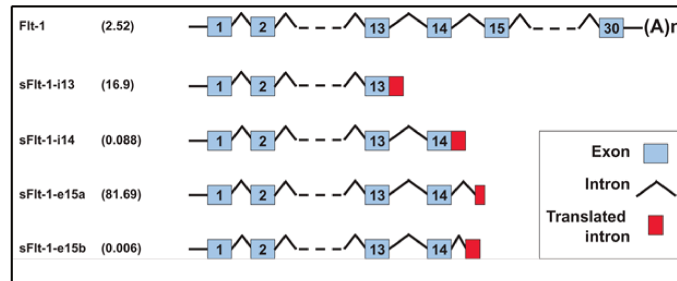
B



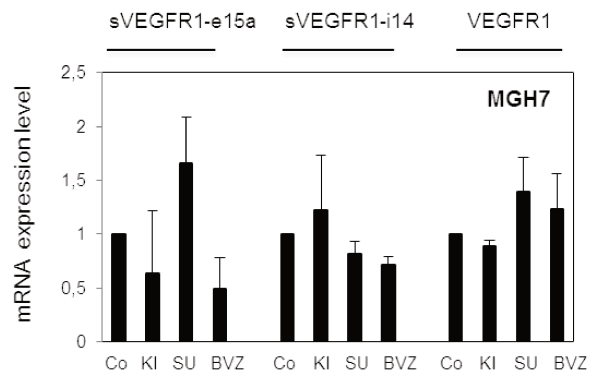
C



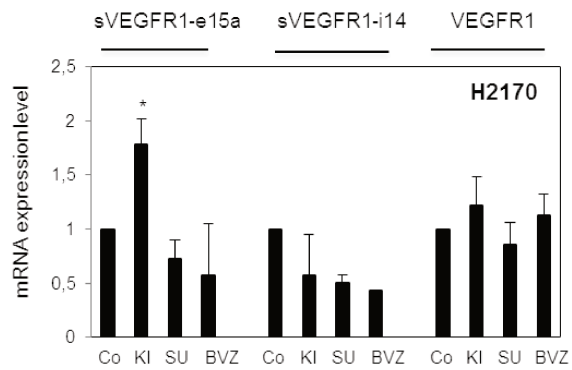
A



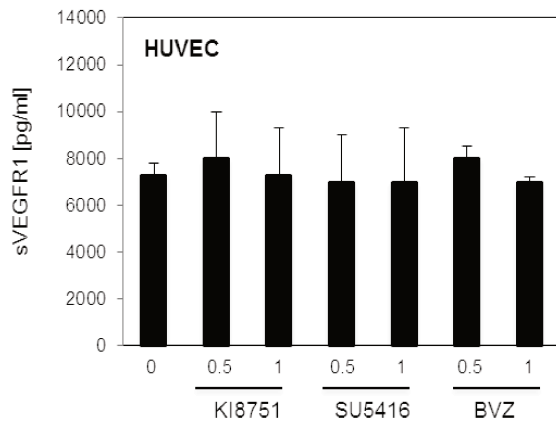
B



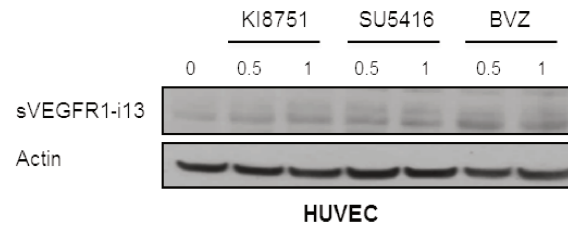
C



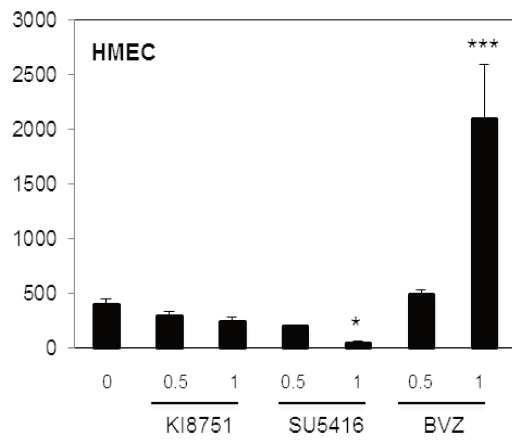
A



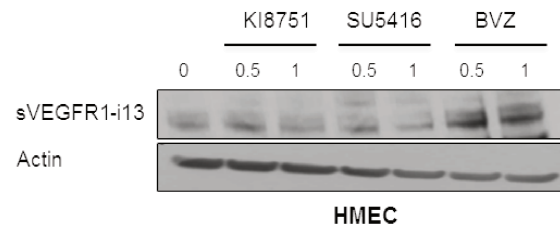
B



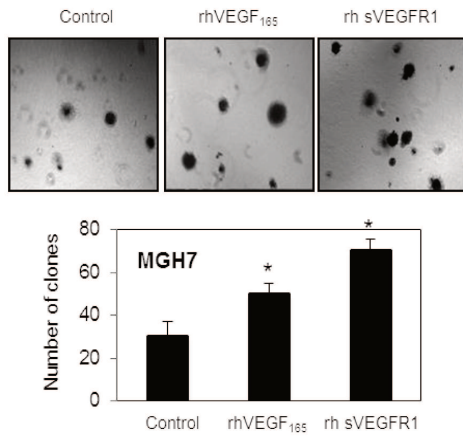
C



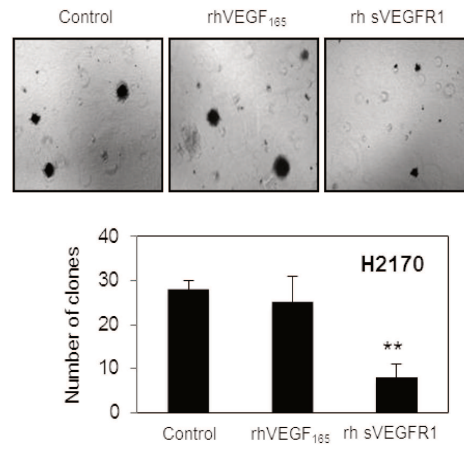
D



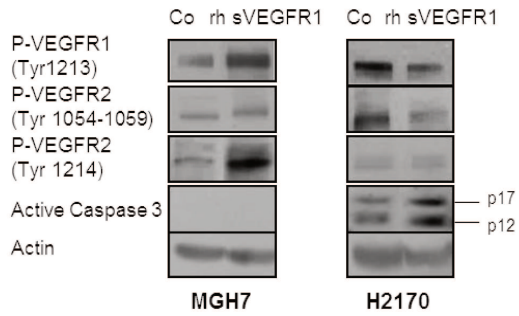
A



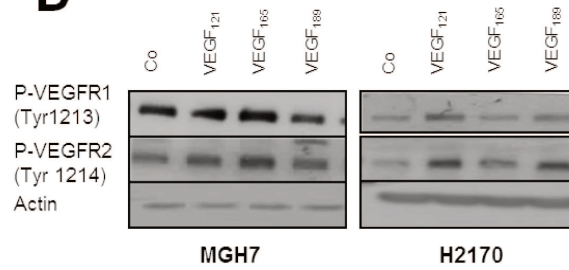
B



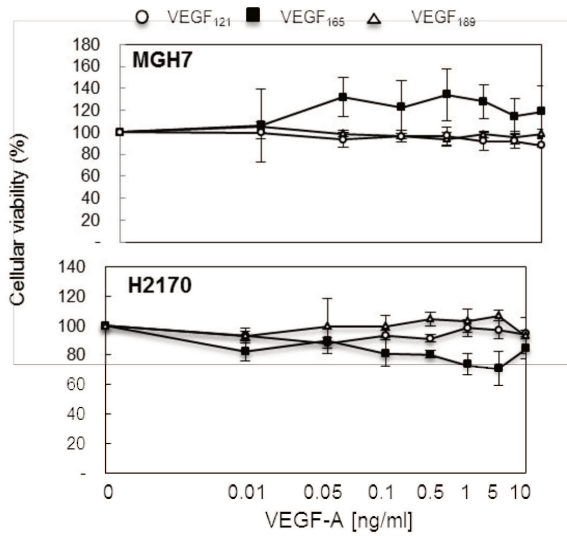
C



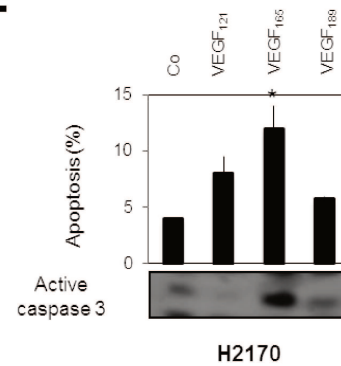
D



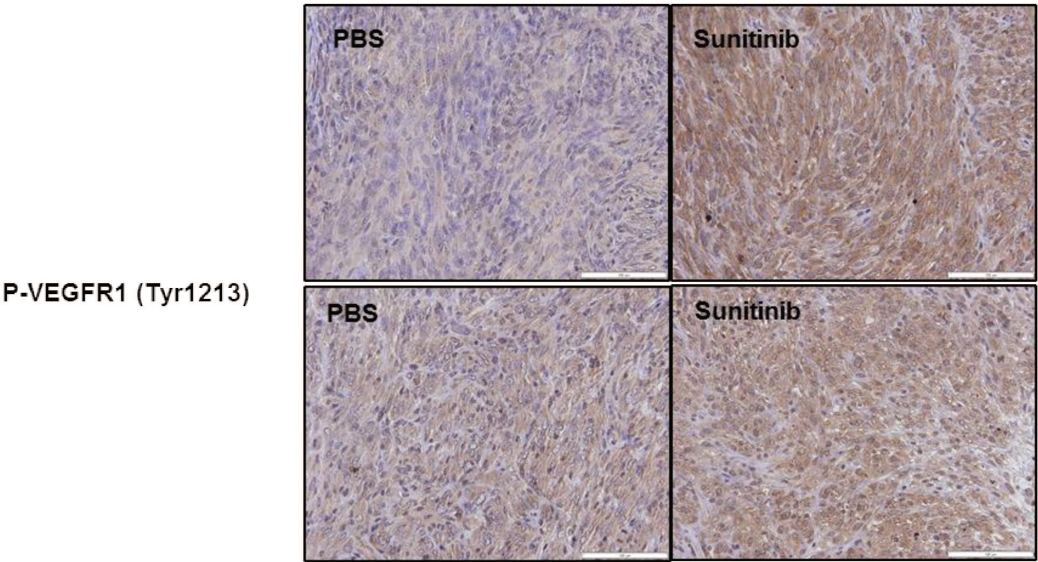
E



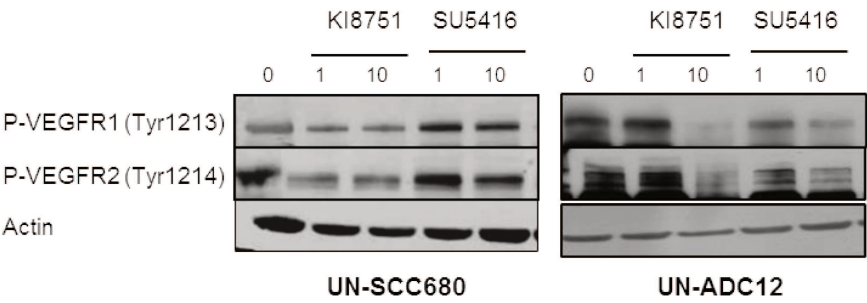
F



A

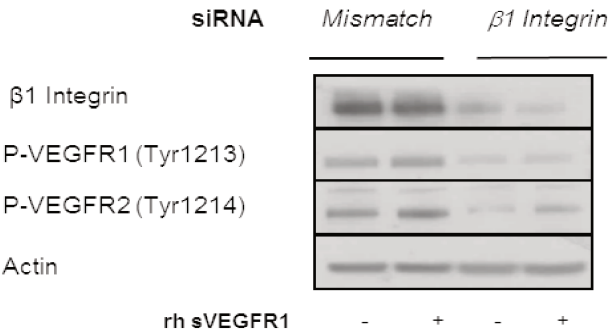


B

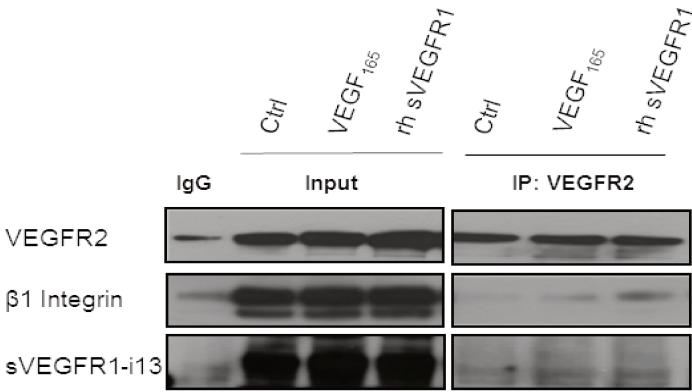


Abou Faycal et al Supplementary Figure 6

A



B



C

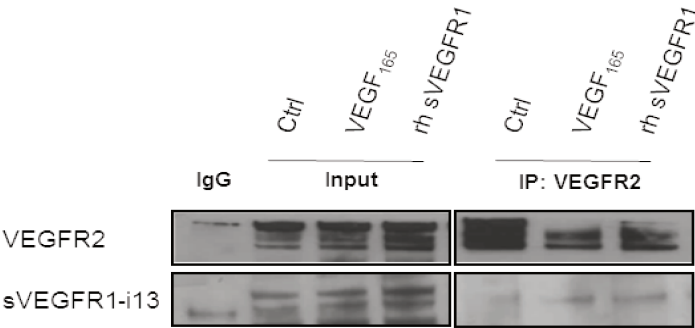


Table 1. Immunohistochemical analysis of sVEGFR1-i13 expression in NSCLCs.

Histological Type	Nb	sVEGFR1-i13 expression level		P ^b
		Class 0	Class 1	
Adenocarcinoma	41	28 (68%)	13 (32%)	NS
Squamous carcinoma	36	20 (56%)	16 (44%)	
Total NSCLCs ^a	77	48 (62%)	29 (38%)	

Immunostaining scores were calculated by multiplying the number of labeled cells (0 to 100%) by the level of intensity (1 to 3). According to this and as compared to the level detected in normal lung tissues, tumor samples were grouped in two classes (see materials and methods section): sVEGFR1-i13: class 0 (low level, score 0-100), class 1 (high level, score > 100). nb=number of cases in each histological type. a Non Small Cell Lung Carcinoma. b χ^2 test. NS: non significant.

Table 2. Relationship between sVEGFR1-i13 and PTM stages in Non Small Cell Lung Carcinoma.

SCC	sVEGFR1-i13 expression level		P ^a
	Class 0	Class 1	
I/II	11 (31%)	3 (8%)	0.05
III/IV	9 (25%)	13 (36%)	
Total	20 (56%)	16 (44%)	

ADC	sVEGFR1-i13 expression level		P ^a
	Class 0	Class 1	
I/II	18 (44%)	9 (22%)	NS
III/IV	10 (24%)	4 (10%)	
Total	28 (68%)	13 (32%)	

Tumors were classified in classes 0, or 1 according to their expression levels in sVEGFR1-i13 as mentioned in the results section. ^a Chi-2 Test.

Résultats complémentaires

Dans cette partie, les résultats complémentaires que j'ai obtenus sont présentés et discutés.

1. Effets complémentaires des traitements

1.1 Effet de la combinaison bevacizumab+cisplatine sur l'expression du sVEGFR-1-i13

Nous avons montré que le bevacizumab augmente l'expression du sVEGFR-1-i13 dans les carcinomes pulmonaires squameux. Toutefois, en clinique, le bevacizumab est souvent combiné avec des agents chimio-thérapeutiques. Notamment, chez les patients porteurs d'adénocarcinomes pulmonaires, l'utilisation du bevacizumab en combinaison avec le carboplatine et le paclitaxel a été adoptée comme traitement standard (Sandler et al. 2006). Toutefois, les mécanismes par lesquels le bevacizumab améliore le rendement de la chimiothérapie ne sont toujours pas clairs à l'heure actuelle. Différents biomarqueurs ont été testés afin de comprendre ces mécanismes. Parmi ces biomarqueurs, nous citerons le sVEGFR-1 dont l'expression plasmatique diminue transitoirement suite à la combinaison de ces traitements chez les patients porteurs d'adénocarcinomes pulmonaires (Rebecca S. Heist et al. 2015b). Nous nous sommes donc intéressés à la combinaison bevacizumab+cisplatine dans nos modèles de carcinomes pulmonaires squameux.

Dans les cellules MGH7, nous montrons que le cisplatine augmente l'expression du sVEGFR-1-i13 et du VEGF₁₆₅ (figure 31). Dans les cellules H2170, le cisplatine inhibe l'expression du sVEGFR-1-i13 et augmente celle du VEGF₁₆₅. Dans les deux lignées, le traitement au cisplatine s'accompagne d'une inhibition de la phosphorylation du VEGFR-2 sur sa tyrosine 1214 et du VEGFR-1 sur sa tyrosine 1213 qui corrèle avec une inhibition des voies de signalisation en aval telles que la voie de p38MAPK dans la lignée MGH7 et les voies AKT (Ser473) et ERK1/2 dans la lignée H2170 (figure 31). Dans les deux modèles, le cisplatine active la caspase 3 et induit l'apoptose. L'ajout de bevacizumab dans ces conditions ne modifie pas la réponse au cisplatine.

Ces résultats montrent que le cisplatine régule aussi l'expression du sVEGFR-1-i13 mais que les réponses biologiques en découlant sont différentes de celles mises en jeu en réponse aux thérapies anti-angiogéniques utilisées seules.

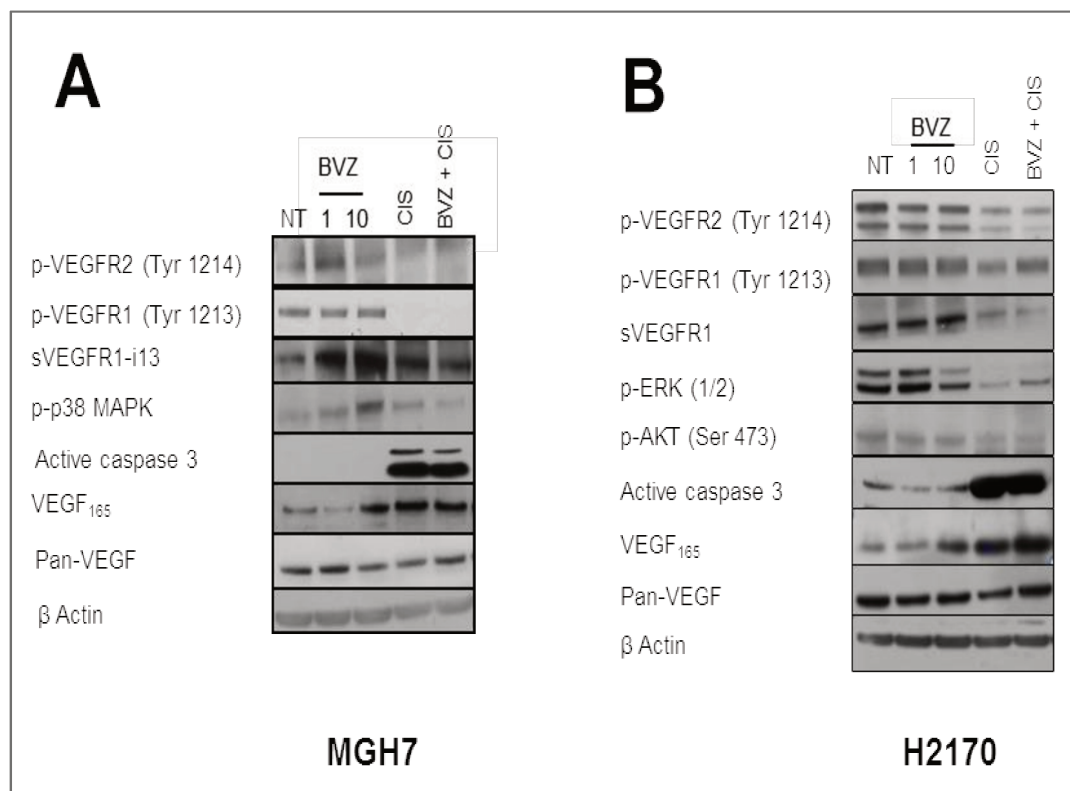


Figure 31. Le cisplatine combiné ou non au bevacizumab diminue l'expression du sVEGFR-1-i13. Les cellules MGH7 et H2170 ont été traitées par le bevacizumab (μg/ml) aux doses indiquées ou bien par le cisplatine à 10 μM combiné ou non au bevacizumab à 1 μg/ml pendant 72 heures. L'expression protéique des différentes protéines a été analysée par western blot. L'actine est utilisée comme contrôle de dépôt.

1.2 Effet du bevacizumab sur l'expression du sVEGFR-2

Le sVEGFR-2 a été déjà listé parmi les biomarqueurs circulants dont le niveau d'expression varie en réponse au bevacizumab (Lambrechts et al. 2013). Par exemple, chez les patientes porteuses de cancer du sein, Denduluri et collaborateurs ont montré que les niveaux de sVCAM-1 et de sVEGFR-2 augmentent significativement après traitement par bevacizumab. Cette augmentation est corrélée avec la régulation d'une boucle autocrine et paracrine dépendante du VEGF-A (Denduluri et al. 2008). Dans le but de tester l'effet du bevacizumab sur le niveau

d'expression du sVEGFR-2, nous avons traité nos deux lignées cellulaires MGH7 et H2170 avec des doses croissantes de bevacizumab, et nous avons quantifié les niveaux protéiques sécrétés de sVEGFR-2 par un test ELISA. Nous montrons que le bevacizumab ne modifie pas significativement l'expression du sVEGFR-2 dans ces deux lignées cellulaires (figure 32). Ces données montrent aussi que le niveau basal de sVEGFR-2 est beaucoup plus haut dans la lignée H2170 que dans la lignée MGH7 que ce soit dans les surnageants traités ou non avec le bevacizumab. Cela pourrait être dû au fait que les niveaux basaux de VEGFR-2 total sont plus élevés dans la lignée H2170 que dans la lignée MGH7. Ces résultats indiquent un effet spécifique du bevacizumab sur l'expression du sVEGFR-1-i13 dans nos modèles d'étude.

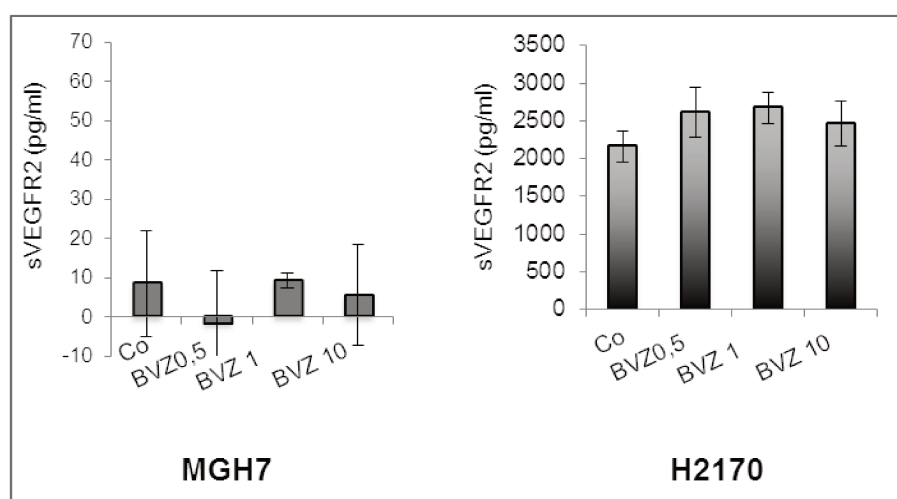


Figure 32. Le bevacizumab ne modifie pas l'expression du sVEGFR-2. Les cellules MGH7 et H2170 ont été traitées avec le bevacizumab à doses croissantes pendant 72 heures. Le surnageant a été ensuite récupéré et centrifugé afin d'éliminer les débris cellulaires. Un test ELISA a été effectué pour quantifier le niveau du sVEGFR-2 dans les surnageants.

1.3 Effet du bevacizumab sur la « vasculogenomimicry »

Le test de mimétisme vasculogénique ou «vasculogenomimicry » est un mécanisme non conventionnel qui évalue la capacité des cellules tumorales à former des tubes de type « vessel-like » de façon indépendante des cellules endothéliales. Dans l'objectif de savoir si les deux lignées cellulaires MGH7 et H2170 possèdent ce pouvoir vasculogénique, nous avons cultivé en matrigel ces cellules et nous les avons ensuite traitées ou non avec des doses croissantes de bevacizumab (1 ou 10 µg/ml). Le matrigel est une membrane basale soluble extraite de la tumeur

EHS (Engelbreth-Holm-Swarm) qui en se solidifiant forme une structure équivalente à une membrane basale de part sa composition, sa structure et ses propriétés physiques. Nous montrons dans la Figure 33. que les cellules MGH7 et H2170 ne forment pas de tubes sur matrigel. Par contre, ceci n'est pas le cas de toutes les lignées cellulaires de SCCs telles que les cellules H157 et Calu-1 qui forment bien des tubes sur matrigel (Figure 33.A). Nous montrons aussi que même en réponse aux thérapies AAG ou bien suite à un traitement avec le recombinant sVEGFR-1 ces lignées sont toujours incapables de former des tubes sur matrigel (Figure 33.B et 33C).

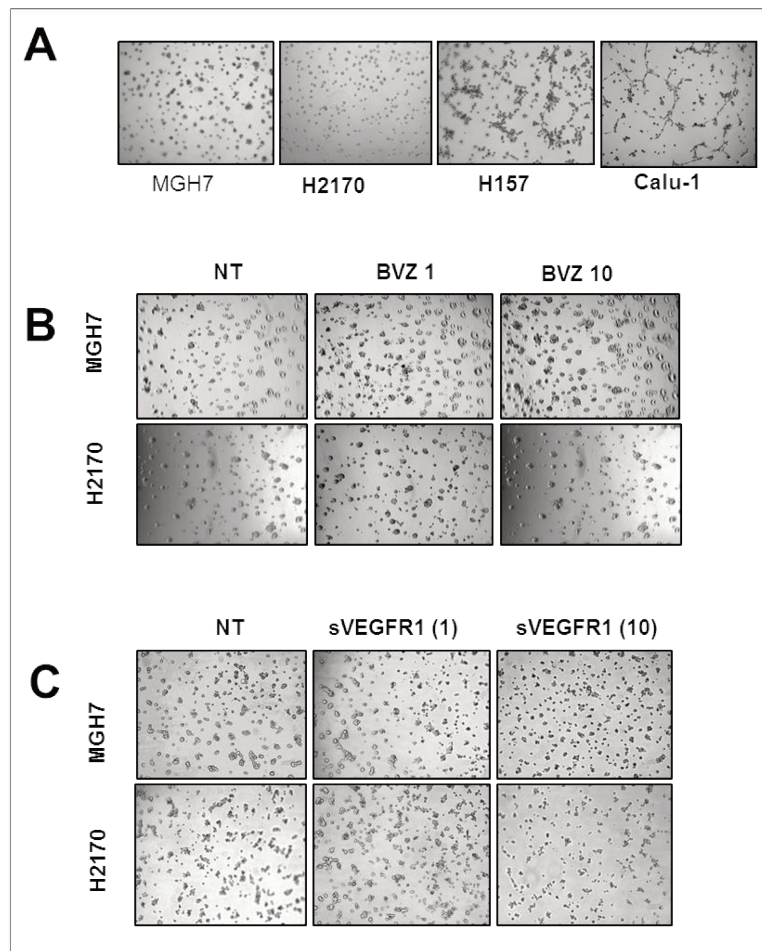


Figure 33. Test de mimétisme vasculogénique. Les cellules non traitées MGH7, H157, H2170 et CALU-1 ont étéensemencées afin de tester leur capacité de formation de tubes (A). Les cellules MGH7 et H2170 ont été traitées avec le bevacizumab à des doses croissantes de 1 ou 10 $\mu\text{g/ml}$ (B) ou bien avec le rhsVEGFR-1 à des doses croissantes de 1 ou 10 ng/ml (C) pendant 48 heures. Le surnageant a été éliminé. Les cellules ont été trypsinées et 50000 cellules ont été resuspendues dans 1 ml de milieu et incubées à 37°C dans une plaque de 24 puits. Les cellules ont été ensuite observées chaque 4 heures sur un microscope inversé. Les photos de la Figure 32 ont été prises après environ 24 heures.

2. Mécanismes moléculaires de régulation du sVEGFR-1-i13

Sur la base de nos résultats, nous avons proposé un mécanisme moléculaire potentiel de régulation du sVEGFR-1-i13 dépendant du VEGF₁₆₅. Cependant, d'autres mécanismes ont été aussi décrits comme par exemple l'inhibition de la voie de signalisation NOTCH1 ou bien de JMJD6 qui augmente l'expression du sVEGFR-1-i13. En parallèle, nous sommes aussi intéressés aux facteurs d'épissage de la famille des protéines SRSF (Ser/Arg-Rich) dont nous avons montré qu'elles jouent un rôle dans la régulation de l'épissage du VEGF-A dans des modèles cellulaires d'adénocarcinomes pulmonaires (Boudria et al., en préparation).

2.1 Les protéines SR : des acteurs potentiels dans la régulation du sVEGFR-1-i13 ?

Au laboratoire, nous avons décrit que les protéines SR sont des facteurs qui régulent l'épissage du VEGF-A dans les adénocarcinomes pulmonaires (Merdzhanova et al. 2010). Plus précisément, nous avons montré que les protéines SRSF2 et SRSF6 favorisent l'expression du VEGF_{165b} alors que la protéine SRSF1 favorise l'expression des isoformes VEGF_{xxx} (Merdzhanova et al., 2010; Boudria et al., soumis). Sur la base de ces résultats, nous nous sommes donc intéressés au rôle potentiel des protéines SR dans la régulation de l'expression du sVEGFR-1-i13 en réponse aux thérapies AAG. Nous montrons que les thérapies anti-angiogéniques (bevacizumab, SU5416 et KI8751) ne modulent pas l'expression des protéines SR dans nos modèles de carcinomes pulmonaires squameux (Figure 34). Cependant, dans la lignée MGH7, nous montrons que la neutralisation de SRSF1 ou SRSF6 reverse l'augmentation d'expression intracellulaire de sVEGFR-1-i13 observée en réponse aux traitements (bevacizumab et SU5416). De façon intéressante, lorsque l'on considère le taux de sVEGFR-1 extra-cellulaire, nous montrons que la neutralisation de SRSF1 ou SRSF6 par elle-même augmente ce taux, mais prévient l'augmentation en réponse au bevacizumab (Figure 34A). Dans la lignée H2170, la neutralisation de SRSF1 ou de SRSF2 prévient l'accumulation intra-cellulaire de sVEGFR-1-i13 en réponse au bevacizumab et au KI8751 mais aussi l'accumulation extra-cellulaire de sVEGFR-1 en réponse au bevacizumab (figure 34A). Ces résultats indiquent que les protéines SR régulent l'expression

protéique du sVEGFR-1 tant au niveau intra-cellulaire que extra-cellulaire dans les lignées MGH7 et H2170, mais que ce rôle pourrait être différent selon le type cellulaire et le type de traitement considéré.

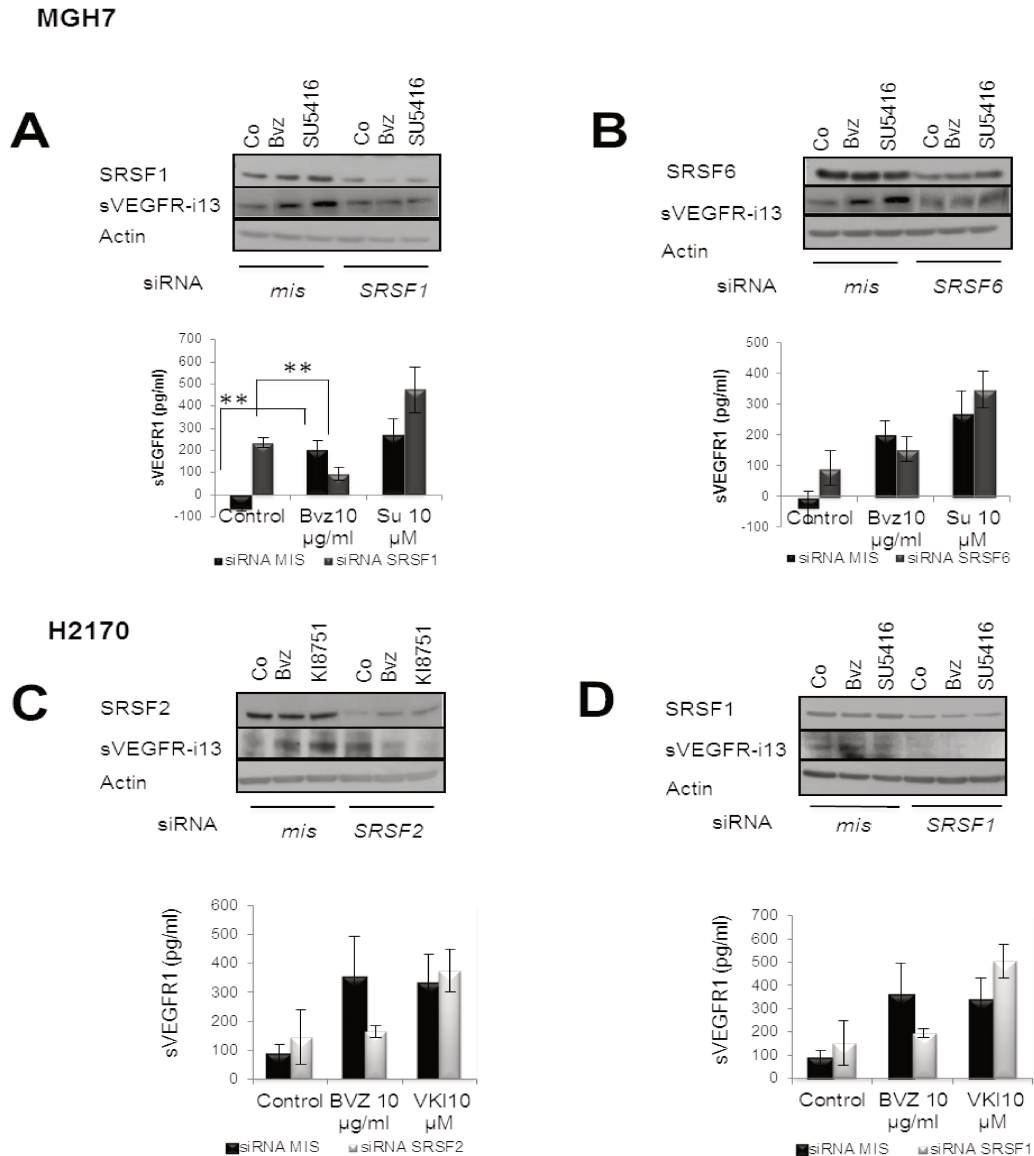


Figure 34. Les protéines SR régulent l'expression intra- et extra-cellulaire du sVEGFR-1-i13 dans les cellules MGH7 et H2170. Les cellules MGH7 et H2170 ont été transfectées par un ARNi contrôle (MIS) ou un ARNi ciblant les protéines SR suivantes : SRSF1 (A,D), SRSF6 (B) et SRSF2 (C) pendant 72 heures. De façon concomitante avec la transfection, les cellules ont été traitées par le bevacizumab à une dose de 10 µg/ml pendant 72 heures ou bien par le semaxanib (10 µM) ou le KI8751 (10 µM) pendant 24 heures. L'expression protéique du sVEGFR-1-i13 et des protéines SR a été analysée par western blot. L'actine est utilisée comme contrôle de dépôt. L'expression protéique du sVEGFR-1-i13 sécrété a été analysée par un test ELISA.

2.2 La régulation du sVEGFR-1-i13 par le VEGF₁₆₅ est médiée par le facteur de transcription SOX2 dans les SCCs

Il a été récemment découvert que le VEGF-A contrôle l'expression de SOX2 (Zhao et al. 2015), un facteur de transcription amplifié chez environ 30% des patients SCC (Tao et al. 2016). Nous sommes donc intéressés de savoir si SOX2 était nécessaire pour la régulation du sVEGFR-1-i13 par le VEGF₁₆₅ dans les cellules SCCs. Nous avons caractérisé le niveau basal de SOX2 dans quatre lignées cellulaires de SCC et nous montrons dans la Figure 35 que les lignées MGH7 et H2170 expriment des niveaux élevés de SOX2 par rapport aux deux autres lignées de SCCs (Figure 35A). Nous montrons ensuite que la surexpression du VEGF₁₆₅ par un plasmide codant spécifiquement pour cette protéine augmente l'expression de SOX2 dans les lignées MGH7 et H2170. La neutralisation de SOX2 par ARN interférence inhibe l'expression du sVEGFR-1-i13 dans les conditions transfectées ou non avec le plasmide VEGF₁₆₅ dans les lignées MGH7 et H2170 (Figure 35B). Cet effet est également confirmé avec le traitement par le rhVEGF₁₆₅ ainsi qu'en réponse aux différentes thérapies dans les deux lignées (Figures 35C et 35D). Ces données sont la première évidence qu'un réseau de signalisation impliquant les protéines SOX2 et VEGF₁₆₅ contrôle l'expression protéique du sVEGFR-1-i13 dans les cellules SCCs en réponse aux thérapies AAG.

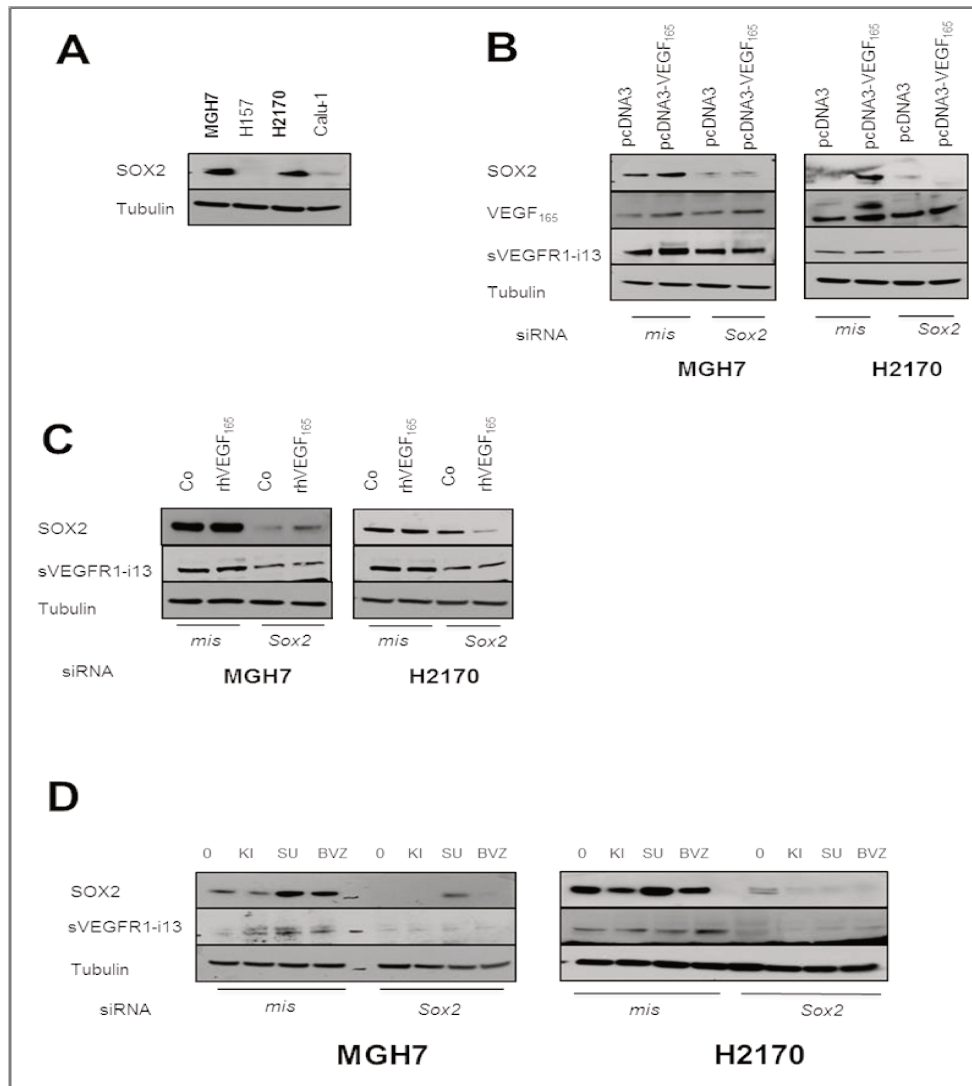


Figure 35. SOX2 régule l'expression intracellulaire du sVEGFR-1-i13 dans les cellules MGH7 et H2170. Les cellules MGH7, H157, H2170 et CALU-1 ont étéensemencées pour tester leurs niveaux protéiques basaux de SOX2 (A). Les cellules MGH7 et H2170 ont été transfectées par un ARNi contrôle (MIS) ou par des ARNi ciblant la protéine SOX2 pendant 72H. Après 24 heures de transfection, les cellules MGH7 et H2170 ont été transfectées avec un plasmide contrôle (Co) ou bien avec un plasmide codant pour le VEGF₁₆₅ pendant 48 heures additionnelles (B). Après transfection, les cellules MGH7 et H2170 ont été traitées avec le rhVEGF₁₆₅ (1ng/ml) pendant 72 heures additionnelles (C). Après la transfection, les cellules MGH7 ont été traitées par le bevacizumab à une dose de 10µg/ml pendant 72 heures ou bien par le SU5416 (10µM) ou le KI8751 (10µM) pendant 24 heures (D). L'expression protéique du sVEGFR-1-i13, de SOX2 et du VEGF₁₆₅ a été analysée par western blot. La tubuline est utilisée comme contrôle de dépôt.

2.3 Régulation du sVEGFR-1 par clivage protéolytique

Le sVEGFR-1 extracellulaire peut être issu de l'épissage alternatif du VEGFR-1 ou bien de son clivage protéolytique à la membrane. Nous avons montré qu'en réponse aux thérapies anti-angiogéniques, le niveau de sVEGFR-1 dans les surnageants de culture augmente en parallèle de l'augmentation du niveau intra-cellulaire de sVEGFR-1-i13. Nous nous sommes donc demandés si le sVEGFR-1 extra-cellulaire pouvait aussi provenir du clivage protéolytique du VEGFR-1 dans nos modèles cellulaires traités ou non par les thérapies anti-angiogéniques. Dans ce but, nous avons traité les cellules MGH7 et H2170 avec le GM6001, un inhibiteur de métalloprotéases à large spectre. Dans les cellules non traitées, la sécrétion du sVEGFR-1 n'est pas affectée, elle est même augmentée dans les cellules H2170 (figure 36). Dans les cellules MGH7, le traitement par GM6001 reverse partiellement l'effet des thérapies anti-angiogéniques et notamment en réponse au bevacizumab (figure 36). Ces données indiquent que le sVEGFR-1 extra-cellulaire généré en réponse aux thérapies anti-angiogéniques pourrait aussi provenir du clivage protéolytique du VEGFR-1 membranaire dans les cellules MGH7.

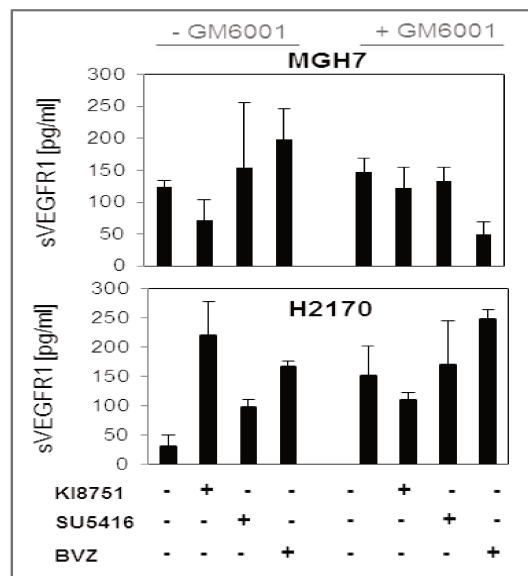


Figure 36. Biogenèse du sVEGFR-1 par clivage protéolytique dans la lignée MGH7. Les cellules MGH7 et H2170 ont été traitées par le GM6001 à une dose de 20 μ M pendant 72 heures. 30 minutes après le traitement par GM6001, les cellules ont été traitées par le bevacizumab à une dose de 10 μ g/ml pendant 72 heures ou bien par le semaxanib (10 μ M) ou le KI8751 (10 μ M) pendant 24 heures. L'expression protéique du sVEGFR-1 sécrété a été analysée par un test ELISA.

2.4 NOTCH1 et JMJD6 ne régulent pas l'expression du sVEGFR-1-i13 dans les cellules de carcinomes pulmonaires squameux

Dans les cellules endothéliales, il a été montré que l'inhibition de la voie JAG/NOTCH1 augmente l'expression du sVEGFR-1-i13 (Kangsamaksin et al. 2015). De plus, dans des modèles murins transgéniques de cancer pulmonaire, il a été montré que SOX2 se lie sur les régions promotrices de NOTCH1 et NOTCH2 et diminue l'expression des transcrits NOTCH1 et NOTCH2 (Xu et al., 2014). Sur la base de ces données et de nos résultats concernant le rôle de SOX2, nous nous sommes donc demandés si l'expression du sVEGFR-1-i13 pouvait être régulée par la voie de signalisation dépendante de NOTCH dans nos modèles cellulaires. Nous avons d'abord montré que les thérapies anti-angiogéniques (bevacizumab, KI8751 ou SU5416) ne modifient pas significativement les niveaux d'expression des transcrits NOTCH1 et NOTCH2 (Figure 37 A). Ensuite, nous avons inhibé la signalisation de NOTCH en traitant les cellules avec un inhibiteur pharmacologique de NOTCH, le FLI-06. Cet inhibiteur prévient la glycosylation de NOTCH qui est nécessaire pour son expression à la membrane plasmique et donc pour l'activation de sa voie de signalisation. Dans les deux lignées cellulaires, nous montrons par western blot et par ELISA que le traitement des cellules par le FLI-06 n'augmente pas significativement les niveaux d'expression du sVEGFR-1-13 intra-cellulaire et du sVEGFR-1 sécrété (Figure 37B). De plus, nous montrons par RT-qPCR que le niveau du transcrit sVEGFR-1i-13 augmente significativement dans les cellules H2170 mais pas dans MGH7 traitées par le FLI-06 (Figure 37C), mais cela est accompagné par l'augmentation du transcrit VEGFR-1, indiquant un effet global sur le niveau de VEGFR-1. Ces résultats suggèrent que la voie de signalisation NOTCH ne contribue pas au contrôle de l'expression du sVEGFR-1-i13 dans nos modèles cellulaires.

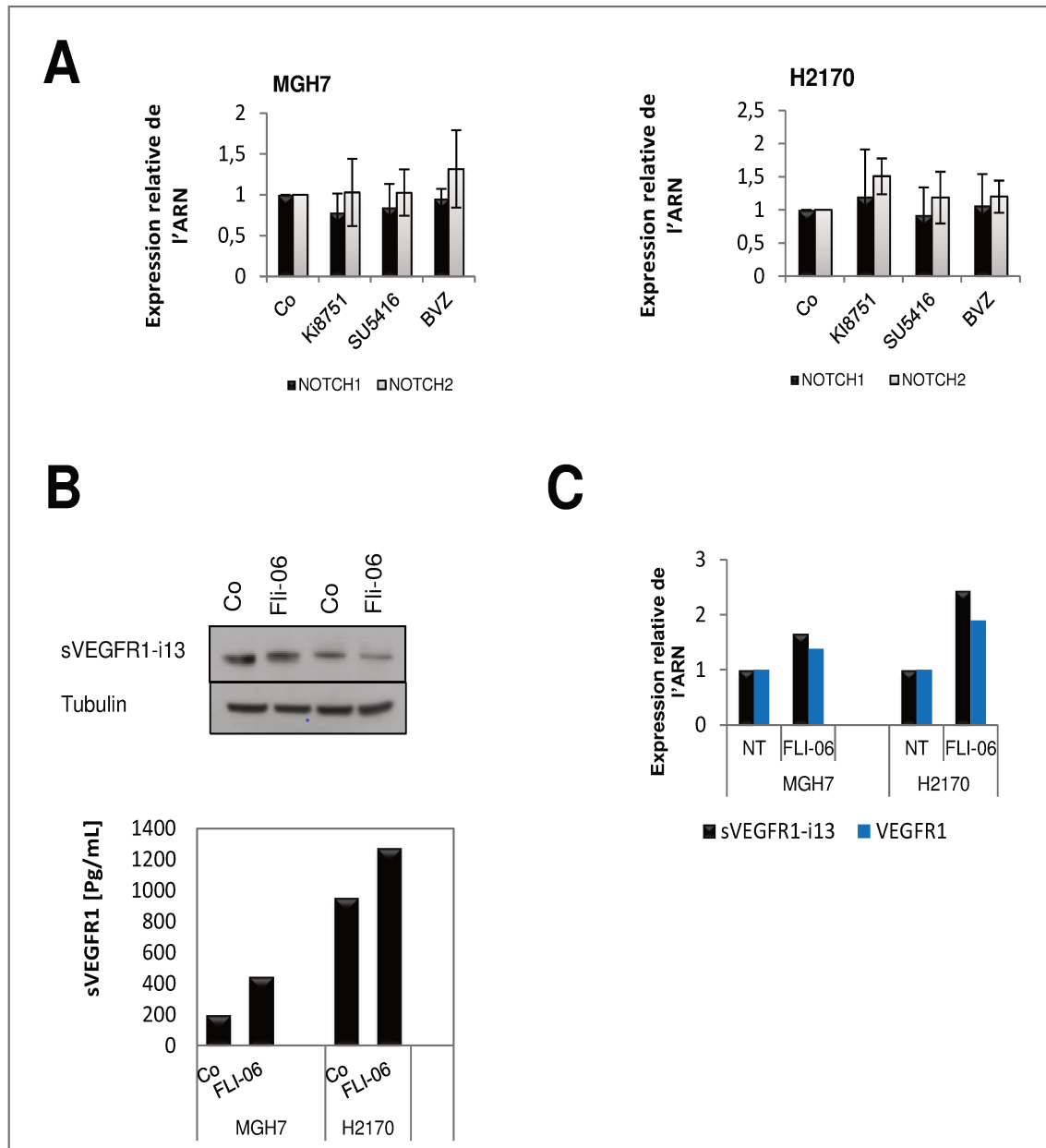


Figure 37. NOTCH ne régule pas l'expression du sVEGFR-1-i13 dans nos modèles d'étude. Les cellules MGH7 et H2170 ont été traitées par le bevacizumab à une dose de 10 μ M pendant 72 heures ou bien par le SU5416 ou le KI8751 pendant 24 heures. L'expression transcriptionnelle de NOTCH1 et de NOTCH2 a été analysée par RT-qPCR, après normalisation par la GAPDH (A). Les cellules MGH7 et H2170 ont été traitées avec un inhibiteur de la voie NOTCH (FLI-06) à une dose de 10 μ M pendant 24 heures. L'expression protéique du sVEGFR-1 sécrété a été analysée par ELISA et l'expression protéique intracellulaire du sVEGFR-1-i13 par western blot (B). L'expression transcriptionnelle du sVEGFR-1-i13 et du VEGFR-1 a été analysée par RT-qPCR, après normalisation par la GAPDH (C).

D'autre part, nous avons étudié le rôle de JMJD6 dans la régulation de l'expression du sVEGFR-1i-13. Nous montrons que les thérapies anti-angiogéniques ne modifient pas l'expression de JMJD6 dans nos cellules (Figure 38). De plus, la transfection des cellules avec le plasmide VEGF₁₆₅ ne régule pas l'expression de JMJD6. Dans ces conditions l'expression du sVEGFR-1-i13 varie. Dans la mesure où la diminution d'expression de JMJD6 a été corrélée à l'augmentation d'expression de sVEGFR-1-i13, ces résultats suggèrent que JMJD6 n'est pas impliquée dans notre système.

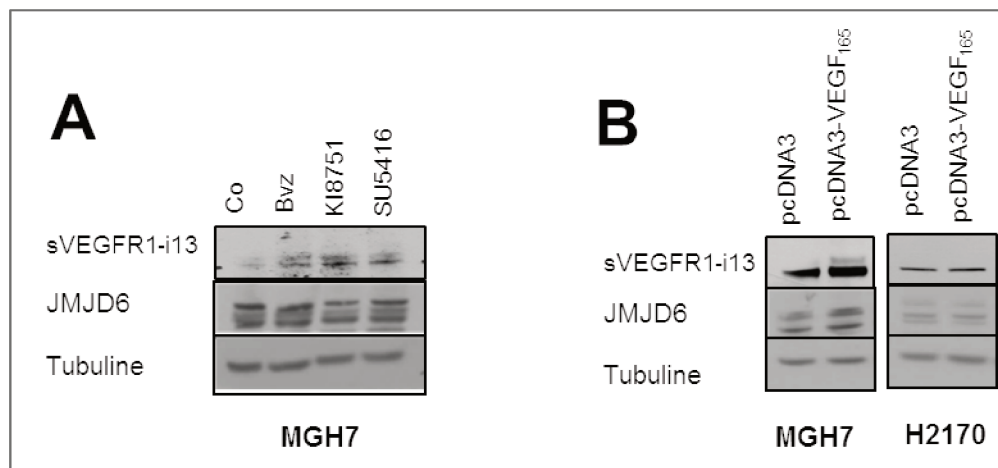


Figure 38. JMJD6 ne régule pas l'expression du sVEGFR-1-i13 dans nos modèles d'étude. (A) Les cellules MGH7 et H2170 ont été traitées par le bevacizumab à une dose de 10 μ g/ml pendant 72 heures ou bien par le semaxanib (10 μ M) ou le KI8751 (10 μ M) pendant 24 heures. (B) Les cellules MGH7 et H2170 ont été transfectées avec un plasmide contrôle (Co) ou bien avec un plasmide codant pour le VEGF₁₆₅ pendant 48 heures. L'expression protéique du sVEGFR-1-i13 et de JMJD6 a été analysée par western blot. La tubuline est utilisée comme contrôle de dépôt.

3. Effets du sVEGFR-1 sur le trafic intra-cellulaire de la neuropiline-1

Nos résultats montrent que le sVEGFR-1 régule de façon différentielle l'activité des récepteurs VEGFR-1/VEGFR-2 dans les lignées de SCC selon le niveau d'expression de l'intégrine $\beta 1$. Dans le but d'approfondir le mécanisme moléculaire par lequel le sVEGFR-1 agit, nous avons recherché son effet potentiel sur un des autres co-récepteurs des VEGFRs, la neuropiline-1 en testant l'effet du sVEGFR-1 sur l'endocytose de la neuropiline-1. Dans ce but, nous avons traité les cellules MGH7 ou H2170 avec des protéines recombinantes rhVEGF₁₆₅ et rhVEGFR-1 à des doses de 1ng/ml pendant une heure. Nous montrons par cytométrie en flux que le sVEGFR-1 et le VEGF₁₆₅ diminuent l'expression membranaire de la neuropiline-1 dans la lignée MGH7 mais pas dans la lignée H2170. Nous confirmons cet effet à 30 min et à 24 heures (résultats non présentés). L'expression protéique totale de la NRP-1 ne varie pas significativement dans les cellules MGH7 traitées alors qu'elle diminue dans les cellules H2170 (figure 39 A). Ceci suggère bien que la NRP-1 membranaire est internalisée dans la lignée MGH7. Dans la mesure où l'internalisation par endocytose de la neuropiline-1 contribue à l'activation du VEGFR-2 (Lanahan et al. 2013), ces résultats sont en accord avec nos résultats de western blot démontrant une régulation différentielle de l'activité des récepteurs VEGFR dans les cellules MGH7 et H2170.

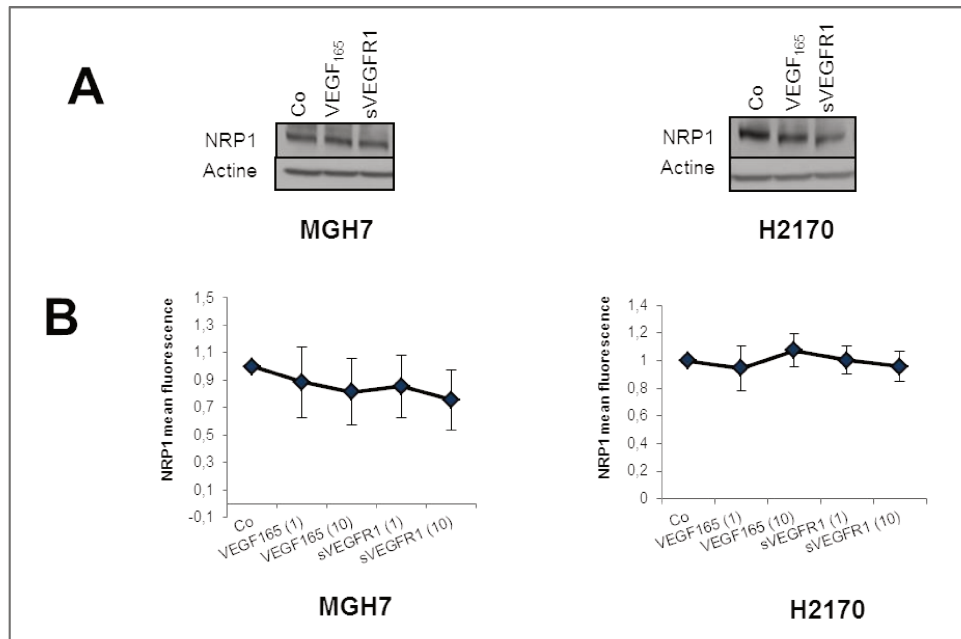


Figure 39. Le sVEGFR-1 induit l'internalisation de la neuropiline-1 dans les cellules MGH7. Les cellules MGH7 et H2170 ont été traitées avec les protéines recombinantes (rhVEGF₁₆₅ et rhVEGFR-1) aux doses indiquées pendant 72 heures (A) ou bien pendant 1 heure (B). L'expression protéique de la neuropiline-1 a été analysée par western blot. L'actine est utilisée comme contrôle de dépôt (A). Le surnageant des cellules a été éliminé. Les cellules ont été ensuite récupérées sans être perméabilisées et un marquage de la neuropiline-1 a été effectué et analysé par cytométrie en flux. (B).

4. Statut de l'ARNm sVEGFR-1-i13 chez les patients CBnPCs

Nous montrons dans l'article l'existence de corrélation entre le niveau intra-tumoral du sVEGFR-1-i13 mesuré en immunohistochimie chez les patients CBnPCs et les stades clinico-pathologiques pTNM. Notamment, les hauts niveaux intra-tumoraux de sVEGFR-1-i13 corrélaient avec des stades pTNM avancés III/IV chez les patients atteints de carcinomes pulmonaires squameux mais pas chez les patients porteurs d'adénocarcinomes. Nous avons trouvé intéressant de quantifier aussi les niveaux de transcrits du sVEGFR-1-i13 et de VEGFR-1 dans une petite cohorte de patients porteurs de CBnPCs. Nous avons réalisé une extraction d'ARN total à partir de coupes de tissus extraits des tumeurs et du poumon normal associé localisé à distance de la tumeur. Les niveaux de transcrits VEGFR-1 et sVEGFR-1-i13 ont été ensuite quantifiés par RT-qPCR. Les résultats montrent que le ratio sVEGFR-1-i13:VEGFR-1 diminue dans la tumeur en comparaison avec le poumon normal chez tous les patients porteurs d'adénocarcinomes pulmonaires (Figure 40). Dans les carcinomes pulmonaires squameux, le ratio sVEGFR-1-i13:VEGFR-1 entre poumon tumoral et normal est plus hétérogène. Cependant, et de façon intéressante, ce ratio augmente dans 3/5 des patients porteurs de stade avancé III/IV. Même si l'extension de ces études à une plus grande cohorte de patients est nécessaire, ces résultats vont dans le même sens que les résultats obtenus en IHC.

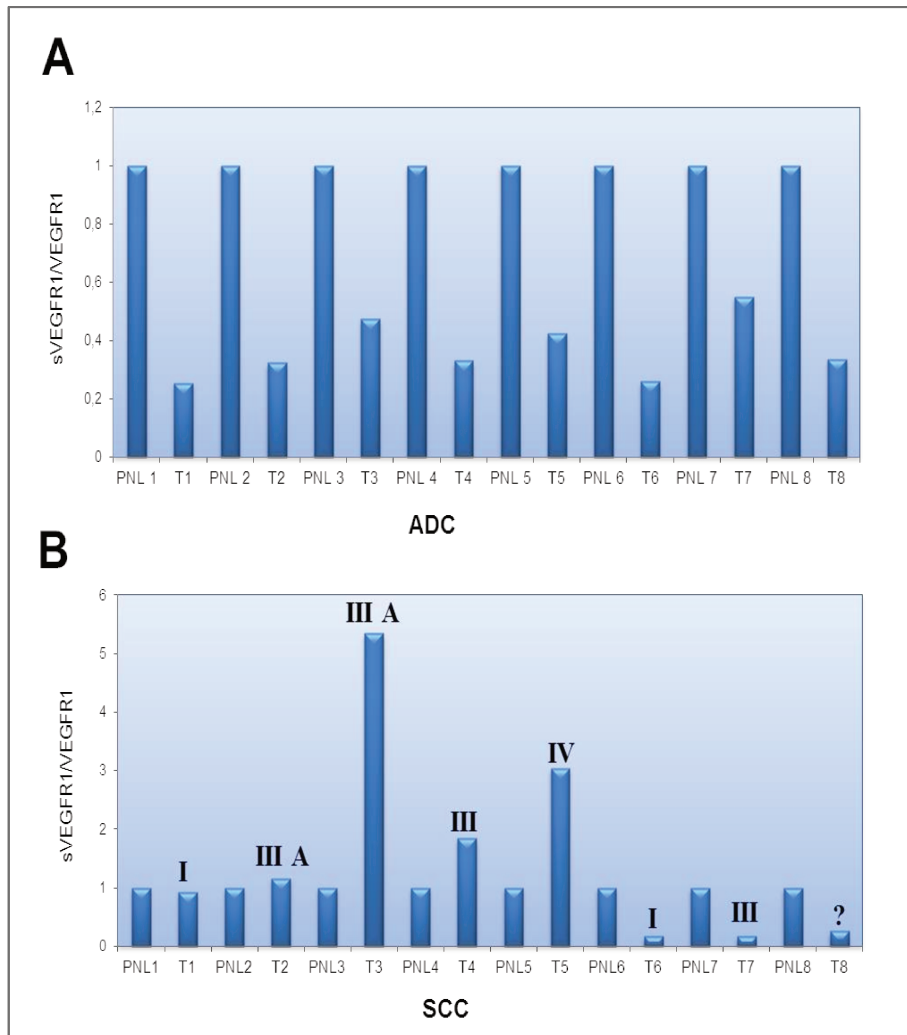


Figure 40. Le ratio sVEGFR-1-i13:VEGFR-1 est élevé chez les patients porteurs de carcinomes pulmonaires squameux de stades avancés. Les extractions d'ARN ont été faites à partir des coupes de tissus obtenues à partir des tumeurs (T) ou du poumon normal (PNL) des patients porteurs d'adénocarcinomes pulmonaires (A) ou de carcinomes pulmonaires squameux (B). L'expression transcriptionnelle du sVEGFR-1-i13 et du VEGFR-1 a été analysée par RT-qPCR, après normalisation par la GAPDH. Le ratio sVEGFR-1-i13:VEGFR-1 a été ensuite calculé pour les différents couples de patients. Le stade des patients porteurs de carcinomes pulmonaires squameux est indiqué au dessus des histogrammes T.

Discussion et Perspectives

Discussion et Perspectives

1. sVEGFR-1: différentes localisations pour différentes fonctions ?

1.1 Le sVEGFR-1-i13 nucléaire: un variant pas si soluble que cela

Durant mes travaux de thèse, nous avons observé pour la première fois une localisation nucléaire du sVEGFR-1-i13. La présence du sVEGFR-1-i13 dans les plasma/sérum ou en intracytoplasmique a été déjà décrite dans les tumeurs. Dans des coupes de tissus de patients CBnPCs, et surtout dans le sous-type histologique squameux, nous avons aussi observé, par marquage immunohistochimique, le sVEGFR-1-i13 dans les noyaux des cellules tumorales. Cette localisation nucléaire est aussi détectée dans les cellules normales bronchiques et les pneumonocytes de type II mais à des niveaux plus faibles que les niveaux détectés dans les carcinomes. Par contre, elle n'est jamais détectée dans les cellules endothéliales ou les macrophages. De façon intéressante, nous observons un marquage nucléaire du sVEGFR-1-i13 majoritairement dans les carcinomes squameux de stade avancé suggérant un rôle de cette accumulation dans la progression tumorale. Une localisation intra-cellulaire et nucléaire des récepteurs VEGFR-1 et VEGFR-2 a déjà été décrite. En effet, Lee et collaborateurs ont montré que dans les cancers du sein, le VEGFR-1 est détecté au niveau de la membrane périmoléculaire. De plus, la neutralisation du VEGF-A ou bien du VEGFR-1 dans ces cellules entraîne une diminution de la survie des cellules tumorales (T.-H. Lee et al. 2007). Dans les cancers du colon, une autre étude a montré que les complexes VEGF-A-VEGFR-1 intracellulaires jouent un rôle important dans la régulation de la survie cellulaire (Bhattacharya et al. 2016). Ces complexes agissent par un mécanisme intracrine qui est indépendant de l'activité kinase du récepteur VEGFR-1. Ces données suggèrent donc que le VEGF-A possède aussi des fonctions intracrines via le VEGFR-1 et pas via le VEGFR-2 ou la NRP-1. De plus, dans les cellules endothéliales, il a été montré que le VEGFR-2 transloque dans le noyau et que la tyrosine du résidu 951 joue un rôle important dans ce processus dynamique (Domingues et al. 2011). Le VEGFR-2 nucléaire se

lie sur son promoteur et active sa propre transcription (Domingues et al. 2011). Ces données sont en accord avec des études qui ont montré que la fixation du VEGF-A sur le VEGFR-2 augmente l'expression des transcrits *vegfr-2* et son niveau protéique également (Shen et al. 1998). De plus, cette fixation entraîne la translocation du VEGFR-2 vers le noyau par un mécanisme qui nécessite sa phosphorylation (Constantino Rosa Santos et al. 2007). Stewart et collaborateurs ont aussi détecté une expression nucléaire du VEGFR-2 phosphorylé dans les cellules tumorales de cancers du sein, du colon et dans les lymphomes non-hodgkiniens (Stewart et al. 2003). De plus, le VEGFR-2 phosphorylé sur son résidu tyrosine 951 possède une localisation nucléaire dans les cellules de mélanomes primaires et métastatiques. Cette localisation nucléaire favorise la progression tumorale inhibant ainsi les effets anti-tumoraux du bevacizumab (Adamcic et al. 2012). Toutes ces données appuient l'hypothèse que le trafic intracellulaire du VEGFR-2 contribue à sa signalisation et au processus angiogénique. Dans nos cellules dérivées de SCC, nous montrons que le sVEGFR-1-i13 interagit avec le VEGFR-2. Dans la mesure où le VEGFR-2 intracellulaire est un acteur de progression tumorale, une des possibilités pourrait être que le sVEGFR-1-i13, en interagissant avec le VEGFR-2, transloque avec ce récepteur dans le noyau ce qui justifierait sa localisation nucléaire et son rôle dans la progression tumorale. Des expériences complémentaires restent à faire pour approfondir ce rôle et notamment des expériences de fractionnement sub-cellulaire dans nos modèles cellulaires traités ou non. Il serait aussi intéressant de rechercher si d'autres variants d'épissage du VEGFR-1 sont détectables dans le noyau.

Plus largement, ce que disent nos résultats, c'est qu'il est important de considérer à la fois les niveaux d'expression du sVEGFR-1 intra-tumoraux en plus de ses niveaux plasmatiques et/ou sériques. En effet, des différences de localisation pourraient entraîner des rôles distincts selon le type de cancers. De plus, l'absence de différence d'expression à l'échelle du sécrétome ne pourrait pas forcément signifier l'absence de différence en intra-cellulaire. Ceci n'est pas restreint au sVEGFR-1 mais est tout aussi valable par exemple pour le VEGF-A dont les variants d'épissage ne jouent pas forcément le même rôle. D'ailleurs, une étude a montré qu'il n'existe pas de corrélation entre les niveaux plasmatiques et intra-tumoraux de VEGF-A ce qui révèle

clairement la nécessité de mesurer aussi les niveaux intra-tumoraux (Rebecca Suk Heist et al. 2008).

1.2 sVEGFR-1-i13 : un composant de la matrice extra-cellulairequisignalise via son interaction avec les intégrines

En 2003, Orrechia et collaborateurs ont montré que le sVEGFR-1-i13 est déposé dans la matrice extra-cellulaire et est un ligand de l'intégrine $\beta 1$ dans les cellules endothéliales. Il contribue par ce biais à l'activation d'une voie de signalisation impliquant Rac et VEGFR-2 (Orecchia et al. 2003a; Orecchia et al. 2013). De façon intéressante, le sVEGFR-1-i13 permet aussi l'adhésion de cellules de mélanomes par un mécanisme mettant en jeu l'intégrine $\beta 1$, le VEGF-A et le récepteur VEGFR-2 (Ruffini et al. 2011). Mes travaux de thèse montrent que la présence de l'intégrine $\beta 1$ pourrait contribuer à un différentiel de réponse aux thérapies anti-angiogéniques dans différentes lignées cellulaires de SCC. En effet, nous montrons que le sVEGFR-1-i13 contrôle une boucle autocrine en formant un complexe ternaire avec le VEGFR-2 et l'intégrine $\beta 1$. Cela induit l'activation des voies de signalisation dépendantes des VEGFRs assurant la prolifération et la survie des cellules comme le montre la Figure 41. Ces données sont très intéressantes et originales parce qu'elles font la preuve que le sVEGFR-1-i13 est aussi capable d'activer la signalisation dépendante des VEGFRs dans les cellules tumorales. Elles lui confèrent un nouveau rôle dans les cancers du poumon de type squameux puisque nous montrons que son expression intra-tumorale élevée chez ces patients est associée à des stades avancés plus agressifs. En accord avec l'existence de fonctions autocrines du sVEGFR-1-i13 chez ces patients, nous montrons aussi une association significative entre les hauts niveaux intra-tumoraux de sVEGFR-1-i13 et l'accumulation de P-VEGFR-1 (Tyr1213) dans ces tumeurs. Le rôle d'une éventuelle signalisation intracrine du sVEGFR-1-i13, et notamment les conséquences de sa présence dans le noyau, reste à déterminer.

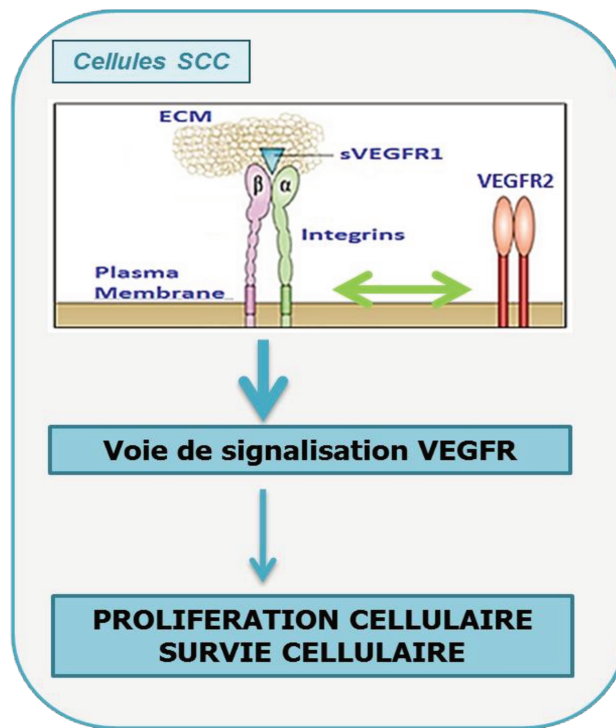


Figure 41. Représentation schématique du mécanisme d'action moléculaire du sVEGFR-1-i13 dans les carcinomes SCC. Dans un modèle de SCC exprimant l'intégrine $\beta 1$, le sVEGFR-1-i13 joue un rôle pro-tumoral et cela grâce à son interaction avec l'intégrine $\beta 1$. Il active ainsi les voies de signalisation des VEGFRs nécessaires pour la prolifération et survie cellulaires des cellules tumorales SCC.

1.3 sVEGFR-1 : un composant du micro-environnement tumoral via son interaction avec les syndécans

Il apparaît donc que le sVEGFR-1 est capable d'activer ou inhiber la signalisation VEGFR-2 en fonction de son interaction avec l'intégrine $\beta 1$ conduisant à l'adhésion et la migration des cellules endothéliales. Par ailleurs, Jin et collaborateurs ont montré que le sVEGFR-1 se lie aux glycosphingolipides GM3 dans les radeaux lipidiques et contrôle de manière autocrine l'adhésion cellulaire et la réorganisation du cytosquelette (J. Jin et al. 2012). De plus, le sVEGFR-1 induit la coalescence et l'internalisation des syndécans dans les podocytes (péricytes glomérulaires). Les syndécans sont des protéoglycanes à héparanes sulfates dont le domaine intracellulaire pourrait interagir avec des protéines adaptatrices, telles que PKC, qui vont recruter à leur tour des kinases telles que SRC et FAK (Focal Adhesion Kinase) (Figure 42.) (Couchman

2010; Morgan, Humphries, et Bass 2007). Ces données suggèrent une autre voie par laquelle les VEGFR-1 par son « co-clustering » avec les syndécans pourrait activer les voies SRC et FAK entraînant ainsi l'adhésion cellulaire.

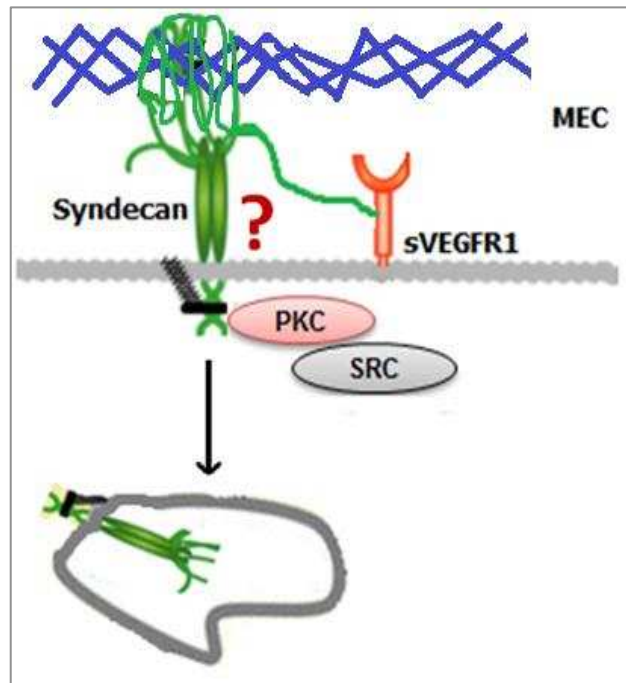


Figure 42. Représentation schématique du rôle de l'interaction sVEGFR-1/syndecan dans les podocytes.

2. Régulation de l'expression du sVEGFR-1-i13

Une des problématiques majeure dans l'étude du sVEGFR-1 en général est que l'on connaît peu les mécanismes moléculaires qui contrôlent son expression et notamment dans les cancers. De plus, on peut imaginer que plusieurs mécanismes peuvent contribuer à son élaboration dans les tumeurs, combinant à la fois un clivage protéolytique et une régulation par épissage alternatif. Dans les cellules MGH7 et H2170, nous avons montré que les métalloprotéases ne sont pas impliquées dans la sécrétion du sVEGFR-1 détectée dans les surnageants en réponse au SU5416 et au KI8751. Cependant, cela pourrait dépendre du type cellulaire et du type de thérapies car dans les cellules MGH7 traitées par le bevacizumab, nous avons observé un effet préventif partiel de l'inhibiteur de métalloprotéases sur la sécrétion de sVEGFR-1.

A l'inverse, nous avons montré un rôle des facteurs d'épissage de la famille des protéines SR sur la régulation de l'expression du sVEGFR-1-i13. Ainsi, mes travaux montrent que la neutralisation de SRSF1, SRSF2 et dans une moindre mesure SRSF6 dans les deux lignées cellulaires MGH7 et H2170 inhibe l'expression intracellulaire du sVEGFR-1-i13 en réponse aux thérapies anti-angiogéniques. De façon intéressante, nous avons aussi observé une corrélation significative entre l'expression de SRSF2 et sVEGFR-1-i13 ($p=0.008$) dans notre série de patients issus de CBnPCs, pour lesquels nous connaissions déjà le statut des protéines SRSF1, SRSF2 et SRSF6. Par contre, dans ces tumeurs, cette corrélation n'est pas retrouvée avec les protéines SRSF1 et SRSF6. Ces données suggèrent que les protéines SR régulent l'expression protéique du sVEGFR-1-i13 dans les cancers du poumon traités ou non par les thérapies anti-angiogéniques. En réponse au bevacizumab, nous détectons une diminution de la quantité de sVEGFR-1 sécrétée dans les cellules MGH7 et H2170 dans lesquelles SRSF1, SRSF2 et SRSF6 ont été neutralisées. Par contre, ce n'est pas observé en réponse au SU5416 et KI8751, ce qui suggère des mécanismes complexes de régulation du sVEGFR-1 total en réponse à l'inactivation des protéines SR et du type de traitement. De plus, en réponse à la neutralisation de SRSF1, nous n'avons pas retrouvé une diminution significative des transcrits sVEGFR-1-i13 en RT-qPCR. SRSF1 a été initialement caractérisée en tant que facteur d'épissage, mais il s'est avéré qu'elle est impliquée dans d'autres régulations post-transcriptionnelles telles que le transport de l'ARN et la traduction protéique (Jia 2010; Karni et al. 2007). De façon intéressante, SRSF1 est une oncoprotéine qui est surexprimée dans le cancer du poumon et dans le cancer colorectal et qui stimule la prolifération tumorale in vitro et in vivo (Karni et al. 2007). Ainsi, dans les cancers du poumon, il a été montré que SRSF1 se lie à l'ARNm de la survivine et induit sa traduction protéique par l'intermédiaire de sa cible mTORC1 (Mammalian Rapamycin Complex 1) (Ezponda et al. 2010). Ce mécanisme de régulation s'effectue par la phosphorylation et l'inactivation de 4E-BP1 comme le montre la Figure 43.

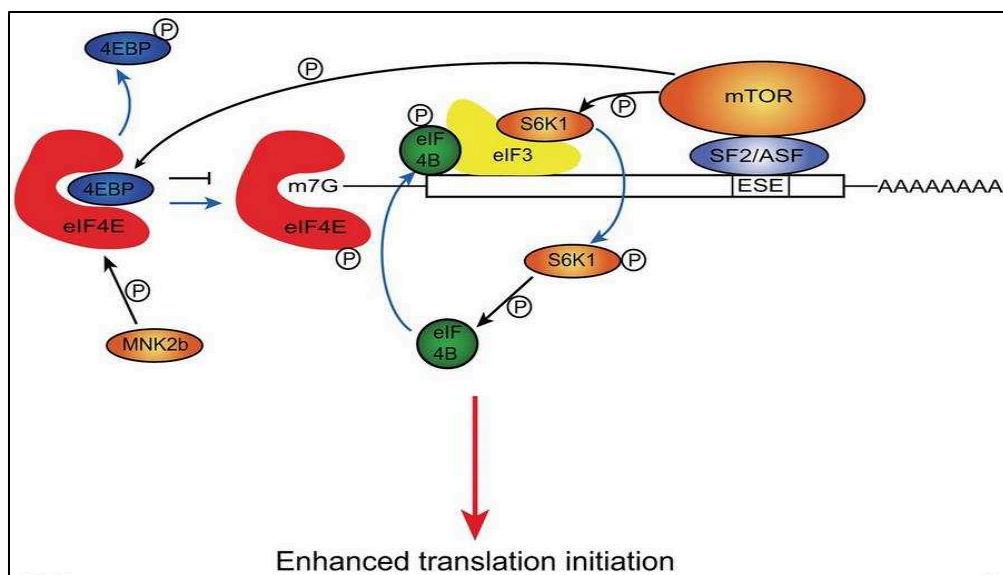


Figure 43. Mécanismes moléculaires de la régulation traductionnelle par SRSF1 (SF2/ASF). Un deuxième mécanisme de régulation traductionnelle de SRSF1 a été aussi décrit dans lequel mTOR phosphoryle S6K1, ce qui favorise l'initiation de traduction (Ezponda et al. 2010).

En perspective de ces données, il serait intéressant de chercher la cible de SRSF1 dans la régulation de l'expression du sVEGFR-1-i13, qui pourrait être mTOR. Cela pourrait être étudié en testant l'effet des inhibiteurs de mTOR (Rapamycine, Temsilorimus) sur l'expression du sVEGFR-1-i13 en combinaison ou non avec la neutralisation de SRSF1.

3. Rôle du sVEGFR-1 en clinique

Sur le plan clinique, les résultats issus de ma thèse permettent d'élargir la vision de l'utilisation du sVEGFR-1, tant du point de vue thérapeutique que du point de vue de son utilisation éventuelle en tant que biomarqueur dans les cancers du poumon. Ils ouvrent aussi des perspectives très intéressantes concernant l'utilisation des thérapies anti-angiogéniques chez les patients porteurs de carcinomes pulmonaires squameux. Ceci est très important dans la mesure où le ramucirumab, un anticorps monoclonal anti-VEGFR-2 humain, a été récemment approuvé en clinique pour les patients porteurs de SCC mais qu'il n'existe à l'heure actuelle aucun marqueur permettant de sélectionner les patients susceptibles de mieux répondre à ce traitement.

3.1 Le sVEGFR-1 : une thérapie en lui même ou une cible thérapeutique à inhiber ?

3.1.1 Le sVEGFR-1 : une thérapie en lui-même

Sur la base des effets anti-angiogéniques du sVEGFR-1, la possibilité de mettre en place des thérapies à base de sVEGFR-1 a été testée dans plusieurs cancers. Dans ce cadre, en 1998, Goldman et collaborateurs ont montré que la transfection de cellules de fibrosarcome humain HT-1080 avec le sVEGFR-1 inhibe de manière significative la croissance tumorale chez la souris nude (Goldman et al. 1998b). De façon importante, dans cette étude, aucun impact sur les cellules tumorales n'a été observé et l'effet anti-tumoral a été corrélé à une inhibition de la néo-angiogenèse tumorale. En outre, des études dans des modèles in vivo ont montré que la surexpression du sVEGFR-1 par des adénovirus inhibait la croissance de xénogreffes dérivées de plusieurs types de cancers dont la lignée d'adénocarcinome pulmonaire H157 (Goldman et al. 1998). Plusieurs autres études ont également montré que le sVEGFR-1 était capable d'inhiber non seulement l'angiogenèse tumorale, mais aussi l'angiogenèse inflammatoire. Ces résultats suggèrent que le sVEGFR-1 pourrait avoir un large éventail d'applications thérapeutiques dans différentes pathologies (Goldman et al. 1998; Takayama et al. 2000 ; Miotla et al. 2000).

Sur la base de ces données pré-cliniques très encourageantes, différentes stratégies thérapeutiques ont été mises en place visant à mimer le rôle de capture du VEGF-A par le sVEGFR-1. Nous citerons par exemple le VEGF-Trap (Aflibercept). Dans des modèles de xénogreffes sur les modèles murins de mélanome ou de rhabdomyosarcome, les injections sous-cutanées de VEGF-Trap à fortes (25mg/kg) et à faibles doses (2,5mg/kg) diminuent significativement la croissance tumorale. De plus, dans le modèle de mélanome (B16F10), l'efficacité des faibles doses de VEGF-Trap est nettement supérieure à celle du DC101 (un anticorps monoclonal anti-VEGFR-2) utilisé à des doses comparables (Konner et Dupont 2004). Cependant, dans le cancer du poumon, les résultats sont très décevants et ne montrent aucune amélioration par rapport au bevacizumab avec des effets secondaires d'assez à très graves tels que fatigue, maux de tête, constipation, fièvre, hypertension, hémorragies. C'est pour cela que l'Aflibercept a été utilisé ensuite en combinaison avec des agents chimiothérapeutiques. Là

encore, aucune amélioration n'a été observée et les effets secondaires étaient aussi importants (Riely et Miller 2007). Afin d'améliorer les effets de l'Alflibercept, un VEGF-Grab a été développé en 2015. Le VEGF-Grab est un récepteur soluble constitué par les domaines de type Ig 2 et 3 du VEGFR-1 fusionnés au fragment Fc de l'IgG (Figure 44.). Le domaine de type Ig 3 du VEGFR-1 a été glycosylé parce que les charges positives de ce domaine induisaient une liaison non spécifique à la matrice extra-cellulaire. Le VEGF-Grab a montré des effets anti-angiogéniques, anti-tumoraux et anti-métastatiques meilleures que celles du VEGF-Trap. Ces données sont assez encourageantes et suggèrent que le VEGF-Grab pourrait être testé cliniquement et avoir des effet anti-angiogéniques prometteurs (J.-E. Lee et al. 2015). Nos résultats indiquent aussi qu'il pourrait avoir des effets sur les cellules tumorales.

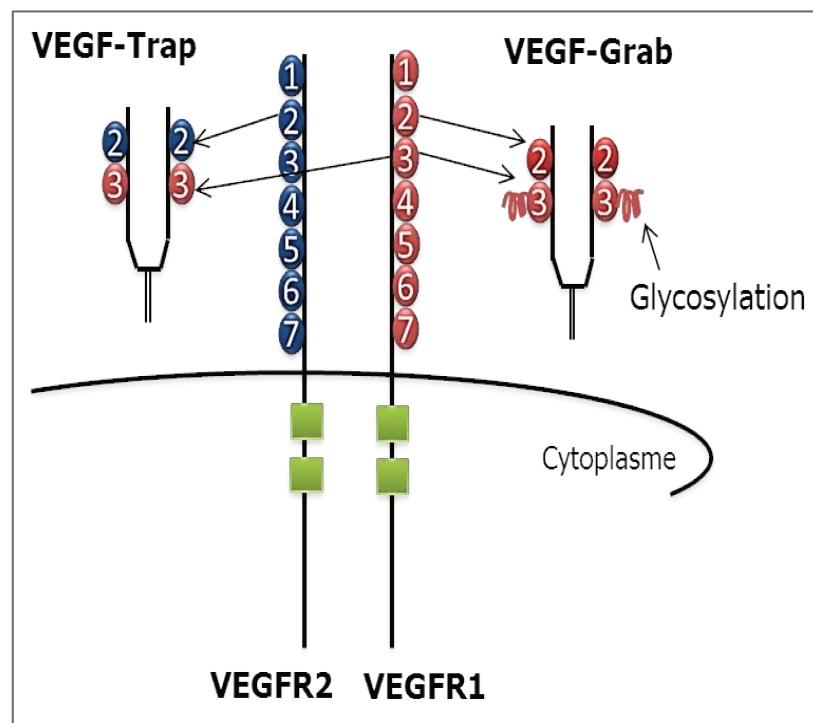


Figure 44. Représentation schématique de la différence entre VEGF-Trap et VEGF-Grab. Schéma adapté de (Lee et al. 2015). La possibilité que la différence de liaison à la MEC entre le VEGF-Trap versus le VEGF-Grab puisse initier des signalisations différentes supportant une réponse clinique distincte reste à démontrer.

3.1.2 Le sVEGFR-1-i13 : une cible thérapeutique à inhiber ?

Comme nous l'avons vu, à côté de son effet anti-angiogénique, le sVEGFR-1-i13 a un effet pro-angiogénique grâce à son interaction avec certains composants de la MEC et les intégrines. Par conséquent, le sVEGFR-1 n'est pas aussi inhibiteur de l'angiogenèse que ce que pensait Kendall quand il a découvert cette protéine. Le sVEGFR-1 pourrait donc être aussi considéré comme une cible thérapeutique à inhiber. Il a été montré que le deuxième domaine Ig du sVEGFR-1 est responsable de sa liaison avec l'intégrine $\beta 1$ (Orecchia et al. 2003a). Ensuite, 12 peptides mimant ce domaine ont été développés afin de tester leur capacité de bloquer les effets d'adhésion cellulaires médiés par la liaison du sVEGFR-1 à l'intégrine $\beta 1$. Parmi ces 12 peptides, le peptide 12 dont la séquence est NYLTHRQ se lie directement à l'intégrine $\beta 1$ et induit la formation de tubes in vitro et stimule la néoangiogenèse in vivo. De plus, ce peptide inhibe la migration des cellules endothéliale induite par le sVEGFR-1. Ces données suggèrent bien que le peptide 12 pourrait être un très bon candidat pour le développement de nouvelles thérapies anti-angiogéniques (Soro et al. 2008b).

3.1.3 Le sVEGFR-1-i13 : cible thérapeutique, thérapie ou biomarqueur de réponse aux thérapies anti-angiogéniques dans les SCC ?

Le début des années 2000 a vu naître les thérapies anti-angiogéniques qui sont devenues des thérapies de référence dans plusieurs cancers. Ces thérapies ont apporté une évolution indiscutable dans les thérapies anti-cancéreuses. Cependant, leurs limitations restent non négligeables en raison notamment de l'apparition de résistances et l'enjeu actuel est de savoir: (1) pourquoi certains patients progressent sous traitement et d'autres sont réfractaires ; (2) d'identifier des biomarqueurs de réponse permettant de sélectionner les patients ainsi que le type de traitement avant de l'administrer. Dans ce contexte, le traitement des patients porteurs de carcinomes pulmonaires squameux par les thérapies anti-angiogéniques demeure un challenge. Ainsi, mes travaux de thèse suggèrent que chez ces patients, il existe toujours un espoir et que l'utilisation de thérapies anti-angiogéniques pourrait être bénéfique chez certains de ces patients

qui sont pourtant exclus de toute cohorte et de tous les essais cliniques incluant le bevacizumab. Dans certains cancers, les patients avec de hauts niveaux plasmatiques de sVEGFR-1 présentent une mauvaise réponse aux thérapies anti-angiogéniques (Duda et al. 2010; Batchelor et al. 2010; Gerstner et al. 2012; Meyerhardt et al. 2012b; Zhu, Sahani, Duda, di Tomaso, et al. 2009). Ces données suggèrent que les hauts niveaux de sVEGFR-1 chez les patients avant le traitement pourraient être un marqueur de résistance aux thérapies AAG. Le ratio sVEGFR-1/VEGF-A a aussi été proposé comme marqueur pronostic. Dans ce contexte, mes travaux de thèse apportent une nouvelle suggestion d'un cocktail de biomarqueurs à tester pour prédire la réponse aux thérapies anti-angiogéniques dans les cancers du poumon, associant les niveaux de sVEGFR-1-i13, VEGF₁₆₅ et intégrine $\beta 1$. Cette combinaison pourrait permettre de prédire la réponse, résistance versus sensibilité. Nous présentons d'abord dans le tableau 8 les niveaux d'expression des différentes protéines dans chaque profil de réponse.

Niveau basal	Résistance aux thérapies AAG	Réponse aux thérapies AAG
VEGF165		—
sVEGFR1 intracellulaire		—
$\beta 1$ intégrine	—	

Tableau 8 Niveaux d'expression des biomarqueurs potentiels de réponse ou de résistance aux thérapies AAG dans les carcinomes pulmonaires SCCs.

De plus, mes résultats de thèse montrent très clairement que le réseau de signalisation dans les cellules tumorales dérivées de carcinomes pulmonaires squameux est très complexe et qu'en réponse aux thérapies anti-angiogéniques ces cellules mettent en place une signalisation impliquant le sVEGFR-1-i13, les récepteurs VEGFRs et aussi leurs co-récepteurs dont l'intégrine $\beta 1$, mais aussi possiblement la neuropiline-1. A l'échelle moléculaire, ces résultats nous conduisent donc à proposer deux modèles illustrés dans les figures 45 et 46 et correspondant à deux profils, un profil de résistance et un profil de réponse aux thérapies AAG.

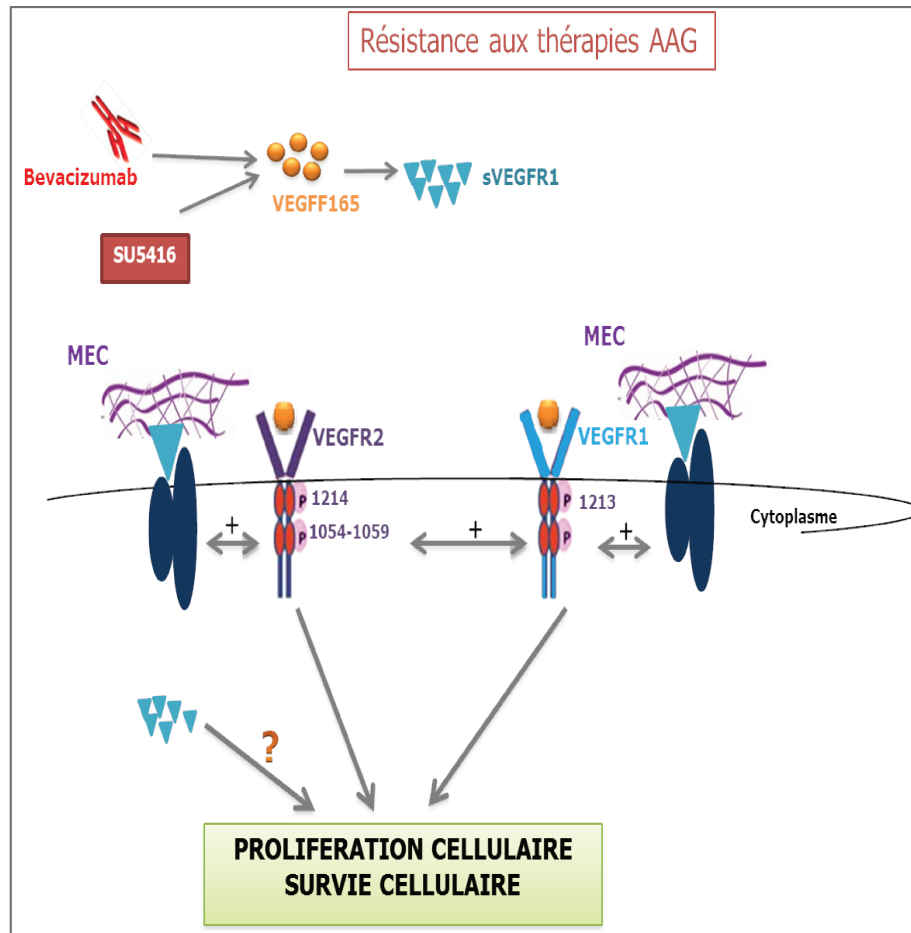


Figure 45. Mécanismes moléculaires de résistance aux thérapies AAG dans les carcinomes pulmonaires SCCs. Les thérapies AAG augmentent l'expression du VEGF165 qui induit la production du sVEGFR-1-i13. Le sVEGFR-1-i13 active une boucle autocrine en se fixant sur l'intégrine $\beta 1$ et active des voies de signalisation dépendantes des VEGFR-1/2 induisant ainsi la prolifération et la survie cellulaires. Le rôle de la signalisation intracrine du sVEGFR-1-i13, notamment nucléaire, reste à déterminer.

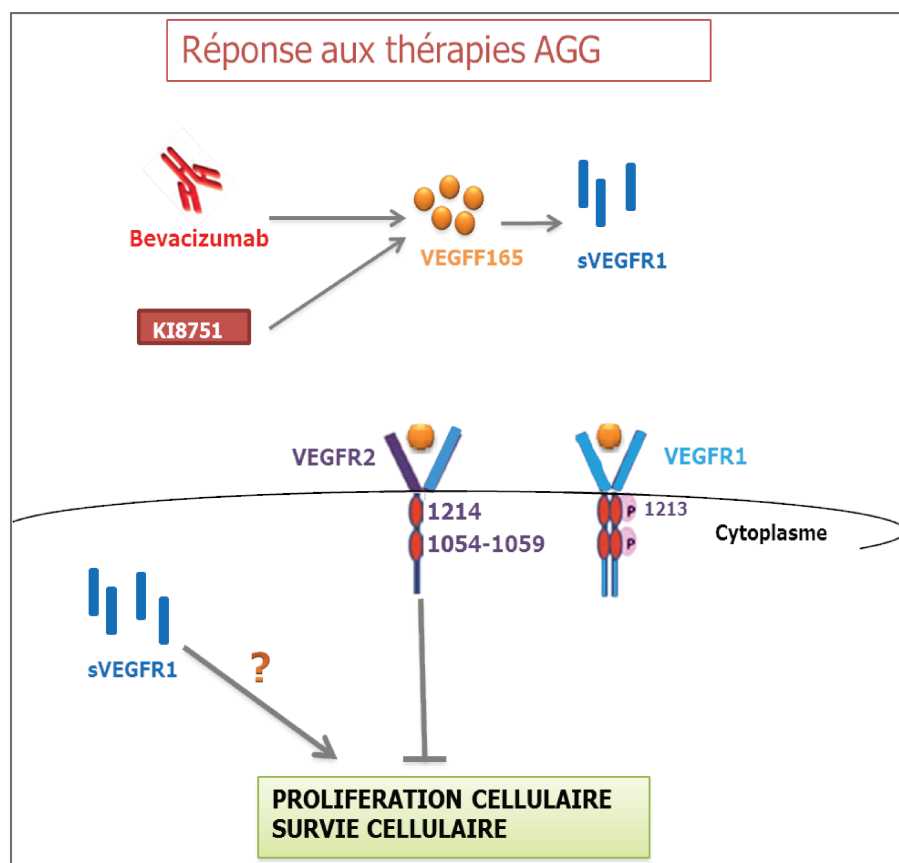


Figure 46. Mécanismes moléculaires de réponse aux thérapies AAG dans les carcinomes pulmonaires SCCs. Les thérapies AAG augmentent l'expression du VEGF165 qui induit la production du sVEGFR-1-i13. Le sVEGFR-1-i13 forme ensuite un complexe avec le VEGFR-2 et inhibe la signalisation VEGFR-2/VEGFR-1 aboutissant à la mort des cellules. Le rôle de la signalisation intracrine du sVEGFR-1-i13, notamment nucléaire, reste à déterminer.

Ce modèle mériterait d'être étendu à un nombre plus important de cellules dérivées de carcinomes pulmonaires squameux. De plus, une des limites de mon travail est que durant ma thèse, je n'ai pas eu le temps d'étudier l'expression de l'intégrine $\beta 1$ chez les patients CBnPCs. Cette étude serait très importante pour valider in situ les phénotypes cellulaires de type MGH7 ou H2170 et savoir si le modèle que nous proposons existe réellement chez les patients. De manière encourageante, des données existent déjà concernant l'expression de l'intégrine $\beta 1$ chez les patients CBnPCs. Ces travaux décrivent la génération et la caractérisation de clones dérivés d'une culture de cellules primaires de biopsies de patients porteurs de SCC pulmonaires

agressifs. Ces clones expriment des phénotypes stables de 5 membres de la familles des intégrines $\beta 1$ (F.-A. Chen et al. 1994). Ces données montrent aussi que les tumeurs primaires de SCC sont très hétérogènes au niveau de leur expression de l'intégrine $\beta 1$ comme ce que nous avons observé dans nos modèles cellulaires. De plus, nos deux modèles constituent une base de réflexion concernant l'utilisation du sVEGFR-1 en clinique dans les cancers pulmonaires squameux. Nous proposons que chez les patients présentant un phénotype de type « **MGH7-like** » (hauts niveaux de $\beta 1$ intégrine et de sVEGFR-1-i13 intra-tumoraux), inhiber le sVEGFR-1 ou sa signalisation dépendante de l'intégrine $\beta 1$ pourrait être un moyen de contrecarrer la résistance aux traitements anti-angiogéniques. Nos données suggèrent qu'il serait intéressant de traiter ces patients avec des doses plus faibles de thérapies anti-angiogéniques combinées aux inhibiteurs anti- $\beta 1$ intégrine ce qui permettrait de diminuer les effets secondaires hémorragiques. In vitro, nous avons obtenu des résultats préliminaires dans nos cellules MGH7 en combinant le bevacizumab et un anticorps neutralisant anti-intégrine $\beta 1$, l'anticorps 4B4 (Beckman Coulter). Ces résultats montrent que la combinaison des deux inhibe plus efficacement la viabilité cellulaire détectée par un test MTS. De plus, chez ces patients, l'utilisation d'un peptide bloquant l'interaction sVEGFR-1/ $\beta 1$ intégrine, tel que le peptide 12, pourrait être intéressante. A l'inverse, chez des patients SCC présentant un phénotype de type « **H2170-like** » (faible niveau de sVEGFR-1-i13 intra-tumoraux, hauts niveaux de VEGFR-2 et très faibles niveaux de $\beta 1$ intégrine), restaurer l'expression du sVEGFR-1 pourrait s'avérer bénéfique. Chez ces patients, il serait donc intéressant de faire des essais cliniques avec le VEGF-Trap.

3.2 sVEGFR-1-i13 : une des composantes possible à la réponse différentielle aux thérapies anti-angiogéniques entre ADC et SCC ?

Mes travaux de thèse apportent finalement des arguments qui pourraient permettre de mieux comprendre les différences de réponse observées en clinique après traitement par les thérapies anti-angiogéniques entre les patients atteints de carcinomes pulmonaires squameux et les patients porteurs d'adénocarcinomes.

3.2.1 L'augmentation du sVEGFR-1-i13 : une des causes des effets indésirables chez les patients SCC ?

De façon importante, les signes cliniques qui ont conduit à l'arrêt du bevacizumab chez les patients SCC sont réminiscents de ceux observés dans la pré-éclampsie, notamment les hémorragies, l'hypertension artérielle (HTA) et la protéinurie. Dans la pré-éclampsie, ces symptômes ont clairement été associés à une augmentation plasmatique du sVEGFR-1. Une des possibilités sur la base de nos résultats est que chez les patients porteurs de SCC, les hémorragies et l'HTA en réponse au bevacizumab soient liés à l'augmentation d'expression du sVEGFR-1. Malheureusement, il sera difficile de vérifier cette hypothèse car nous ne disposons pas de prélèvements avant/après traitement chez les patients SCC. Par contre, dans la mesure où le ramucirumab, un anticorps anti-VEGFR-2, est maintenant à l'essai clinique dans les patients SCC, nous pourrions envisager de tester cette hypothèse. De façon intéressante, au cours de notre étude, nous avons montré que les cellules MGH7 et les tumeurs murines UN-SCC680 répondent moins en ce qui concerne l'augmentation du sVEGFR-1-i13 au KI8751 et au DC101 ciblant le VEGFR-2 qu'au SU5416 et au bevacizumab. Il se pourrait donc que le traitement par le ramucirumab entraîne moins d'augmentation de sVEGFR-1 chez les patients SCC que le bevacizumab, expliquant pourquoi les effets indésirables seraient moins importants.

3.2.2 Régulation différentielle du sVEGFR-1-i13 entre SCC et ADC

Une autre des questions soulevées par mes travaux de thèse est de comprendre les mécanismes qui contribuent à l'augmentation du sVEGFR-1-i13 dans les carcinomes squameux alors que son expression diminue dans les adénocarcinomes en réponse aux thérapies anti-angiogéniques.

Rôle de SOX2

SOX2 a été décrit comme un facteur de transcription oncogénique dans les lignées cellulaires de SCC pulmonaires (Ferone et al. 2016). Cependant, les gènes consensus en aval de SOX2 n'ont pas encore été clairement établis. Dans des modèles murins transgéniques de cancer pulmonaire squameux, il a été montré que SOX2 se lie sur les régions promotrices de NOTCH et NOTCH2 et diminue l'expression des transcrits NOTCH1 et NOTCH2 (Xu et al. 2014) alors qu'une autre étude a montré que dans la lignée cellulaire A549 d'adénocarcinome pulmonaire, SOX2 active NOTCH1 (Figure 47.) (S. Chen et al. 2012). Ces données suggèrent que la régulation de NOTCH1 par SOX2 pourrait être différentielle dans les deux sous-types histologiques de cancer de poumon SCC et ADC. D'autre part, dans les cellules endothéliales, il a été montré que l'inhibition de la voie JAG / NOTCH1 augmente l'expression du sVEGFR-1-i13 (Kangsamaksin et al. 2015). Dans nos modèles cellulaires dérivés de SCC, nous n'avons pas observé d'inhibition de l'expression des transcrits NOTCH1 et NOTCH2 en réponse aux thérapies anti-angiogéniques suggérant que l'effet de SOX2 sur la régulation de l'expression du sVEGFR-1-i13 ne passe pas par l'inhibition de NOTCH1 dans ce contexte. Cependant, comme les mécanismes de régulation du sVEGFR-1-i13 en réponse aux thérapies anti-angiogéniques s'avèrent contradictoires entre les ADC et les SCC pulmonaires, il serait intéressant de tester le rôle de la voie SOX2/NOTCH dans les adénocarcinomes.

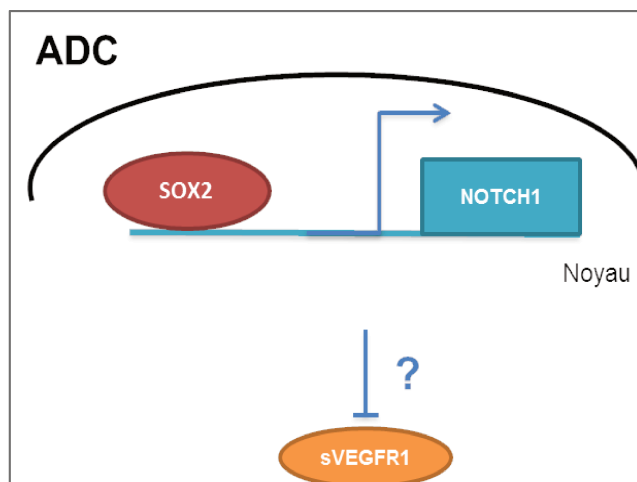


Figure 47. Mécanismes différentiels de régulation du sVEGFR-1 dans les adénocarcinomes (ADC) et les carcinomes pulmonaires squameux (SCC).

Rôle de JMJD6 et de U2AF65

Dans certains adénocarcinomes mais pas dans les carcinomes pulmonaires squameux, Meyerson et collaborateurs ont décrit une mutation du facteur d'épissage U2AF65 (Cancer Genome Atlas Research Network 2012). De façon intéressante, un rôle de U2AF65 avec l'hydroxylase JMJD6 dans le contrôle de l'expression du sVEGFR-1-i13 a été décrit dans les cellules endothéliales (Boeckel et al. 2011). Ainsi, en condition normoxique, il a été montré que JMJD6 interagit avec U2AF65 et hydroxyle U2AF65 conduisant à l'activation de la transcription du VEGFR-1 total. A l'inverse, en condition hypoxique, l'activité de JMJD6 diminue et elle est moins capable d'hydroxyle U2AF65. U2AF65 sous forme « hypo-hydroxylée » régule alors l'épissage du VEGFR-1 en faveur du sVEGFR-1-i13 (Palmer et al. 2016). Les conséquences de la mutation d'U2AF65 sur son interaction avec JMJD6 et son hydroxylation ne sont pas connues, de même que l'impact des thérapies anti-angiogéniques dans ce contexte (figure 48). Dans les adénocarcinomes pulmonaires, une des possibilités est donc que la mutation de U2AF65 inhibe ses fonctions dans l'épissage du sVEGFR-1-i13 et préviennent l'augmentation de sVEGFR-1-i13 en réponse aux thérapies anti-angiogéniques. Il serait important dans ce cadre de vérifier le statut muté ou non de U2AF65 dans les lignées cellulaires dérivées d'adénocarcinomes pulmonaires dans lesquelles nous avons travaillé.

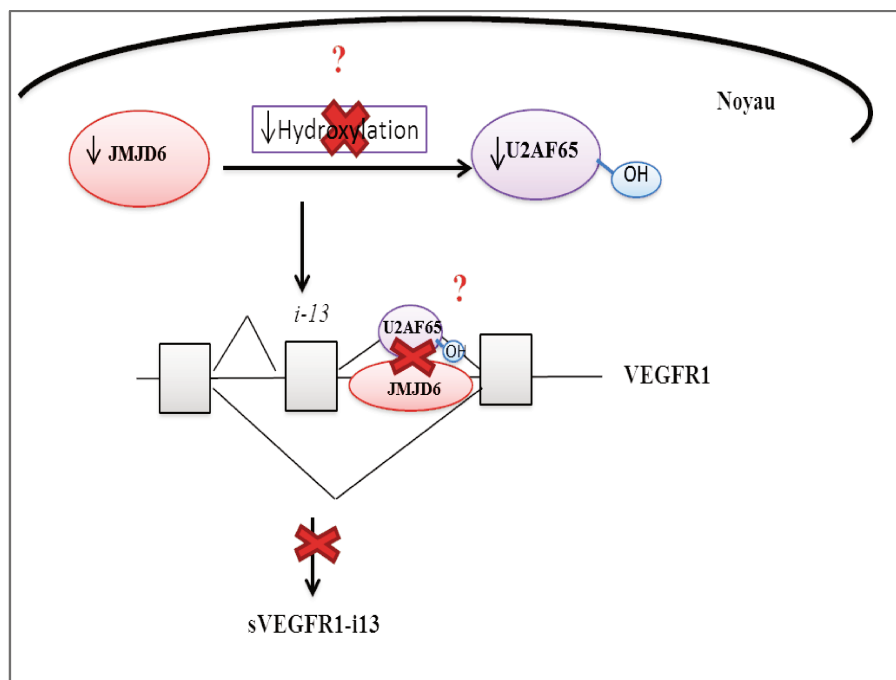


Figure 48. Mécanisme différentiel de régulation du sVEGFR-1-i13 entre les ADC et les SCC pulmonaires. Dans les ADCs, la mutation de U2AF65 pourrait affecter son interaction avec JMJD6, son hydroxylation et/ou sa liaison aux sites d'épissage sur le transcrit VEGFR-1 (croix rouges) et par ce biais inhiber l'expression du sVEGFR-1-i13 en réponse aux thérapies anti-angiogéniques.

3.2.3 Variants d'épissage du VEGFR-1 et du VEGF-A : des rôles différents dans la réponse aux thérapies anti-angiogéniques entre SCC et ADC

Dans les adénocarcinomes (Boudria et al, en préparation) et les carcinomes pulmonaires squameux (Abou-Faycal et al., en préparation), nous montrons que les thérapies anti-angiogéniques modulent l'expression des variants d'épissage du VEGF-A et des VEGFRs et activent une boucle autocrine entraînant un effet sur la prolifération et la survie des cellules tumorales. Cependant, il apparaît que les variants d'épissage modulés dans ce contexte et les conséquences biologiques découlant de cette modulation ne sont pas les mêmes et que cela dépend fortement du sous-type histologique considéré comme le montre le tableau 9. Plusieurs observations ont permis d'associer les épissages alternatifs aberrants à la tumorigénèse (Venables 2004). Récemment, des études de RNA-Seq à large échelle ont été faites dans les

cancers et ont permis d'identifier des variants d'épissage anormaux et des facteurs d'épissage dérégulés spécifiquement dans certains types de cancers et d'impliquer ces dérégulations dans les processus invasifs, métastatiques ou de résistance à l'apoptose (Sveen et al. 2016). Nous citerons à titre d'exemple le variant EGFR vIII qui est exprimé dans 5% des carcinomes pulmonaires squameux et pas dans les ADCs (H. Ji et al. 2006). Cependant, l'impact des thérapies sur ces épissages reste mal connu. Dans l'ensemble, nos travaux identifient donc l'épissage alternatif des composants de la voie de signalisation VEGF-A/VEGFR comme un mécanisme général de réponse aux thérapies anti-angiogéniques dans les CBnPCs. La modulation de ces épissages constitue une piste thérapeutique à approfondir pour optimiser la réponse à ces traitements.

Variant	ADC	SCC
VEGF165	—	↗
VEGF165b	↗	—
sVEGFR1-i13	↘	↗

Tableau 9 Les niveaux d'expression des variants du VEGF-A : VEGF165 et VEGF165b et du sVEGFR-1-i13 en réponse aux thérapies AAG dans les deux sous-types histologiques ADC et SCC.

Conclusion

Conclusion

Pour conclure, ce travail nous a permis de montrer que les thérapies anti-angiogéniques (bevacizumab, SU5416, KI8751) augmentent les niveaux d'expression du variant d'épissage sVEGFR-1-i13 in vitro et in vivo spécifiquement dans des modèles dérivés de carcinomes pulmonaires squameux mais pas dans les adénocarcinomes pulmonaires. Cette régulation a lieu à un niveau post-transcriptionnel via la régulation de l'épissage alternatif de l'ARNm VEGFR-1 en faveur du sVEGFR-1-i13 et pourrait mettre en jeu certaines protéines SR, des facteurs d'épissage jouant un rôle crucial dans l'épissage constitutif et alternatif des transcrits. Nous montrons aussi que l'expression du sVEGFR-1-i13 est régulée par son ligand, le VEGF₁₆₅, dans des cellules dérivées de SCC. De plus, nous montrons que le sVEGFR-1-i13 régule une boucle autocrine dépendante de l'intégrine $\beta 1$ et du VEGFR-2 activant ainsi la prolifération et la survie des cellules tumorales SCCs. De façon intéressante, le sVEGFR-1-i13 n'active pas la voie de signalisation dépendante des VEGFRs dans un modèle qui n'exprime pas l'intégrine $\beta 1$ et induit l'apoptose de ces cellules. Ces données suggèrent que l'intégrine $\beta 1$ est un des partenaires biologiques du sVEGFR-1-i13 lui permettant d'exercer un rôle pro-prolifératif et donc pro-tumoral dans les cellules dérivées de SCCs. Dans une cohorte de 77 patients porteurs de CBnPCs, nous montrons finalement que les hauts niveaux de sVEGFR-1-i13 sont corrélés avec des stades pTNM avancés uniquement chez les patients porteurs de SCCs. Ces données suggèrent que le sVEGFR-1-i13 pourrait être un biomarqueur pronostique chez ces patients. Cependant, il serait pertinent de le combiner avec d'autres biomarqueurs potentiels tels que le VEGF₁₆₅ et l'intégrine $\beta 1$. Ainsi, nos résultats permettent d'identifier une sous-population de patients porteurs de SCC qui pourrait être éligibles aux thérapies. De plus, comme l'intégrine $\beta 1$ est le partenaire du sVEGFR-1-i13, cela suggère aussi la possibilité qu'en diminuant les doses de thérapies anti-angiogéniques et en les combinant avec des inhibiteurs anti- $\beta 1$ intégrine, cela pourrait permettre de diminuer les effets secondaires.

Bibliographie

Bibliographie

A

- Abedi, H., et I. Zachary. 1997. « Vascular Endothelial Growth Factor Stimulates Tyrosine Phosphorylation and Recruitment to New Focal Adhesions of Focal Adhesion Kinase and Paxillin in Endothelial Cells ». *Journal of Biological Chemistry* 272 (24): 15442- 51. doi:10.1074/jbc.272.24.15442.
- Adamcic, Una, Karolina Skowronski, Craig Peters, Jodi Morrison, et Brenda L. Coomber. 2012. « The Effect of Bevacizumab on Human Malignant Melanoma Cells with Functional VEGF/VEGFR2 Autocrine and Intracrine Signaling Loops ». *Neoplasia* 14 (7): 612-IN16. doi:10.1593/neo.11948.
- Addison, Christina L., Keyue Ding, Lesley Seymour, Huijun Zhao, Scott A. Laurie, Frances A. Shepherd, Glenwood D. Goss, et Penelope A. Bradbury. 2015. « Analysis of serum protein levels of angiogenic factors and their soluble receptors as markers of response to cediranib in the NCIC CTG BR. 24 clinical trial ». *Lung Cancer* 90 (2): 288–295.
- Ahmad, S. 2004. « Elevated Placental Soluble Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 Inhibits Angiogenesis in Preeclampsia ». *Circulation Research* 95 (9): 884- 91. doi:10.1161/01.RES.0000147365.86159.f5.
- Ahmad, Shakil, et Asif Ahmed. 2004. « Elevated Placental Soluble Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 Inhibits Angiogenesis in Preeclampsia ». *Circulation Research* 95 (9): 884- 91. doi:10.1161/01.RES.0000147365.86159.f5.
- Ahmad, Shakil, Peter W. Hewett, Bahjat Al-Ani, Samir Sissaoui, Takeshi Fujisawa, Melissa J. Cudmore, et Asif Ahmed. 2011. « Autocrine activity of soluble Flt-1 controls endothelial cell function and angiogenesis ». *Vascular Cell* 3: 15. doi:10.1186/2045-824X-3-15.
- Albertson, Donna G. 2006. « Gene Amplification in Cancer ». *Trends in Genetics* 22 (8): 447- 55. doi:10.1016/j.tig.2006.06.007.
- Alevizakos, Michalis, Serafim Kaltsas, et Konstantinos N. Syrigos. 2013. « The VEGF Pathway in Lung Cancer ». *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 72 (6): 1169- 81. doi:10.1007/s00280-013-2298-3.
- Alexandrov, Ludmil B, et Michael R Stratton. 2014. « Mutational Signatures: The Patterns of Somatic Mutations Hidden in Cancer Genomes ». *Current Opinion in Genetics & Development* 24 (février): 52- 60. doi:10.1016/j.gde.2013.11.014.
- Ali, B. R., H. Xu, N. A. Akawi, A. John, N. S. Karuvantevida, R. Langer, L. Al-Gazali, et B. Leitinger. 2010. « Trafficking Defects and Loss of Ligand Binding Are the Underlying Causes of All Reported DDR2 Missense Mutations Found in SMED-SL Patients ». *Human Molecular Genetics* 19 (11): 2239- 50. doi:10.1093/hmg/ddq103.
- Ambati, Balamurali K., Miho Nozaki, Nirbhai Singh, Atsunobu Takeda, Pooja D. Jani, Tushar Suthar, Romulo J. C. Albuquerque, et al. 2006. « Corneal Avascularity Is due to Soluble VEGF Receptor-1 ». *Nature* 443 (7114): 993- 97. doi:10.1038/nature05249.
- Ambati, Balamurali K., Emory Patterson, Pooja Jani, Crystal Jenkins, Eric Higgins, Nirbhai Singh, Tushar Suthar, Nehali Vira, Kimberly Smith, et Ruth Caldwell. 2007. « Soluble Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 Contributes to the Corneal Antiangiogenic Barrier ». *The British Journal of Ophthalmology* 91 (4): 505- 8. doi:10.1136/bjo.2006.107417.
- Anand, Sudarshan. 2013. « A Brief Primer on microRNAs and Their Roles in Angiogenesis ». *Vascular Cell* 5 (1): 2. doi:10.1186/2045-824X-5-2.

- Anton, Lauren, Anthony O. Olarerin-George, John B. Hogenesch, et Michal A. Elovitz. 2015. « Placental Expression of miR-517a/B and miR-517c Contributes to Trophoblast Dysfunction and Preeclampsia ». Édité par Hai-Yan Lin. PLOS ONE 10 (3): e0122707. doi:10.1371/journal.pone.0122707.
- Aplin, Andrew E., Sheryl A. Stewart, Richard K. Assoian, et R. L. Juliano. 2001. « Integrin-Mediated Adhesion Regulates ERK Nuclear Translocation and Phosphorylation of Elk-1 ». *The Journal of Cell Biology* 153 (2): 273-82. doi:10.1083/jcb.153.2.273.
- Arcondéguy, Tania, Eric Lacazette, Stefania Millevoi, Hervé Prats, et Christian Touriol. 2013a. « VEGF-A mRNA Processing, Stability and Translation: A Paradigm for Intricate Regulation of Gene Expression at the Post-Transcriptional Level ». *Nucleic Acids Research* 41 (17): 7997-8010. doi:10.1093/nar/gkt539.
- . 2013b. « VEGF-A mRNA processing, stability and translation: a paradigm for intricate regulation of gene expression at the post-transcriptional level ». *Nucleic Acids Research* 41 (17): 7997-8010. doi:10.1093/nar/gkt539.
- Aref, Salah, Mamdouh El Sherbiny, Tarek Goda, Manal Fouda, Hassan Al Askalany, et Doaa Abdalla. 2005. « Soluble VEGF/sFlt1 Ratio Is an Independent Predictor of AML Patient Outcome ». *Hematology (Amsterdam, Netherlands)* 10 (2): 131-34. doi:10.1080/10245330500065797.
- Askari, Janet A., Patrick A. Buckley, A. Paul Mould, et Martin J. Humphries. 2009. « Linking Integrin Conformation to Function ». *Journal of Cell Science* 122 (2): 165-70. doi:10.1242/jcs.018556.
- Autiero, Monica, Johannes Waltenberger, Didier Communi, Andrea Kranz, Lieve Moons, Diether Lambrechts, Jens Kroll, et al. 2003. « Role of PlGF in the Intra- and Intermolecular Cross Talk between the VEGF Receptors Flt1 and Flk1 ». *Nature Medicine* 9 (7): 936-43. doi:10.1038/nm884.

B

- Bachelder, Robin E., Aimee Crago, Jun Chung, Melissa A. Wendt, Leslie M. Shaw, Gregory Robinson, et Arthur M. Mercurio. 2001. « Vascular endothelial growth factor is an autocrine survival factor for neuropilin-expressing breast carcinoma cells ». *Cancer research* 61 (15): 5736-5740.
- Bader, A. G., D. Brown, J. Stoudemire, et P. Lammers. 2011. « Developing Therapeutic microRNAs for Cancer ». *Gene Therapy* 18 (12): 1121-26. doi:10.1038/gt.2011.79.
- Bader, Andreas G. 2012. « miR-34 – a microRNA replacement therapy is headed to the clinic ». *RNA* 3: 120. doi:10.3389/fgene.2012.00120.
- Bagri, Anil, Marc Tessier-Lavigne, et Ryan J. Watts. 2009. « Neuropilins in Tumor Biology ». *American Association for Cancer Research* 15 (6): 1860-64. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-0563.
- Balch, W. 1994. « Vesicular Stomatitis Virus Glycoprotein Is Sorted and Concentrated during Export from the Endoplasmic Reticulum ». *Cell* 76 (5): 841-52. doi:10.1016/0092-8674(94)90359-X.
- Bando, H., H. A. Weich, M. Brokelmann, S. Horiguchi, N. Funata, T. Ogawa, et M. Toi. 2005. « Association between intratumoral free and total VEGF, soluble VEGFR-1, VEGFR-2 and prognosis in breast cancer ». *British Journal of Cancer* 92 (3): 553-61. doi:10.1038/sj.bjc.6602374.
- Banks, R. E., M. A. Forbes, J. Searles, D. Pappin, B. Canas, D. Rahman, S. Kaufmann, et al. 1998. « Evidence for the Existence of a Novel Pregnancy-Associated Soluble Variant of the Vascular Endothelial Growth Factor Receptor, Flt-1. ». *Molecular Human Reproduction* 4 (4): 377-86. doi:10.1093/molehr/4.4.377.

- Bargal, Ruth, Valerie Cormier-Daire, Ziva Ben-Neriah, Martine Le Merrer, Jacob Sosna, Judith Melki, David H. Zangen, et al. 2009. « Mutations in DDR2 Gene Cause SMED with Short Limbs and Abnormal Calcifications ». *The American Journal of Human Genetics* 84 (1): 80-84. doi:10.1016/j.ajhg.2008.12.004.
- Barleon, B., G. Siemeister, G. Martiny-Baron, K. Weindel, C. Herzog, et D. Marmé. 1997. « Vascular Endothelial Growth Factor up-Regulates Its Receptor Fms-like Tyrosine Kinase 1 (FLT-1) and a Soluble Variant of FLT-1 in Human Vascular Endothelial Cells ». *Cancer Research* 57 (23): 5421-25.
- Barleon, B., S. Sozzani, D. Zhou, H. A. Weich, A. Mantovani, et D. Marme. 1996. « Migration of Human Monocytes in Response to Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Is Mediated via the VEGF Receptor Flt-1 ». *Blood* 87 (8): 3336-43.
- Barleon, B., F. Totzke, C. Herzog, S. Blanke, E. Kremmer, G. Siemeister, D. Marmé, et G. Martiny-Baron. 1997. « Mapping of the Sites for Ligand Binding and Receptor Dimerization at the Extracellular Domain of the Vascular Endothelial Growth Factor Receptor FLT-1 ». *The Journal of Biological Chemistry* 272 (16): 10382-88.
- Barlesi, F., A. Scherpereel, V. Gorbunova, R. Gervais, A. Vikström, C. Chouaid, A. Chella, et al. 2014. « Maintenance Bevacizumab-Pemetrexed after First-Line Cisplatin-Pemetrexed-Bevacizumab for Advanced Nonsquamous Nonsmall-Cell Lung Cancer: Updated Survival Analysis of the AVAPERL (MO22089) Randomized Phase III Trial ». *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 25 (5): 1044-52. doi:10.1093/annonc/mdu098.
- Barreau, Carine, Luc Paillard, et H. Beverley Osborne. 2005. « AU-Rich Elements and Associated Factors: Are There Unifying Principles? » *Nucleic Acids Research* 33 (22): 7138-50. doi:10.1093/nar/gki1012.
- Bass, Adam J., Hideo Watanabe, Craig H. Mermel, Soyoung Yu, Sven Perner, Roel G. Verhaak, So Young Kim, et al. 2009. « SOX2 Is an Amplified Lineage-Survival Oncogene in Lung and Esophageal Squamous Cell Carcinomas ». *Nature Genetics* 41 (11): 1238-42. doi:10.1038/ng.465.
- Batchelor, Tracy T., Dan G. Duda, Emmanuelle di Tomaso, Marek Ancukiewicz, Scott R. Plotkin, Elizabeth Gerstner, April F. Eichler, et al. 2010. « Phase II Study of Cediranib, an Oral Pan-Vascular Endothelial Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor, in Patients With Recurrent Glioblastoma ». *Journal of Clinical Oncology* 28 (17): 2817-23. doi:10.1200/JCO.2009.26.3988.
- Bates, D. O., P. J. Catalano, K. E. Symonds, A. H. R. Varey, P. Ramani, P. J. O'Dwyer, B. J. Giantonio, N. J. Meropol, A. B. Benson, et S. J. Harper. 2012. « Association between VEGF Splice Isoforms and Progression-Free Survival in Metastatic Colorectal Cancer Patients Treated with Bevacizumab ». *Clinical Cancer Research* 18 (22): 6384-91. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-2223.
- Bates, David O., Tai-Gen Cui, Joanne M. Doughty, Matthias Winkler, Marto Sugiono, Jacqueline D. Shields, Danielle Peat, David Gillatt, et Steven J. Harper. 2002. « VEGF165b, an Inhibitory Splice Variant of Vascular Endothelial Growth Factor, Is down-Regulated in Renal Cell Carcinoma ». *Cancer Research* 62 (14): 4123-31.
- Beck, Benjamin, Gregory Driessens, Steven Goossens, Khalil Kass Youssef, Anna Kuchnio, Amélie Caauwe, Panagiota A. Sotiropoulou, et al. 2011. « A vascular niche and a VEGF-Nrp1 loop regulate the initiation and stemness of skin tumours ». *Nature* 478 (7369): 399-403.
- Bennett, J. S., B. W. Berger, et P. C. Billings. 2009. « The Structure and Function of Platelet Integrins ». *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 7 (juillet): 200-205. doi:10.1111/j.1538-7836.2009.03378.x.

- Bergers, Gabriele, et Laura E. Benjamin. 2003. « Tumorigenesis and the Angiogenic Switch ». *Nature Reviews Cancer* 3 (6): 401-10. doi:10.1038/nrc1093.
- Bergers, Gabriele, et Douglas Hanahan. 2008. « Modes of resistance to anti-angiogenic therapy ». *Nature Reviews Cancer* 8 (8): 592-603.
- Bernstein, Philip, et Jeffrey Ross. 1989. « Poly(A), poly(A) Binding Protein and the Regulation of mRNA Stability ». *Trends in Biochemical Sciences* 14 (9): 373-77. doi:10.1016/0968-0004(89)90011-X.
- Beuselinck, Benoit, Alexandra Karadimou, Diether Lambrechts, Bart Claes, Pascal Wolter, Gabrielle Couchy, Joost Berkers, et al. 2014. « VEGFR1 Single Nucleotide Polymorphisms Associated with Outcome in Patients with Metastatic Renal Cell Carcinoma Treated with Sunitinib – a Multicentric Retrospective Analysis ». *Acta Oncologica* 53 (1): 103-12. doi:10.3109/0284186X.2013.770600.
- Bhaskar, Vinay, Dong Zhang, Melvin Fox, Pui Seto, Melanie HL Wong, Pauline E Wales, David Powers, Debra T Chao, Robert B DuBridge, et Vanitha Ramakrishnan. 2007. « A function blocking anti-mouse integrin $\alpha 5\beta 1$ antibody inhibits angiogenesis and impedes tumor growth in vivo ». *Journal of Translational Medicine* 5 (novembre): 61. doi:10.1186/1479-5876-5-61.
- Bhattacharya, Rajat, Xiang-Cang Ye, Rui Wang, Xia Ling, Madonna McManus, Fan Fan, Delphine Boulbes, et Lee M. Ellis. 2016. « Intracrine VEGF Signaling Mediates the Activity of Prosurvival Pathways in Human Colorectal Cancer Cells ». *Cancer Research* 76 (10): 3014-24. doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-1605.
- Binder, Bernd R., Judit Mihaly, et Gerald W. Prager. 2007. « uPAR-uPA-PAI-1 Interactions and Signaling: A Vascular Biologist's View ». *Thrombosis and Haemostasis* 97 (3): 336-42.
- Blechman, Janna M, Sima Lev, Jacob Barg, Miriam Eisenstein, Baruch Vaks, Zvi Vogel, David Givol, et Yosef Yarden. 1995. « The Fourth Immunoglobulin Domain of the Stem Cell Factor Receptor Couples Ligand Binding to Signal Transduction ». *Cell* 80 (1): 103-13. doi:10.1016/0092-8674(95)90455-7.
- Boeckel, Jes-Niels, Virginia Guarani, Masamichi Koyanagi, Tino Roexe, Andreas Lengeling, Ralph T. Schermuly, Pascal Gellert, Thomas Braun, Andreas Zeiher, et Stefanie Dimmeler. 2011. « Jumonji domain-containing protein 6 (Jmjd6) is required for angiogenic sprouting and regulates splicing of VEGF-receptor 1 ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (8): 3276-81. doi:10.1073/pnas.1008098108.
- Boer, Richard H. de, Óscar Arrieta, Chih-Hsin Yang, Maya Gottfried, Valorie Chan, Johann Raats, Filippo de Marinis, et al. 2011. « Vandetanib Plus Pemetrexed for the Second-Line Treatment of Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer: A Randomized, Double-Blind Phase III Trial ». *Journal of Clinical Oncology* 29 (8): 1067-74. doi:10.1200/JCO.2010.29.5717.
- Brahmer, Julie R., Leora Horn, Scott J. Antonia, David R. Spigel, Leena Gandhi, Lecia V. Sequist, Vindira Sankar, et al. 2013. « Survival and long-term follow-up of the phase I trial of nivolumab (Anti-PD-1; BMS-936558; ONO-4538) in patients (pts) with previously treated advanced non-small cell lung cancer (NSCLC). » *ASCO Meeting Abstracts* 31 (15_suppl): 8030.
- Brambilla, E., et A. Gazdar. 2009. « Pathogenesis of Lung Cancer Signalling Pathways: Roadmap for Therapies ». *European Respiratory Journal* 33 (6): 1485-97. doi:10.1183/09031936.00014009.
- Britten, Carolyn D., Fairooz Kabbinavar, J. Randolph Hecht, Carlo L. Bello, Jim Li, Charles Baum, et Dennis Slamon. 2007. « A Phase I and Pharmacokinetic Study of Sunitinib Administered Daily for 2 Weeks, Followed by a 1-Week off Period ». *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 61 (3): 515-24. doi:10.1007/s00280-007-0498-4.
- Brose, Marcia S., Patricia Volpe, Michael Feldman, Madhu Kumar, Irum Rishi, Renee Gerrero, Eugene Einhorn, et al. 2002. « BRAF and RAS Mutations in Human Lung Cancer and Melanoma ». *Cancer Research* 62 (23): 6997-7000.

- Buteau-Lozano, Hélène, Magali Ancelin, Bernard Lardeux, Julie Milanini, et Martine Perrot-Applanat. 2002. « Transcriptional Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor by Estradiol and Tamoxifen in Breast Cancer Cells ». *Cancer Research* 62 (17): 4977-84.
- Byzova, Tatiana V., Corey K. Goldman, Nisar Pampori, Kenneth A. Thomas, Andrew Bett, Sanford J. Shattil, et Edward F. Plow. 2000. « A Mechanism for Modulation of Cellular Responses to VEGF ». *Molecular Cell* 6 (4): 851-60. doi:10.1016/S1097-2765(05)00076-6.

C

- Cackowski, Frank C, Li Xu, Bo Hu, et Shi-Yuan Cheng. 2004. « Identification of Two Novel Alternatively Spliced Neuropilin-1 Isoforms ». *Genomics* 84 (1): 82-94. doi:10.1016/j.ygeno.2004.02.001.
- Cai, Huaibin, et Randall R. Reed. 1999. « Cloning and characterization of neuropilin-1-interacting protein: a PSD-95/Dlg/ZO-1 domain-containing protein that interacts with the cytoplasmic domain of neuropilin-1 ». *The Journal of neuroscience* 19 (15): 6519-6527.
- Calvetti, Lorenzo, Sara Pilotto, Luisa Carbognin, Roberto Ferrara, Mario Caccese, Giampaolo Tortora, et Emilio Bria. 2015. « The coming of ramucirumab in the landscape of anti-angiogenic drugs: potential clinical and translational perspectives ». *Expert opinion on biological therapy* 15 (9): 1359-1370.
- Cancer Genome Atlas Research Network. 2012. « Comprehensive Genomic Characterization of Squamous Cell Lung Cancers ». *Nature* 489 (7417): 519-25. doi:10.1038/nature11404.
- Cao, Y., G. E. E. Wang, K. Pal, S. K. Dutta, D. Bar-Sagi, et D. Mukhopadhyay. 2012. « VEGF Exerts an Angiogenesis-Independent Function in Cancer Cells to Promote Their Malignant Progression ». *Cancer Research* 72 (16): 3912-18. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-4058.
- Cao, Yihai. 2014. « VEGF-Targeted Cancer Therapeutics—paradoxical Effects in Endocrine Organs ». *Nature Reviews Endocrinology* 10 (9): 530-39. doi:10.1038/nrendo.2014.114.
- Carmeliet, Peter. 2003. « Angiogenesis in Health and Disease ». *Nature Medicine* 9 (6): 653-60. doi:10.1038/nm0603-653.
- Casanovas, Oriol. 2011. « The adaptive stroma joining the antiangiogenic resistance front ». *The Journal of Clinical Investigation* 121 (4): 1244-47. doi:10.1172/JCI46430.
- Cascone, Tina, Matthew H. Herynk, Li Xu, Zhiqiang Du, Humam Kadara, Monique B. Nilsson, Carol J. Oborn, et al. 2011. « Upregulated Stromal EGFR and Vascular Remodeling in Mouse Xenograft Models of Angiogenesis Inhibitor-Resistant Human Lung Adenocarcinoma ». *The Journal of Clinical Investigation* 121 (4): 1313-28. doi:10.1172/JCI42405.
- Catena, Raúl, Leyre Larzabal, Marta Larrayoz, Eva Molina, Jose Hermida, Jackeline Agorreta, Ramon Montes, Ruben Pio, Luis M Montuenga, et Alfonso Calvo. 2010. « VEGF121b and VEGF165b Are Weakly Angiogenic Isoforms of VEGF-A ». *Molecular Cancer* 9 (1): 320. doi:10.1186/1476-4598-9-320.
- Cébe-Suarez, S., A. Zehnder-Fjällman, et K. Ballmer-Hofer. 2006. « The role of VEGF receptors in angiogenesis; complex partnerships ». *Cellular and Molecular Life Sciences* 63 (5): 601-15. doi:10.1007/s00018-005-5426-3.
- CHABANNES, Eric, Stéphane BERNARDINI, Hervé WALLERAND, et Hugues BITTARD. 2001. « L'angiogenèse dans les tumeurs vésicales: indicateur pronostique et cible thérapeutique ». *Progrès en Urologie* 11 (3). <http://www.urofrance.org/fileadmin/documents/data/PU/2001/PU-2001-00110417/TEXTF-PU-2001-00110417.PDF>.

- Chang, Yu-Ting, Ming-Chu Chang, Shu-Chen Wei, Yu-Wen Tien, Chiun Hsu, Po-Chin Liang, Po-Nien Tsao, I.-Shiow Jan, et Jau-Min Wong. 2008. « Serum Vascular Endothelial Growth Factor/Soluble Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1 Ratio Is an Independent Prognostic Marker in Pancreatic Cancer ». *Pancreas* 37 (2): 145-50. doi:10.1097/MPA.0b013e318164548a.
- Chatterjee, Sampurna, Lukas C. Heukamp, Maike Siobal, Jakob Schöttle, Caroline Wieczorek, Martin Peifer, Davide Frasca, et al. 2013. « Tumor VEGF:VEGFR2 Autocrine Feed-Forward Loop Triggers Angiogenesis in Lung Cancer ». *Journal of Clinical Investigation* 123 (4): 1732-40. doi:10.1172/JCI65385.
- Chen, Fang-An, Thomas Alosco, B. Anne Croy, K. Narumi, Dean H. Percy, et Richard B. Bankert. 1994. « Clones of Tumor Cells Derived from a Single Primary Human Lung Tumor Reveal Different Patterns of β_1 Integrin Expression ». *Cell Communication & Adhesion* 2 (4): 345-57. doi:10.3109/15419069409014209.
- Chen, Si, Yingxi Xu, Yanan Chen, Xuefei Li, Wenjun Mou, Lina Wang, Yanhua Liu, et al. 2012. « SOX2 Gene Regulates the Transcriptional Network of Oncogenes and Affects Tumorigenesis of Human Lung Cancer Cells ». Édité par Qian Tao. *PLoS ONE* 7 (5): e36326. doi:10.1371/journal.pone.0036326.
- Cheng, Haiying, Marina Shcherba, Gopichand Pendurti, Yuanxin Liang, Bilal Piperdi, et Roman Perez-Soler. 2014. « Targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway: potential for lung cancer treatment ». *Lung cancer management* 3 (1): 67-75. doi:10.2217/lmt.13.72.
- Choudhury, Amit, Michel Dominguez, Vishwajeet Puri, Deepak K. Sharma, Keishi Narita, Christine L. Wheatley, David L. Marks, et Richard E. Pagano. 2002. « Rab proteins mediate Golgi transport of caveola-internalized glycosphingolipids and correct lipid trafficking in Niemann-Pick C cells ». *The Journal of Clinical Investigation* 109 (12): 1541-50. doi:10.1172/JCI15420.
- Cianfrocca, M E, K A Kimmel, J Gallo, T Cardoso, M M Brown, G Hudes, N Lewis, et al. 2006. « Phase 1 trial of the antiangiogenic peptide ATN-161 (Ac-PHSCN-NH₂), a beta integrin antagonist, in patients with solid tumours ». *British Journal of Cancer* 94 (11): 1621-26. doi:10.1038/sj.bjc.6603171.
- Constantino Rosa Santos, Susana, Cláudia Miguel, Ines Domingues, Angelo Calado, Zhenping Zhu, Yan Wu, et Sérgio Dias. 2007. « VEGF and VEGFR-2 (KDR) Internalization Is Required for Endothelial Recovery during Wound Healing ». *Experimental Cell Research* 313 (8): 1561-74. doi:10.1016/j.yexcr.2007.02.020.
- Cooke, Vesselina G., Valerie S. LeBleu, Doruk Keskin, Zainab Khan, Joyce T. O'Connell, Yingqi Teng, Michael B. Duncan, et al. 2012. « Pericyte Depletion Results in Hypoxia-Associated Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Metastasis Mediated by Met Signaling Pathway ». *Cancer Cell* 21 (1): 66-81. doi:10.1016/j.ccr.2011.11.024.
- Cortot, Alexis B., et Pasi A. Jänne. 2014. « Molecular Mechanisms of Resistance in Epidermal Growth Factor Receptor-Mutant Lung Adenocarcinomas ». *European Respiratory Review: An Official Journal of the European Respiratory Society* 23 (133): 356-66. doi:10.1183/09059180.00004614.
- Costa, Daniel B., Balázs Halmos, Amit Kumar, Susan T. Schurer, Mark S. Huberman, Titus J. Boggon, Daniel G. Tenen, et Susumu Kobayashi. 2007. « BIM Mediates EGFR Tyrosine Kinase Inhibitor-Induced Apoptosis in Lung Cancers with Oncogenic EGFR Mutations ». *PLoS Medicine* 4 (10): 1669-1679; discussion 1680. doi:10.1371/journal.pmed.0040315.
- Couchman, John R. 2010. « Transmembrane Signaling Proteoglycans ». *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 26 (1): 89-114. doi:10.1146/annurev-cellbio-100109-104126.
- Couraud, Sébastien, Gérard Zalcman, Bernard Milleron, Franck Morin, et Pierre-Jean Souquet. 2012. « Lung Cancer in Never Smokers – A Review ». *European Journal of Cancer* 48 (9): 1299-1311. doi:10.1016/j.ejca.2012.03.007.

- Courtney, Kevin D., Ryan B. Corcoran, et Jeffrey A. Engelman. 2010. « The PI3K Pathway As Drug Target in Human Cancer ». *Journal of Clinical Oncology* 28 (6): 1075-83. doi:10.1200/JCO.2009.25.3641.
- Cranmer, L. D., A. Y. Bedikian, et A. Ribas. 2005. « Phase II study of volociximab (M200), an $\alpha 5\beta 1$ anti-integrin antibody in metastatic melanoma. 2005 ASCO Annual Meeting Proceedings Part I », janvier. <https://www.scienceopen.com/document?vid=1e95a460-758a-415c-aef3-24bed4ecd77d>.
- Crawford, Yongping, Ian Kasman, Lanlan Yu, Cuiling Zhong, Xiumin Wu, Zora Modrusan, Josh Kaminker, et Napoleone Ferrara. 2009. « PDGF-C Mediates the Angiogenic and Tumorigenic Properties of Fibroblasts Associated with Tumors Refractory to Anti-VEGF Treatment ». *Cancer Cell* 15 (1): 21-34. doi:10.1016/j.ccr.2008.12.004.
- Cruz, Charles S. Dela, Lynn T. Tanoue, et Richard A. Matthay. 2011. « Lung Cancer: Epidemiology, Etiology, and Prevention ». *Clinics in Chest Medicine* 32 (4): 605-44. doi:10.1016/j.ccm.2011.09.001.
- Cui, Tai-Gen, Rebecca R. Foster, Moin Saleem, Peter W. Mathieson, David A. Gillatt, David O. Bates, et Steven J. Harper. 2004. « Differentiated Human Podocytes Endogenously Express an Inhibitory Isoform of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF165b) mRNA and Protein ». *American Journal of Physiology - Renal Physiology* 286 (4): F767-73. doi:10.1152/ajprenal.00337.2003.

D

- Dacic, Sanja, Melina Flanagan, Kathleen Cieply, Suresh Ramalingam, James Luketich, Chandra Belani, et Samuel A. Yousem. 2006. « Significance of EGFR Protein Expression and Gene Amplification in Non-Small Cell Lung Carcinoma ». *American Journal of Clinical Pathology* 125 (6): 860-65. doi:10.1309/H5UW6CPCWWC92241.
- Dales, Jean-Philippe, Stéphane Garcia, Pascal Bonnier, Florence Dulfaud, Séverine Carpentier, Amina Djemli, Olivier Ramuz, et al. 2003. « Valeur pronostique de l'expression des recepteurs du VEGF, VEGFR-1 (FLT-1) et VEGFR-2 (KDR/FLK-1) dans le cancer du sein ». *Annales de pathologie* 23 (4): 297-305.
- D'Alessio, Silvia, et Francesco Blasi. 2009. « The Urokinase Receptor as an Entertainer of Signal Transduction ». *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)* 14: 4575-87.
- Dameron, Kristina M., Olga V. Volpert, Michael A. Tainsky, Noel Bouck, et others. 1994. « Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1 ». *SCIENCE-NEW YORK THEN WASHINGTON*-, 1582-1582.
- Darland, D. C., L. J. Massingham, S. R. Smith, E. Piek, M. Saint-Geniez, et P. A. D'Amore. 2003. « Pericyte Production of Cell-Associated VEGF Is Differentiation-Dependent and Is Associated with Endothelial Survival ». *Developmental Biology* 264 (1): 275-88.
- Davies, Helen, Graham R. Bignell, Charles Cox, Philip Stephens, Sarah Edkins, Sheila Clegg, Jon Teague, et al. 2002. « Mutations of the BRAF Gene in Human Cancer ». *Nature* 417 (6892): 949-54. doi:10.1038/nature00766.
- Davis-Smyth, T, H Chen, J Park, L G Presta, et N Ferrara. 1996. « The second immunoglobulin-like domain of the VEGF tyrosine kinase receptor Flt-1 determines ligand binding and may initiate a signal transduction cascade. » *The EMBO Journal* 15 (18): 4919-27.
- Davis-Smyth, Terri, Leonard G. Presta, et Napoleone Ferrara. 1998. « Mapping the Charged Residues in the Second Immunoglobulin-like Domain of the Vascular Endothelial Growth Factor/Placenta

- Growth Factor Receptor Flt-1 Required for Binding and Structural Stability ». *Journal of Biological Chemistry* 273 (6): 3216-22. doi:10.1074/jbc.273.6.3216.
- Delcombel, Romain, Lauriane Janssen, Roger Vassy, Melissa Gammons, Oualid Haddad, Benjamin Richard, Didier Letourneur, et al. 2012. « New Prospects in the Roles of the C-Terminal Domains of VEGF-A and Their Cooperation for Ligand Binding, Cellular Signaling and Vessels Formation ». *Angiogenesis* 16 (2): 353-71. doi:10.1007/s10456-012-9320-y.
- DeMaria, Christine T., et Gary Brewer. 1996. « AUF1 Binding Affinity to A+U-Rich Elements Correlates with Rapid mRNA Degradation ». *Journal of Biological Chemistry* 271 (21): 12179-84. doi:10.1074/jbc.271.21.12179.
- Denduluri, Neelima, Sherry X. Yang, Arlene W. Berman, Diana Nguyen, David J. Liewehr, Seth M. Steinberg, et Sandra M. Swain. 2008. « Circulating Biomarkers of Bevacizumab Activity in Patients with Breast Cancer ». *Cancer Biology & Therapy* 7 (1): 15-20. doi:10.4161/cbt.7.1.5337.
- Detterbeck, Frank C., Daniel J. Boffa, et Lynn T. Tanoue. 2009. « The New Lung Cancer Staging System ». *Chest* 136 (1): 260-71. doi:10.1378/chest.08-0978.
- Didkowska, Joanna, Urszula Wojciechowska, Marta Mańczuk, et Jakub Łobaszewski. 2016. « Lung cancer epidemiology: contemporary and future challenges worldwide ». *Annals of Translational Medicine* 4 (8). doi:10.21037/atm.2016.03.11.
- Dijke, Peter ten, et Helen M. Arthur. 2007. « Extracellular Control of TGF β Signalling in Vascular Development and Disease ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8 (11): 857-69. doi:10.1038/nrm2262.
- Ding, Manhua, Liang Liu, Chengxi Hu, Yi Liu, Yun Qiao, et Xiaodong Jiang. 2014. « Expression of VEGFR2 and NRP-1 in non-small cell lung cancer and their clinical significance ». *Chinese Journal of Cancer Research* 26 (6): 669.
- Doebele, R. C., P. Conkling, A. M. Traynor, G. A. Otterson, Y. Zhao, S. Wind, P. Stopfer, R. Kaiser, et D. R. Camidge. 2012. « A Phase I, Open-Label Dose-Escalation Study of Continuous Treatment with BIBF 1120 in Combination with Paclitaxel and Carboplatin as First-Line Treatment in Patients with Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer ». *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 23 (8): 2094-2102. doi:10.1093/annonc/mdr596.
- Domingues, Inês, José Rino, Jeroen A. A. Demmers, Primal de Lanerolle, et Susana Constantino Rosa Santos. 2011. « VEGFR2 Translocates to the Nucleus to Regulate Its Own Transcription ». Édité par Christiana Ruhrberg. *PLoS ONE* 6 (9): e25668. doi:10.1371/journal.pone.0025668.
- Dor, Yuval, Rinnat Porat, et Eli Keshet. 2001. « Vascular Endothelial Growth Factor and Vascular Adjustments to Perturbations in Oxygen Homeostasis ». *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 280 (6): C1367-74.
- Dowlati, Afshin, Robert Gray, Alan B. Sandler, Joan H. Schiller, et David H. Johnson. 2008. « Cell Adhesion Molecules, Vascular Endothelial Growth Factor, and Basic Fibroblast Growth Factor in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer Treated with Chemotherapy with or without Bevacizumab—an Eastern Cooperative Oncology Group Study ». *American Association for Cancer Research* 14 (5): 1407-12. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-1154.
- D'Souza-Schorey, Crislyn, et Philippe Chavrier. 2006. « ARF Proteins: Roles in Membrane Traffic and beyond ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 7 (5): 347-58. doi:10.1038/nrm1910.
- Duda, Dan G., Rakesh K. Jain, et Christopher G. Willett. 2007. « Antiangiogenics: The Potential Role of Integrating This Novel Treatment Modality With Chemoradiation for Solid Cancers ». *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* 25 (26): 4033-42. doi:10.1200/JCO.2007.11.3985.
- Duda, Dan G., Christopher G. Willett, Marek Ancukiewicz, Emmanuelle di Tomaso, Mira Shah, Brian G. Czito, Rex Bentley, et al. 2010. « Plasma Soluble VEGFR-1 Is a Potential Dual Biomarker of

- Response and Toxicity for Bevacizumab with Chemoradiation in Locally Advanced Rectal Cancer ». *The Oncologist* 15 (6): 577-83. doi:10.1634/theoncologist.2010-0029.
- Dutt, Amit, Alex H. Ramos, Peter S. Hammerman, Craig Mermel, Jeonghee Cho, Tanaz Sharifnia, Ajit Chande, et al. 2011. « Inhibitor-Sensitive FGFR1 Amplification in Human Non-Small Cell Lung Cancer ». *PLOS ONE* 6 (6): e20351. doi:10.1371/journal.pone.0020351.
- Dvorak, H. F., L. F. Brown, M. Detmar, et A. M. Dvorak. 1995. « Vascular Permeability Factor/Vascular Endothelial Growth Factor, Microvascular Hyperpermeability, and Angiogenesis ». *The American Journal of Pathology* 146 (5): 1029-39.

E

- Ebos, John M. L., Guido Bocci, Shan Man, Philip E. Thorpe, Daniel J. Hicklin, Danielle Zhou, Xiaohong Jia, et Robert S. Kerbel. 2004. « A Naturally Occurring Soluble Form of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 Detected in Mouse and Human Plasma ». Ontario Graduate Scholarship in Science and Technology (J.M.L. Ebos); Sunnybrook Trust for Medical Research (G. Bocci); and NIH Grant CA41223, Canadian Institutes for Health Research, and National Cancer Institute of Canada (R.S. Kerbel). » *American Association for Cancer Research* 2 (6): 315-26.
- Ebos, John M. L., Christina R. Lee, William Cruz-Munoz, Georg A. Bjarnason, James G. Christensen, et Robert S. Kerbel. 2009. « Accelerated Metastasis after Short-Term Treatment with a Potent Inhibitor of Tumor Angiogenesis ». *Cancer Cell* 15 (3): 232-39. doi:10.1016/j.ccr.2009.01.021.
- Eichmann, Anne, et Michael Simons. 2012. « VEGF Signaling inside Vascular Endothelial Cells and beyond ». *Current Opinion in Cell Biology* 24 (2): 188-93. doi:10.1016/j.ceb.2012.02.002.
- Ellis, Peter M., Rolf Kaiser, Yihua Zhao, Peter Stopfer, Steve Gyorffy, et Nasser Hanna. 2010. « Phase I Open-Label Study of Continuous Treatment with BIBF 1120, a Triple Angiokinase Inhibitor, and Pemetrexed in Pretreated Non-Small Cell Lung Cancer Patients ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 16 (10): 2881-89. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-2944.
- Elmén, Joacim, Morten Lindow, Asli Silahdaroglu, Mads Bak, Mette Christensen, Allan Lind-Thomsen, Maj Hedtjärn, et al. 2008. « Antagonism of microRNA-122 in Mice by Systemically Administered LNA-antimiR Leads to up-Regulation of a Large Set of Predicted Target mRNAs in the Liver ». *Nucleic Acids Research* 36 (4): 1153-62. doi:10.1093/nar/gkm1113.
- Eming, Sabine A., Gereon Lauer, Melanie Cole, Sandra Jurk, Hildegard Christ, Carsten Hornig, Thomas Krieg, et Herbert A. Weich. 2004. « Increased levels of the soluble variant of the vascular endothelial growth factor receptor VEGFR-1 are associated with a poor prognosis in wound healing ». *Journal of investigative dermatology* 123 (4): 799-802.
- Engelman, Jeffrey A., Kreshnik Zejnullahu, Tetsuya Mitsudomi, Youngchul Song, Courtney Hyland, Joon Oh Park, Neal Lindeman, et al. 2007. « MET Amplification Leads to Gefitinib Resistance in Lung Cancer by Activating ERBB3 Signaling ». *Science* 316 (5827): 1039-43. doi:10.1126/science.1141478.
- Esau, Christine, Xiaolin Kang, Eigen Peralta, Elaine Hanson, Eric G. Marcusson, Lingamanaidu V. Ravichandran, Yingqing Sun, et al. 2004. « MicroRNA-143 Regulates Adipocyte Differentiation ». *Journal of Biological Chemistry* 279 (50): 52361-65. doi:10.1074/jbc.C400438200.
- Ezponda, Teresa, María J. Pajares, Jackeline Agorreta, José I. Echeveste, José M. López-Picazo, Wenceslao Torre, Ruben Pio, et Luis M. Montuenga. 2010. « The Oncoprotein SF2/ASF

- Promotes Non-Small Cell Lung Cancer Survival by Enhancing Survivin Expression ». *Clinical Cancer Research* 16 (16): 4113-25. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-0076.
- Ezzati, Majid, et Alan D. Lopez. 2003. « Estimates of Global Mortality Attributable to Smoking in 2000 ». *Lancet* (London, England) 362 (9387): 847-52. doi:10.1016/S0140-6736(03)14338-3.
- Faivre, Sandrine, George Demetri, William Sargent, et Eric Raymond. 2007. « Molecular Basis for Sunitinib Efficacy and Future Clinical Development ». *Nature Reviews Drug Discovery* 6 (9): 734-45. doi:10.1038/nrd2380.

F

- Fan, H, et R Derynck. 1999. « Ectodomain shedding of TGF- α and other transmembrane proteins is induced by receptor tyrosine kinase activation and MAP kinase signaling cascades. » *The EMBO Journal* 18 (24): 6962-72. doi:10.1093/emboj/18.24.6962.
- Fan, XiuJun, Anshita Rai, Neeraja Kambham, Joyce F. Sung, Nirbhai Singh, Matthew Petitt, Sabita Dhal, et al. 2014. « Endometrial VEGF Induces Placental sFLT1 and Leads to Pregnancy Complications ». *Journal of Clinical Investigation* 124 (11): 4941-52. doi:10.1172/JCI76864.
- Fayette, J., B. Fleury, et J.-Y. Blay. 2008. « Nouvelles approches dans les thérapies ciblées: les récepteurs des facteurs de croissance de type insuline (IGF) et les cyclines ». In *Les thérapies ciblées*, 157-68. *Oncologie pratique*. Springer Paris. doi:10.1007/978-2-287-36008-4_11.
- Ferone, Giustina, Ji-Ying Song, Kate D. Sutherland, Rajith Bhaskaran, Kim Monkhorst, Jan-Paul Lambooij, Natalie Proost, Gaetano Gargiulo, et Anton Berns. 2016. « SOX2 Is the Determining Oncogenic Switch in Promoting Lung Squamous Cell Carcinoma from Different Cells of Origin ». *Cancer Cell* 30 (4): 519-532.
- Ferrara, Napoleone. 2004a. « Vascular Endothelial Growth Factor: Basic Science and Clinical Progress ». *Endocrine Reviews* 25 (4): 581-611. doi:10.1210/er.2003-0027.
- . 2004b. « Vascular Endothelial Growth Factor: Basic Science and Clinical Progress ». *Endocrine Reviews* 25 (4): 581-611. doi:10.1210/er.2003-0027.
- . 2010. « Vascular Endothelial Growth Factor and Age-Related Macular Degeneration: From Basic Science to Therapy ». *Nature Medicine* 16 (10): 1107-11. doi:10.1038/nm1010-1107.
- Ferrara, Napoleone, et Terri Davis-Smyth. 2011. « The Biology of Vascular Endothelial Growth Factor ». *Endocrine Reviews*, avril. <http://press.endocrine.org.gate2.inist.fr/doi/full/10.1210/edrv.18.1.0287>.
- Folkman, J., et D. Hanahan. 1991. « Switch to the Angiogenic Phenotype during Tumorigenesis ». *Princess Takamatsu Symposia* 22: 339-47.
- Folkman, Judah. 2007. « Angiogenesis: An Organizing Principle for Drug Discovery? » *Nature Reviews Drug Discovery* 6 (4): 273-86. doi:10.1038/nrd2115.
- . 2010. « Tumor Angiogenesis: Therapeutic Implications ». *Review-article*. [Http://dx.doi.org.gate2.inist.fr/10.1056/NEJM197111182852108](http://dx.doi.org.gate2.inist.fr/10.1056/NEJM197111182852108). janvier 14. <http://www.nejm.org.gate2.inist.fr/doi/full/10.1056/NEJM197111182852108>.
- Fong, Guo-Hua, Janet Rossant, Marina Gertsenstein, et Martin L. Breitman. 1995. « Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium ». *Nature* 376 (6535): 66-70. doi:10.1038/376066a0.
- Forbes, Simon A., Nidhi Bindal, Sally Bamford, Charlotte Cole, Chai Yin Kok, David Beare, Mingming Jia, et al. 2011. « COSMIC: Mining Complete Cancer Genomes in the Catalogue of Somatic

- Mutations in Cancer ». *Nucleic Acids Research* 39 (Database issue): D945-950. doi:10.1093/nar/gkq929.
- Forsythe, J. A., B. H. Jiang, N. V. Iyer, F. Agani, S. W. Leung, R. D. Koos, et G. L. Semenza. 1996. « Activation of Vascular Endothelial Growth Factor Gene Transcription by Hypoxia-Inducible Factor 1. » *Molecular and Cellular Biology* 16 (9): 4604-13. doi:10.1128/MCB.16.9.4604.
- Foshay, Kara M., et G. Ian Gallicano. 2008. « Regulation of Sox2 by STAT3 Initiates Commitment to the Neural Precursor Cell Fate ». *Stem Cells and Development* 17 (2): 269-78. doi:10.1089/scd.2007.0098.
- Fuh, G., K. C. Garcia, et A. M. de Vos. 2000. « The Interaction of Neuropilin-1 with Vascular Endothelial Growth Factor and Its Receptor Flt-1 ». *The Journal of Biological Chemistry* 275 (35): 26690-95. doi:10.1074/jbc.M003955200.
- Fukasawa, Mitsuharu, Akira Matsushita, et Murray Korc. 2007. « Neuropilin-1 Interacts with Integrin $\beta 1$ and Modulates Pancreatic Cancer Cell Growth, Survival and Invasion ». *Cancer Biology & Therapy* 6 (8): 1184-91. doi:10.4161/cbt.6.8.4363.

G

- Gao, Y. T., W. J. Blot, W. Zheng, A. G. Ershow, C. W. Hsu, L. I. Levin, R. Zhang, et J. F. Fraumeni. 1987. « Lung Cancer among Chinese Women ». *International Journal of Cancer* 40 (5): 604-9.
- Gelfand, Maria V., Nellwyn Hagan, Aleksandra Tata, Won-Jong Oh, Baptiste Lacoste, Kyu-Tae Kang, Justyna Kopycinska, Joyce Bischoff, Jia-Huai Wang, et Chenghua Gu. 2014. « Neuropilin-1 Functions as a VEGFR2 Co-Receptor to Guide Developmental Angiogenesis Independent of Ligand Binding ». *eLife* 3 (septembre): e03720. doi:10.7554/eLife.03720.
- Gerber, Hans-Peter, Fabrizio Condorelli, Jeanie Park, et Napoleone 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 ». *Journal of Biological Chemistry* 272 (38): 23659-67. doi:10.1074/jbc.272.38.23659.
- Geretti, Elena, Akio Shimizu, et Michael Klagsbrun. 2008. « Neuropilin Structure Governs VEGF and Semaphorin Binding and Regulates Angiogenesis ». *Angiogenesis* 11 (1): 31-39. doi:10.1007/s10456-008-9097-1.
- Gerstner, Elizabeth Robins, Kyrre E. Emblem, Andrew S. Chi, April F. Eichler, Fred Hochberg, Jan Drappatz, Eudocia Carmen Quant, et al. 2012. « Effects of cediranib, a VEGF signaling inhibitor, in combination with chemoradiation on tumor blood flow and survival in newly diagnosed glioblastoma ». *Journal of Clinical Oncology* 30 (suppl; abstr 2009). <http://meetinglibrary.asco.org/content/94368-114>.
- Ghosh, Sriparna, Catherine A.W. Sullivan, Maciej P. Zerkowski, Annette M. Molinaro, David L. Rimm, Robert L. Camp, et Gina G. Chung. 2008. « High Levels of Vascular Endothelial Growth Factor and Its Receptors (VEGFR-1, VEGFR-2, Neuropilin-1) Are Associated with Worse Outcome in Breast Cancer ». *Human Pathology* 39 (12): 1835-43. doi:10.1016/j.humpath.2008.06.004.
- Gingerich, Timothy J., Jean-Jacques Feige, et Jonathan LaMarre. 2004. « AU-rich elements and the control of gene expression through regulated mRNA stability ». *Animal Health Research Reviews* 5 (1): 49-63. doi:10.1079/AHRR200460.
- Gitay-Goren, Hela, Tzafra Cohen, Shoshana Tessler, Shay Soker, Stela Gengrinovitch, Patricia Rockwell, Michael Klagsbrun, Ben-Zion Levi, et Gera Neufeld. 1996. « Selective Binding of VEGF to One

- of the Three Vascular Endothelial Growth Factor Receptors of Vascular Endothelial Cells ». *Journal of Biological Chemistry* 271 (10): 5519-23. doi:10.1074/jbc.271.10.5519.
- Gluzman-Poltorak, Zoya, Tzafr Cohen, Yael Herzog, et Gera Neufeld. 2000. « Neuropilin-2 and Neuropilin-1 Are Receptors for the 165-Amino Acid Form of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and of Placenta Growth Factor-2, but Only Neuropilin-2 Functions as a Receptor for the 145-Amino Acid Form of VEGF ». *Journal of Biological Chemistry* 275 (24): 18040-45. doi:10.1074/jbc.M909259199.
- Goel, Hira Lal, Cheng Chang, Bryan Pursell, Irwin Leav, Stephen Lyle, Hualin Simon Xi, Chung-Cheng Hsieh, et al. 2012. « VEGF/neuropilin-2 regulation of Bmi-1 and consequent repression of IGF-IR define a novel mechanism of aggressive prostate cancer ». *Cancer discovery* 2 (10): 906-921.
- Goel, Hira Lal, et Arthur M. Mercurio. 2013a. « VEGF targets the tumour cell ». *Nature Reviews Cancer* 13 (12): 871-82. doi:10.1038/nrc3627.
- . 2013b. « VEGF targets the tumour cell ». *Nature Reviews Cancer* 13 (12): 871-82. doi:10.1038/nrc3627.
- Goh, Lai Kuan, et Alexander Sorkin. 2013. « Endocytosis of receptor tyrosine kinases ». *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 5 (5): a017459.
- Goldman, Corey K., Richard L. Kendall, Gustavo Cabrera, Liliana Soroceanu, Yuji Heike, G. Yancey Gillespie, Gene P. Siegal, et al. 1998a. « Paracrine Expression of a Native Soluble Vascular Endothelial Growth Factor Receptor Inhibits Tumor Growth, Metastasis, and Mortality Rate ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95 (15): 8795-8800.
- . 1998b. « Paracrine Expression of a Native Soluble Vascular Endothelial Growth Factor Receptor Inhibits Tumor Growth, Metastasis, and Mortality Rate ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95 (15): 8795-8800.
- Goldstraw, Peter, Kari Chansky, John Crowley, Ramon Rami-Porta, Hisao Asamura, Wilfried E. Eberhardt, Andrew G. Nicholson, et al. 2016. « The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals for Revision of the TNM Stage Groupings in the Forthcoming (Eighth) Edition of the TNM Classification for Lung Cancer ». *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 11 (1): 39-51. doi:10.1016/j.jtho.2015.09.009.
- Gorgoni, Barbara, et Nicola K. Gray. 2004. « The Roles of Cytoplasmic poly(A)-Binding Proteins in Regulating Gene Expression: A Developmental Perspective ». *Briefings in Functional Genomics & Proteomics* 3 (2): 125-41. doi:10.1093/bfpg/3.2.125.
- Goss, Glenwood D., Andrew Arnold, Frances A. Shepherd, Mircea Dediu, Tudor-Eliade Ciuleanu, David Fenton, Mauro Zukin, et al. 2010. « Randomized, Double-Blind Trial of Carboplatin and Paclitaxel with Either Daily Oral Cediranib or Placebo in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer: NCIC Clinical Trials Group BR24 Study ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 28 (1): 49-55. doi:10.1200/JCO.2009.22.9427.
- Govindan, Ramaswamy, Jeffrey Bogart, Thomas Stinchcombe, Xiaofei Wang, Lydia Hodgson, Robert Kratzke, Jennifer Garst, Timothy Brotherton, et Everett E. Vokes. 2011. « Randomized phase II study of pemetrexed, carboplatin, and thoracic radiation with or without cetuximab in patients with locally advanced unresectable non-small-cell lung cancer: Cancer and Leukemia Group B trial 30407 ». *Journal of Clinical Oncology* 29 (23): 3120-3125.
- Gressett, Sarah M., et Sachin R. Shah. 2009. « Intricacies of bevacizumab-induced toxicities and their management ». *Annals of Pharmacotherapy* 43 (3): 490-500.
- Grosskreutz, Cynthia L., Bela Anand-Apte, Cécile Dupl  a, Timothy P. Quinn, Bruce I. Terman, Bruce Zetter, et Patricia A. D'Amore. 1999. « Vascular Endothelial Growth Factor-Induced Migration

- of Vascular Smooth Muscle Cells in Vitro ». *Microvascular Research* 58 (2): 128-36. doi:10.1006/mvre.1999.2171.
- Grünewald, Felix S., Andrea E. Prota, Alexandra Giese, et Kurt Ballmer-Hofer. 2010. « Structure–function Analysis of VEGF Receptor Activation and the Role of Coreceptors in Angiogenic Signaling ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1804 (3): 567-80. doi:10.1016/j.bbapap.2009.09.002.
- Grunstein, Jeremy, Joseph J. Masbad, Reed Hickey, Frank Giordano, et Randall S. Johnson. 2000. « Isoforms of Vascular Endothelial Growth Factor Act in a Coordinate Fashion To Recruit and Expand Tumor Vasculature ». *Molecular and Cellular Biology* 20 (19): 7282-91. doi:10.1128/MCB.20.19.7282-7291.2000.
- Guerrin, Marina, Hafida Moukadiri, Pascale Chollet, Françoise Moro, Kamla Dutt, François Malecaze, et Jean Plouët. 1995. « Vasculotropin/Vascular Endothelial Growth Factor Is an Autocrine Growth Factor for Human Retinal Pigment Epithelial Cells Cultured in Vitro: AUTOCRINE ACTIVITY OF VASNEGF ». *Journal of Cellular Physiology* 164 (2): 385-94. doi:10.1002/jcp.1041640219.

H

- Hamerlik, Petra, Justin D. Lathia, Rikke Rasmussen, Qiulian Wu, Jirina Bartkova, MyungHee Lee, Pavel Moudry, et al. 2012. « Autocrine VEGF–VEGFR2–Neuropilin-1 signaling promotes glioma stem-like cell viability and tumor growth ». *The Journal of experimental medicine* 209 (3): 507–520.
- Hanahan, Douglas, et Robert A. Weinberg. 2011. « Hallmarks of Cancer: The Next Generation ». *Cell* 144 (5): 646-74. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013.
- Harris, Adrian L., Petra Reusch, Bernhard Barleon, Cheng Hang, Nicola Dobbs, et Dieter Marme. 2001. « Soluble Tie2 and Flt1 Extracellular Domains in Serum of Patients with Renal Cancer and Response to Antiangiogenic Therapy ». *Clinical Cancer Research* 7 (7): 1992-97.
- Hart, Matthew J., Marinella G. Callow, Brian Souza, et Paul Polakis. 1996. « IQGAP1, a calmodulin-binding protein with a rasGAP-related domain, is a potential effector for cdc42Hs. » *The EMBO journal* 15 (12): 2997.
- Hartsough, Edward J., Rosana D. Meyer, Vipul Chitalia, Yan Jiang, Victor E. Marquez, Irina V. Zhdanova, Janice Weinberg, Catherine E. Costello, et Nader Rahimi. 2013. « Lysine methylation promotes VEGFR-2 activation and angiogenesis ». *Science signaling* 6 (304): ra104.
- Hashimoto, Takehisa, Yoshio Tokuchi, Moriaki Hayashi, Yasuhito Kobayashi, Kazunori Nishida, Shin-ichi Hayashi, Yuichi Ishikawa, Ken Nakagawa, Jun-ichi Hayashi, et Eiju Tsuchiya. 2000. « Different Subtypes of Human Lung Adenocarcinoma Caused by Different Etiological Factors ». *The American Journal of Pathology* 157 (6): 2133-41.
- Hazarika, Surovi, Ayotunde O. Dokun, Yongjun Li, Aleksander S. Popel, Christopher D. Kontos, et Brian H. Annex. 2007. « Impaired Angiogenesis after Hindlimb Ischemia in Type 2 Diabetes Mellitus: Differential Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1 and Soluble Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1 ». *Circulation Research* 101 (9): 948-56. doi:10.1161/CIRCRESAHA.107.160630.
- Hecht, Stephen S. 1999. « Tobacco Smoke Carcinogens and Lung Cancer ». *Journal of the National Cancer Institute* 91 (14): 1194-1210. doi:10.1093/jnci/91.14.1194.
- Heim, Astrid, Christina Grimm, Udo Müller, Simon Häußler, Mukram M. Mackeen, Juliane Merl, Stefanie M. Hauck, et al. 2014. « Jumonji domain containing protein 6 (Jmjd6) modulates

- splicing and specifically interacts with arginine–serine-rich (RS) domains of SR-and SR-like proteins ». *Nucleic acids research*, gku488.
- Heist, Rebecca S., Dan G. Duda, Dushyant V. Sahani, Marek Ancukiewicz, Panos Fidas, Lecia V. Sequist, Jennifer S. Temel, et al. 2015a. « Improved tumor vascularization after anti-VEGF therapy with carboplatin and nab-paclitaxel associates with survival in lung cancer ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112 (5): 1547–52. doi:10.1073/pnas.1424024112.
- . 2015b. « Improved tumor vascularization after anti-VEGF therapy with carboplatin and nab-paclitaxel associates with survival in lung cancer ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112 (5): 1547–52. doi:10.1073/pnas.1424024112.
- Heist, Rebecca Suk, Rihong Zhai, Geoffrey Liu, Wei Zhou, Xihong Lin, Li Su, Kofi Asomaning, Thomas J. Lynch, John C. Wain, et David C. Christiani. 2008. « VEGF Polymorphisms and Survival in Early-Stage Non–Small-Cell Lung Cancer ». *Journal of Clinical Oncology* 26 (6): 856–62. doi:10.1200/JCO.2007.13.5947.
- Herbst, Roy S., Rafat Ansari, Frederique Bustin, Patrick Flynn, Lowell Hart, Gregory A. Otterson, Gordana Vlahovic, Chang-Heok Soh, Paula O'Connor, et John Hainsworth. 2011. « Efficacy of Bevacizumab plus Erlotinib versus Erlotinib Alone in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer after Failure of Standard First-Line Chemotherapy (BeTa): A Double-Blind, Placebo-Controlled, Phase 3 Trial ». *Lancet (London, England)* 377 (9780): 1846–54. doi:10.1016/S0140-6736(11)60545-X.
- Herbst, Roy S., Amir Onn, et Alan Sandler. 2005. « Angiogenesis and Lung Cancer: Prognostic and Therapeutic Implications ». *Journal of Clinical Oncology* 23 (14): 3243–56. doi:10.1200/JCO.2005.18.853.
- Herbst, Roy S., Yan Sun, Wilfried E. E. Eberhardt, Paul Germonpré, Nagahiro Saijo, Caicun Zhou, Jie Wang, et al. 2010. « Vandetanib plus Docetaxel versus Docetaxel as Second-Line Treatment for Patients with Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer (ZODIAC): A Double-Blind, Randomised, Phase 3 Trial ». *The Lancet. Oncology* 11 (7): 619–26. doi:10.1016/S1470-2045(10)70132-7.
- Heydarian, M., T. McCaffrey, L. Florea, Z. Yang, M.M. Ross, W. Zhou, et S.E. Maynard. 2009. « Novel Splice Variants of sFlt1 Are Upregulated in Preeclampsia ». *Placenta* 30 (3): 250–55. doi:10.1016/j.placenta.2008.12.010.
- Hicklin, Daniel J., et Lee M. Ellis. 2005. « Role of the Vascular Endothelial Growth Factor Pathway in Tumor Growth and Angiogenesis ». *Journal of Clinical Oncology* 23 (5): 1011–27. doi:10.1200/JCO.2005.06.081.
- Hiratsuka, Sachie, Osamu Minowa, Junko Kuno, Tetsuo Noda, et Masabumi Shibuya. 1998. « Flt-1 Lacking the Tyrosine Kinase Domain Is Sufficient for Normal Development and Angiogenesis in Mice ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95 (16): 9349–54.
- Hirsch, Fred R., Marileila Varella-Garcia, Paul A. Bunn, Michael V. Di Maria, Robert Veve, Roy M. Bremmes, Anna E. Barón, Chan Zeng, et Wilbur A. Franklin. 2003. « Epidermal Growth Factor Receptor in Non-Small-Cell Lung Carcinomas: Correlation between Gene Copy Number and Protein Expression and Impact on Prognosis ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 21 (20): 3798–3807. doi:10.1200/JCO.2003.11.069.
- Hodi, F. Stephen, Steven J. O'Day, David F. McDermott, Robert W. Weber, Jeffrey A. Sosman, John B. Haanen, Rene Gonzalez, et al. 2010. « Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma ». *New England Journal of Medicine* 363 (8): 711–23. doi:10.1056/NEJMoa1003466.
- Hoff, Paulo M., Robert A. Wolff, Karla Bogaard, Sherry Waldrum, et James L. Abbruzzese. 2006. « A Phase I study of escalating doses of the tyrosine kinase inhibitor semaxanib (SU5416) in

- combination with irinotecan in patients with advanced colorectal carcinoma ». *Japanese journal of clinical oncology* 36 (2): 100–103.
- Holash, Jocelyn, Sam Davis, Nick Papadopoulos, Susan D. Croll, Lillian Ho, Michelle Russell, Patricia Boland, et al. 2002. « VEGF-Trap: A VEGF Blocker with Potent Antitumor Effects ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (17): 11393–98. doi:10.1073/pnas.172398299.
- Hollander, M. Christine, Gideon M. Blumenthal, et Phillip A. Dennis. 2011. « PTEN Loss in the Continuum of Common Cancers, Rare Syndromes and Mouse Models ». *Nature Reviews Cancer* 11 (4): 289–301. doi:10.1038/nrc3037.
- Holmes, David IR, et Ian Zachary. 2005. « The vascular endothelial growth factor (VEGF) family: angiogenic factors in health and disease ». *Genome Biology* 6: 209. doi:10.1186/gb-2005-6-2-209.
- Holmqvist, Kristina, Michael. J. Cross, Charlotte Rolny, Robert Hägerkvist, Nader Rahimi, Taro Matsumoto, Lena Claesson-Welsh, et Michael Welsh. 2004. « The Adaptor Protein Shb Binds to Tyrosine 1175 in Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Receptor-2 and Regulates VEGF-Dependent Cellular Migration ». *Journal of Biological Chemistry* 279 (21): 22267–75. doi:10.1074/jbc.M312729200.
- Holmqvist, Kristina, Michael Cross, Debbie Riley, et Michael Welsh. 2003. « The Shb Adaptor Protein Causes Src-Dependent Cell Spreading and Activation of Focal Adhesion Kinase in Murine Brain Endothelial Cells ». *Cellular Signalling* 15 (2): 171–79. doi:10.1016/S0898-6568(02)00076-1.
- Hornig, C., B. Barleon, S. Ahmad, P. Vuorela, A. Ahmed, et H. A. Weich. 2000. « Release and Complex Formation of Soluble VEGFR-1 from Endothelial Cells and Biological Fluids ». *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology* 80 (4): 443–54.
- Hornig, Carsten, Bernhard Barleon, Shakil Ahmad, Piia Vuorela, Asif Ahmed, et Herbert A. Weich. 2000. « Release and Complex Formation of Soluble VEGFR-1 from Endothelial Cells and Biological Fluids ». *Laboratory Investigation* 80 (4): 443–54. doi:10.1038/labinvest.3780050.
- Houck, K. A., D. W. Leung, A. M. Rowland, J. Winer, et N. Ferrara. 1992. « Dual Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor Bioavailability by Genetic and Proteolytic Mechanisms. » *Journal of Biological Chemistry* 267 (36): 26031–37.
- Houck, Keith A., Napoleone Ferrara, Jane Winer, George Cachianes, Bing Li, et David W. Leung. 1991. « The Vascular Endothelial Growth Factor Family: Identification of a Fourth Molecular Species and Characterization of Alternative Splicing of RNA ». *Molecular Endocrinology* 5 (12): 1806–14. doi:10.1210/mend-5-12-1806.
- Huang, Yanyan. 2011. « RNA interference targeting NRP-1 inhibits human glioma cell proliferation and enhances cell apoptosis ». *Molecular Medicine Reports*, août. doi:10.3892/mmr.2011.550.
- Huez, Isabelle, Stéphanie Bornes, Damien Bresson, Laurent Créancier, et Hervé Prats. 2001. « New Vascular Endothelial Growth Factor Isoform Generated by Internal Ribosome Entry Site-Driven CUG Translation Initiation ». *Molecular Endocrinology* 15 (12): 2197–2210. doi:10.1210/mend.15.12.0738.
- Hurwitz, Herbert, Louis Fehrenbacher, William Novotny, Thomas Cartwright, John Hainsworth, William Heim, Jordan Berlin, et al. 2004. « Bevacizumab plus Irinotecan, Fluorouracil, and Leucovorin for Metastatic Colorectal Cancer ». *New England Journal of Medicine* 350 (23): 2335–42. doi:10.1056/NEJMoa032691.
- Hussenet, Thomas, Soraya Dali, Julien Exinger, Ben Monga, Bernard Jost, Doulaye Dembelé, Nadine Martinet, et al. 2010. « SOX2 Is an Oncogene Activated by Recurrent 3q26.3 Amplifications in Human Lung Squamous Cell Carcinomas ». Édité par Alexander Idnurm. *PLoS ONE* 5 (1): e8960. doi:10.1371/journal.pone.0008960.
- Hynes, Richard O. 2002. « Integrins ». *Cell* 110 (6): 673–87. doi:10.1016/S0092-8674(02)00971-6.

I

- Igarashi, Katsuhide, Toshio Isohara, Toshiaki Kato, Keiko Shigeta, Tomoka Yamano, et Isao Uno. 1998. « Tyrosine 1213 of Flt-1 Is a Major Binding Site of Nck and SHP-2 ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 246 (1): 95-99. doi:10.1006/bbrc.1998.8578.
- Ikeda, Takayuki, Li Sun, Naoki Tsuruoka, Yasuhito Ishigaki, Yasuo Yoshitomi, Yoshino Yoshitake, et Hideto Yonekura. 2011. « Hypoxia down-regulates sFlt-1 (sVEGFR-1) expression in human microvascular endothelial cells by a mechanism involving mRNA alternative processing ». *Biochemical Journal* 436 (Pt 2): 399-407. doi:10.1042/BJ20101490.
- Ilhan, Nevin, Necip Ilhan, et Figen Deveci. 2004. « Functional Significance of Vascular Endothelial Growth Factor and Its Receptor (Receptor-1) in Various Lung Cancer Types ». *Clinical Biochemistry* 37 (9): 840-45. doi:10.1016/j.clinbiochem.2004.03.012.
- Inoue, Toshiya, Keiko Kibata, Motoyuki Suzuki, Shuji Nakamura, Ryuichi Motoda, et Kunzo Orita. 2000. « Identification of a Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Antagonist, sFlt-1, from a Human Hematopoietic Cell Line NALM-16 ». *FEBS Letters* 469 (1): 14-18. doi:10.1016/S0014-5793(00)01246-1.
- Ishida, Atsushi, Jacqueline Murray, Yuji Saito, Chryso Kanthou, Omar Benzakour, Masabumi Shibuya, et Errol S. Wijelath. 2001. « Expression of Vascular Endothelial Growth Factor Receptors in Smooth Muscle Cells ». *Journal of Cellular Physiology* 188 (3): 359-68. doi:10.1002/jcp.1121.
- Ito, Nobuyuki, Christer Wernstedt, Ulla Engström, et Lena Claesson-Welsh. 1998. « Identification of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 Tyrosine Phosphorylation Sites and Binding of SH2 Domain-Containing Molecules ». *Journal of Biological Chemistry* 273 (36): 23410-18. doi:10.1074/jbc.273.36.23410.

J

- Jain, Rakesh K. 2001. « Normalizing Tumor Vasculature with Anti-Angiogenic Therapy: A New Paradigm for Combination Therapy ». *Nature Medicine* 7 (9): 987-89. doi:10.1038/nm0901-987.
- . 2005. « Normalization of Tumor Vasculature: An Emerging Concept in Antiangiogenic Therapy ». *Science* 307 (5706): 58-62. doi:10.1126/science.1104819.
- Jakeman, Lyn B., J. Winer, G. L. Bennett, C. A. Altar, et N. Ferrara. 1992. « Binding sites for vascular endothelial growth factor are localized on endothelial cells in adult rat tissues. » *Journal of Clinical Investigation* 89 (1): 244.
- Jarvis, Ashley, Charles K. Allerton, Haiyan Jia, Birger Herzog, Acely Garza-Garcia, Natalie Winfield, Katie Ellard, et al. 2010. « Small Molecule Inhibitors of the Neuropilin-1 Vascular Endothelial Growth Factor A (VEGF-A) Interaction ». *Journal of Medicinal Chemistry* 53 (5): 2215-26. doi:10.1021/jm901755g.
- Ji, Hongbin, Xiaojun Zhao, Yuki Yuza, Takeshi Shimamura, Danan Li, Alexei Protopopov, Boonim L. Jung, et al. 2006. « Epidermal Growth Factor Receptor Variant III Mutations in Lung

- Tumorigenesis and Sensitivity to Tyrosine Kinase Inhibitors ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (20): 7817-22. doi:10.1073/pnas.0510284103.
- Ji, Junfang, Jiong Shi, Anuradha Budhu, Zhipeng Yu, Marshonna Forgues, Stephanie Roessler, Stefan Ambs, et al. 2009. « MicroRNA Expression, Survival, and Response to Interferon in Liver Cancer ». *The New England Journal of Medicine* 361 (15): 1437-47. doi:10.1056/NEJMoa0901282.
- Jia, Rong. 2010. « SRp20 Is a Proto-Oncogene Critical for Cell Proliferation and Tumor Induction and Maintenance ». *International Journal of Biological Sciences*, 806-26. doi:10.7150/ijbs.6.806.
- Jin, Guang, Min Jung Kim, Hyo-Sung Jeon, Jin Eun Choi, Dong Sun Kim, Eung Bae Lee, Sung Ick Cha, et al. 2010. « PTEN Mutations and Relationship to EGFR, ERBB2, KRAS, and TP53 Mutations in Non-Small Cell Lung Cancers ». *Lung Cancer* 69 (3): 279-83. doi:10.1016/j.lungcan.2009.11.012.
- Jin, Jing, Karen Sison, Chengjin Li, Ruijun Tian, Monika Wnuk, Hoon-Ki Sung, Marie Jeansson, et al. 2012. « Soluble FLT1 Binds Lipid Microdomains in Podocytes to Control Cell Morphology and Glomerular Barrier Function ». *Cell* 151 (2): 384-99. doi:10.1016/j.cell.2012.08.037.
- Jingjing, L., Y. Xue, N. Agarwal, et R. S. Roque. 1999. « Human Müller cells express VEGF183, a novel spliced variant of vascular endothelial growth factor. » *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 40 (3): 752-59.
- Johnson, David H., Louis Fehrenbacher, William F. Novotny, Roy S. Herbst, John J. Nemunaitis, David M. Jablons, Corey J. Langer, et al. 2004. « Randomized Phase II Trial Comparing Bevacizumab Plus Carboplatin and Paclitaxel With Carboplatin and Paclitaxel Alone in Previously Untreated Locally Advanced or Metastatic Non-Small-Cell Lung Cancer ». *Journal of Clinical Oncology* 22 (11): 2184-91. doi:10.1200/JCO.2004.11.022.
- Johnson, Louise N. 2009. « Protein Kinase Inhibitors: Contributions from Structure to Clinical Compounds ». *Quarterly Reviews of Biophysics* 42 (1): 1-40. doi:10.1017/S0033583508004745.
- Joyce, Johanna A., et Jeffrey W. Pollard. 2009. « Microenvironmental Regulation of Metastasis ». *Nature Reviews Cancer* 9 (4): 239-52. doi:10.1038/nrc2618.
- Jubb, Adrian M., Kathy D. Miller, Hope S. Rugo, Adrian L. Harris, Dafeng Chen, James D. Reimann, Melody A. Cobleigh, et al. 2011. « Impact of Exploratory Biomarkers on the Treatment Effect of Bevacizumab in Metastatic Breast Cancer ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 17 (2): 372-81. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-1791.
- Jung, Jae-Joon, Ajit Tiwari, Shivangi M. Inamdar, Christie P. Thomas, Apollina Goel, et Amit Choudhury. 2012. « Secretion of Soluble Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1 (sVEGFR1/sFlt1) Requires Arf1, Arf6, and Rab11 GTPases ». *PLoS ONE* 7 (9). doi:10.1371/journal.pone.0044572.

K

- Kangsamaksin, T., A. Murtomaki, N. M. Kofler, H. Cuervo, R. A. Chaudhri, I. W. Tattersall, P. E. Rosenstiel, C. J. Shawber, et J. Kitajewski. 2015. « NOTCH Decoys That Selectively Block DLL/NOTCH or JAG/NOTCH Disrupt Angiogenesis by Unique Mechanisms to Inhibit Tumor Growth ». *Cancer Discovery* 5 (2): 182-97. doi:10.1158/2159-8290.CD-14-0650.
- Kanno, Shinichi, Nobuyuki Oda, Mayumi Abe, Yoshito Terao, Mikito Ito, Kenya Shitara, Koichi Tabayashi, Masabumi Shibuya, et Yasufumi Sato. 2000. « Roles of two VEGF receptors, Flt-1 and KDR, in the signal transduction of VEGF effects in human vascular endothelial cells ». *Oncogene* 19 (17): 2138-2146.
- Karni, Rotem, Elisa de Stanchina, Scott W. Lowe, Rahul Sinha, David Mu, et Adrian R. Krainer. 2007. « The Gene Encoding the Splicing Factor SF2/ASF Is a Proto-Oncogene ». *Nature Structural & Molecular Biology* 14 (3): 185-93. doi:10.1038/nsmb1209.
- Karumanchi, S. Ananth, et Yuval Bdolet. 2004. « Hypoxia and sFlt-1 in Preeclampsia: The “chicken-and-Egg” question ». *Endocrinology* 145 (11): 4835-37. doi:10.1210/en.2004-1028.
- Katoh, Osamu, Hiroshi Tauchi, Kuniko Kawaishi, Akiro Kimura, et Yukio Satow. 1995. « Expression of the Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Receptor Gene, KDR, in Hematopoietic Cells and Inhibitory Effect of VEGF on Apoptotic Cell Death Caused by Ionizing Radiation ». *Cancer Research* 55 (23): 5687-92.
- Kawakami, Tsutomu, Tetsuji Tokunaga, Hiroyuki Hatanaka, Hiroshi Kijima, Hitoshi Yamazaki, Yoshiyuki Abe, Yoshiyuki Osamura, Hiroshi Inoue, Yoshito Ueyama, et Masato 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 (10): 2196-2201. doi:10.1002/cncr.10936.
- Kawano, Osamu, Hidefumi Sasaki, Katsuhiko Okuda, Haruhiro Yukiue, Tomoki Yokoyama, Motoki Yano, et Yoshitaka Fujii. 2007. « PIK3CA Gene Amplification in Japanese Non-Small Cell Lung Cancer ». *Lung Cancer* 58 (1): 159-60. doi:10.1016/j.lungcan.2007.06.020.
- Kearney, J. B. 2004. « The VEGF Receptor Flt-1 (VEGFR-1) Is a Positive Modulator of Vascular Sprout Formation and Branching Morphogenesis ». *Blood* 103 (12): 4527-35. doi:10.1182/blood-2003-07-2315.
- Kendall, R L, et K A Thomas. 1993. « Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90 (22): 10705-9.
- Kendall, Richard L., Guan Wang, et Kenneth A. Thomas. 1996. « Identification of a Natural Soluble Form of the Vascular Endothelial Growth Factor Receptor, FLT-1, and Its Heterodimerization with KDR ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 226 (2): 324-28. doi:10.1006/bbrc.1996.1355.
- Khalili, Parisa, Ani Arakelian, Gaoping Chen, Marian L. Plunkett, Ivy Beck, Graham C. Parry, Fernando Doñate, David E. Shaw, Andrew P. Mazar, et Shafaat A. Rabbani. 2006. « A non-RGD-Based Integrin Binding Peptide (ATN-161) Blocks Breast Cancer Growth and Metastasis in Vivo ». *American Association for Cancer Research* 5 (9): 2271-80. doi:10.1158/1535-7163.MCT-06-0100.
- Kim, Nan Hee, Jeong Heon Oh, Ji A. Seo, Kye Won Lee, Sin Gon Kim, Kyung Mook Choi, Sei Hyun Baik, et al. 2005. « Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Soluble VEGF Receptor FLT-1 in Diabetic Nephropathy ». *Kidney International* 67 (1): 167-77. doi:10.1111/j.1523-1755.2005.00067.x.

- Kishimoto, Y., Y. Murakami, M. Shiraishi, K. Hayashi, et T. Sekiya. 1992. « Aberrations of the p53 Tumor Suppressor Gene in Human Non-Small Cell Carcinomas of the Lung ». *Cancer Research* 52 (17): 4799-4804.
- Kishuku, M., Y. Nishioka, S. Abe, J. Kishi, H. Ogino, Y. Aono, M. Azuma, et al. 2010. « Correction: Expression of Soluble Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 in Human Monocyte-Derived Mature Dendritic Cells Contributes to Their Antiangiogenic Property ». *The Journal of Immunology* 185 (4): 2630-2630. doi:10.4049/jimmunol.1090069.
- Klagsbrun, Michael, Seiji Takashima, et Roni Mamluk. 2002. « The Role of Neuropilin in Vascular and Tumor Biology ». In *Neuropilin: From Nervous System to Vascular and Tumor Biology*, édité par Dominique Bagnard, 33-48. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 515. Springer US. doi:10.1007/978-1-4615-0119-0_3.
- Koch, Sina, Sònia Tugues, Xiujuan Li, Laura Gualandi, et Lena Claesson-Welsh. 2011a. « Signal Transduction by Vascular Endothelial Growth Factor Receptors ». *Biochemical Journal* 437 (2): 169-83. doi:10.1042/BJ20110301.
- . 2011b. « Signal Transduction by Vascular Endothelial Growth Factor Receptors ». *Biochemical Journal* 437 (2): 169-83. doi:10.1042/BJ20110301.
- Kong-Beltran, Monica, Somasekar Seshagiri, Jiping Zha, Wenjing Zhu, Kaumudi Bhawe, Nerissa Mendoza, Thomas Holcomb, et al. 2006. « Somatic Mutations Lead to an Oncogenic Deletion of Met in Lung Cancer ». *Cancer Research* 66 (1): 283-89. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-2749.
- Konner, Jason, et Jakob Dupont. 2004. « Use of Soluble Recombinant Decoy Receptor Vascular Endothelial Growth Factor Trap (VEGF Trap) to Inhibit Vascular Endothelial Growth Factor Activity ». *Clinical Colorectal Cancer* 4 (octobre): S81-85. doi:10.3816/CCC.2004.s.013.
- Koo, P. J., D. Morgensztern, J. L. Boyer, et R. S. Herbst. 2012. « Targeting Vascular Endothelial Growth Factor in Patients With Squamous Cell Lung Cancer ». *Journal of Clinical Oncology* 30 (10): 1137-39. doi:10.1200/JCO.2011.40.4053.
- Kopan, Raphael, et Ma. Xenia G. Ilagan. 2009. « The Canonical Notch Signaling Pathway: Unfolding the Activation Mechanism ». *Cell* 137 (2): 216-33. doi:10.1016/j.cell.2009.03.045.
- Kopetz, Scott, Paulo M. Hoff, Jeffrey S. Morris, Robert A. Wolff, Cathy Eng, Katrina Y. Glover, Rosie Adinin, et al. 2010. « Phase II Trial of Infusional Fluorouracil, Irinotecan, and Bevacizumab for Metastatic Colorectal Cancer: Efficacy and Circulating Angiogenic Biomarkers Associated with Therapeutic Resistance ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 28 (3): 453-59. doi:10.1200/JCO.2009.24.8252.
- Korpanty, Grzegorz J., Donna M. Graham, Mark D. Vincent, et Natasha B. Leighl. 2015. « Biomarkers that currently affect clinical practice in lung cancer: EGFR, ALK, MET, ROS-1, and KRAS ». *The Treatment of Metastatic Non-small Cell Lung Cancer (NSCLC) in New Era of Personalised Medicine*, 64.
- Kroll, Jens, et Johannes Waltenberger. 1997. « The vascular endothelial growth factor receptor KDR activates multiple signal transduction pathways in porcine aortic endothelial cells ». *Journal of Biological Chemistry* 272 (51): 32521-32527.
- Krützfeldt, Jan, Satoru Kuwajima, Ravi Braich, Kallanthottathil G. Rajeev, John Pena, Thomas Tuschl, Muthiah Manoharan, et Markus Stoffel. 2007. « Specificity, Duplex Degradation and Subcellular Localization of Antagomirs ». *Nucleic Acids Research* 35 (9): 2885-92. doi:10.1093/nar/gkm024.
- Krützfeldt, Jan, Nikolaus Rajewsky, Ravi Braich, Kallanthottathil G. Rajeev, Thomas Tuschl, Muthiah Manoharan, et Markus Stoffel. 2005. « Silencing of microRNAs in Vivo with 'antagomirs' ». *Nature* 438 (7068): 685-89. doi:10.1038/nature04303.
- Kubo, Kazuo, Toshiyuki Shimizu, Shin-ichi Ohyama, Hideko Murooka, Akemi Iwai, Kazuhide Nakamura, Kazumasa Hasegawa, et al. 2005. « Novel Potent Orally Active Selective VEGFR-2 Tyrosine Kinase Inhibitors: Synthesis, Structure-Activity Relationships, and Antitumor Activities

- of N-Phenyl-N'-{4-(4-Quinolylloxy)phenyl}ureas ». *Journal of Medicinal Chemistry* 48 (5): 1359-66. doi:10.1021/jm030427r.
- Kuehbach, Angelika, Carmen Urbich, Andreas M. Zeiher, et Stefanie Dimmeler. 2007. « Role of Dicer and Drosha for Endothelial MicroRNA Expression and Angiogenesis ». *Circulation Research* 101 (1): 59-68. doi:10.1161/CIRCRESAHA.107.153916.
- Kumai, Yasuhiro, Hiroaki Ooboshi, Setsuro Ibayashi, Eiichi Ishikawa, Hiroshi Sugimori, Masahiro Kamouchi, Takanari Kitazono, Kensuke Egashira, et Mitsuo Iida. 2007. « Postischemic Gene Transfer of Soluble Flt-1 Protects against Brain Ischemia with Marked Attenuation of Blood-Brain Barrier Permeability ». *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 27 (6): 1152-60. doi:10.1038/sj.jcbfm.9600420.
- Kunizaki, M., R. Hamamoto, F. P. Silva, K. Yamaguchi, T. Nagayasu, M. Shibuya, Y. Nakamura, et Y. Furukawa. 2007. « The Lysine 831 of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1 Is a Novel Target of Methylation by SMYD3 ». *Cancer Research* 67 (22): 10759-65. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-1132.
- Kwak, Eunice L., Raffaella Sordella, Daphne W. Bell, Nadia Godin-Heymann, Ross A. Okimoto, Brian W. Brannigan, Patricia L. Harris, et al. 2005. « Irreversible inhibitors of the EGF receptor may circumvent acquired resistance to gefitinib ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (21): 7665-70. doi:10.1073/pnas.0502860102.

L

- Ladomery, Michael R., Steven J. Harper, et David O. Bates. 2007. « Alternative Splicing in Angiogenesis: The Vascular Endothelial Growth Factor Paradigm ». *Cancer Letters* 249 (2): 133-42. doi:10.1016/j.canlet.2006.08.015.
- Lal, Hind. 2009. « Integrins and Proximal Signaling Mechanisms in Cardiovascular Disease ». *Frontiers in Bioscience Volume* (14): 2307. doi:10.2741/3381.
- Lamallice, Laurent, François Houle, Guillaume Jourdan, et Jacques Huot. 2004. « Phosphorylation of tyrosine 1214 on VEGFR2 is required for VEGF-induced activation of Cdc42 upstream of SAPK2/p38 ». *Oncogene* 23 (2): 434-45. doi:10.1038/sj.onc.1207034.
- Lambrechts, Diether, Heinz-Josef Lenz, Sanne de Haas, Peter Carmeliet, et Stefan J. Scherer. 2013. « Markers of Response for the Antiangiogenic Agent Bevacizumab ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 31 (9): 1219-30. doi:10.1200/JCO.2012.46.2762.
- Lambrechts, Diether, Erik Storkebaum, Masafumi Morimoto, Jurgen Del-Favero, Frederik Desmet, Stefan L. Marklund, Sabine Wyns, et al. 2003. « VEGF Is a Modifier of Amyotrophic Lateral Sclerosis in Mice and Humans and Protects Motoneurons against Ischemic Death ». *Nature Genetics* 34 (4): 383-94. doi:10.1038/ng1211.
- Lamszus, Katrin, Ulrike Ulbricht, Jakob Matschke, Marc A. Brockmann, Regina Fillbrandt, et Manfred Westphal. 2003. « Levels of Soluble Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Receptor 1 in Astrocytic Tumors and Its Relation to Malignancy, Vascularity, and VEGF-A ». *American Association for Cancer Research* 9 (4): 1399-1405.
- Lanahan, Anthony, Xi Zhang, Alessandro Fantin, Zhen Zhuang, Felix Rivera-Molina, Katherine Speichinger, Claudia Prahst, et al. 2013. « The Neuropilin 1 Cytoplasmic Domain Is Required for

- VEGF-A-Dependent Arteriogenesis ». *Developmental Cell* 25 (2): 156-68. doi:10.1016/j.devcel.2013.03.019.
- Lange, Tali, Noga Guttman-Raviv, Limor Baruch, Marcelle Machluf, et Gera Neufeld. 2003. « VEGF162, A New Heparin-Binding Vascular Endothelial Growth Factor Splice Form That Is Expressed in Transformed Human Cells ». *Journal of Biological Chemistry* 278 (19): 17164-69. doi:10.1074/jbc.M212224200.
- Larrayoz, Marta, Ruben Pio, María J Pajares, Isabel Zudaire, Daniel Ajona, Oriol Casanovas, Luis M Montuenga, et Jackeline Agorreta. 2014. « Contrasting responses of non-small cell lung cancer to antiangiogenic therapies depend on histological subtype ». *EMBO Molecular Medicine* 6 (4): 539-50. doi:10.1002/emmm.201303214.
- Laurie, Scott Andrew, Benjamin J. Solomon, Lesley Seymour, Peter Michael Ellis, Glenwood D. Goss, Frances A. Shepherd, Michael J. Boyer, et al. 2012. « A randomized double-blind trial of carboplatin plus paclitaxel (CP) with daily oral cediranib (CED), an inhibitor of vascular endothelial growth factor receptors, or placebo (PLA) in patients (pts) with previously untreated advanced non-small cell lung cancer (NSCLC): NCIC Clinical Trials Group study BR29. » In *ASCO Annual Meeting Proceedings*, 30:7511.
- Lee, Hyun Ju, Xianhua Xu, Gheeyoung Choe, Doo Hyun Chung, Jeong-Wook Seo, Jae Ho Lee, Choon-Taek Lee, Sanghoon Jheon, Sook-Whan Sung, et Jin-Haeng Chung. 2010. « Protein Overexpression and Gene Amplification of Epidermal Growth Factor Receptor in Nonsmall Cell Lung Carcinomas: Comparison of Four Commercially Available Antibodies by Immunohistochemistry and Fluorescence in Situ Hybridization Study ». *Lung Cancer* 68 (3): 375-82. doi:10.1016/j.lungcan.2009.07.014.
- Lee, J.-E., C. Kim, H. Yang, I. Park, N. Oh, S. Hua, H. Jeong, et al. 2015. « Novel Glycosylated VEGF Decoy Receptor Fusion Protein, VEGF-Grab, Efficiently Suppresses Tumor Angiogenesis and Progression ». *Molecular Cancer Therapeutics* 14 (2): 470-79. doi:10.1158/1535-7163.MCT-14-0968-T.
- Lee, Jin Soo, Vera Hirsh, Keunchil Park, Shukui Qin, Cesar R. Blajman, Reury-Perng Perng, Yuh-Min Chen, Laura Emerson, Peter Langmuir, et Christian Manegold. 2012. « Vandetanib Versus Placebo in Patients with Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer after Prior Therapy with an Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor: A Randomized, Double-Blind Phase III Trial (ZEPHYR) ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 30 (10): 1114-21. doi:10.1200/JCO.2011.36.1709.
- Lee, Tae-Hee, Seyha Seng, Masayuki Sekine, Cimona Hinton, Yigong Fu, Hava Karsenty Avraham, et Shalom Avraham. 2007. « Vascular Endothelial Growth Factor Mediates Intracrine Survival in Human Breast Carcinoma Cells through Internally Expressed VEGFR1/FLT1 ». *PLoS Medicine* 4 (6). doi:10.1371/journal.pmed.0040186.
- Leighl, Natasha B., Luis E. Raez, Benjamin Besse, Peter J. Rosen, Fabrice Barlesi, E. Massarelli, Nashat Gabrail, et al. 2010. « A Multicenter, Phase 2 Study of Vascular Endothelial Growth Factor Trap (Aflibercept) in Platinum- and Erlotinib-Resistant Adenocarcinoma of the Lung ». *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 5 (7): 1054-59.
- Leite de Oliveira, Rodrigo, Alexander Hamm, et Massimiliano Mazzone. 2011. « Growing Tumor Vessels: More than One Way to Skin a Cat – Implications for Angiogenesis Targeted Cancer Therapies ». *Molecular Aspects of Medicine* 32 (2): 71-87. doi:10.1016/j.mam.2011.04.001.
- Lemmon, Mark A., et Joseph Schlessinger. 2010. « Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases ». *Cell* 141 (7): 1117-34. doi:10.1016/j.cell.2010.06.011.
- Levine, Richard J., Sharon E. Maynard, Cong Qian, Kee-Hak Lim, Lucinda J. England, Kai F. Yu, Enrique F. Schisterman, et al. 2004. « Circulating Angiogenic Factors and the Risk of

- Preeclampsia ». *New England Journal of Medicine* 350 (7): 672-83. doi:10.1056/NEJMoa031884.
- Levy, Andrew P. 1998. « Hypoxic Regulation of VEGF mRNA Stability by RNA-Binding Proteins ». *Trends in Cardiovascular Medicine* 8 (6): 246-50. doi:10.1016/S1050-1738(98)00020-6.
- Lichtenberger, Beate M., Poi Kiang Tan, Heide Niederleithner, Napoleone Ferrara, Peter Petzelbauer, et Maria Sibilia. 2010. « Autocrine VEGF signaling synergizes with EGFR in tumor cells to promote epithelial cancer development ». *Cell* 140 (2): 268-279.
- Lichtenthaler, Stefan F., Christian Haass, et Harald Steiner. 2011. « Regulated intramembrane proteolysis—lessons from amyloid precursor protein processing ». *Journal of neurochemistry* 117 (5): 779-796.
- Limaverde-Sousa, Gabriel, Cinthya Sternberg, et Carlos Gil Ferreira. 2014. « Antiangiogenesis beyond VEGF Inhibition: A Journey from Antiangiogenic Single-Target to Broad-Spectrum Agents ». *Cancer Treatment Reviews* 40 (4): 548-57. doi:10.1016/j.ctrv.2013.11.009.
- Longhurst, C. M., et L. K. Jennings. 1998. « Integrin-mediated signal transduction ». *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* 54 (6): 514-526.
- Loomans, Cindy J. M., Eelco J. P. de Koning, Frank J. T. Staal, Maarten B. Rookmaaker, Caroline Verseyden, Hetty C. de Boer, Marianne C. Verhaar, Branko Braam, Ton J. Rabelink, et Anton-Jan van Zonneveld. 2004. « Endothelial Progenitor Cell Dysfunction ». *Diabetes* 53 (1): 195-99. doi:10.2337/diabetes.53.1.195.
- López-Malpartida, Ana Victoria, María Dolores Ludeña, Gonzalo Varela, et José García Pichel. 2009. « Differential ErbB Receptor Expression and Intracellular Signaling Activity in Lung Adenocarcinomas and Squamous Cell Carcinomas ». *Lung Cancer* 65 (1): 25-33. doi:10.1016/j.lungcan.2008.10.009.
- Lu, Kan V., Jeffrey P. Chang, Christine A. Parachoniak, Melissa M. Pandika, Manish K. Aghi, David Meyronet, Nadezda Isachenko, Shaun D. Fouse, Joanna J. Phillips, David A. Cheresch, et others. 2012. « VEGF inhibits tumor cell invasion and mesenchymal transition through a MET/VEGFR2 complex ». *Cancer cell* 22 (1): 21-35.
- Lu, Kan V., Jeffrey P. Chang, Christine A. Parachoniak, Melissa M. Pandika, Manish K. Aghi, David Meyronet, Nadezda Isachenko, Shaun D. Fouse, Joanna J. Phillips, David A. Cheresch, Morag Park, et al. 2012. « VEGF Inhibits Tumor Cell Invasion and Mesenchymal Transition through a MET/VEGFR2 Complex ». *Cancer Cell* 22 (1): 21-35. doi:10.1016/j.ccr.2012.05.037.
- Luo, Ji, Nicole L. Solimini, et Stephen J. Elledge. 2009. « Principles of Cancer Therapy: Oncogene and Non-Oncogene Addiction ». *Cell* 136 (5): 823-37. doi:10.1016/j.cell.2009.02.024.
- Luo, Zhe-Xi, Peiji Chen, Gang Li, et Meng Chen. 2007. « A New Eutriconodont Mammal and Evolutionary Development in Early Mammals ». *Nature* 446 (7133): 288-93. doi:10.1038/nature05627.
- Lurje, Georg, Marc Schiesser, Andreas Claudius Hoffmann, et Paul Magnus Schneider. 2010. « Circulating Tumor Cells in Gastrointestinal Malignancies: Current Techniques and Clinical Implications ». *Journal of Oncology* 2010: 1-9. doi:10.1155/2010/392652.
- Lutterbach, Bart, Qinwen Zeng, Lenora J. Davis, Harold Hatch, Gaozhen Hang, Nancy E. Kohl, Jackson B. Gibbs, et Bo-Sheng Pan. 2007. « Lung Cancer Cell Lines Harboring MET Gene Amplification Are Dependent on Met for Growth and Survival ». *Cancer Research* 67 (5): 2081-88. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-3495.

M

- Mak, Paul, Irwin Leav, Bryan Pursell, Donggoo Bae, Xiaofang Yang, Cherie A. Taglienti, Lindsey M. Gouvin, Vishva M. Sharma, et Arthur M. Mercurio. 2010. « ER β impedes prostate cancer EMT by destabilizing HIF-1 α and inhibiting VEGF-mediated snail nuclear localization: implications for Gleason grading ». *Cancer cell* 17 (4): 319–332.
- Malhotra, Rajeev, Samuel Paskin-Flerlage, Roham T. Zamanian, Patrick Zimmerman, Jonathan W. Schmidt, Donna Y. Deng, Mark Southwood, et al. 2013. « Circulating Angiogenic Modulatory Factors Predict Survival and Functional Class in Pulmonary Arterial Hypertension ». *Pulmonary Circulation* 3 (2): 369–80. doi:10.4103/2045-8932.110445.
- Mancuso, Andrea, et Cora N Sternberg. 2006. « New Treatment Approaches in Metastatic Renal Cell Carcinoma »: *Current Opinion in Urology* 16 (5): 337–41. doi:10.1097/01.mou.0000240305.78205.77.
- Mani, Sendurai A., Wenjun Guo, Mai-Jing Liao, Elinor Ng. Eaton, Ayyakkannu Ayyanan, Alicia Y. Zhou, Mary Brooks, et al. 2008. « The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells ». *Cell* 133 (4): 704–15. doi:10.1016/j.cell.2008.03.027.
- Matsumoto, Taro, Svante Bohman, Johan Dixelius, Tone Berge, Anna Dimberg, Peetra Magnusson, Ling Wang, et al. 2005. « VEGF receptor-2 Y951 signaling and a role for the adapter molecule TSAAd in tumor angiogenesis ». *The EMBO Journal* 24 (13): 2342–53. doi:10.1038/sj.emboj.7600709.
- Mayer, Ulrike, Gesine Saher, Reinhard Fässler, Antje Bornemann, Frank Echtermeyer, Helga von der Mark, Nicolai Miosge, Ernst Pösch, et Klaus von der Mark. 1997. « Absence of Integrin $\alpha 7$ Causes a Novel Form of Muscular Dystrophy ». *Nature Genetics* 17 (3): 318–23. doi:10.1038/ng1197-318.
- Maynard, Sharon E., Jiang-Yong Min, Jaime Merchan, Kee-Hak Lim, Jianyi Li, Susanta Mondal, Towia A. Libermann, et al. 2003. « Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia ». *Journal of Clinical Investigation* 111 (5): 649–58. doi:10.1172/JCI200317189.
- McDonald, Donald M., et Peter L. Choyke. 2003. « Imaging of Angiogenesis: From Microscope to Clinic ». *Nature Medicine* 9 (6): 713–25. doi:10.1038/nm0603-713.
- McMullen, M. E., P. W. Bryant, C. C. Glembocki, P. A. Vincent, et K. M. Pumiglia. 2005. « Activation of p38 Has Opposing Effects on the Proliferation and Migration of Endothelial Cells ». *Journal of Biological Chemistry* 280 (22): 20995–3. doi:10.1074/jbc.M407060200.
- Meadows, K. N., P. Bryant, et K. Pumiglia. 2001. « Vascular Endothelial Growth Factor Induction of the Angiogenic Phenotype Requires Ras Activation ». *Journal of Biological Chemistry* 276 (52): 49289–98. doi:10.1074/jbc.M108069200.
- Medinger, Michael, Natalie Fischer, et Alexandar Tzankov. 2010. « Vascular Endothelial Growth Factor-Related Pathways in Hemato-Lymphoid Malignancies ». *Journal of Oncology* 2010: 1–13. doi:10.1155/2010/729725.
- Meert, A.-P., M. Paesmans, B. Martin, P. Delmotte, T. Berghmans, J.-M. Verdebout, J.-J. Lafitte, C. Mascaux, et J.-P. Sculier. 2002. « The Role of Microvessel Density on the Survival of Patients with Lung Cancer: A Systematic Review of the Literature with Meta-Analysis ». *British Journal of Cancer* 87 (7): 694–701. doi:10.1038/sj.bjc.6600551.
- Meiron, Moran, Rachel Anunu, Eyal J. Scheinman, Sharon Hashmueli, et Ben-Zion Levi. 2001. « New isoforms of VEGF are translated from alternative initiation CUG codons located in its 5' UTR ». *Biochemical and biophysical research communications* 282 (4): 1053–1060.

- Menzies, A. M., et G. V. Long. 2014. « Dabrafenib and Trametinib, Alone and in Combination for BRAF-Mutant Metastatic Melanoma ». *Clinical Cancer Research* 20 (8): 2035-43. doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-2054.
- Merdzhanova, G., S. Gout, M. Keramidas, V. Edmond, J.-L. Coll, C. Brambilla, E. Brambilla, S. Gazzeri, et B. Eymin. 2010. « The Transcription Factor E2F1 and the SR Protein SC35 Control the Ratio of pro-Angiogenic versus Antiangiogenic Isoforms of Vascular Endothelial Growth Factor-A to Inhibit Neovascularization in Vivo ». *Oncogene* 29 (39): 5392-5403. doi:10.1038/onc.2010.281.
- Messersmith, Wells A., Manuel Hidalgo, Michael Carducci, et S. Gail Eckhardt. 2006. « Novel Targets in Solid Tumors: MEK Inhibitors ». *Clinical Advances in Hematology & Oncology: H&O* 4 (11): 831-36.
- Meyerhardt, Jeffrey A., Marek Ancukiewicz, Thomas A. Abrams, Deborah Schrag, Peter C. Enzinger, Jennifer A. Chan, Matthew H. Kulke, et al. 2012a. « Phase I Study of Cetuximab, Irinotecan, and Vandetanib (ZD6474) as Therapy for Patients with Previously Treated Metastatic Colorectal Cancer ». *PLoS ONE* 7 (6). doi:10.1371/journal.pone.0038231.
- . 2012b. « Phase I Study of Cetuximab, Irinotecan, and Vandetanib (ZD6474) as Therapy for Patients with Previously Treated Metastatic Colorectal Cancer ». *PLOS ONE* 7 (6): e38231. doi:10.1371/journal.pone.0038231.
- Meyerson, Matthew, Stacey Gabriel, et Gad Getz. 2010. « Advances in Understanding Cancer Genomes through Second-Generation Sequencing ». *Nature Reviews Genetics* 11 (10): 685-96. doi:10.1038/nrg2841.
- Mezquita, Belén, Jovita Mezquita, Montserrat Pau, et Cristóbal Mezquita. 2010. « A Novel Intracellular Isoform of VEGFR-1 Activates Src and Promotes Cell Invasion in MDA-MB-231 Breast Cancer Cells ». *Journal of Cellular Biochemistry* 110 (3): 732-42. doi:10.1002/jcb.22584.
- Mezquita, Belén, Pau Mezquita, Montserrat Pau, Jovita Mezquita, et Cristóbal Mezquita. 2014. « Unlocking Doors without Keys: Activation of Src by Truncated C-Terminal Intracellular Receptor Tyrosine Kinases Lacking Tyrosine Kinase Activity ». *Cells* 3 (1): 92-111. doi:10.3390/cells3010092.
- Milanini, J., F. Vinals, J. Pouyssegur, et G. Pages. 1998. « p42/p44 MAP Kinase Module Plays a Key Role in the Transcriptional Regulation of the Vascular Endothelial Growth Factor Gene in Fibroblasts ». *Journal of Biological Chemistry* 273 (29): 18165-72. doi:10.1074/jbc.273.29.18165.
- Miller-Kasprzak, E., et P.P. Jagodziński. 2008. « 5-Aza-2'-Deoxycytidine Increases the Expression of Anti-Angiogenic Vascular Endothelial Growth Factor 189b Variant in Human Lung Microvascular Endothelial Cells ». *Biomedicine & Pharmacotherapy* 62 (3): 158-63. doi:10.1016/j.biopha.2007.07.015.
- Minguet, Joan, Katherine H. Smith, et Peter Bramlage. 2016. « Targeted Therapies for Treatment of Non-Small Cell Lung Cancer-Recent Advances and Future Perspectives ». *International Journal of Cancer* 138 (11): 2549-61. doi:10.1002/ijc.29915.
- Miotla, Jadwiga, Rose Maciewicz, Jane Kendrew, Marc Feldmann, et Ewa Paleolog. 2000. « Treatment with Soluble VEGF Receptor Reduces Disease Severity in Murine Collagen-Induced Arthritis ». *Laboratory Investigation* 80 (8): 1195-1205. doi:10.1038/labinvest.3780127.
- Miquerol, L., B. L. Langille, et A. Nagy. 2000. « Embryonic Development Is Disrupted by Modest Increases in Vascular Endothelial Growth Factor Gene Expression ». *Development* 127 (18): 3941-46.
- Miyake, Tatsuya, Keiichi Kumasawa, Noriko Sato, Tsuyoshi Takiuchi, Hitomi Nakamura, et Tadashi Kimura. 2016. « Soluble VEGF Receptor 1(sFLT1) Induces Non-Apoptotic Cell Death of Ovarian and Colorectal Cancer Cells ». *Placenta* 46 (octobre): 107. doi:10.1016/j.placenta.2016.08.021.

- Morabito, Alessandro, Maria Carmela Piccirillo, Fabiano Falasconi, Gianfranco De Feo, Antonia Del Giudice, Jane Bryce, Massimo Di Maio, Ermelinda De Maio, Nicola Normanno, et Francesco Perrone. 2009. « Vandetanib (ZD6474), a Dual Inhibitor of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor (VEGFR) and Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Tyrosine Kinases: Current Status and Future Directions ». *The Oncologist* 14 (4): 378-90. doi:10.1634/theoncologist.2008-0261.
- Morgan, Mark R., Martin J. Humphries, et Mark D. Bass. 2007. « Synergistic control of cell adhesion by integrins and syndecans ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8 (12): 957-69. doi:10.1038/nrm2289.
- Mukhopadhyay, Anandaroop, Kristofer C. Berrett, Ushma Kc, Phillip M. Clair, Stelian M. Pop, Shamus R. Carr, Benjamin L. Witt, et Trudy G. Oliver. 2014. « Sox2 Cooperates with Lkb1 Loss in a Mouse Model of Squamous Cell Lung Cancer ». *Cell reports* 8 (1): 40-49. doi:10.1016/j.celrep.2014.05.036.

N

- Nagy, Janice A., Eliza Vasile, Dian Feng, Christian Sundberg, Lawrence F. Brown, Michael J. Detmar, Joel A. Lawitts, et al. 2002. « Vascular Permeability Factor/Vascular Endothelial Growth Factor Induces Lymphangiogenesis as Well as Angiogenesis ». *The Journal of Experimental Medicine* 196 (11): 1497-1506. doi:10.1084/jem.20021244.
- Nakayama, Masanori, Akiko Nakayama, Max van Lessen, Hiroyuki Yamamoto, Sarah Hoffmann, Hannes CA Drexler, Norimichi Itoh, et al. 2013. « Spatial regulation of VEGF receptor endocytosis in angiogenesis ». *Nature cell biology* 15 (3): 249-260.
- Natale, Ronald B., Sumitra Thongprasert, F. Anthony Greco, Michael Thomas, Chun-Ming Tsai, Patrapim Sunpaweravong, David Ferry, et al. 2011. « Phase III Trial of Vandetanib Compared with Erlotinib in Patients with Previously Treated Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 29 (8): 1059-66. doi:10.1200/JCO.2010.28.5981.
- « National Health Advisory Issued for Radon ». 2016. WebMD. Consulté le juin 17. <http://www.webmd.com/cancer/news/20050113/national-health-advisory-issued-for-radon>.
- Neagoe, P.-E. 2005. « Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)-A165-Induced Prostacyclin Synthesis Requires the Activation of VEGF Receptor-1 and -2 Heterodimer ». *Journal of Biological Chemistry* 280 (11): 9904-12. doi:10.1074/jbc.M412017200.
- Nikolinakos, Petros G., Nasser Altorki, David Yankelevitz, Hai T. Tran, Shaoyu Yan, Dilip Rajagopalan, Walter Bordogna, Lone H. Ottesen, et John V. Heymach. 2010. « Plasma cytokine and angiogenic factor profiling identifies markers associated with tumor shrinkage in early-stage non-small cell lung cancer patients treated with pazopanib ». *Cancer research* 70 (6): 2171-2179.
- « Notice: 11th Report on Carcinogens Proposed listings - NTP ». 2016. Consulté le juin 17. <http://ntp.niehs.nih.gov/about/presscenter/frndocs/2001/roc11newnomsfr/index.html>.

O

- Öberg-Welsh, Charlotte, Stellan Sandler, Arne Andersson, et Michael Welsh. 1997. « Effects of Vascular Endothelial Growth Factor on Pancreatic Duct Cell Replication and the Insulin Production of Fetal Islet-like Cell Clusters in Vitro ». *Molecular and Cellular Endocrinology* 126 (2): 125-32. doi:10.1016/S0303-7207(96)03977-9.
- O'Donnell, A., A. Padhani, C. Hayes, A. J. Kakkar, M. Leach, J. M. Trigo, M. Scurr, et al. 2005. « A Phase I study of the angiogenesis inhibitor SU5416 (semaxanib) in solid tumours, incorporating dynamic contrast MR pharmacodynamic end points ». *British journal of cancer* 93 (8): 876-883.
- Okada, Futoshi, Janusz W. Rak, Brad St Croix, Blandine Lieubeau, Mitsunori Kaya, Luba Roncari, Senji Shirasawa, Takehiko Sasazuki, et Robert S. Kerbel. 1998. « Impact of Oncogenes in Tumor Angiogenesis: Mutant K-Ras up-Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor/Vascular Permeability Factor Is Necessary, but Not Sufficient for Tumorigenicity of Human Colorectal Carcinoma Cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95 (7): 3609-14.
- Okudela, Koji, Masaya Suzuki, Shinji Kageyama, Tomoyasu Bunai, Kiyoko Nagura, Hisaki Igarashi, Kazuya Takamochi, et al. 2007. « PIK3CA Mutation and Amplification in Human Lung Cancer ». *Pathology International* 57 (10): 664-71. doi:10.1111/j.1440-1827.2007.02155.x.
- Olsson, Anna-Karin, Anna Dimberg, Johan Kreuger, et Lena Claesson-Welsh. 2006. « VEGF Receptor Signalling - in Control of Vascular Function ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 7 (5): 359-71. doi:10.1038/nrm1911.
- Onesto, C., J.-M. Hannoun-Lévi, E. Chamorey, J.-L. Formento, A. Ramaioli, et G. Pagès. 2006. « Vascular Endothelial Growth Factor-A and Poly(A) Binding Protein-Interacting Protein 2 Expression in Human Head and Neck Carcinomas: Correlation and Prognostic Significance ». *British Journal of Cancer* 94 (10): 1516-23. doi:10.1038/sj.bjc.6603108.
- Onesto, Cercina, Edurne Berra, Renaud Grépin, et Gilles Pagès. 2004. « Poly(A)-Binding Protein-Interacting Protein 2, a Strong Regulator of Vascular Endothelial Growth Factor mRNA ». *Journal of Biological Chemistry* 279 (33): 34217-26. doi:10.1074/jbc.M400219200.
- Orecchia, Angela, Pedro Miguel Lacal, Cataldo Schietroma, Veronica Morea, Giovanna Zambruno, et Cristina Maria Failla. 2003a. « Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 Is Deposited in the Extracellular Matrix by Endothelial Cells and Is a Ligand for the Alpha 5 Beta 1 Integrin ». *Journal of Cell Science* 116 (Pt 17): 3479-89. doi:10.1242/jcs.00673.
- . 2003b. « Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 Is Deposited in the Extracellular Matrix by Endothelial Cells and Is a Ligand for Theα 5β1 Integrin ». *Journal of Cell Science* 116 (17): 3479-89. doi:10.1242/jcs.00673.
- Orecchia, Angela, Amel Mettouchi, Paolo Uva, Glenn C. Simon, Diego Arcelli, Simona Avitabile, Gianluca Ragone, et al. 2013. « Endothelial Cell Adhesion to Soluble Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 Triggers a Cell Dynamic and Angiogenic Phenotype ». *The FASEB Journal*, octobre, fj.12-225771. doi:10.1096/fj.12-225771.
- Oxnard, Geoffrey R., Maria E. Arcila, Camelia S. Sima, Gregory J. Riely, Juliann Chmielecki, Mark G. Kris, William Pao, Marc Ladanyi, et Vincent A. Miller. 2011. « Acquired Resistance to EGFR Tyrosine Kinase Inhibitors in EGFR-Mutant Lung Cancer: Distinct Natural History of Patients with Tumors Harboring the T790M Mutation ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 17 (6): 1616-22. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-2692.

P

- Pàez-Ribes, Marta, Elizabeth Allen, James Hudock, Takaaki Takeda, Hiroaki Okuyama, Francesc Viñals, Masahiro Inoue, Gabriele Bergers, Douglas Hanahan, et Oriol Casanovas. 2009. « Antiangiogenic Therapy Elicits Malignant Progression of Tumors to Increased Local Invasion and Distant Metastasis ». *Cancer Cell* 15 (3): 220-31. doi:10.1016/j.ccr.2009.01.027.
- Pagès, Gilles, et Jacques Pouyssegur. 2005. « Transcriptional Regulation of the Vascular Endothelial Growth Factor Gene—a Concert of Activating Factors ». *Cardiovascular Research* 65 (3): 564-73. doi:10.1016/j.cardiores.2004.09.032.
- Pajares, María J., Jackeline Agorreta, Marta Larrayoz, Aurélien Vesin, Teresa Ezponda, Isabel Zudaire, Wenceslao Torre, et al. 2012. « Expression of Tumor-Derived Vascular Endothelial Growth Factor and Its Receptors Is Associated with Outcome in Early Squamous Cell Carcinoma of the Lung ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 30 (10): 1129-36. doi:10.1200/JCO.2011.37.4231.
- Palmer, K. R., S. Tong, L. Tuohey, P. Cannon, L. Ye, N. J. Hannan, F. C. Brownfoot, S. E. Illanes, et T. J. Kaitu'u-Lino. 2016. « Jumonji Domain Containing Protein 6 Is Decreased in Human Preeclamptic Placentas and Regulates sFLT-1 Splice Variant Production ». *Biology of Reproduction* 94 (3): 59-59. doi:10.1095/biolreprod.115.134460.
- Pan, Qi, Yvan Chathery, Yan Wu, Nisha Rathore, Raymond K. Tong, Franklin Peale, Anil Bagri, Marc Tessier-Lavigne, Alexander W. Koch, et Ryan J. Watts. 2007. « Neuropilin-1 binds to VEGF121 and regulates endothelial cell migration and sprouting ». *Journal of Biological Chemistry* 282 (33): 24049-24056.
- Pao, William, et Vincent A. Miller. 2005. « Epidermal Growth Factor Receptor Mutations, Small-Molecule Kinase Inhibitors, and Non-Small-Cell Lung Cancer: Current Knowledge and Future Directions ». *Journal of Clinical Oncology* 23 (11): 2556-68. doi:10.1200/JCO.2005.07.799.
- Parker, Matthew W., Ping Xu, Xiaobo Li, et Craig W. Vander Kooi. 2012. « Structural Basis for Selective Vascular Endothelial Growth Factor-A (VEGF-A) Binding to Neuropilin-1 ». *Journal of Biological Chemistry* 287 (14): 11082-89. doi:10.1074/jbc.M111.331140.
- Parsons, J. T. 2003. « Focal adhesion kinase: the first ten years ». *Journal of Cell Science* 116 (8): 1409-16. doi:10.1242/jcs.00373.
- Parsons-Wingerter, Patricia, Ian M. Kasman, Scott Norberg, Anette Magnussen, Sara Zanivan, Alberto Rissone, Peter Baluk, et al. 2005. « Uniform overexpression and rapid accessibility of $\alpha 5 \beta 1$ integrin on blood vessels in tumors ». *The American journal of pathology* 167 (1): 193-211.
- Patel, Jyoti D., Thomas A. Hensing, Alfred Rademaker, Eric M. Hart, Matthew G. Blum, Daniel T. Milton, et Philip D. Bonomi. 2009. « Phase II Study of Pemetrexed and Carboplatin Plus Bevacizumab With Maintenance Pemetrexed and Bevacizumab As First-Line Therapy for Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer ». *Journal of Clinical Oncology* 27 (20): 3284-89. doi:10.1200/JCO.2008.20.8181.
- Patnaik, Amita, Patricia M. LoRusso, Wells A. Messersmith, Kyriakos P. Papadopoulos, Lia Gore, Muralidhar Beeram, Vanitha Ramakrishnan, et al. 2014. « A Phase Ib study evaluating MNRP1685A, a fully human anti-NRP1 monoclonal antibody, in combination with bevacizumab and paclitaxel in patients with advanced solid tumors ». *Cancer chemotherapy and pharmacology* 73 (5): 951-960.
- Patsenker, E., et F. Stickel. 2011. « Role of Integrins in Fibrosing Liver Diseases ». *AJP: Gastrointestinal and Liver Physiology* 301 (3): G425-34. doi:10.1152/ajpgi.00050.2011.
- Paz-Ares, Luis G., Bonne Biesma, David Heigener, Joachim von Pawel, Timothy Eisen, Jaafar Bennouna, Li Zhang, et al. 2012. « Phase III, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial of

- Gemcitabine/Cisplatin Alone or with Sorafenib for the First-Line Treatment of Advanced, Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 30 (25): 3084-92. doi:10.1200/JCO.2011.39.7646.
- Pellet-Many, Caroline, Paul Frankel, Haiyan Jia, et Ian Zachary. 2008. « Neuropilins: Structure, Function and Role in Disease ». *Biochemical Journal* 411 (2): 211-26. doi:10.1042/BJ20071639.
- Perrin, R. M., O. Konopatskaya, Y. Qiu, S. Harper, D. O. Bates, et A. J. Churchill. 2005. « Diabetic Retinopathy Is Associated with a Switch in Splicing from Anti- to pro-Angiogenic Isoforms of Vascular Endothelial Growth Factor ». *Diabetologia* 48 (11): 2422-27. doi:10.1007/s00125-005-1951-8.
- Perrot-Appianat, Martine, et Melanie Di Benedetto. 2012. « Autocrine functions of VEGF in breast tumor cells: adhesion, survival, migration and invasion ». *Cell adhesion & migration* 6 (6): 547-553.
- Peto, J., et R. Doll. 1986. « Passive smoking. » *British journal of cancer* 54 (3): 381.
- Piao, Yuji, Ji Liang, Lindsay Holmes, Amado J. Zurita, Verlene Henry, John V. Heymach, et John F. de Groot. 2012. « Glioblastoma Resistance to Anti-VEGF Therapy Is Associated with Myeloid Cell Infiltration, Stem Cell Accumulation, and a Mesenchymal Phenotype ». *Neuro-Oncology* 14 (11): 1379-92. doi:10.1093/neuonc/nos158.
- Pinedo, H. M., H. M. Verheul, R. J. D'Amato, et J. Folkman. 1998. « Involvement of Platelets in Tumour Angiogenesis? » *Lancet (London, England)* 352 (9142): 1775-77.
- Pirker, Robert, Jose R Pereira, Joachim von Pawel, Maciej Krzakowski, Rodryg Ramlau, Keunchil Park, Filippo de Marinis, et al. 2012. « EGFR Expression as a Predictor of Survival for First-Line Chemotherapy plus Cetuximab in Patients with Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer: Analysis of Data from the Phase 3 FLEX Study ». *The Lancet Oncology* 13 (1): 33-42. doi:10.1016/S1470-2045(11)70318-7.
- Plouët, Jean, Francoise Moro, Stéphane Bertagnolli, Nadine Coldeboeuf, Honore Mazarguil, Simone Clamens, et Francis Bayard. 1997. « Extracellular Cleavage of the Vascular Endothelial Growth Factor 189-Amino Acid Form by Urokinase Is Required for Its Mitogenic Effect ». *Journal of Biological Chemistry* 272 (20): 13390-96. doi:10.1074/jbc.272.20.13390.
- Plow, Edward F., Thomas A. Haas, Li Zhang, Joseph Loftus, et Jeffrey W. Smith. 2000. « Ligand Binding to Integrins ». *Journal of Biological Chemistry* 275 (29): 21785-88. doi:10.1074/jbc.R000003200.
- Poltorak, Zoya, Tzafra Cohen, Revital Sivan, Yelena Kandelis, Gadi Spira, Israel Vlodavsky, Eli Keshet, et Gera Neufeld. 1997. « VEGF145, a Secreted Vascular Endothelial Growth Factor Isoform That Binds to Extracellular Matrix ». *Journal of Biological Chemistry* 272 (11): 7151-58. doi:10.1074/jbc.272.11.7151.
- Prahst, Claudia, Mélanie Héroult, Anthony A. Lanahan, Noa Uziel, Ofra Kessler, Niva Shraga-Heled, Michael Simons, Gera Neufeld, et Hellmut G. Augustin. 2008. « Neuropilin-1-VEGFR-2 complexing requires the PDZ-binding domain of neuropilin-1 ». *Journal of Biological Chemistry* 283 (37): 25110-25114.

Q

- Qi, Jian-Wei, Ting-Ting Qin, Li-Xia Xu, Kun Zhang, Gui-Li Yang, Jie Li, Huai-Yuan Xiao, Zhi-Song Zhang, et Lu-Yuan Li. 2013. « TNFSF15 Inhibits Vasculogenesis by Regulating Relative Levels of Membrane-Bound and Soluble Isoforms of VEGF Receptor 1 ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110 (34): 13863-68. doi:10.1073/pnas.1304529110.
- Qian, Bin-Zhi, et Jeffrey W. Pollard. 2010. « Macrophage Diversity Enhances Tumor Progression and Metastasis ». *Cell* 141 (1): 39-51. doi:10.1016/j.cell.2010.03.014.

R

- Raghu, Hari, Arun Kumar Nalla, Christopher S. Gondi, Meena Gujrati, Dzunh H. Dinh, et Jasti S. Rao. 2012. « uPA and uPAR shRNA Inhibit Angiogenesis via Enhanced Secretion of SVEGFR1 Independent of GM-CSF but Dependent on TIMP-1 in Endothelial and Glioblastoma Cells ». *Molecular Oncology* 6 (1): 33-47. doi:10.1016/j.molonc.2011.11.008.
- Rahimi, Nader, Todd E. Golde, et Rosana D. Meyer. 2009. « Identification of Ligand-Induced Proteolytic Cleavage and Ectodomain Shedding of VEGFR-1/FLT1 in Leukemic Cancer Cells ». *Cancer Research* 69 (6): 2607-14. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-2905.
- Raikwar, Nandita S., Kang Z. Liu, et Christie P. Thomas. 2014. « N-Terminal Cleavage and Release of the Ectodomain of Flt1 Is Mediated via ADAM10 and ADAM 17 and Regulated by VEGFR2 and the Flt1 Intracellular Domain ». *PLOS ONE* 9 (11): e112794. doi:10.1371/journal.pone.0112794.
- Ramlau, Rodryg, Vera Gorbunova, Tudor Eliade Ciuleanu, Silvia Novello, Mustafa Ozguroglu, Tuncay Goksel, Clarissa Baldotto, et al. 2012. « Aflibercept and Docetaxel Versus Docetaxel Alone After Platinum Failure in Patients With Advanced or Metastatic Non-Small-Cell Lung Cancer: A Randomized, Controlled Phase III Trial ». *Journal of Clinical Oncology* 30 (29): 3640-47. doi:10.1200/JCO.2012.42.6932.
- Ranpura, Vishal, Sanjaykumar Hapani, et Shenhong Wu. 2011. « Treatment-Related Mortality with Bevacizumab in Cancer Patients: A Meta-Analysis ». *JAMA* 305 (5): 487-94. doi:10.1001/jama.2011.51.
- Reck, M., R. Kaiser, C. Eschbach, M. Stefanic, J. Love, U. Gatzemeier, P. Stopfer, et J. von Pawel. 2011. « A Phase II Double-Blind Study to Investigate Efficacy and Safety of Two Doses of the Triple Angiokinase Inhibitor BIBF 1120 in Patients with Relapsed Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer ». *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 22 (6): 1374-81. doi:10.1093/annonc/mdq618.
- Reck, Martin, Rolf Kaiser, Anders Mellemegaard, Jean-Yves Douillard, Sergey Orlov, Maciej Krzakowski, Joachim von Pawel, et al. 2014. « Docetaxel plus Nintedanib versus Docetaxel plus Placebo in Patients with Previously Treated Non-Small-Cell Lung Cancer (LUME-Lung 1): A Phase 3, Double-Blind, Randomised Controlled Trial ». *The Lancet. Oncology* 15 (2): 143-55. doi:10.1016/S1470-2045(13)70586-2.
- Reck, Martin, Joachim von Pawel, Petr Zatloukal, Rodryg Ramlau, Vera Gorbounova, Vera Hirsh, Natasha Leighl, et al. 2009. « Phase III Trial of Cisplatin Plus Gemcitabine With Either Placebo or Bevacizumab As First-Line Therapy for Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer: AVAiL ». *Journal of Clinical Oncology* 27 (8): 1227-34. doi:10.1200/JCO.2007.14.5466.

- Rehn, M. 2001. « Interaction of endostatin with integrins implicated in angiogenesis ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98 (3): 1024-29. doi:10.1073/pnas.031564998.
- Ren, Mindong, Genxing Xu, Jianbo Zeng, Carmen De Lemos-Chiarandini, Milton Adesnik, et David D. Sabatini. 1998. « Hydrolysis of GTP on rab11 is required for the direct delivery of transferrin from the pericentriolar recycling compartment to the cell surface but not from sorting endosomes ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (11): 6187-92.
- Reuben, Suzanne H. 2010. *Reducing Environmental Cancer Risk: What We Can Do Now*. DIANE Publishing.
- Riely, Gregory J., et Vincent A. Miller. 2007. « Vascular Endothelial Growth Factor Trap in Non-Small Cell Lung Cancer ». *Clinical Cancer Research* 13 (15): 4623s-4627s. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-0544.
- Risau, W. 1997. « Mechanisms of Angiogenesis ». *Nature* 386 (6626): 671-74. doi:10.1038/386671a0.
- Rittmeyer, Achim, Arnaud Scherpereel, Vera A. Gorbunova, Radj Gervais, Anders Vikstrom, Christos Chouaid, Antonio Chella, et al. 2013. « Effect of maintenance bevacizumab (Bev) plus pemetrexed (Pem) after first-line cisplatin/Pem/Bev in advanced nonsquamous non-small cell lung cancer (nsNSCLC) on overall survival (OS) of patients (pts) on the AVAPERL (MO22089) phase III randomized trial. » *ASCO Meeting Abstracts* 31 (15_suppl): 8014.
- Roberts, David M., Joseph B. Kearney, Jennifer H. Johnson, Michael P. Rosenberg, Rakesh Kumar, et Victoria L. Bautch. 2004. « The Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Receptor Flt-1 (VEGFR-1) Modulates Flk-1 (VEGFR-2) Signaling During Blood Vessel Formation ». *The American Journal of Pathology* 164 (5): 1531-35. doi:10.1016/S0002-9440(10)63711-X.
- Roda, Julie M., Yijie Wang, Laura A. Sumner, Gary S. Phillips, Clay B. Marsh, et Timothy D. Eubank. 2012. « Stabilization of HIF-2 α induces sVEGFR-1 production from tumor-associated macrophages and decreases tumor growth in a murine melanoma model ». *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 189 (6): 3168-77. doi:10.4049/jimmunol.1103817.
- Rosenbaum-Dekel, Yifat, Alisa Fuchs, Evgeny Yakirevich, Aviva Azriel, Salam Mazareb, Murray B. Resnick, et Ben-Zion Levi. 2005. « Nuclear localization of long-VEGF is associated with hypoxia and tumor angiogenesis ». *Biochemical and biophysical research communications* 332 (1): 271-278.
- Rossignol, Mireille, Michael L. Gagnon, et Michael Klagsbrun. 2000. « Genomic Organization of Human Neuropilin-1 and Neuropilin-2 Genes: Identification and Distribution of Splice Variants and Soluble Isoforms ». *Genomics* 70 (2): 211-22. doi:10.1006/geno.2000.6381.
- Rousseau, Simon, Francois Houle, Jacques Landry, et Jacques Huot. 1997. « p38 MAP kinase activation by vascular endothelial growth factor mediates actin reorganization and cell migration in human endothelial cells ». *Oncogene* 15 (18): 2169-2177.
- Ruffini, F., C. M. Failla, A. Orecchia, M. R. Bani, A. S. Dorio, C. Fortes, G. Zambruno, et al. 2011. « Expression of the Soluble Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 in Cutaneous Melanoma: Role in Tumour Progression ». *The British Journal of Dermatology* 164 (5): 1061-70. doi:10.1111/j.1365-2133.2010.10200.x.
- Ruiz de Almodovar, C., D. Lambrechts, M. Mazzone, et P. Carmeliet. 2009. « Role and Therapeutic Potential of VEGF in the Nervous System ». *Physiological Reviews* 89 (2): 607-48. doi:10.1152/physrev.00031.2008.

S

- Saito, Tetsuya, Norihiko Takeda, Eisuke Amiya, Tomoko Nakao, Hajime Abe, Hiroaki Semba, Katsura Soma, et al. 2013. « VEGF-A Induces Its Negative Regulator, Soluble Form of VEGFR-1, by Modulating Its Alternative Splicing ». *FEBS Letters* 587 (14): 2179-85. doi:10.1016/j.febslet.2013.05.038.
- Sakurai, Y., K. Ohgimoto, Y. Kataoka, N. Yoshida, et M. Shibuya. 2005. « Essential Role of Flk-1 (VEGF Receptor 2) Tyrosine Residue 1173 in Vasculogenesis in Mice ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102 (4): 1076-81. doi:10.1073/pnas.0404984102.
- Salven, P., A. Orpana, et H. Joensuu. 1999. « Leukocytes and Platelets of Patients with Cancer Contain High Levels of Vascular Endothelial Growth Factor ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 5 (3): 487-91.
- Sandler, Alan, Robert Gray, Michael C. Perry, Julie Brahmer, Joan H. Schiller, Afshin Dowlati, Rogerio Lilenbaum, et David H. Johnson. 2006. « Paclitaxel–Carboplatin Alone or with Bevacizumab for Non–Small-Cell Lung Cancer ». *New England Journal of Medicine* 355 (24): 2542-50. doi:10.1056/NEJMoa061884.
- Sawano, Asako, Shinobu Iwai, Yoshiko Sakurai, Mikito Ito, Kenya Shitara, Tatsutoshi Nakahata, et Masabumi Shibuya. 2001. « Flt-1, Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1, Is a Novel Cell Surface Marker for the Lineage of Monocyte-Macrophages in Humans ». *Blood* 97 (3): 785-91. doi:10.1182/blood.V97.3.785.
- Scagliotti, Giorgio, Silvia Novello, Joachim von Pawel, Martin Reck, José Rodrigues Pereira, Michael Thomas, José Elias Abrão Miziara, et al. 2010. « Phase III Study of Carboplatin and Paclitaxel Alone or With Sorafenib in Advanced Non–Small-Cell Lung Cancer ». *Journal of Clinical Oncology* 28 (11): 1835-42. doi:10.1200/JCO.2009.26.1321.
- Scagliotti, Giorgio V., Ihor Vynnychenko, Keunchil Park, Yukito Ichinose, Kaoru Kubota, Fiona Blackhall, Robert Pirker, et al. 2012. « International, Randomized, Placebo-Controlled, Double-Blind Phase III Study of Motesanib plus Carboplatin/Paclitaxel in Patients with Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer: MONET1 ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 30 (23): 2829-36. doi:10.1200/JCO.2011.41.4987.
- Schekman, Randy, et Lelio Orci. 1996. « Coat Proteins and Vesicle Budding ». *Science* 271 (5255): 1526-33. doi:10.1126/science.271.5255.1526.
- Schneider, Jochen G., Sarah R. Amend, et Katherine N. Weilbaecher. 2011. « Integrins and Bone Metastasis: Integrating Tumor Cell and Stromal Cell Interactions ». *Bone* 48 (1): 54-65. doi:10.1016/j.bone.2010.09.016.
- Schwartz, Jonathan D., Eric K. Rowinsky, Hagop Youssoufian, Bronislaw Pytowski, et Yan Wu. 2010. « Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 in Human Cancer: Concise Review and Rationale for Development of IMC-18F1 (Human Antibody Targeting Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1) ». *Cancer* 116 (S4): 1027-32. doi:10.1002/cncr.24789.
- Sebolt-Leopold, J. S., D. T. Dudley, R. Herrera, K. Van Becelaere, A. Wiland, R. C. Gowan, H. Tecle, et al. 1999. « Blockade of the MAP Kinase Pathway Suppresses Growth of Colon Tumors in Vivo ». *Nature Medicine* 5 (7): 810-16. doi:10.1038/10533.
- Sela, Shay, Ahuva Itin, Shira Natanson-Yaron, Caryn Greenfield, Debra Goldman-Wohl, Simcha Yagel, et Eli Keshet. 2008. « A Novel Human-Specific Soluble Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1: Cell-Type-Specific Splicing and Implications to Vascular Endothelial Growth Factor Homeostasis and Preeclampsia ». *Circulation Research* 102 (12): 1566-74. doi:10.1161/CIRCRESAHA.108.171504.

- Senger, Donald R., Livingston Van De Water, Lawrence F. Brown, Janice A. Nagy, Kiang-Teck Yeo, Tet-Kin Yeo, Brygida Berse, Robert W. Jackman, Ann M. Dvorak, et Harold F. Dvorak. s. d. « Vascular Permeability Factor (VPF, VEGF) in Tumor Biology ». *Cancer and Metastasis Reviews* 12 (3-4): 303-24. doi:10.1007/BF00665960.
- Sequist, L. V., R. G. Martins, D. Spigel, S. M. Grunberg, P. A. Janne, D. McCollum, A. Spira, T. Evans, B. E. Johnson, et T. J. Lynch Jr. 2007. « iTARGET: A phase II trial to assess the response to gefitinib in epidermal growth factor receptor (EGFR)-mutated non-small cell lung cancer (NSCLC) tumors ». In *ASCO Annual Meeting Proceedings*, 25:7504.
- Shalaby, Fouad, Janet Rossant, Terry P. Yamaguchi, Marina Gertsenstein, Xiang-Fu Wu, Martin L. Breitman, et Andre C. Schuh. 1995. « Failure of Blood-Island Formation and Vasculogenesis in Flk-1-Deficient Mice ». *Nature* 376 (6535): 62-66. doi:10.1038/376062a0.
- Sharma, Sreenath V., Daphne W. Bell, Jeffrey Settleman, et Daniel A. Haber. 2007. « Epidermal Growth Factor Receptor Mutations in Lung Cancer ». *Nature Reviews Cancer* 7 (3): 169-81. doi:10.1038/nrc2088.
- Shaw, Alice T., Beow Y. Yeap, Mari Mino-Kenudson, Subba R. Digumarthy, Daniel B. Costa, Rebecca S. Heist, Benjamin Solomon, et al. 2009. « Clinical Features and Outcome of Patients With Non-Small-Cell Lung Cancer Who Harbor EML4-ALK ». *Journal of Clinical Oncology* 27 (26): 4247-53. doi:10.1200/JCO.2009.22.6993.
- Shaw, Reuben J., et Lewis C. Cantley. 2006. « Ras, PI(3)K and mTOR Signalling Controls Tumour Cell Growth ». *Nature* 441 (7092): 424-30. doi:10.1038/nature04869.
- Shen, Ben-Quan, David Y. Lee, Hans-Peter Gerber, Bruce A. Keyt, Napoleone Ferrara, et Thomas F. Zioncheck. 1998. « Homologous Up-Regulation of KDR/Flk-1 Receptor Expression by Vascular Endothelial Growth Factor in Vitro ». *Journal of Biological Chemistry* 273 (45): 29979-85. doi:10.1074/jbc.273.45.29979.
- Shibuya, M., S. Yamaguchi, A. Yamane, T. Ikeda, A. Tojo, H. Matsushime, et M. Sato. 1990. « Nucleotide Sequence and Expression of a Novel Human Receptor-Type Tyrosine Kinase Gene (Flt) Closely Related to the Fms Family ». *Oncogene* 5 (4): 519-24.
- Shigematsu, H. 2005. « Somatic Mutations of the HER2 Kinase Domain in Lung Adenocarcinomas ». *Cancer Research* 65 (5): 1642-46. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-4235.
- Shih, Shu-Ching, et Kevin P. Claffey. 1999. « Regulation of Human Vascular Endothelial Growth Factor mRNA Stability in Hypoxia by Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein L ». *Journal of Biological Chemistry* 274 (3): 1359-65. doi:10.1074/jbc.274.3.1359.
- Shima, David T., Masatoshi Kuroki, Urban Deutsch, Yin-Shan Ng, Anthony P. Adamis, et Patricia A. D'Amore. 1996. « The Mouse Gene for Vascular Endothelial Growth Factor GENOMIC STRUCTURE, DEFINITION OF THE TRANSCRIPTIONAL UNIT, AND CHARACTERIZATION OF TRANSCRIPTIONAL AND POST-TRANSCRIPTIONAL REGULATORY SEQUENCES ». *Journal of Biological Chemistry* 271 (7): 3877-83. doi:10.1074/jbc.271.7.3877.
- Shinkai, Akeo, Mikito Ito, Hideharu Anazawa, Sachiko Yamaguchi, Kenya Shitara, et Masabumi Shibuya. 1998. « Mapping of the Sites Involved in Ligand Association and Dissociation at the Extracellular Domain of the Kinase Insert Domain-Containing Receptor for Vascular Endothelial Growth Factor ». *Journal of Biological Chemistry* 273 (47): 31283-88. doi:10.1074/jbc.273.47.31283.
- Shiose, Satomi, Taiji Sakamoto, Hiroshi Yoshikawa, Yasuaki Hata, Yoichi Kawano, Tatsuro Ishibashi, Hajime Inomata, Koichi Takayama, et Hikaru Ueno. 2000. « Gene Transfer of a Soluble Receptor of VEGF Inhibits the Growth of Experimental Eyelid Malignant Melanoma ». *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 41 (9): 2395-2403.

- Shraga-Heled, N., O. Kessler, C. Prahst, J. Kroll, H. Augustin, et G. Neufeld. 2007. « Neuropilin-1 and Neuropilin-2 Enhance VEGF121 Stimulated Signal Transduction by the VEGFR-2 Receptor ». *The FASEB Journal* 21 (3): 915-26. doi:10.1096/fj.06-6277com.
- Shweiki, Dorit, Ahuva Itin, Dov Soffer, et Eli Keshet. 1992. « Vascular Endothelial Growth Factor Induced by Hypoxia May Mediate Hypoxia-Initiated Angiogenesis ». *Nature* 359 (6398): 843-45. doi:10.1038/359843a0.
- « Signal relays in the VEGF system | Nathalie Ortega - Academia.edu ». 2016. Consulté le septembre 14. http://www.academia.edu/7990358/Signal_relays_in_the_VEGF_system.
- Soda, Manabu, Young Lim Choi, Munehiro Enomoto, Shuji Takada, Yoshihiro Yamashita, Shunpei Ishikawa, Shin-ichiro Fujiwara, et al. 2007. « Identification of the Transforming EML4-ALK Fusion Gene in Non-Small-Cell Lung Cancer ». *Nature* 448 (7153): 561-66. doi:10.1038/nature05945.
- Soda, Manabu, Shuji Takada, Kengo Takeuchi, Young Lim Choi, Munehiro Enomoto, Toshihide Ueno, Hidenori Haruta, et al. 2008. « A Mouse Model for EML4-ALK-Positive Lung Cancer ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (50): 19893-97. doi:10.1073/pnas.0805381105.
- Soker, Shay, Seiji Takashima, Hua Quan Miao, Gera Neufeld, et Michael Klagsbrun. 1998. « Neuropilin-1 Is Expressed by Endothelial and Tumor Cells as an Isoform-Specific Receptor for Vascular Endothelial Growth Factor ». *Cell* 92 (6): 735-45. doi:10.1016/S0092-8674(00)81402-6.
- Soldi, R, S Mitola, M Strasly, P Defilippi, G Tarone, et F Bussolino. 1999. « Role of alphavbeta3 integrin in the activation of vascular endothelial growth factor receptor-2. » *The EMBO Journal* 18 (4): 882-92. doi:10.1093/emboj/18.4.882.
- Somanath, Payaningal R., Alieta Ciocea, et Tatiana V. Byzova. 2009. « Integrin and Growth Factor Receptor Alliance in Angiogenesis ». *Cell biochemistry and biophysics* 53 (2): 53-64. doi:10.1007/s12013-008-9040-5.
- Sondell, Mariann, Göran Lundborg, et Martin Kanje. 1999. « Vascular Endothelial Growth Factor Has Neurotrophic Activity and Stimulates Axonal Outgrowth, Enhancing Cell Survival and Schwann Cell Proliferation in the Peripheral Nervous System ». *The Journal of Neuroscience* 19 (14): 5731-40.
- Soro, Simonetta, Angela Orecchia, Lucia Morbidelli, Pedro Miguel Lacal, Veronica Morea, Kurt Ballmer-Hofer, Federica Ruffini, et al. 2008a. « A Proangiogenic Peptide Derived from Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 Acts through $\alpha 5 \beta 1$ Integrin ». *Blood* 111 (7): 3479-88. doi:10.1182/blood-2007-03-077537.
- . 2008b. « A Proangiogenic Peptide Derived from Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 Acts through $\alpha 5 \beta 1$ Integrin ». *Blood* 111 (7): 3479-88. doi:10.1182/blood-2007-03-077537.
- Spigel, David R., Scott N. Gettinger, Leora Horn, Roy S. Herbst, Leena Gandhi, Michael S. Gordon, Cristina Cruz, et al. 2013. « Clinical activity, safety, and biomarkers of MPDL3280A, an engineered PD-L1 antibody in patients with locally advanced or metastatic non-small cell lung cancer (NSCLC). » *ASCO Meeting Abstracts* 31 (15_suppl): 8008.
- Staton, Ca, I Kumar, Mwr Reed, et Nj Brown. 2007. « Neuropilins in Physiological and Pathological Angiogenesis ». *The Journal of Pathology* 212 (3): 237-48. doi:10.1002/path.2182.
- Stawowy, P, C Margeta, F Blaschke, C Lindschau, C Spencerhansch, M Leitges, G Biagini, E Fleck, et K Graf. 2005. « Protein Kinase C Epsilon Mediates Angiotensin II-Induced Activation of β -Integrins in Cardiac Fibroblasts ». *Cardiovascular Research* 67 (1): 50-59. doi:10.1016/j.cardiores.2005.03.002.
- Stephens, Philip J., Chris D. Greenman, Beiyuan Fu, Fengtang Yang, Graham R. Bignell, Laura J. Mudie, Erin D. Pleasance, et al. 2011. « Massive Genomic Rearrangement Acquired in a Single

- Catastrophic Event during Cancer Development ». *Cell* 144 (1): 27-40. doi:10.1016/j.cell.2010.11.055.
- Stewart, M, H Turley, N Cook, F Pezzella, G Pillai, D Ogilvie, S Cartlidge, et al. 2003. « The Angiogenic Receptor KDR Is Widely Distributed in Human Tissues and Tumours and Relocates Intracellularly on Phosphorylation. An Immunohistochemical Study ». *Histopathology* 43 (1): 33-39. doi:10.1046/j.1365-2559.2003.01644.x.
- Stoecklin, Georg, Brigitte Gross, Xiu-Fen Ming, et Christoph Moroni. 2003. « A Novel Mechanism of Tumor Suppression by Destabilizing AU-Rich Growth Factor mRNA ». *Oncogene* 22 (23): 3554-61. doi:10.1038/sj.onc.1206418.
- Stoeltzing, Oliver, Wenbiao Liu, Niels Reinmuth, Fan Fan, Graham C. Parry, Alexander A. Parikh, Marya F. McCarty, Corazon D. Bucana, Andrew P. Mazar, et Lee M. Ellis. 2003. « Inhibition of Integrin $\alpha 5 \beta 1$ Function with a Small Peptide (ATN-161) plus Continuous 5-FU Infusion Reduces Colorectal Liver Metastases and Improves Survival in Mice ». *International Journal of Cancer* 104 (4): 496-503. doi:10.1002/ijc.10958.
- Stratton, Michael R., Peter J. Campbell, et P. Andrew Futreal. 2009. « The Cancer Genome ». *Nature* 458 (7239): 719-24. doi:10.1038/nature07943.
- Stuttfield, Edward, et Kurt Ballmer-Hofer. 2009. « Structure and Function of VEGF Receptors ». *IUBMB Life* 61 (9): 915-22. doi:10.1002/iub.234.
- Sugahara, Kazuki N., Tambet Teesalu, Priya Prakash Karmali, Venkata Ramana Kotamraju, Lilach Agemy, Daniel R. Greenwald, et Erkki Ruoslahti. 2010. « Coadministration of a tumor-penetrating peptide enhances the efficacy of cancer drugs ». *science* 328 (5981): 1031-1035.
- Sveen, A., S. Kilpinen, A. Ruusulehto, R. A. Lothe, et R. I. Skotheim. 2016. « Aberrant RNA Splicing in Cancer; Expression Changes and Driver Mutations of Splicing Factor Genes ». *Oncogene* 35 (19): 2413-27. doi:10.1038/onc.2015.318.
- Szalai, Gabor, Roberto Romero, Tinnakorn Chaiworapongsa, Yi Xu, Bing Wang, Hyunyoung Ahn, Zhonghui Xu, et al. 2015. « Full-Length Human Placental sFlt-1-e15a Isoform Induces Distinct Maternal Phenotypes of Preeclampsia in Mice ». *PLOS ONE* 10 (4): e0119547. doi:10.1371/journal.pone.0119547.

T

- Takahashi, T. 2001. « A single autophosphorylation site on KDR/Flk-1 is essential for VEGF-A-dependent activation of PLC-gamma and DNA synthesis in vascular endothelial cells ». *The EMBO Journal* 20 (11): 2768-78. doi:10.1093/emboj/20.11.2768.
- Takahashi, T., T. Shirasawa, K. Miyake, Y. Yahagi, N. Maruyama, N. Kasahara, T. Kawamura, O. Matsumura, T. Mitarai, et O. Sakai. 1995. « Protein Tyrosine Kinases Expressed in Glomeruli and Cultured Glomerular Cells: Flt-1 and VEGF Expression in Renal Mesangial Cells ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 209 (1): 218-26. doi:10.1006/bbrc.1995.1492.
- Takahashi, Tomoko, Sachiko Yamaguchi, Kazuhiro Chida, et Masabumi Shibuya. 2001. « A Single Autophosphorylation Site on KDR/Flk-1 Is Essential for VEGF-A-dependent Activation of PLC- γ and DNA Synthesis in Vascular Endothelial Cells ». *The EMBO Journal* 20 (11): 2768-78. doi:10.1093/emboj/20.11.2768.
- Takayama, Koichi, Hikaru Ueno, Yoichi Nakanishi, Taiji Sakamoto, Koji Inoue, Kiyoshi Shimizu, Hideya Oohashi, et Nobuyuki Hara. 2000. « Suppression of Tumor Angiogenesis and Growth by

- Gene Transfer of a Soluble Form of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor into a Remote Organ ». *Cancer Research* 60 (8): 2169-77.
- Tao, Dan, Xiaohong Han, Ningning Zhang, Dongmei Lin, Di Wu, Xinxin Zhu, Wenya Song, et Yuankai Shi. 2016. « Genetic Alteration Profiling of Patients with Resected Squamous Cell Lung Carcinomas ». *Oncotarget*, juin. doi:10.18632/oncotarget.9096.
- Tchaikovski, Vadim, Guido Fellbrich, et Johannes Waltenberger. 2008. « The Molecular Basis of VEGFR-1 Signal Transduction Pathways in Primary Human Monocytes ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 28 (2): 322-28. doi:10.1161/ATVBAHA.107.158022.
- Tee, Meng Kian, et Robert B. Jaffe. 2001. « A precursor form of vascular endothelial growth factor arises by initiation from an upstream in-frame CUG codon ». *Biochemical Journal* 359 (1): 219. doi:10.1042/0264-6021:3590219.
- Teesalu, Tabet, Kazuki N. Sugahara, Venkata Ramana Kotamraju, et Erkki Ruoslahti. 2009. « C-End Rule Peptides Mediate Neuropilin-1-Dependent Cell, Vascular, and Tissue Penetration ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (38): 16157-62. doi:10.1073/pnas.0908201106.
- Tepper, Oren M., Robert D. Galiano, Jennifer M. Capla, Christoph Kalka, Paul J. Gagne, Glen R. Jacobowitz, Jamie P. Levine, et Geoffrey C. Gurtner. 2002. « Human Endothelial Progenitor Cells From Type II Diabetics Exhibit Impaired Proliferation, Adhesion, and Incorporation Into Vascular Structures ». *Circulation* 106 (22): 2781-86. doi:10.1161/01.CIR.0000039526.42991.93.
- Tessler, S., P. Rockwell, D. Hicklin, T. Cohen, B. Z. Levi, L. Witte, I. R. Lemischka, et G. Neufeld. 1994. « Heparin Modulates the Interaction of VEGF165 with Soluble and Cell Associated Flk-1 Receptors ». *The Journal of Biological Chemistry* 269 (17): 12456-61.
- Thadhani, Ravi, Tuelay Kisner, Henning Hagmann, Verena Bossung, Stefanie Noack, Wiebke Schaarschmidt, Alexander Jank, et al. 2011. « Pilot study of extracorporeal removal of soluble fms-like tyrosine kinase 1 in preeclampsia ». *Circulation* 124 (8): 940-950.
- Thielemann, Anna, Aleksandra Baszczuk, Zygmunt Kopczyński, Przemysław Kopczyński, et Sylwia Grodecka-Gazdecka. 2013. « Clinical Usefulness of Assessing VEGF and Soluble Receptors sVEGFR-1 and sVEGFR-2 in Women with Breast Cancer ». *Annals of Agricultural and Environmental Medicine: AAEM* 20 (2): 293-97.
- Thomas, Christie P., Janet I. Andrews, Nandita S. Raikwar, Elizabeth A. Kelley, Florian Herse, Ralf Dechend, Thaddeus G. Golos, et Kang Z. Liu. 2009. « A Recently Evolved Novel Trophoblast-Enriched Secreted Form of fms-Like Tyrosine Kinase-1 Variant Is Up-Regulated in Hypoxia and Preeclampsia ». *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 94 (7): 2524-30. doi:10.1210/jc.2009-0017.
- Thomas, Jean-Leon, Kasey Baker, Jinah Han, Charles Calvo, Harri Nurmi, Anne C. Eichmann, et Kari Alitalo. 2013. « Interactions between VEGFR and Notch signaling pathways in endothelial and neural cells ». *Cellular and molecular life sciences: CMLS* 70 (10): 1779-92. doi:10.1007/s00018-013-1312-6.
- Tischer, E., R. Mitchell, T. Hartman, M. Silva, D. Gospodarowicz, J. C. Fiddes, et J. A. Abraham. 1991. « The Human Gene for Vascular Endothelial Growth Factor. Multiple Protein Forms Are Encoded through Alternative Exon Splicing. » *Journal of Biological Chemistry* 266 (18): 11947-54.
- Tobelem, G. 2008. « [Physiologic and neoplastic angiogenesis] ». *Journal De Chirurgie* 145 Spec No 1 (janvier): 1S4-7.
- Toi, Masakazu, Hiroko Bando, Taeko Ogawa, Mariko Muta, Carsten Hornig, et Herbert A. Weich. 2002. « Significance of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)/Soluble VEGF Receptor-1 Relationship in Breast Cancer ». *International Journal of Cancer* 98 (1): 14-18.

- Tomaso, Emmanuelle di, Nyal London, Daniel Fuja, James Logie, James A. Tyrrell, Walid Kamoun, Lance L. Munn, et Rakesh K. Jain. 2009. « PDGF-C Induces Maturation of Blood Vessels in a Model of Glioblastoma and Attenuates the Response to Anti-VEGF Treatment ». Édité par Joseph Alan Bauer. PLoS ONE 4 (4): e5123. doi:10.1371/journal.pone.0005123.
- Torre, Lindsey A., Freddie Bray, Rebecca L. Siegel, Jacques Ferlay, Joannie Lortet-Tieulent, et Ahmedin Jemal. 2015. « Global Cancer Statistics, 2012 ». CA: A Cancer Journal for Clinicians 65 (2): 87-108. doi:10.3322/caac.21262.
- Travis, William D., Elisabeth Brambilla, Masayuki Noguchi, Andrew G. Nicholson, Kim R. Geisinger, Yasushi Yatabe, David G. Beer, et al. 2011. « International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Classification of Lung Adenocarcinoma ». Journal of Thoracic Oncology 6 (2): 244-85. doi:10.1097/JTO.0b013e318206a221.
- Trédaniel, J., S. Aarab-Terrisse, L. Teixeira, F. Savinelli, S. Fraboulet, D. Gossot, et C. Hennequin. 2009. « [Atmospheric air pollution and lung cancer: epidemiologic data] ». Revue Des Maladies Respiratoires 26 (4): 437-445, 484.
- Tsao, Po-Nien, Feng-Tsan Chan, Shu-Chen Wei, Wu-Shiun Hsieh, Hung-Chieh Chou, Yi-Ning Su, Chien-Yi Chen, Wen-Ming Hsu, Fon-Jou Hsieh, et Su-Ming Hsu. 2007. « Soluble Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 Protects Mice in Sepsis ». Critical Care Medicine 35 (8): 1955-60. doi:10.1097/01.CCM.0000275273.56547.B8.
- Turner, Nicholas, et Richard Grose. 2010. « Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer ». Nature Reviews Cancer 10 (2): 116-29. doi:10.1038/nrc2780.

U

- Ullisse, Salvatore, Enke Baldini, Salvatore Sorrenti, et Massimino D'Armiento. 2009. « The Urokinase Plasminogen Activator System: A Target for Anti-Cancer Therapy ». Current Cancer Drug Targets 9 (1): 32-71. doi:10.2174/156800909787314002.
- Ullrich, O., S. Reinsch, S. Urbé, M. Zerial, et R. G. Parton. 1996. « Rab11 Regulates Recycling through the Pericentriolar Recycling Endosome ». The Journal of Cell Biology 135 (4): 913-24.

V

- Valle, J. W., R. K. Ramanathan, R. Glynn-Jones, A. Anthoney, J. Berlin, S. Yazji, et T. R. Evans. 2016. « Phase II study of volociximab (M200), an $\alpha 5\beta 1$ anti-integrin antibody in metastatic adenocarcinoma of the pancreas (MPC) ». ResearchGate. Consulté le août 29. https://www.researchgate.net/publication/40706341_Phase_II_study_of_volociximab_M200_an_alpha5beta1_anti-integrin_antibody_in_metastatic_adenocarcinoma_of_the_pancreas_MPC.
- Van Cutsem, Eric, Josep Tabernero, Radek Lakomy, Hans Prenen, Jana Prausová, Teresa Macarulla, Paul Ruff, et al. 2012a. « Addition of Aflibercept to Fluorouracil, Leucovorin, and Irinotecan Improves Survival in a Phase III Randomized Trial in Patients with Metastatic Colorectal Cancer Previously Treated with an Oxaliplatin-Based Regimen ». Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology 30 (28): 3499-3506. doi:10.1200/JCO.2012.42.8201.

- . 2012b. « Addition of Aflibercept to Fluorouracil, Leucovorin, and Irinotecan Improves Survival in a Phase III Randomized Trial in Patients with Metastatic Colorectal Cancer Previously Treated with an Oxaliplatin-Based Regimen ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 30 (28): 3499-3506. doi:10.1200/JCO.2012.42.8201.
- Vasan, N., J. L. Boyer, et R. S. Herbst. 2014. « A RAS Renaissance: Emerging Targeted Therapies for KRAS-Mutated Non-Small Cell Lung Cancer ». *Clinical Cancer Research* 20 (15): 3921-30. doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-1762.
- Vempati, Prakash, Aleksander S Popel, et Feilim Mac Gabhann. 2011. « Formation of VEGF Isoform-Specific Spatial Distributions Governing Angiogenesis: Computational Analysis ». *BMC Systems Biology* 5 (1): 59. doi:10.1186/1752-0509-5-59.
- Venables, Julian P. 2004. « Aberrant and Alternative Splicing in Cancer ». *Cancer Research* 64 (21): 7647-54. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-1910.
- Verheul, H. M., K. Hoekman, S. Luykx-de Bakker, C. A. Eekman, C. C. Folman, H. J. Broxterman, et H. M. Pinedo. 1997. « Platelet: Transporter of Vascular Endothelial Growth Factor ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 3 (12 Pt 1): 2187-90.
- Verrax, Julien, Florence Defresne, Florence Lair, Gaëlle Vandermeulen, Géraldine Rath, Chantal Dessy, Véronique Prétat, et Olivier Feron. 2011. « Delivery of Soluble VEGF Receptor 1 (sFlt1) by Gene Electrotransfer as a New Antiangiogenic Cancer Therapy ». *Molecular Pharmaceutics* 8 (3): 701-8. doi:10.1021/mp100268t.
- Vincenti, Valeria, Caterina Cassano, Mariano Rocchi, et M. Graziella Persico. 1996. « Assignment of the Vascular Endothelial Growth Factor Gene to Human Chromosome 6p21.3 ». *Circulation* 93 (8): 1493-95. doi:10.1161/01.CIR.93.8.1493.
- Vries, C. de, J. A. Escobedo, H. Ueno, K. Houck, N. Ferrara, et L. T. Williams. 1992a. « The Fms-like Tyrosine Kinase, a Receptor for Vascular Endothelial Growth Factor ». *Science* 255 (5047): 989-91. doi:10.1126/science.1312256.
- . 1992b. « The Fms-like Tyrosine Kinase, a Receptor for Vascular Endothelial Growth Factor ». *Science* 255 (5047): 989-91. doi:10.1126/science.1312256.

W

- Wada, Takeshi, Subrina Jesmin, Satoshi Gando, Yuichiro Yanagida, Asumi Mizugaki, Sayeeda Nusrat Sultana, Sohel Zaedi, et Hiroyuki Yokota. 2013. « The role of angiogenic factors and their soluble receptors in acute lung injury (ALI)/acute respiratory distress syndrome (ARDS) associated with critical illness ». *Journal of Inflammation* 10 (1): 1.
- Wang, L., H. Zeng, P. Wang, S. Soker, et D. Mukhopadhyay. 2003. « Neuropilin-1-Mediated Vascular Permeability Factor/Vascular Endothelial Growth Factor-Dependent Endothelial Cell Migration ». *Journal of Biological Chemistry* 278 (49): 48848-60. doi:10.1074/jbc.M310047200.
- Warner, Andrea J., Jennifer Lopez-Dee, Emma L. Knight, James R. Feramisco, et Sally A. Prigent. 2000. « The Shc-Related Adaptor Protein, Sck, Forms a Complex with the Vascular-Endothelial-Growth-Factor Receptor KDR in Transfected Cells ». *Biochemical Journal* 347 (2): 501-9. doi:10.1042/bj3470501.
- Warren, Carmen M., Safiyyah Ziyad, Anaïs Briot, Aaron Der, et M. Luisa Iruela-Arispe. 2014. « A ligand-independent VEGFR2 signaling pathway limits angiogenic responses in diabetes ». *Science signaling* 7 (307): ra1.

- Webby, C. J., A. Wolf, N. Gromak, M. Dreger, H. Kramer, B. Kessler, M. L. Nielsen, et al. 2009. « Jmjd6 Catalyses Lysyl-Hydroxylation of U2AF65, a Protein Associated with RNA Splicing ». *Science* 325 (5936): 90-93. doi:10.1126/science.1175865.
- Wedge, Stephen R., Jane Kendrew, Laurent F. Hennequin, Paula J. Valentine, Simon T. Barry, Sandra R. Brave, Neil R. Smith, et al. 2005. « AZD2171: A Highly Potent, Orally Bioavailable, Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2 Tyrosine Kinase Inhibitor for the Treatment of Cancer ». *Cancer Research* 65 (10): 4389-4400. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-4409.
- Weinstein, I. Bernard. 2002. « Addiction to Oncogenes--the Achilles Heal of Cancer ». *Science* 297 (5578): 63-64. doi:10.1126/science.1073096.
- Weis, Sara M., et David A. Cheresh. 2011. « Tumor Angiogenesis: Molecular Pathways and Therapeutic Targets ». *Nature Medicine* 17 (11): 1359-70. doi:10.1038/nm.2537.
- Weiss, Jonathan, Martin L. Sos, Danila Seidel, Martin Peifer, Thomas Zander, Johannes M. Heuckmann, Roland T. Ullrich, et al. 2010. « Frequent and Focal FGFR1 Amplification Associates with Therapeutically Tractable FGFR1 Dependency in Squamous Cell Lung Cancer ». *Science Translational Medicine* 2 (62): 62ra93-62ra93. doi:10.1126/scitranslmed.3001451.
- Wey, Jane S., Fan Fan, Michael J. Gray, Todd W. Bauer, Marya F. McCarty, Ray Somcio, Wenbiao Liu, et al. 2005. « Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 Promotes Migration and Invasion in Pancreatic Carcinoma Cell Lines ». *Cancer* 104 (2): 427-38. doi:10.1002/cncr.21145.
- White, Donald E., Natasza A. Kurpios, Dongmei Zuo, John A. Hassell, Sandra Blaess, Ulrich Mueller, et William J. Muller. 2004. « Targeted Disruption of β 1-Integrin in a Transgenic Mouse Model of Human Breast Cancer Reveals an Essential Role in Mammary Tumor Induction ». *Cancer Cell* 6 (2): 159-70. doi:10.1016/j.ccr.2004.06.025.
- Wild, Jonathan R. L., Carolyn A. Staton, Keith Chapple, et Bernard M. Corfe. 2012. « Neuropilins: Expression and Roles in the Epithelium: Neuropilins: Expression and Roles in Epithelium ». *International Journal of Experimental Pathology* 93 (2): 81-103. doi:10.1111/j.1365-2613.2012.00810.x.
- Willett, Christopher G., Dan G. Duda, Emmanuelle di Tomaso, Yves Boucher, Marek Ancukiewicz, Dushyant V. Sahani, Johanna Lahdenranta, et al. 2009. « Efficacy, Safety, and Biomarkers of Neoadjuvant Bevacizumab, Radiation Therapy, and Fluorouracil in Rectal Cancer: A Multidisciplinary Phase II Study ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 27 (18): 3020-26. doi:10.1200/JCO.2008.21.1771.
- Wistuba, Ignacio I., Jarett Berry, Carmen Behrens, Anirban Maitra, Narayan Shivapurkar, Sara Milchgrub, Bruce Mackay, John D. Minna, et Adi F. Gazdar. 2000. « Molecular Changes in the Bronchial Epithelium of Patients with Small Cell Lung Cancer ». *Clinical Cancer Research* 6 (7): 2604-10.
- Witmer, Antonella N., Harriet G. Blaauwgeers, Herbert A. Weich, Kari Alitalo, Gijs F. J. M. Vrensen, et Reinier O. Schlingemann. 2002. « Altered Expression Patterns of VEGF Receptors in Human Diabetic Retina and in Experimental VEGF-Induced Retinopathy in Monkey ». *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 43 (3): 849-57.
- Wu, Florence T H, Marianne O Stefanini, Feilim Mac Gabhann, Christopher D Kontos, Brian H Annex, et Aleksander S Popel. 2010. « A systems biology perspective on sVEGFR1: its biological function, pathogenic role and therapeutic use ». *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 14 (3): 528-52. doi:10.1111/j.1582-4934.2009.00941.x.

X

- Xia, Lin, Zhaogang Dong, Yun Zhang, Xiaoying Zhang, Xiaobin Song, Mingxia Sun, Yingwei Hu, et al. 2016. « Interleukin-4 and Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Mediates the Upregulation of Soluble Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 in RAW264.7 Cells—a Process in Which p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Has an Important Role ». *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* 49 (3): 344-51. doi:10.1016/j.jmii.2014.06.008.
- Xiong, Yali, Dan A. Liebermann, Jennifer S. Tront, Eliezer J. Holtzman, Yajue Huang, Barbara Hoffman, et Ossie Geifman-Holtzman. 2009. « Gadd45a Stress Signaling Regulates sFlt-1 Expression in Preeclampsia ». *Journal of Cellular Physiology* 220 (3): 632-39. doi:10.1002/jcp.21800.
- Xu, Xia, Lingling Huang, Christopher Futtner, Brian Schwab, Rishi R. Rampersad, Yun Lu, Thomas A. Sporn, Brigid L. M. Hogan, et Mark W. Onaitis. 2014. « The Cell of Origin and Subtype of K-Ras-Induced Lung Tumors Are Modified by Notch and Sox2 ». *Genes & Development* 28 (17): 1929-39. doi:10.1101/gad.243717.114.

Y

- Yadav, Lalita, Naveen Puri, Varun Rastogi, Pranali Satpute, et Vandana Sharma. 2015. « Tumour Angiogenesis and Angiogenic Inhibitors: A Review ». *Journal of Clinical and Diagnostic Research : JCDR* 9 (6): XE01-XE05. doi:10.7860/JCDR/2015/12016.6135.
- Yamamoto, Hiromasa, Hisayuki Shigematsu, Masaharu Nomura, William W. Lockwood, Mitsuo Sato, Naoki Okumura, Junichi Soh, et al. 2008. « PIK3CA Mutations and Copy Number Gains in Human Lung Cancers ». *Cancer Research* 68 (17): 6913-21. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-5084.
- Yamaoka-Tojo, Minako, Masuko Ushio-Fukai, Lula Hilenski, Sergey I. Dikalov, Yuqing E. Chen, Taiki Tojo, Tohru Fukai, et al. 2004. « IQGAP1, a novel vascular endothelial growth factor receptor binding protein, is involved in reactive oxygen species—dependent endothelial migration and proliferation ». *Circulation research* 95 (3): 276–283.
- Yaqoob, Usman, Sheng Cao, Uday Shergill, Kumaravelu Jagavelu, Zhimin Geng, Meng Yin, Thiago M de Assuncao, et al. 2012. « Neuropilin-1 stimulates tumor growth by increasing fibronectin fibril assembly in the tumor microenvironment ». *Cancer research* 72 (16): 4047-59. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-3907.
- Yeh, Tammie C., Vivienne Marsh, Bryan A. Bernat, Josh Ballard, Heidi Colwell, Ron J. Evans, Janet Parry, et al. 2007. « Biological Characterization of ARRY-142886 (AZD6244), a Potent, Highly Selective Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 1/2 Inhibitor ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 13 (5): 1576-83. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-1150.

Z

- Zhang, Jianming, Priscilla L. Yang, et Nathanael S. Gray. 2009. « Targeting Cancer with Small Molecule Kinase Inhibitors ». *Nature Reviews Cancer* 9 (1): 28-39. doi:10.1038/nrc2559.
- Zhang, T., V. Kruys, G. Huez, et C. Gueydan. 2002. « AU-Rich Element-Mediated Translational Control: Complexity and Multiple Activities of Trans-Activating Factors ». *Biochemical Society Transactions* 30 (6): 952-58. doi:10.1042/bst0300952.
- Zhang, Xiaobo, John P. Gaspard, et Daniel C. Chung. 2001. « Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor by the Wnt and K-Ras Pathways in Colonic Neoplasia ». *Cancer Research* 61 (16): 6050-54.
- Zhao, D., C. Pan, J. Sun, C. Gilbert, K. Drews-Elger, D. J. Azzam, M. Picon-Ruiz, et al. 2015. « VEGF Drives Cancer-Initiating Stem Cells through VEGFR-2/Stat3 Signaling to Upregulate Myc and Sox2 ». *Oncogene* 34 (24): 3107-19. doi:10.1038/onc.2014.257.
- Zhou, S. 1993. « SH2 Domains Recognize Specific Phosphopeptide Sequences ». *Cell* 72 (5): 767-78. doi:10.1016/0092-8674(93)90404-E.
- Zhu, Andrew X., Marek Ancukiewicz, Jeffrey G. Supko, Lawrence Scott Blaszewsky, Jeffrey A. Meyerhardt, Thomas Adam Abrams, Nadine Jackson McCleary, et al. 2012. « Clinical, pharmacodynamic (PD), and pharmacokinetic (PK) evaluation of cediranib in advanced hepatocellular carcinoma (HCC): A phase II study (CTEP 7147). » *ASCO Meeting Abstracts* 30 (15_suppl): 4112.
- Zhu, Andrew X., Marek Ancukiewicz, Jeffrey G. Supko, Dushyant V. Sahani, Lawrence S. Blaszewsky, Jeffrey A. Meyerhardt, Thomas A. Abrams, et al. 2013. « Efficacy, Safety, Pharmacokinetics, and Biomarkers of Cediranib Monotherapy in Advanced Hepatocellular Carcinoma: A Phase II Study ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 19 (6): 1557-66. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-3041.
- Zhu, Andrew X., Dushyant V. Sahani, Dan G. Duda, Emmanuelle di Tomaso, Marek Ancukiewicz, Onofrio A. Catalano, Vivek Sindhwani, et al. 2009. « Efficacy, safety, and potential biomarkers of sunitinib monotherapy in advanced hepatocellular carcinoma: a phase II study ». *Journal of Clinical Oncology* 27 (18): 3027-3035.
- Zhu, Andrew X., Dushyant V. Sahani, Dan G. Duda, Emmanuelle di Tomaso, Marek Ancukiewicz, Onofrio A. Catalano, Vivek Sindhwani, et al. 2009. « Efficacy, Safety, and Potential Biomarkers of Sunitinib Monotherapy in Advanced Hepatocellular Carcinoma: A Phase II Study ». *Journal of Clinical Oncology* 27 (18): 3027-35. doi:10.1200/JCO.2008.20.9908.

Annexe 1

VEGF₁₆₅b promotes lung tumor progression and escape from anti-angiogenic therapies through a β 1 integrin/VEGFR/neuropilin autocrine loop

Asma Boudria^{1,2}, Stephanie Gout^{1,2}, Michelle Keramidas^{2,3}, Cherine Abou Faycal^{1,2}, Sandra Manet^{2,4}, Jean-Luc Coll^{2,3}, Anne-Claire Toffart^{2,5}, Denis Moro-Sibilot^{2,5}, Corinne Albiges-Rizo^{2,4}, Eva Faurobert^{2,4}, Christian Brambilla^{2,5}, Elisabeth Brambilla^{2,5}, Sylvie Gazzeri^{1,2} and Beatrice Eymin^{1,2*}

¹ INSERM U1209, UMR CNRS 5309, Team RNA splicing, Cell Signaling and Response to Therapies, Grenoble, 38042, France.

² Université Grenoble Alpes, Institut Albert Bonniot, Grenoble, 38041, France.

³ INSERM, U1209, UMR CNRS 5309, Team Cancer Targets and Experimental Therapeutics, Grenoble, 38042, France.

⁴ INSERM U1209, UMR CNRS 5309, Team Cell Adhesion Dynamics and Differentiation, Grenoble, 38042, France

⁵ INSERM U1209, UMR CNRS 5309, Team Tumor Molecular Pathology and Biomarkers, Grenoble, 38042, France

Running title: VEGF₁₆₅b and tumor progression

Total character count: 41909

* Corresponding author:

Dr. Beatrice Eymin

INSERM U1209, CNRS UMR5309 Institute For Advanced Biosciences,

BP170 38042 Grenoble Cedex 09, FRANCE

Tel: +33 4 76 54 94 76 / Fax: +33 4 76 54 94 13

email: Beatrice.Eymin@ujf-grenoble.fr

To whom requests for reprints should be addressed

Abstract

Vascular Endothelial Growth Factor-A (VEGF-A) is highly subjected to alternative pre-mRNA splicing that generates several splice variants with either pro-(VEGF_{xxx}) or anti-(VEGF_{xxx}b) angiogenic properties. However, distinct functions of the various VEGF-A isoforms on tumor cells themselves remain largely unknown. In this study, we identify a VEGFR/ β 1 integrin/neuropilin-2 autocrine loop by which VEGF₁₆₅b specifically promotes the proliferation of lung tumor cells and induces an invasive phenotype, together with increased expression of stem cell markers. In Non Small Cell Lung Carcinoma (NSCLC), we correlate high levels of VEGF₁₆₅b or VEGF₁₆₅b/VEGF₁₆₅ ratio with advanced stages and lymph node metastases, respectively. Importantly, we demonstrate that bevacizumab, an anti-angiogenic compound used for the treatment of NSCLC patients, specifically increases the expression of VEGF₁₆₅b and activates the invasive VEGFR/ β 1 integrin/neuropilin loop. Overall, these data unravel an unexpected role of the VEGF₁₆₅b splice variant, previously known as an anti-angiogenic VEGF-A isoform, in the progression of lung tumors and their escape from anti-angiogenic therapies.

Keywords: anti-angiogenic therapies; lung tumor; pre-mRNA alternative splicing; VEGF₁₆₅b.

Introduction

Angiogenesis is a complex process, by which new blood vessels arise from the pre-existing vasculature, that contributes to several diseases including cancer (1, 2). Vascular Endothelial Growth Factor-A (VEGF-A) is secreted by tumor cells and plays a crucial role in different aspects of tumor-induced angiogenesis. Binding of VEGF-A to its cognate tyrosine kinase receptors VEGFR-1 (Flt-1) or VEGFR-2 (Flk-1/KDR) and their co-receptors neuropilin-1 and neuropilin-2, promotes the activation of downstream signaling pathways that control proliferation, survival and migration of endothelial cells thus also controls neo-angiogenesis (3, 4). However, it has become apparent that the function of VEGF-A is not restricted to angiogenesis and vascular permeability (5). Besides acting on endothelial cells through paracrine signaling, VEGF-A also impacts tumor cells themselves, especially those that express VEGF receptors and neuropilins, including lung tumors (6). Such VEGF-A autocrine signaling might be essential for tumor initiation, survival, proliferation or invasion as it promotes de-differentiation, and epithelial to mesenchymal transition, but also because it regulates the self-renewal of cancer stem cells (7) (8) (9) (10). However, recent studies have revealed VEGF-A biology to be even more complex. As an example, VEGF-A was shown to prevent tumor cell invasion and mesenchymal transition in glioblastoma through activation of a MET/VEGFR2 signaling pathway (11). In early squamous lung carcinoma patients, combination of high levels of VEGF-A, VEGFR1 and VEGFR2 was associated with a better rather than a worse outcome (12).

It has been known for two decades that VEGF-A is expressed as multiple isoforms generically referred to as VEGF_{xxx} which result from the pre-mRNA alternative splicing of eight exons (13). To date, nine VEGF_{xxx} isoforms have been described, which range in length from 111 to

206 amino acid residues (VEGF₁₁₁₋₂₀₆). In 2002, a sister family of VEGF-A isoforms termed VEGF_{xxx}b was identified (14) (15). VEGF_{xxx}b isoforms are generated through the use of an alternative 3' splice acceptor site in the final exon 8 of VEGF-A. This leads to the synthesis of proteins with the same length as the VEGF_{xxx} isoforms, but with a distinct C-terminal domain (14). At the molecular level, owing to the absence of the basic carboxy-terminal amino acids essential for neuropilin-1 binding, VEGF₁₆₅b cannot trigger a strong and sustained activation of VEGFR2, and it inhibits the classical VEGF downstream signaling pathways in endothelial cells (16) (17) (18). Therefore, while VEGF₁₆₅ is a pro-angiogenic factor, VEGF₁₆₅b acts as an anti-angiogenic one (14) (16) (19). In agreement with these results, a decrease of VEGF₁₆₅b correlates with a poor prognosis in various tumors such as melanoma (19). Nevertheless, some tumors have paradoxically high levels of VEGF_{xxx}b protein, such as infiltrating ductal breast carcinoma (20), arguing in favor of a differential role of VEGF₁₆₅b according to the tumor type.

Owing to the crucial role of neo-angiogenesis in tumor development, several anti-angiogenic therapies have been developed that inhibit either VEGF-A binding or VEGFR tyrosine kinase activity. However, these therapies modestly improve overall survival. Interestingly, recent studies highlighted *VEGF-A* pre-mRNA splicing as a potential reservoir for predictive biomarkers to anti-angiogenic therapies. Hence, improved Progression Free Survival (PFS) and/or Overall Survival (OS) after treatment with the humanized monoclonal anti-VEGF-A antibody, bevacizumab is observed in breast, gastric or pancreatic cancer patients expressing high plasma levels of the shortest and most diffusible VEGF-A isoform (VEGF₁₂₁) (21) (22). In addition, metastatic colorectal cancer patients with a low VEGF₁₆₅b:VEGF_{total} tumor ratio have a better outcome when treated with the combination of the FOLFOX4 chemotherapeutic protocol with bevacizumab compared to FOLFOX4 alone (23). Therefore, deciphering the

expression pattern and specific functions of VEGF_{xxx} and VEGF_{xxx}b splice isoforms in tumors might be critical when considering the response to these therapies. In this study, we unravel an unexpected role of the VEGF₁₆₅b splice variant. We show that VEGF₁₆₅b stimulates lung adenocarcinoma progression and contributes to escape from bevacizumab treatment through the activation of an invasive β 1 integrin/VEGFR/neuropilin-2 autocrine loop. As a whole, our results reveal that VEGF₁₆₅b has a dual function, acting either as a tumor suppressor or a tumor promoter.

Results

VEGF₁₆₅b promotes cell proliferation and lung adenocarcinoma growth

To investigate the autocrine functions of VEGF₁₆₅b and VEGF₁₆₅ splice variants in Non Small Cell Lung Carcinoma (NSCLC), we first chose to generate stable clones overexpressing either isoform in two cellular models derived from lung adenocarcinoma, namely H358 and H1299. Surprisingly and despite repetitive assays, we were not able to obtain stable clones overexpressing VEGF₁₆₅ in either cell line. In contrast, clones which expressed high level of VEGF₁₆₅b were generated (Supplementary Figure 1a), and we noticed that they proliferated faster than their control counterparts (Figure 1a). Same results were obtained when conditioned medium derived from these clones (Supplementary Figure 1b) or from VEGF₁₆₅b-overexpressing HEK cells (Supplementary Figure 1c) was applied to H358 or H1299 native cells. In agreement with these results, cells treated with recombinant human VEGF₁₆₅b ligand (rhVEGF₁₆₅b) displayed increased proliferation whereas cells treated with VEGF₁₆₅ did not (Figure 1b). Conversely, cells transfected with siRNA specifically targeting the *VEGF₁₆₅b*

isoform grew slower than *mismatch* transfected cells (Figure 1c). We also observed that VEGF₁₆₅-treated cells detached from the Petri dishes. Combined with the inability to generate stable clones overexpressing VEGF₁₆₅, these results strongly suggested a deleterious effect of VEGF₁₆₅. Consistently, rhVEGF₁₆₅ induced apoptosis in both H358 and H1299 models (Figure 1d). These results were confirmed in cells transiently transfected with a VEGF₁₆₅-encoding plasmid (Supplementary Figure 1d). Taken together, these data showed a distinct effect of VEGF₁₆₅ and VEGF₁₆₅b splice variants, and provided the first evidence that VEGF₁₆₅b stimulates the proliferation of lung tumor cells.

To test whether VEGF₁₆₅b might also stimulate lung tumor growth in vivo, we designed in vivo experiments in which H358 cells were sub-cutaneously injected into nude mice and allowed to form tumors. When tumors reached around 30-40 mm³, mice were sub-divided in 2 groups that received either PBS + *mismatch* siRNA [*mismatch*] or PBS + VEGF₁₆₅b siRNA [VEGF₁₆₅b] before being sacrificed at day 59. In agreement with a role of VEGF₁₆₅b in lung tumor growth, tumors deprived of VEGF₁₆₅b were smaller than control xenografts (Figure 1e). Importantly, CD31 or α -SMA endothelial staining was not different between the groups (data not shown), strongly suggesting that tumor growth inhibition is not associated with decreased neo-angiogenesis. To confirm these data, and as it was previously reported that the splicing factor SRSF6 physiologically induces VEGF₁₆₅b expression in primary epithelial cells (24), we generated stable myc-tagged SRSF6-overexpressing clones in the H358 cell line. In agreement with the notion that SRSF6 is a potent inducer of VEGF₁₆₅b expression in lung adenocarcinoma cells also, we obtained clones with a two-fold increased expression of VEGF₁₆₅b compared to control cells, despite a reduction in overall VEGF-A level (Supplementary Figure 1e). Consistent with the anti-angiogenic properties of secreted VEGF₁₆₅b, HUVEC cells cultured with conditioned medium of the SRSF6 clones were unable to form tubes in matrigel (Supplementary Figure 1f). Nevertheless, H358-SRSF6 xenografts

grew faster than control tumors (Supplementary Figure 1g) and reached higher tumor weights (Figure 1f.). Again, any significant difference in microvascular density as revealed by CD31 or α -SMA staining of neo-vessels was observed (data not shown). Therefore in agreement with our in vitro results, these data strongly suggested that VEGF₁₆₅b stimulates lung tumor growth by autocrine rather than paracrine mechanisms.

Lung adenocarcinoma express high levels of VEGF₁₆₅b

The above results prompted us to analyze the status of VEGF₁₆₅ and VEGF₁₆₅b in a series of normal lung parenchyma tissues and 76 NSCLCs, including 41 adenocarcinomas (ADC) and 35 squamous cell lung carcinomas (SCC) using specific anti-VEGF₁₆₅ and anti-VEGF₁₆₅b antibodies we generated in the laboratory (Supplementary Figure 2a). In normal lung, a moderate diffuse cytoplasmic staining of both VEGF₁₆₅ and VEGF₁₆₅b isoforms was observed in bronchial basal cells and hyperplastic type II pneumonocytes (Supplementary Figures 2b and 3). NSCLCs had a more heterogeneous pattern of VEGF₁₆₅b and VEGF₁₆₅ staining (Table 1, Figures 2a and 2b and Supplementary Figure 3). Compared to normal lung tissues, we observed that 46% (35/76) of NSCLC have low (class 0) VEGF₁₆₅ protein expression (Table 1). These results were unexpected as it is currently thought that the VEGF₁₆₅ isoform is the main VEGF-A isoform overexpressed in tumors. On the other hand, we found that 26% (20/76) of NSCLC, and mostly ADC patients (34%, 14/41), express high intra-tumoral VEGF₁₆₅b protein levels (class 2, Table 1). Interestingly, higher VEGF₁₆₅b circulating levels were also observed in the sera of a subset of lung adenocarcinoma patients compared to healthy control subjects (Figure 2c). Same patterns of VEGF₁₆₅/VEGF₁₆₅b expression were found in various cellular models derived from lung ADC or SCC compared to immortalized human bronchial epithelial HBEK-3KT cells (Supplementary Figure 2c). Importantly, we

noticed that high levels of VEGF₁₆₅b correlate with advanced PTM III/IV stages (p=0.0413; Supplementary Table 1). Combined with our in vitro data (Figure 1), these in situ observations suggest that VEGF₁₆₅b contributes to NSCLC aggressivity.

VEGF₁₆₅b activates a VEGFR/NRP autocrine loop to promote tumor cell proliferation

In close relationship with tumor growth, the knock-down of VEGF₁₆₅b in H358-derived xenografts significantly decreased KI67 staining, a marker of cell proliferation (Figure 3a). On the other hand, SRSF6-overexpressing xenografts exhibited an increased KI67 staining (Figure 3b). Lung adenocarcinoma cells express VEGFR1, VEGFR2, neuropilin-1 and neuropilin-2 receptors (6). In endothelial cells, it has been previously shown that VEGF₁₆₅b does not activate VEGFR receptors efficiently owing to its inability to bind neuropilins (14). Nevertheless, and based on the above results, we postulated that rhVEGF₁₆₅b may activate VEGFR signaling pathways in tumor cells to promote cellular proliferation. We found that a long-term rhVEGF₁₆₅b treatment triggers a persistent accumulation of activated P-VEGFR1(Tyr1213), P-VEGFR2(Tyr1054/1059) and P-VEGFR2(Tyr1214) proteins, which was associated with the accumulation of neuropilin-1 (NRP1) and/or neuropilin-2 (NRP2) (Figure 3c and Supplementary Figure 4a). Furthermore, we observed that rhVEGF₁₆₅b causes an increase in *VEGFR1*, *VEGFR2*, *NRP1* and *NRP2* mRNA levels (Supplementary Figure 4b). All these regulations were never found with rhVEGF₁₆₅ (Figure 3c and Supplementary Figures 4a and 4b) although it was able to induce the phosphorylation of both VEGFR1/VEGFR2 receptors at early time points (Supplementary Figure 4c). In agreement with these results, the knock-down of VEGF₁₆₅b strongly decreased VEGFR1, P-VEGFR1(Tyr1213) and VEGFR2 immunostainings in H358-derived xenografts (Figure 3d). Furthermore, a strong immunostaining of VEGFR1, P-VEGFR1(Tyr1213), VEGFR2,

neuropilin-1 and neuropilin-2 was detected in about 50% of primary lung tumors compared to normal lung tissues (Table 2), and a significant association between VEGF₁₆₅b and VEGFR1 ($p=0.0325$), neuropilin-1 ($p=0.016$) or neuropilin-2 ($p=0.0176$) status was observed (Supplementary Table 2). In contrast, no correlation was found between VEGF₁₆₅ and VEGFR1, P-VEGFR1(Tyr1213), VEGFR2, neuropilin-1 or neuropilin-2 status (Supplementary Table 3). These results showed that VEGF₁₆₅b activates a VEGFR/neuropilin autocrine loop in lung tumor cells. Interestingly, such activation was associated with the downstream up-regulation of P-ERK1/2 and P-p38MAPK (Figure 3c and Supplementary Figure 4a). Activation of VEGFR receptors together with accumulation of P-ERK1/2 and P-p38MAPK were confirmed in VEGF₁₆₅b-overexpressing clones (Figure 3e) and the inhibition of ERK signaling by the use of U0126, a MEK1 pharmacological inhibitor, slowed-down cell proliferation (Figure 3f). Together, these results demonstrated that VEGF₁₆₅b triggers a sustained activation of VEGFR-dependent signaling pathways that promotes ERK1/2-dependent tumor cells proliferation.

Anti-angiogenic treatments increase VEGF₁₆₅b expression

Bevacizumab, a humanized monoclonal antibody against VEGF-A, is currently used in the clinic for the treatment of lung adenocarcinoma patients. However, despite early promise, the overall survival rate is disappointing and the molecular mechanisms involved in tumor escape remain largely unknown. It was shown that VEGF-A controls its own translation (25). Thus, we postulated that bevacizumab may influence VEGF₁₆₅b expression. As illustrated in Figure 4a, bevacizumab induced a dose-dependent intra-cellular accumulation of the VEGF₁₆₅b protein in H358 cells. In contrast, the level of pan-VEGF-A decreased in the same conditions (Figure 4a). Same results were obtained using semaxanib (SU5416), a VEGFR tyrosine

kinase inhibitor (Figure 4b). Furthermore, treatment of H358-xenografted mice with bevacizumab up-regulated VEGF₁₆₅b protein level as detected by immunohistochemistry (Figure 4c), while it did not affect VEGF₁₆₅ expression (data not shown). As a whole, these results are the first evidence that anti-angiogenic therapies increase the expression of VEGF₁₆₅b. At the molecular level, bevacizumab induced accumulation of phosphorylated VEGFR1/VEGFR2 and p38 MAPK (Figure 4d and Supplementary Figure 5a) and increased *VEGFR1/VEGFR2* mRNA levels (Supplementary Figure 5b). Importantly, the knock-down of VEGF₁₆₅b prevented the activation of VEGFR1/VEGFR2 and p38MAPK induced by bevacizumab. Decreased VEGFR1, P-VEGFR1(Tyr1213) and VEGFR2 immunostainings following VEGF₁₆₅b neutralization was also observed in bevacizumab-treated xenografts (Figure 4e). Taken together, these results clearly indicated that bevacizumab activates the VEGF₁₆₅b/VEGFR autocrine loop in lung tumors. However, as we did not detect significant effect of bevacizumab on tumor growth in vivo (data not shown), nor on ERK1/2 activation in vitro (Figure 4d and Supplementary Figure 5a), these data strongly suggested that VEGF₁₆₅b triggers other functions besides its proliferative ones upon bevacizumab treatment.

Bevacizumab is currently used in combination with platinum salts for the treatment of NSCLC patients. We showed that cisplatin also increased the expression level of VEGF₁₆₅b in ADC cell lines while a decrease of pan-VEGF-A was observed (Figure 4f). A stronger accumulation of VEGF₁₆₅b occurred upon co-treatment with cisplatin and bevacizumab. In agreement with these results, an elevated VEGF₁₆₅b:VEGF-A_{total} ratio was observed in the sera of 4/10 lung ADC patients following bevacizumab/cisplatin treatment (Supplementary Figure 6a) and VEGF₁₆₅b was found to represent 20% to 60% of all VEGF-A_{total} in the sera of treated patients (data not shown). Interestingly, the specific neutralization of VEGF₁₆₅b in ADC cell lines increased caspase-3 cleavage in response to cisplatin (Supplementary Figure 6b), suggesting that VEGF₁₆₅b could also act as an inhibitor of apoptosis. In agreement with this

hypothesis, VEGF₁₆₅b clones were more resistant to cisplatin-induced apoptosis (Supplementary Figure 6c). In contrast, inhibition of VEGF₁₆₅b activity by the use of a neutralizing anti-VEGF₁₆₅b antibody increased cells sensitivity (Supplementary Figure 6d). Together, these results demonstrate that VEGF₁₆₅b prevents apoptosis in response to anti-angiogenic therapies used in combination with platinum salts.

VEGF₁₆₅b also promotes an invasive phenotype upon bevacizumab treatment

When performing all the above studies, we noticed that cells treated with rhVEGF₁₆₅b exhibited morphological changes, suggesting phenotypic transformation. Consistently, accumulation of EMT markers such as N-cadherin, SNAIL, vimentin or fibronectin was observed (Supplementary Figure 7a). These EMT features were never observed in response to rhVEGF₁₆₅. SRSF6-overexpressing xenografts also evidenced epithelial to mesenchymal transition compared to control xenografts, as shown by the decrease of E-cadherin and the accumulation of N-cadherin and vimentin proteins (Supplementary Figure 7b). To extend these results, we took advantage of our VEGF₁₆₅b clones. We showed that VEGF₁₆₅b overexpression induces the accumulation of EMT markers (Figure 5a) and closes wounds faster than control cells (Figure 5b). Of note, H358 cells were not tested in wound healing assay as they never reach confluency when grown in Petri dishes. However, in transwell assays, H358-VEGF₁₆₅b clones transmigrated more efficiently than control cells (Figure 5c). We also found that H1299-VEGF₁₆₅b clones produce more pro-MMP9 and active MMP9 metalloproteinases (Figure 5d), arguing again in favour of a more invasive phenotype. In agreement with these results, high VEGF₁₆₅b/VEGF₁₆₅ ratios were associated with the presence of lymph node metastases (pN+) in NSCLC (Figure 5e; p=0.0403). Interestingly, aldehyde dehydrogenase 1A1 (ALDH1A1), CD133 and/or CD15 mRNA levels significantly

increased in VEGF₁₆₅b clones compared to control cells (Figure 5f). As these markers are associated with stemness in lung cancer cells, these results indicate that VEGF₁₆₅b also promotes the genesis of cancer stem cells that is consistent with its proliferative (Figure 1a), invasive (Figures 5b and 5c) but also anti-apoptotic functions (Supplementary Figures 6b, 6c and 6d). Treatment of H1299 cells with bevacizumab for a long period of time (7 days) induced the expression of EMT markers such as N-cadherin, vimentin, fibronectin and α -SMA proteins (Figure 5g). Although less pronounced after 3 days of treatment, the expression of some of these EMT markers was reduced by the specific depletion of VEGF₁₆₅b and a decrease of p38 MAPK activation was found (Figure 5h). Downregulation of E-cadherin together with increased vimentin staining at the plasma membrane were also observed in bevacizumab-treated H358 xenografts, and both events were prevented by the neutralisation of VEGF₁₆₅b (Supplementary Figure 7c). Taken together, these results indicate that bevacizumab-mediated VEGF₁₆₅b up-regulation leads to a more invasive EMT phenotype.

VEGF₁₆₅b stimulates an invasive β 1 integrin signaling pathway which triggers the formation of actin stress fibers and focal adhesions

Next, we undertook a series of experiments to decipher the molecular mechanism(s) by which VEGF₁₆₅b activates invasive VEGFR signaling. In endothelial cells, Chen and colleagues previously reported that matrix-bound VEGF₁₆₅ is able to maintain the phosphorylation of VEGFR2 on its tyrosine 1214 residue leading to sustained activation of phospho-p38 MAPK. Such effects were dependent on the association of VEGFR2 with β 1 integrin (26). In our cellular models, we reproducibly observed that rhVEGF₁₆₅b triggers a sustained activation of P-VEGFR2(Tyr1214) and also p38-MAPK proteins (Figures 3c and 3d and Supplementary

Figure 4a). Therefore, we studied the effects of VEGF₁₆₅b on β 1 integrin activation. First, we immunoprecipitated activated β 1 integrin in clones overexpressing VEGF₁₆₅b (Figure 6a) or in cells that had been exposed to rhVEGF₁₆₅b ligand for 30 minutes (Figure 6b). A slight but reproducible increased expression of activated β 1 integrin was detected in the immunoprecipitates of cells overexpressing VEGF₁₆₅b or treated with rhVEGF₁₆₅b, whereas the total amount of β 1 integrin was not changed by any of the treatments. Similar results were obtained upon bevacizumab treatment (Figure 6c). In agreement with a role of VEGF₁₆₅b on β 1 integrin activation, cell-surface activated β 1 integrin slightly increased compared to untreated or rhVEGF₁₆₅-treated cells (Figure 6d). Furthermore, cells exposed to rhVEGF₁₆₅b (Figure 6e) or bevacizumab (Figure 6f) also had more focal adhesions. A reorganization of the actin cytoskeleton in stress fibers was observed in cells cultured with rhVEGF₁₆₅b (Figure 6g), overexpressing VEGF₁₆₅b (Supplementary Figure 7d) or treated with bevacizumab (Supplementary Figure 7e). Importantly, the formation of actin stress fibers was prevented when VEGF₁₆₅b was knocked-down in bevacizumab-treated cells (Figure 6h). In contrast, F-actin staining was more cortical and poorly organized in stress fibers in control or rhVEGF₁₆₅-treated cells (Figure 6g). The expression of phospho-FAK and phospho-cofilin proteins, two targets of β 1 integrin signaling involved in actin polymerization, was also upregulated in VEGF₁₆₅b clones (Supplementary Figure 7f). Altogether, these observations were consistent with the idea that VEGF₁₆₅b activates the β 1 integrin to mediate its biological effects. To confirm this hypothesis, we used β 1 integrin siRNA. We showed that β 1 integrin neutralization prevents the formation of focal adhesions (Supplementary Figure 8a) and actin stress fibers (Supplementary Figures 8b and 8c), the accumulation of phospho-VEGFR2(Tyr1214) and phospho-p38MAPK proteins (Supplementary Figure 8d) and cell migration (Supplementary Figure 8e) in response to VEGF₁₆₅b or bevacizumab (Supplementary Figure 9). Taken together, these results identify β 1 integrin as a critical

mediator of the invasive effects of VEGF₁₆₅b and demonstrate that bevacizumab activates this VEGF₁₆₅b/ β 1 integrin pathway.

Neuropilin-2 contributes to the functions of VEGF₁₆₅b through interaction with β 1 integrin and VEGFR2

Besides the activation of VEGFR1 and VEGFR2 receptors, we reproducibly noticed that VEGF₁₆₅b or bevacizumab increases the expression of neuropilin-1 and neuropilin-2 (Figures 3 and 4, Supplementary Figures 4 and 5). As it was previously demonstrated that β 1 integrin interacts with neuropilin-1 (27) or neuropilin-2 to conduct signals throughout the cell (28, 29), we next investigated the contribution of neuropilins to the VEGF₁₆₅b/ β 1 integrin pathway. Neuropilin-2 was constantly co-immunoprecipitated with VEGFR2 (Figure 7a) or β 1 integrin (Figure 7b) in our cells, and complex formation was enhanced when cells were treated with rhVEGF₁₆₅b. Moreover, knocking-down neuropilin-2 using specific siRNA in cells treated with rhVEGF₁₆₅b or in VEGF₁₆₅b-clones prevented the formation of both actin stress fibers (Figures 7c and 7d) and focal adhesions (Supplementary Figure 10a). The same results were obtained following bevacizumab treatment (Figure 7e and Supplementary Figures 10b and 10c). In contrast, neutralization of neuropilin-1 had no effect (Supplementary Figure 10 and data not shown). Importantly, increased interaction of β 1 integrin with VEGFR2 and neuropilin-2 was observed following bevacizumab treatment and was strongly prevented when expression of VEGF₁₆₅b was neutralized (Figure 7f). Overall our data implicate neuropilin 2 as a key player of the VEGF₁₆₅b/VEGFR2/ β 1 integrin signaling pathway, and demonstrate that bevacizumab activates this autocrine loop to select lung tumor cells with a more invasive phenotype.

Discussion

The vast majority of immunohistochemical studies published to date in tumors have used pan-VEGF-A antibodies which do not discriminate between VEGF_{xxx} and VEGF_{xxx}b splice variants because these two families of proteins are identical except for their extreme C-terminal 6 amino acids. However, a better characterization of the role of each VEGF-A splice isoform is needed, especially in light of some recent data unravelling the VEGF₁₂₁ and VEGF₁₆₅b isoforms as potential biomarkers of the response to bevacizumab treatment in some cancers (21, 23). The VEGF₁₆₅b splice variant was previously viewed as an anti-angiogenic factor whose downregulation in tumors was associated with advanced tumor stage, vascular invasion and metastases (14, 16) (19) (30). Here, in contrast to this simplistic view, we find high levels of the VEGF₁₆₅b protein in a significant proportion of lung adenocarcinoma. Furthermore, we show that VEGF₁₆₅b expression correlates with III/IV advanced stages and observed an association between a high VEGF₁₆₅b/VEGF₁₆₅ ratio and lymph node metastases. Therefore, in parallel with VEGF₁₆₅ triggering both invasive and anti-invasive functions (11), we highlight a more complex role of VEGF₁₆₅b in tumors. In this new scheme, VEGF₁₆₅b cannot be viewed anymore solely as a tumor suppressive anti-angiogenic factor, but has now to be considered as a tumor promoting factor also. These data aid interpretation of observations in various tumors such as renal cell carcinoma (31) where VEGF_{xxx}b isoforms are not always down-regulated. In addition, our data have also important clinical implications as we show that drugs currently used in clinic positively impact VEGF₁₆₅b expression.

VEGF₁₆₅b isoform: a pro-tumoral role besides its anti-angiogenic function

We provide the first evidence that overexpressed and recombinant VEGF₁₆₅b stimulate cell proliferation in lung tumor cell lines. We also demonstrate that VEGF₁₆₅b causes tumour cell invasion and initiates the genesis of cancer stem cells as evidenced by the increase of CD133, CD15 and/or ALDH1A1 mRNA levels. Importantly, the specific knock-down or conversely the overexpression of VEGF₁₆₅b also slows-down or promotes the growth of NSCLC xenografted into nude mice, respectively. This is associated with a modulation of the KI67 proliferative index while CD31 or α -SMA endothelial staining, two markers of tumor neo-angiogenesis, did not significantly vary. Paradoxically, we previously demonstrated that overexpression of VEGF₁₆₅b correlates with reduced angiogenesis in nude mice xenografts derived from lung adenocarcinoma cell lines (32). However, in this former study, we only investigated the early paracrine effects of VEGF₁₆₅b on neo-angiogenesis as mice were sacrificed 7 days after induction of VEGF₁₆₅b overexpression. In the current study, mice were sacrificed 45 days after tumor cells injection. The new results support the idea (Figure 8) that autocrine tumor promoting functions of VEGF₁₆₅b may surpass its paracrine anti-angiogenic functions to promote lung tumor growth. Our results could help to understand a previous observation by Catena and co-workers who noticed that stable overexpression of VEGF₁₆₅b protein in lung ADC xenografts results in a significant increase in tumor development, without significant differences in vascular density (20). However, it was also previously reported that VEGF₁₆₅b overexpression slows-down the growth of colon carcinoma cells, xenografted into nude mice, through inhibition of tumor neovascularization, without any effects on tumor proliferative rate (33) (34) (35). Therefore, whether VEGF₁₆₅b exerts anti-versus pro-tumoral functions may depend on the tumor type.

β 1 integrin: a critical hub to mediate VEGF₁₆₅b invasive properties

What directs the choice between the dual functions of VEGF₁₆₅b in cancers? One plausible but not exclusive explanation could come from whether tumors cells co-express VEGFR receptors and/or their co-receptors NRPs, as in lung tumors (6). Hence, we show that VEGF₁₆₅b increases VEGFR1, VEGFR2, neuropilin-1 and/or neuropilin-2 mRNA and protein levels, and triggers a sustained phosphorylation of both VEGFR1 and VEGFR2 receptors which correlates with p38MAPK activation. Interestingly, we unravel a cross-talk between β 1 integrin and VEGF₁₆₅b, in which β 1 integrin acts as a critical hub for VEGF₁₆₅b tumor promoting functions. Indeed, we show that VEGF₁₆₅b activates β 1 integrin and stimulates its interaction with VEGFR2 and neuropilin-2, leading to the phosphorylation of FAK and cofilin, two effectors of β 1 integrin signalling involved in actin stress fiber formation. Taken together, our data identify a VEGF₁₆₅b/VEGFR2/ β 1 integrin/neuropilin-2 axis that mediates tumor invasiveness in NSCLCs. They provide the molecular rationale for the previous observation of Zhang and colleagues demonstrating that upregulation of β 1 integrin correlates with advanced stages, lymph node metastases, increased relapse rate and decreased overall survival in lung adenocarcinoma patients (36). In breast cancer cells, neuropilin-2 was previously shown to interact with and to activate α 6 β 1 integrin to promote activation of FAK-dependent signaling pathways and tumor invasion (5, 28, 29). In addition, it was reported that neuropilin-2^{high} population of tumor cells harvested from invasive breast carcinomas expressed higher levels of α 6 β 1 integrin and active FAK (29). Since VEGF_{xxx}b levels are significantly higher in infiltrating breast carcinoma (20), it is thus tempting to speculate that VEGF₁₆₅b also plays a tumor promoting role in these cancers through a VEGF₁₆₅b/VEGFR2/ β 1 integrin/neuropilin-2 axis.

VEGF-A splicing and clinical drug response

The identification of predictive biomarkers of response to anti-angiogenic therapies is a crucial issue in the clinic. Eventhough these therapies were initially developed to target endothelial cells only, it is of prime importance to evaluate their impact on tumor cells themselves. In this study, we provide the first evidence that anti-angiogenic therapies combined (or not) with platinum salts impact *VEGF-A* alternative pre-mRNA splicing by specifically increasing VEGF_{165b} levels in lung adenocarcinoma cell lines. In addition, using in vitro and in vivo models, we demonstrate that bevacizumab activates the VEGF_{165b}/β1 integrin/VEGFR/neuropilin-2 signaling network leading to a more invasive phenotype. Therefore, besides its ability to promote lung tumor growth, VEGF_{165b}, together with β1 integrin, appears also to be a critical determinant of the response to anti-angiogenic therapies. In this setting, our results support the very recent observation that integrin alpha 9 (ITGA9), known to form a heterodimeric receptor with activated β1 integrin, belongs to a 10 gene-signature that predicts outcome in advanced non squamous NSCLC patients treated with a combination of bevacizumab and erlotinib (37) (38). They also support the previous demonstration that β1 integrin and its downstream effector kinase FAK are activated in bevacizumab-resistant glioblastoma patients and contribute to bevacizumab resistance (39) (40).

VEGF-A was previously shown to control its own translation through activation of the VEGFR2 and mTOR signalling pathways (25). Therefore, our observation that both bevacizumab (that traps VEGF-A) and semaxanib (that inhibits VEGF-A/VEGFR signalling) increase VEGF_{165b} levels strongly suggests that VEGF-A also controls its own splicing. Goel and colleagues recently reported a connection, in breast cancer stem cells, between autocrine VEGF-A signaling and the splicing of the ITGA6 integrin through the transcriptional

repression of ESRP1, a key RNA splicing factor (41). In our cellular models, we postulate that the regulation of VEGF-A splicing might require SRSF2 and/or SRSF6 protein; both of these splicing factors were previously reported to favor VEGF₁₆₅b expression in primary epithelial cells (42). Hence, we show that SRSF6 upregulates VEGF₁₆₅b protein in human lung adenocarcinoma cells. In addition, we previously demonstrated that SRSF2 favors the expression of VEGF₁₆₅b (32) and that cisplatin treatment increases the expression of SRSF2 in our cells (43). Clearly, deepened understanding of the molecular mechanisms that control VEGF-A splicing in response to drugs currently used in clinic is needed as it could open the way to alternative therapeutic strategies aimed at modulate RNA splicing in lung cancers in combination with anti-angiogenic therapies.

To conclude, we propose here a model (Figure 8) in which activation of a VEGF₁₆₅b-dependent autocrine loop, involving VEGFR receptors, β 1 integrin and neuropilin-2 proteins, leads to the acquisition of a more invasive phenotype which contributes to the resistance of NSCLCs to anti-angiogenic therapies. This model is distinct but not antinomic to the model of Bates and colleagues who proposed that a tumor angiogenic profile accounts for the observation that colon carcinoma patients with lower VEGF₁₆₅b concentrations are more sensitive to bevacizumab + FOLFOX treatment compared to FOLFOX alone (23). In that case, paracrine rather than autocrine functions of VEGF₁₆₅b are presumed to be at play. As a whole, these and our data reinforce the need for a better understanding of the contribution of each VEGF-A splice variant and their interactors during the tumorigenic process. In addition, these results highlight the need for addressing the respective status of VEGF-A splice variants and their paracrine/autocrine functions when investigating the global response to anti-angiogenic treatments.

Materials and Methods

Patients, Tissue samples and Serum

Seventy six human Non Small Cell Lung Carcinoma (NSCLC) and 17 matched normal lung parenchymas were included in this study. Tumors consisted of 41 adenocarcinomas and 35 squamous cell lung carcinomas (Table 1). Tumor tissues and normal lung parenchyma taken away from the bulk of the tumor were collected from resection of lung tumors, and stored for scientific research in a biological resource repository (Centre de Ressources Biologiques, CHU Albert Michallon, Grenoble Hospital). National ethical guidelines were followed. All patients enrolled in this trial provided written informed consent. Tissue banking and research conduct was approved by the Ministry of Research (approval AC-2010-1129) and by the regional IRB (CPP 5 Sud Est). For histological classification, tumor samples were fixed in formalin, and diagnosis was made on paraffin-embedded material using the WHO classification of lung criteria (44) (45). For each case, one section from the most representative block was chosen. These sections always contained more than 70% of tumor cells. For quantification of VEGF₁₆₅b in sera, blood samples from nine healthy subjects and ten patients with chemotherapy-naïve ADC enrolled from July 2005 to August 2010 in the Pharmacogenoscan study (NCT00222404; Grenoble University Hospital) were used (46). This study was approved by the Ethics Committee of the Grenoble University Hospital (NCT00222404) and patients signed an informed consent.

Immunohistochemistry

Immunohistochemistry was performed using either an anti-VEGF₁₆₅b antibody raised against the specific C-terminal amino acid sequence of VEGF₁₆₅b or an anti-VEGF₁₆₅ antibody raised

against the six terminal amino acids (CDKPRR sequence) and a sixteen amino acids sequence targeting terminal part of VEGF₁₆₅ encompassing exons 7 and 8a. These two antibodies were engineered in the laboratory together with the Covalab society (Villeurbanne, France). As shown in Supplementary Figure 1A, these antibodies were specific for VEGF_{165b} or VEGF₁₆₅ isoform, respectively. VEGF_{165b} immunostaining was confirmed by using the mouse monoclonal IgG1 antibody raised against the nine C-terminal amino acids of VEGF_{165b} [ab14994; Abcam; (23)]. This antibody was also previously shown to have specificity for the VEGF_{165b} isoform over the VEGF₁₆₅ and does not cross-react with VEGF₁₆₅ or VEGF₁₂₁ recombinant protein (16) (47). The other antibodies used for immunohistochemistry were: anti-phospho-VEGFR1(Tyr1213) (Millipore), anti-VEGFR1 (sc-316, Santa Cruz), anti-VEGFR2 (sc-6251, Santa Cruz), anti-neuropilin-1 (sc-5307, Santa Cruz), anti-neuropilin-2 (sc-13117, Santa Cruz), anti-KI67 (M7240, DAKO), anti-CD31 (ab28364, Abcam) and anti alpha-SMA (ab5694, Abcam). Immunohistochemical analysis was carried-out on formalin-fixed and paraffin-embedded tissue sections. Briefly, seven-micrometer sections were dehydrated in xylene and rehydrated in graded ethanol solutions. Endogenous peroxidase activity was blocked by immersion in H₂O₂ solution. The antigen immunoreactivity was enhanced by microwaving the sections for 3 x 5 minutes in citrate buffer, pH 6. Then, a classical three step immunohistochemical method was applied. Incubation with the primary antibody at 4°C overnight (for manual technique) or for 1 hour at 37°C-42°C on autostainer (Ventana Medical International, Inc.) was followed by exposure to HRP-coupled secondary antibody, and then by DAB substrate-chromogen system (K3767, DAKO). The negative control involved omission of the primary antibody and incubation with immunoglobulins of the same species and isotype. Immunostainings were evaluated independently by two pathologists who were blind to all clinicopathological data. For immunostaining evaluation, a score (0-300) was established by multiplying the percentage of labelled cells (0 to 100%) by

the staining intensity (0, null; 1, low; 2, moderate; 3, strong). Scores obtained for alveolar type II pneumocytes and bronchial cells in normal lung tissues taken at distance from the tumor were considered as normal scores for adenocarcinoma and squamous cell carcinoma, respectively. Indeed, bronchial basal cells are considered as candidate cancer stem cells for squamous cell lung carcinoma, basaloids and small cell lung carcinoma, while type II pneumocytes-CLARA cells are considered as bronchiolo-alveolar carcinoma stem cells (BASC). According to median scores in normal tissues and to the histograms of distribution, tumors were sub-divided in three classes for VEGF₁₆₅b (class 0: low ≤ 50 ; class 1: moderate 51-150; class 2: high ≥ 150) and VEGF₁₆₅ expression (class 0: low ≤ 50 ; class 1: moderate 51-100; class 2: high > 100). For VEGFR1, phospho-VEGFR1 (P-VEGFR1), VEGFR2, neuropilin-1 and neuropilin-2, tumors were sub-divided into two classes with low (class 0) or high (class 1) expression. The selected cut-offs were: class 0: score < 125 ; class 1: score ≥ 125 for VEGFR1, class 0: score < 75 ; class 1: score ≥ 75 for P-VEGFR1, class 0: score < 150 ; class 1: score ≥ 150 for VEGFR2, class 0: score < 125 ; class 1: score ≥ 125 for neuropilin-1 and neuropilin-2. The staining scores were compared in different categories using Fisher's exact test and a Mann-Whitney test. All tests were two-tailed and p values < 0.05 were considered significant. The statistical analyses were performed using Statview software (Abacus Concepts).

Cells, Cell Culture and Reagents

Human lung adenocarcinoma and squamous lung carcinoma cell lines (H358, H1299, H157) were cultured in 5% CO₂ at 37°C in RPMI-1640 medium supplemented with 2mM L-glutamine and 10% (v/v) Fetal Calf Serum (FCS) as described previously (32). HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) cells were cultured using EGM-2 BulletKit (CC-

3156 & CC-4176, LONZA). VEGF₁₆₅b-overexpressing HEK cells were kindly provided by Dr Gilles Pagès (IRCAN, Nice, France). Bevacizumab (Avastin®) was provided by Roche/Genetech, Indianapolis, USA. Recombinant rhVEGF₁₆₅b (cat#DY3045) and rhVEGF₁₆₅ (cat# DVE00) proteins were from R&D systems. SU5416 was purchased from Sigma-Aldrich (cat# S8442) and cisplatin was from Calbiochem (cat#232120). U0126 was purchased from Calbiochem. Stable SRSF6 and VEGF₁₆₅b clones derived from H358 or H1299 cells were obtained after transfection using Fugene® 6 reagent (Roche Diagnostic, France) with either pcDNA3 empty vector or pcDNA3-SRSF6-myc or pcDNA3-VEGF₁₆₅b encoding plasmids. Plasmids encoding VEGF₁₆₅ or VEGF₁₆₅b were obtained from David Bates (University of Nottingham, UK). Transfected cells were grown in RPMI-1640 medium containing 10% FCS and 800 µg/ml geneticin (G418) for at least 4 weeks in order to select stable transfected clones. Single colonies were isolated and expanded for further analyses. Cell culture conditions were maintained as initially described. Two representative VEGF₁₆₅b-overexpressing clones were chosen for H358 (clones 13 and 36) and H1299 (clones 2 and 5) cells. Both clones gave similar results in each cell line.

Immunofluorescence studies

Round 12mm glass coverslips were placed in 24-wells plates and coated overnight at 4°C with 2µg/mL fibronectin. Cells were trypsinized, serum starved for 30 min and seeded on washed glass coverslips coated with fibronectin for 24 hours. Cells were fixed in 4% PFA for 20 min at RT, washed in 1X PBS and non-specific binding sites were blocked in PBS containing 10% goat serum for 30 min at 37°C. Immunofluorescence staining of β1 integrin was performed on fixed cells using the anti-β1 integrin antibody (clone 9EG7; Becton Dickinson). Cells were then permeabilized in PBS1X/Triton 0.2% for 10 min at RT and

stained with anti-phospho(Tyr-118)-paxillin antibody (Life Technology). Secondary antibodies coupled with AlexaFluor 488 or 546 were used (Life Technology). Actin stress fibers were visualized on fixed and permeabilized cells after staining with phalloidin TRITC (P-1951, Sigma Aldrich). Cells were then mounted in a solution containing 4,6-diamino-2-phenylindole (DAPI) (Roti ®-Mount FluorCare DAPI, ROTH), visualized by fluorescent microscopy using Axioimager microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany) with the AxioVision® software at a 60x magnification and processed with Image J software.

Apoptosis, Wound healing, Invasion and Tubulogenesis assays

Apoptosis was evaluated by scoring the percentage of apoptotic cells on 500 cells after Hoescht 33342 staining. Cytotoxic experiments were performed using the methylene blue colorimetric assay as previously described (48, 49). To perform wound-healing assays, cells were grown on 4-well lab-tek chamber Permanox® slides, previously coated with fibronectin (10µg/mL), until confluence was reached. Monolayers were wounded with 200µL plastics tips. The wound healing process was followed using an inverted microscope equipped with a camera MicroMAX N/B (Princeton Instruments), by keeping cells in the same culture conditions as initially described. To study cell invasion, 24-well 8µm-pored transwells (Corning) were used. H358-VEGF₁₆₅b and H1299-VEGF₁₆₅b stable clones were grown in Petri dishes until confluent and serum starved for 24 hours before starting the experiment. 2.5×10^5 cells in 200 µL serum-free media were re-plated in transwell upper chambers previously coated with matrigel (cat#356231, BD Biosciences), whereas lower chambers were filled with RPMI-1640 medium supplemented with 20% FCS and 50ng/mL β-FGF as a chemoattractant. After 24 hours, non-migrating cells were removed using a cotton swab, transwell membranes were fixed using PFA 4% and colored with Hoechst. Cells were counted

under a fluorescence microscope. *In vitro* tubulogenesis assay was performed as described below. Overnight serum starved HUVEC cells were plated on Matrigel-coated 24-well plates at 5×10^4 cells/well. Cells were left to attach for 2 hours at 37°C. Then, medium was removed from wells, and replaced by conditioned culture supernatant derived from either stable clones overexpressing SRSF6 protein or from control cells. Tubulogenesis was followed for 24 hours using an inverted microscope equipped with a MicroMAX N/B camera (Princeton Instruments).

Analysis of activated $\beta 1$ integrin by flow cytometry

Cells were trypsinized, washed with PBS and re-suspended in 200 μ l of PBS/BSA 1%. The cells were then centrifuged, re-suspended in PBS/BSA 1% (either with or without Mn^{2+} 0.5 mM) to induce $\beta 1$ integrin activation and incubated on ice for 15 min. Primary antibody HUTS4 was added and incubated for 30 min. Finally, cells were washed twice with PBS, incubated with a secondary Alexa⁴⁸⁸ anti-rat antibody and fixed with 4% PFA. Cells were then washed and resuspended in PBS before flow cytometry analysis. The percentage of $\beta 1$ integrin activation was calculated using the formula: % activation = (Mean FL1-A [Ac] / Mean FL1-A [Ac+ Mn^{2+}]) x 100.

Zymography

Medium was collected from cultured cells in order to analyze the activity of MMP9 using gelatin zymography. Cells were cultured in Petri dishes until confluent. For each condition, gelatin gels were loaded with sample mixed with sample buffer [0.03% bromophenol blue, 0.5M Tris-HCl pH 6.8, 10% SDS (w/v) and 4% saccharose (w/v)]. Electrophoresis was

performed on 10% polyacrylamide gels containing 1% (w/v) gelatin (Sigma) at 80V, under non-reducing conditions. Gels were washed twice in 2.5% (v/v) Triton X-100 for 30 minutes at room temperature and incubated in a Substrate Reaction Buffer (52mM Tris-HCl pH 7.2, 5mM CaCl₂, 200mM NaCl, 0.01% Triton X-100) for 24 hours. The gels were further stained in Coomassie Blue Staining Solution [0.2% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G250, 10% acetic acid solution and 20% (v/v) methanol] for 30 minutes, and de-stained in a solution containing 20% (v/v) methanol and 10% (v/v) acetic acid. Pro-MMP9 and MMP-9 were identified according to their molecular weight.

ELISA assays

ELISA assays were performed on cellular extracts and cellular supernatants using a total of 100 μ g of proteins for each sample. VEGF₁₆₅b was quantified using the R&D system DuoSet ELISA kit (cat#DY3045) and pan-VEGF using either the Human VEGF Standard ELISA Development Kit from PeproTech (cat# 900-K10) or the ELISA assay from R&D System (DVE00). The latter assay has been shown to measure all VEGF isoforms, although VEGF₁₆₅b is detected at a lower efficiency according to Varey et al (33). Importantly, the amount of VEGF₁₆₅b and pan-VEGF (VEGF-A_{total}) proteins in serum never correlated with platelet counts, nor the time at which these sera were collected (from 4 to 12 weeks after the start of treatment).

RNA interference

Small interfering RNA (siRNA) and control non-targeting siRNA (*mismatch*) were purchased from EUROGENTEC (Liège Science Park, Belgium). β 1 integrin silencing was performed

using SMARTpool siGENOME ITGB1 siRNA (M-004506-00-0020). Transfection with smartpools was performed using Oligofectamine RNAi max (13778150, Invitrogen). The siRNA specifically targeting VEGF₁₆₅b was: forward, 5'-GAACGUACUUGCAGAUCUCUCTT-3'; reverse, 5'-GAGAGAUCUGCAAGUACGUUCTT-3'. The sequences for neuropilin-2 siRNA were designed as sense, 5'-AAAGGCUGGAAGUCAGCACUAAUUU-3'; and antisense, 5'-AAAAAUUAGUGCUGACUUCCAGCUU-3'. The scrambled siRNA oligonucleotides used as a control for all RNA interference experiments were as follows: forward 5'-UCGGCUCUUACGCAUUCAATT-3' and reverse 5'-CAAGAAAGGCCAGUCCAAGTT-3'. Transfection was performed using OligofectamineTM reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Cells were analysed 72 hours post-transfection. The sequence for control siRNA used in *in vivo* experiments was designed as forward, 5'-CUUACGCUCACUACUGCGATT-3'; and reverse, 5'-UCGCAGUAGUGAGCGUAA-GTT-3'.

Quantitative RT-PCR

Total RNA was extracted using Trizol® reagent (Invitrogen). RNA concentration and integrity was determined using a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (Labtech). Then, one microgram of total RNA was subjected to cDNA synthesis with iScriptTM Reverse Transcription Supermix for RT-qPCR (BIO-RAD). Quantitative RT-PCR (qRT-PCR) was performed using GoTaq® qPCR Master Mix (Promega). RT²-qPCR VEGFR1/FLT1 (Hs.654360) and VEGFR2/KDR (Hs.479756) primer assays were purchased from TEBU-Bio (Le Perray-en-Yvelines, France). Neuropilin-1 primer sequences were as follows: 5'-ACACCTGAGCTGCGGACTTT-3' (sense) and 5'-GGCCTGGTCGTCATCACA-3'

(antisense). Neuropilin-2 primer sequences were: 5'-GCGCAAGTTCAAAGTCTCCT-3' (sense) and 5'-TCACAGCCCAGCACCTC-3' (antisense). ALDH1A1, CD133 and CD15 primer sequences were as follows: ALDH1A1 5'-AGTGCCCCTTTGGTGGATTC-3' (sense) and 5'-AAGAGCTTCTCTCCACTCTTG-3' (antisense); CD133 5'-CAGAGTACAACGCCAAACCA-3' (sense) and 5'-AAATCACGATGAGGGTCAGC-3' (antisense); CD15 5'-ATGGGTGAGTTCAACGAGAAGA (sense) and 5'-GCAGGCTGATGTAGTCACTCT-3' (antisense). Relative gene expression was calculated, for each sample, as the ratio of specific target gene to GAPDH gene (reference gene), thus normalizing the expression of target gene for sample to sample differences in RNA input.

Antibodies and Immunoblotting

Immunoblotting experiments were performed as previously described (50). Briefly, cell monolayers were washed 3 times with PBS and cell lysis was performed directly on petri dishes by adding RIPA buffer and incubating the petri dishes on ice for 30 min. Cells were scraped, cellular protein extracts were recovered and lysates were centrifuged at 13000 rpm for 30 min at 4°C. Equal amounts of protein extracts were separated by SDS-PAGE, transferred to PVDF membranes and probed with indicated antibodies. The antibodies used were: anti-VEGF₁₆₅b (MAB3045) from R&D Systems, anti-VEGF₁₆₅ (Covalab), anti-myc (clone 9E10, sc-40), anti-VEGF-A (A20, sc-152), anti-neuropilin-1 (Abcam), anti-neuropilin-2 (clone C-9, sc-13117) from Santa Cruz, anti-alpha-p38 MAPK-Thr180/Tyr182 (MABS64, clone 6E5.2) and anti-phospho-VEGFR1-Tyr1213 (cat#07-758) from Millipore, anti-phospho-VEGFR2-Tyr1214 (44-1052) from Invitrogen, anti-VEGFR2 (mAB2479, clone 55B11), anti-actin (mAB8456), anti-AKT (mAB9272), anti-phospho-AKT-Ser473 (mAB4060, clone D9E), anti-active caspase-3 (mAB9661), anti-phospho-ERK1/2-

Thr202/Tyr204 (mAB9106) and anti-p44/42 MAPK (ERK1/2) (mAB9102) from Cell Signaling, anti-SNAIL (ab63371), anti-phospho-VEGFR2-Tyr1054/1059 (ab5473) and anti-neuropilin-1 (ab81321) from Abcam, anti-SRSF2 (4F11) from Euromedex, anti-tubulin from TEBU, anti-N-cadherin (32/N-Cadherin) and anti-E-cadherin (36/E-Cadherin) from BD Biosciences, anti-vimentin (V6630, clone V9) and anti-fibronectin (clone FN-15) from Sigma, anti- β 1 integrin activated clone 9EG7 (553715) from BD Pharmingen, anti-VEGFR2 (mAB2479, clone 55B11) and anti-phospho-cofilin (3311) from Cell Signaling, anti-phospho-FAK (2211S) from Epitomics. Sera for immunoprecipitation or detection of either total or activated β 1 integrin were home-made antibodies provided by Corinne Albiges-Rizo.

Immunoprecipitation experiments

Cells were lysed on ice using RIPA buffer supplemented with proteases and phosphatase inhibitors and 5 mM sodium molybdate to enhance the cross-linking of the complexes. One mg of total protein extracts was pre-cleared for 1 hour in the presence of a mixture of protein A- and protein G-coated magnetic beads and incubated overnight at 4°C, together with protein A/protein G beads, either with TS2/16 serum, an anti- β 1 integrin antibody (sc-6622) or an anti-VEGFR2 antibody (mAb2479) in order to immune-precipitate total β 1 integrin or total VEGFR2, respectively. An irrelevant rabbit IgG (GTX26797, GeneTex) was used as control for immunoprecipitation.

***In vivo* studies**

All animal experiments were conducted in agreement with the “Principles of Laboratory Animal Care” (NIH publication n°86-23, revised 1985) and were approved by a regional ethics committee. Female athymic Swiss nude mice were purchased from Janvier (Le Genest-

Isle, France). In all experiments, 20×10^6 H358 control cells or H358-SRSF6 overexpressing cells were injected sub-cutaneously into nude mice. Tumor volumes were measured once a week in two perpendicular diameters and calculated as follows: $a \times b^2 \times 0.4$, where “a” and “b” are the largest and smallest diameters, respectively. In order to investigate the effects of bevacizumab treatment, 20×10^6 H358 cells were implanted sub-cutaneously in nude mice and allowed to form tumors for 3-4 weeks. When tumor volumes reached $30\text{-}40\text{mm}^3$, mice were divided into 4 groups (10 mice each) and were alternatively SC- or IP-injected four times a week, with either *mismatch* siRNA as a control or *VEGF₁₆₅b* siRNA ($16\mu\text{g}/\text{mice}$). Once a week, siRNAs were combined with either bevacizumab ($7.5\text{mg}/\text{kg}$) or PBS as a control. Transfection of siRNA was performed using in vivo-jetPEI™-Gal (cat#202-10G, Polyplus-transfection). Tumor volumes were monitored throughout the experiment as described above. Mice were sacrificed after 7 weeks of treatment, tumors were removed, photographed, weighed, washed, fixed in Buffered Formaldehyde and processed for immunohistochemical analysis as previously detailed. Vascularisation of tumor samples was assessed by measuring the amount of haemoglobin in RIPA extracts using Drabkin’s reagent (Sigma). The results were normalized relative to the amount of protein in each sample. Statistical analysis of tumor volumes between groups was performed using a non-parametric Mann-Whitney t test (at least 7 animals per group).

References

1. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*. 2000;407(6801):249-57.
2. Ferrara N, Mass RD, Campa C, Kim R. Targeting VEGF-A to treat cancer and age-related macular degeneration. *Annu Rev Med*. 2007;58:491-504.
3. Roskoski R, Jr. Vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in tumor progression. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2007;62(3):179-213.
4. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*. 2003;9(6):669-76.
5. Goel HL, Mercurio AM. VEGF targets the tumour cell. *Nat Rev Cancer*. 13(12):871-82.
6. Lantuejoul S, Constantin B, Drabkin H, Brambilla C, Roche J, Brambilla E. Expression of VEGF, semaphorin SEMA3F, and their common receptors neuropilins NP1 and NP2 in preinvasive bronchial lesions, lung tumours, and cell lines. *J Pathol*. 2003;200(3):336-47.
7. Bachelder RE, Crago A, Chung J, Wendt MA, Shaw LM, Robinson G, et al. Vascular endothelial growth factor is an autocrine survival factor for neuropilin-expressing breast carcinoma cells. *Cancer Res*. 2001;61(15):5736-40.
8. Bachelder RE, Wendt MA, Mercurio AM. Vascular endothelial growth factor promotes breast carcinoma invasion in an autocrine manner by regulating the chemokine receptor CXCR4. *Cancer Res*. 2002;62(24):7203-6.
9. Goel HL, Chang C, Pursell B, Leav I, Lyle S, Xi HS, et al. VEGF/neuropilin-2 regulation of Bmi-1 and consequent repression of IGF-IR define a novel mechanism of aggressive prostate cancer. *Cancer Discov*. 2(10):906-21.

10. Lichtenberger BM, Tan PK, Niederleithner H, Ferrara N, Petzelbauer P, Sibilio M. Autocrine VEGF signaling synergizes with EGFR in tumor cells to promote epithelial cancer development. *Cell*.140(2):268-79.
11. Lu KV, Chang JP, Parachoniak CA, Pandika MM, Aghi MK, Meyronet D, et al. VEGF inhibits tumor cell invasion and mesenchymal transition through a MET/VEGFR2 complex. *Cancer Cell*.22(1):21-35.
12. Pajares MJ, Agorreta J, Larrayoz M, Vesin A, Ezponda T, Zudaire I, et al. Expression of tumor-derived vascular endothelial growth factor and its receptors is associated with outcome in early squamous cell carcinoma of the lung. *J Clin Oncol*.30(10):1129-36.
13. Robinson CJ, Stringer SE. The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors. *J Cell Sci*. 2001;114(Pt 5):853-65.
14. Bates DO, Cui TG, Doughty JM, Winkler M, Sugiono M, Shields JD, et al. VEGF165b, an inhibitory splice variant of vascular endothelial growth factor, is down-regulated in renal cell carcinoma. *Cancer Res*. 2002;62(14):4123-31.
15. Lodomery MR, Harper SJ, Bates DO. Alternative splicing in angiogenesis: the vascular endothelial growth factor paradigm. *Cancer Lett*. 2007;249(2):133-42.
16. Woolard J, Wang WY, Bevan HS, Qiu Y, Morbidelli L, Pritchard-Jones RO, et al. VEGF165b, an inhibitory vascular endothelial growth factor splice variant: mechanism of action, in vivo effect on angiogenesis and endogenous protein expression. *Cancer Res*. 2004;64(21):7822-35.
17. Kawamura H, Li X, Harper SJ, Bates DO, Claesson-Welsh L. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-A165b is a weak in vitro agonist for VEGF receptor-2 due to lack of coreceptor binding and deficient regulation of kinase activity. *Cancer Res*. 2008;68(12):4683-92.

18. Cebe Suarez S, Pieren M, Cariolato L, Arn S, Hoffmann U, Bogucki A, et al. A VEGF-A splice variant defective for heparan sulfate and neuropilin-1 binding shows attenuated signaling through VEGFR-2. *Cell Mol Life Sci.* 2006;63(17):2067-77.
19. Pritchard-Jones RO, Dunn DB, Qiu Y, Varey AH, Orlando A, Rigby H, et al. Expression of VEGF(xxx)b, the inhibitory isoforms of VEGF, in malignant melanoma. *Br J Cancer.* 2007;97(2):223-30.
20. Catena R, Larzabal L, Larrayoz M, Molina E, Hermida J, Agorreta J, et al. VEGF(1)(2)(1)b and VEGF(1)(6)(5)b are weakly angiogenic isoforms of VEGF-A. *Mol Cancer.* 9:320.
21. Lambrechts D, Lenz HJ, de Haas S, Carmeliet P, Scherer SJ. Markers of response for the antiangiogenic agent bevacizumab. *J Clin Oncol.* 31(9):1219-30.
22. Rugo HS. Inhibiting angiogenesis in breast cancer: the beginning of the end or the end of the beginning? *J Clin Oncol.* 30(9):898-901.
23. Bates DO, Catalano PJ, Symonds KE, Varey AH, Ramani P, O'Dwyer PJ, et al. Association between VEGF splice isoforms and progression-free survival in metastatic colorectal cancer patients treated with bevacizumab. *Clin Cancer Res.* 18(22):6384-91.
24. Nowak DG, Woolard J, Amin EM, Konopatskaya O, Saleem MA, Churchill AJ, et al. Expression of pro- and anti-angiogenic isoforms of VEGF is differentially regulated by splicing and growth factors. *J Cell Sci.* 2008;121(Pt 20):3487-95.
25. Chatterjee S, Heukamp LC, Siobal M, Schottle J, Wiczorek C, Peifer M, et al. Tumor VEGF:VEGFR2 autocrine feed-forward loop triggers angiogenesis in lung cancer. *J Clin Invest.* 123(4):1732-40.
26. Chen TT, Luque A, Lee S, Anderson SM, Segura T, Iruela-Arispe ML. Anchorage of VEGF to the extracellular matrix conveys differential signaling responses to endothelial cells. *J Cell Biol.* 188(4):595-609.

27. Fukasawa M, Matsushita A, Korc M. Neuropilin-1 interacts with integrin beta1 and modulates pancreatic cancer cell growth, survival and invasion. *Cancer Biol Ther.* 2007;6(8):1173-80.
28. Goel HL, Pursell B, Chang C, Shaw LM, Mao J, Simin K, et al. GLI1 regulates a novel neuropilin-2/alpha6beta1 integrin based autocrine pathway that contributes to breast cancer initiation. *EMBO Mol Med.*5(4):488-508.
29. Goel HL, Pursell B, Standley C, Fogarty K, Mercurio AM. Neuropilin-2 regulates alpha6beta1 integrin in the formation of focal adhesions and signaling. *J Cell Sci.*125(Pt 2):497-506.
30. Diaz R, Pena C, Silva J, Lorenzo Y, Garcia V, Garcia JM, et al. p73 Isoforms affect VEGF, VEGF165b and PEDF expression in human colorectal tumors: VEGF165b downregulation as a marker of poor prognosis. *Int J Cancer.* 2008;123(5):1060-7.
31. Grepin R, Guyot M, Jacquin M, Durivault J, Chamorey E, Sudaka A, et al. Acceleration of clear cell renal cell carcinoma growth in mice following bevacizumab/Avastin treatment: the role of CXCL cytokines. *Oncogene.*31(13):1683-94.
32. Merdzhanova G, Gout S, Keramidas M, Edmond V, Coll JL, Brambilla C, et al. The transcription factor E2F1 and the SR protein SC35 control the ratio of pro-angiogenic versus antiangiogenic isoforms of vascular endothelial growth factor-A to inhibit neovascularization in vivo. *Oncogene.*29(39):5392-403.
33. Varey AH, Rennel ES, Qiu Y, Bevan HS, Perrin RM, Raffy S, et al. VEGF 165 b, an antiangiogenic VEGF-A isoform, binds and inhibits bevacizumab treatment in experimental colorectal carcinoma: balance of pro- and antiangiogenic VEGF-A isoforms has implications for therapy. *Br J Cancer.* 2008;98(8):1366-79.

34. Rennel ES, Hamdollah-Zadeh MA, Wheatley ER, Magnussen A, Schuler Y, Kelly SP, et al. Recombinant human VEGF165b protein is an effective anti-cancer agent in mice. *Eur J Cancer*. 2008;44(13):1883-94.
35. Rennel E, Waine E, Guan H, Schuler Y, Leenders W, Woolard J, et al. The endogenous anti-angiogenic VEGF isoform, VEGF165b inhibits human tumour growth in mice. *Br J Cancer*. 2008;98(7):1250-7.
36. Zhang PF, Zeng GQ, Yi LZ, Liu JP, Wan XX, Qu JQ, et al. Identification of integrin beta1 as a prognostic biomarker for human lung adenocarcinoma using 2D-LC-MS/MS combined with iTRAQ technology. *Oncol Rep*.30(1):341-9.
37. Cascone T, Heymach JV. Can the Lung Cancer Pie Be Divided into Angiogenic Slices? *Clin Cancer Res*.
38. Franzini A, Baty F, Macovei, II, Durr O, Droege C, Betticher D, et al. Gene expression signatures predictive of bevacizumab/erlotinib therapeutic benefit in advanced non-squamous non-small cell lung cancer patients (SAKK 19/05 trial). *Clin Cancer Res*.
39. Carbonell WS, DeLay M, Jahangiri A, Park CC, Aghi MK. beta1 integrin targeting potentiates antiangiogenic therapy and inhibits the growth of bevacizumab-resistant glioblastoma. *Cancer Res*.73(10):3145-54.
40. Huvelde D, Lewis-Tuffin LJ, Carlson BL, Schroeder MA, Rodriguez F, Giannini C, et al. Targeting Src family kinases inhibits bevacizumab-induced glioma cell invasion. *PLoS One*.8(2):e56505.
41. Goel HL, Gritsko T, Pursell B, Chang C, Shultz LD, Greiner DL, et al. Regulated splicing of the alpha6 integrin cytoplasmic domain determines the fate of breast cancer stem cells. *Cell Rep*. 2014;7(3):747-61.
42. Nowak DG, Amin EM, Rennel ES, Hoareau-Aveilla C, Gammons M, Damodoran G, et al. Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) splicing from pro-angiogenic

to anti-angiogenic isoforms: a novel therapeutic strategy for angiogenesis. *J Biol Chem*.285(8):5532-40.

43. Edmond V, Moysan E, Khochbin S, Matthias P, Brambilla C, Brambilla E, et al. Acetylation and phosphorylation of SRSF2 control cell fate decision in response to cisplatin. *EMBO J*.30(3):510-23.

44. Beasley MB, Brambilla E, Travis WD. The 2004 World Health Organization classification of lung tumors. *Semin Roentgenol*. 2005;40(2):90-7.

45. Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson AG, Geisinger KR, Yatabe Y, et al. International association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol*.6(2):244-85.

46. Toffart AC, Timsit JF, Couraud S, Merle P, Moro-Sibilot D, Perol M, et al. Immunohistochemistry evaluation of biomarker expression in non-small cell lung cancer (Pharmacogenoscan study). *Lung Cancer*.83(2):182-8.

47. Perrin RM, Konopatskaya O, Qiu Y, Harper S, Bates DO, Churchill AJ. Diabetic retinopathy is associated with a switch in splicing from anti- to pro-angiogenic isoforms of vascular endothelial growth factor. *Diabetologia*. 2005;48(11):2422-7.

48. Salon C, Merdzhanova G, Brambilla C, Brambilla E, Gazzeri S, Eymin B. E2F-1, Skp2 and cyclin E oncoproteins are upregulated and directly correlated in high-grade neuroendocrine lung tumors. *Oncogene*. 2007;26(48):6927-36.

49. Merdzhanova G, Edmond V, De Seranno S, Van den Broeck A, Corcos L, Brambilla C, et al. E2F1 controls alternative splicing pattern of genes involved in apoptosis through upregulation of the splicing factor SC35. *Cell Death Differ*. 2008;15(12):1815-23.

50. Salon C, Eymin B, Micheau O, Chaperot L, Plumas J, Brambilla C, et al. E2F1 induces apoptosis and sensitizes human lung adenocarcinoma cells to death-receptor-

mediated apoptosis through specific downregulation of c-FLIP(short). Cell Death Differ. 2006;13(2):260-72.

Acknowledgements

We thank Sophie Michallet, Floriane Albert, Celine Barrial and Virginie Rouyre for technical assistance. We also thank Laurence David-Boudet, Nicolas Lemaitre and Adrien Mombrun for IHC performance. Thanks to Philippe Lorimier for tumor bank gestion and data retrieving. This work was supported by the Comité Départemental Isère and Comité Départemental Savoie de la Ligue Nationale contre le Cancer, by the INCa/DHOS (Appel d'Offre Recherche Translationnelle 2010), by the Fondation de France (Projet Grande Ampleur 2011), by ROCHE fellowship (Bourse de Recherche Fondamentale), by the Fondation ARC pour la Recherche Contre le Cancer and by Fonds de dotation AGIR pour les Maladies Chroniques. Stephanie Gout was supported by a post-doctoral fellowship from the Fondation ARC pour la Recherche Contre le Cancer. Asma Boudria was supported by the Ministere de l'Education et de la Recherche Algerien (program PROFAS) and by the Fondation pour La Recherche Médicale. Cherine Abou Faycal was supported by the Ligue Nationale Contre Le Cancer. The CAR team is supported by the Ligue Nationale Contre Le Cancer (Equipe labellisée Ligue 2014).

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Figure legends

Figure 1. VEGF₁₆₅b promotes cellular proliferation and lung tumor growth. (a) Cell proliferation in two stable VEGF₁₆₅b clones, named 13 and 36 respectively, derived from H358 and H1299 or (b) in H358 and H1299 treated with rhVEGF₁₆₅ or rhVEGF₁₆₅b (0.1 ng/ml) for 72 hours or (c) in H358 and H1299 cells transfected with either *mismatch* or *VEGF₁₆₅b* siRNA for 72 hours. Cell number was estimated following trypan blue staining. The means $\pm$ SD of three independent experiments are illustrated (Student non paired t test). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. Western blot analysis using anti-VEGF₁₆₅b or anti-panVEGF-A antibody was performed to assess the specific knock-down of VEGF₁₆₅b. Tubulin was used as a loading control. (d) Apoptosis (Hoechst staining) of cells incubated with rhVEGF₁₆₅ or rhVEGF₁₆₅b (0.1 ng/ml) for 72 hours. $n = 3$ independent experiments. Values are mean $\pm$ SD (Student non paired t test). ** $p < 0.01$ (e) H358 cells were sub-cutaneously injected into nude mice to form tumors. Animals were then sub-divided in two groups ($n=10$ for each group), receiving *mismatch* or *VEGF₁₆₅b* siRNA. Upper panels: representative tumors. Lower panel: mean tumor volume $\pm$ SD in each condition (Student non paired t test) ** $p < 0.01$. (f) Upper panels: representative pictures of Tet-On4 and SRSF6 xenografts. Lower panels: tumor weights (non-parametric Mann-Whitney test) *** $p < 0.001$.

Figure 2. VEGF₁₆₅b is highly expressed in a significant proportion of NSCLCs. (a, b) Upper panels: representative VEGF₁₆₅b or VEGF₁₆₅ immunostaining from paraffin-embedded sections of (a, left panels) acinous lung adenocarcinoma, (a, right panels) papillary lung adenocarcinoma or (b) well-differentiated squamous cell lung carcinoma. Lower panels: distribution of VEGF₁₆₅ and VEGF₁₆₅b scores for each tumor case. (c) Quantification (Elisa) of VEGF₁₆₅b in blood samples of healthy controls and chemotherapy-naïve adenocarcinoma

patients (ADC). Median levels are indicated (non-parametric Mann-Whitney t test). Of note, circulating VEGF₁₆₅b levels never correlated with platelet count (data not shown).

Figure 3. VEGF₁₆₅b activates a VEGFR/NRP autocrine loop to promote tumor cells proliferation. (a, d) H358 cells were sub-cutaneously injected into nude mice to form tumors. Animals were then sub-divided in two groups (n=10 for each group), receiving *mismatch* or *VEGF₁₆₅b* siRNA. Left panels in (a) represent immunostainings of KI67. Right panel: histogram of the percentage of KI67-stained tumor cells for each condition. Five fields containing at least 100 cells were scored for each tumor xenograft. ** p<0.01 in Student non paired t test. (b) Percentage of control (Tet-On4) or SRSF6-overexpressing tumor cells with positive KI67 staining. Five fields containing at least 100 cells were scored for each tumor xenograft (non-parametric Mann-Whitney test) *** p< 0.001. (c) Immunoblots for indicated proteins in H358 cells treated with rhVEGF₁₆₅ or rhVEGF₁₆₅b (0.1 ng/ml) for 72 hours. Actin was used as a loading control. (d) Representative immunostaining of indicated proteins in H358 xenografts treated with *mismatch* or *VEGF₁₆₅b* siRNA. VEGF₁₆₅b immunostaining demonstrated the knock-down of VEGF₁₆₅b. (e) Immunoblots of the indicated proteins in H358 VEGF₁₆₅b-overexpressing clones. Actin was used as a loading control. (f) H358 control or H358 VEGF₁₆₅b-clones were treated or not for 48 hours with 10μM U0126 as indicated. Cell number was estimated following trypan blue staining. Values are mean ± SD of 3 independent experiments. (Student non paired t test, *** p<0.001).

Figure 4. Anti-angiogenic therapies increase VEGF₁₆₅b protein level. (a, b) Intra-cellular dosage (Elisa) of VEGF₁₆₅b and pan-VEGF-A in H358 cells, treated or not (NT), with (a) bevacizumab for 72 hours or (b) semaxanib (SU5416) for 48 hours. n = 3 independent experiments. Values are mean $\pm$ SD (Student non paired t test) * p<0.05, ** p<0.01. (c) Representative immunostaining of VEGF₁₆₅b in H358 sub-cutaneous xenografts having received or not bevacizumab (7.5 mg/kg) once a week. (d) Immunoblots for indicated proteins in H358 cells transfected with *mismatch* or *VEGF₁₆₅b* siRNA for 72 hours and incubated or not with increasing doses of bevacizumab. Tubulin was used as a loading control. (e) H358 sub-cutaneous xenografts (n=10 for each group) were injected with *mismatch* or *VEGF₁₆₅b* siRNA and treated with bevacizumab (7.5 mg/kg) once a week. Representative immunostaining of indicated proteins are illustrated. (f) H358 or H1299 cells were treated, or not (NT), for 72 hours with either 5 μ M cisplatin or a combination of 5 μ M cisplatin and 1 μ g/ml bevacizumab. ELISA assays were performed in intracellular extracts. n = 3 independent experiments. Values are mean $\pm$ SD (non-paired Student t test). * p<0.05; ** p<0.01.

Figure 5. VEGF₁₆₅b promotes invasion. (a) Immunoblots for Epithelial to Mesenchymal Transition (EMT) markers in control and H1299-VEGF₁₆₅b clones. Tubulin was used as a loading control. Same results were obtained in H358-VEGF₁₆₅b clones. (b) Wound healing assay in control and H1299-VEGF₁₆₅b clones (5 and 2). Scratch recovering was estimated after 13 hours. Lower panel represents the scratch coverage percentage. n = 3 independent experiments. Values are mean $\pm$ SD (Student non paired t test). ** p<0.01. (c) Boyden chamber assay in control and H358-VEGF₁₆₅b clones (13 and 36) using serum gradient and β -FGF as attractants. Trans-migrating cells were stained with Hoechst as illustrated in left panel. n = 3 independent experiments. Values are mean $\pm$ SD (Student non paired t test). *

p<0.05 ** p<0.01. (d) Representative immunoblots of MMP-9 gelatin zymography in H1299-VEGF₁₆₅b clones. The supernatant from HT1080 cell line was used as a control for MMPs activation. (e) Distribution of the VEGF₁₆₅b:VEGF₁₆₅ ratio (IHC) according to the nodal status in NSCLC (Mann-Whitney's t test). (f) RT-QPCR analysis of ALDH1A1, CD133 and CD15 mRNA levels in control, H1299-VEGF₁₆₅b and H358-VEGF₁₆₅b clones. Similar results were obtained in H1299-VEGF₁₆₅b clones (data not shown). GAPDH was used as an internal control. Results are the mean $\pm$ SD of 3 independent experiments (Student non paired t test). * p<0.05 ** p<0.01. (g, h) Immunoblots for EMT markers in H1299 treated with increasing doses of bevacizumab during 7 days (g) or in H1299 transfected for 72 hours with either *mismatch* or *VEGF₁₆₅b* siRNA and incubated with increasing doses of bevacizumab (h).

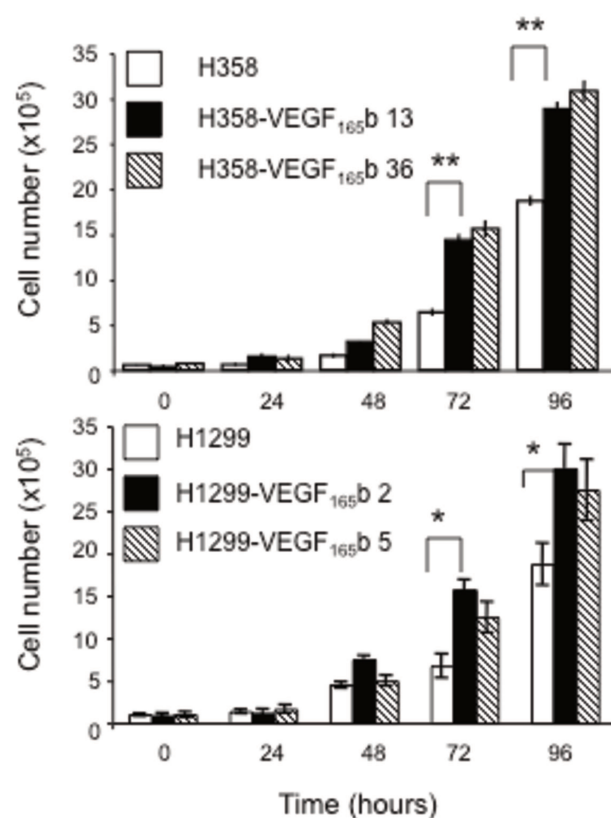
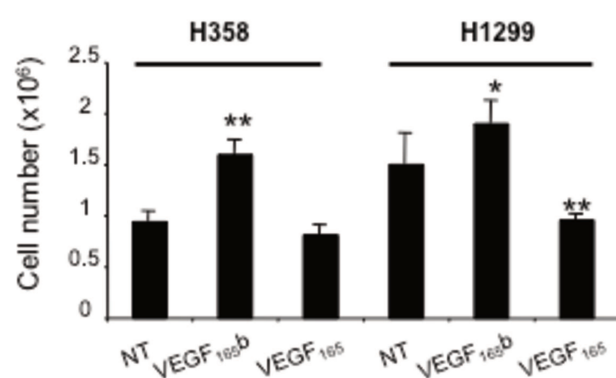
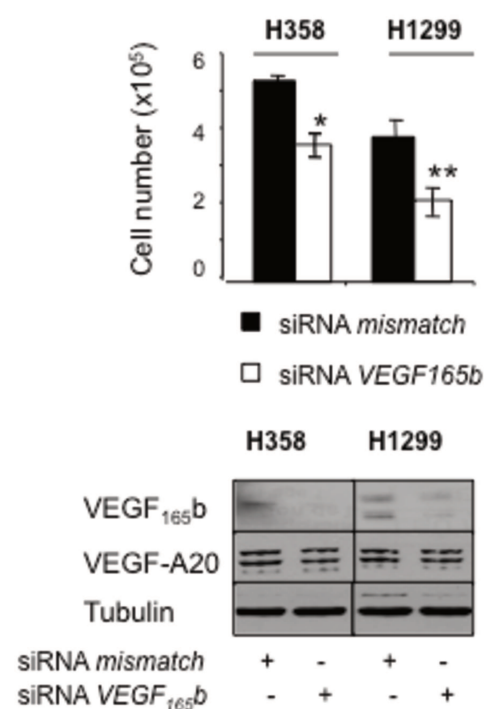
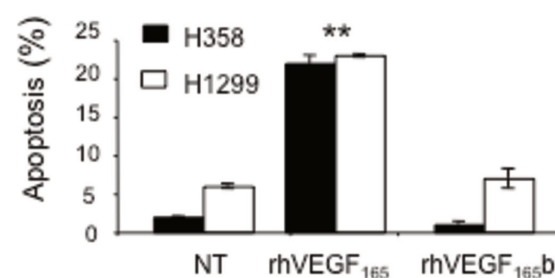
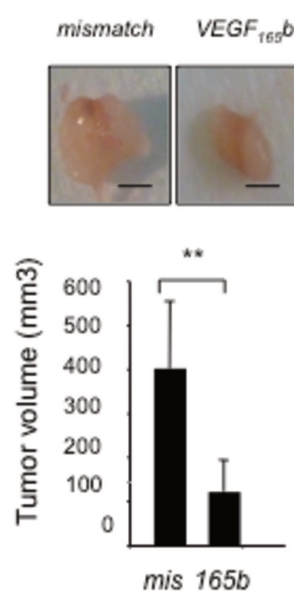
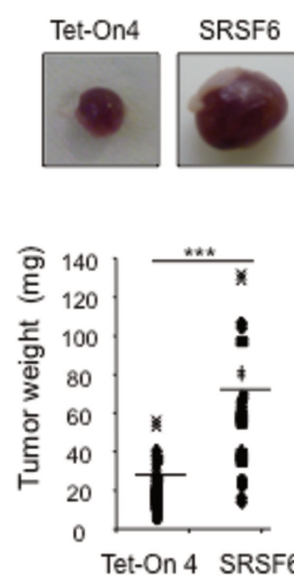
Figure 6. VEGF₁₆₅b activates a β 1 integrin signaling pathway to trigger actin cytoskeleton reorganization. (a, b, c) Immunoprecipitation (IP) of activated β 1 integrin in cellular extracts from (a) H358 control or -VEGF₁₆₅b clones, (b) H358 treated with rhVEGF₁₆₅ or rhVEGF₁₆₅b (0.1 ng/ml) for 60 min, (c) H358 treated with bevacizumab at the indicated concentrations. IgG was used as an irrelevant antibody. Total amount of β 1 integrin in protein extracts was assessed by western blotting (lower panels). Numbers represent the results of densitometric quantification of the signal using image J software. The ratio activated β 1 integrin:total β 1 integrin in untreated cells was arbitrarily assigned the value 1. (d) β 1 integrin activation measured by flow cytometry in H1299 treated or not (NT) for 1 hour with rhVEGF₁₆₅ or rhVEGF₁₆₅b (10 ng/ml). The mean $\pm$ SDs of four independent experiments are presented. (Mann-Whitney's U test). NS: not significant. (e, f) H1299 were plated onto fibronectin glass coverslips for 24 hours and (e) treated or not for 1 hour with rhVEGF₁₆₅ or rhVEGF₁₆₅b (1 ng/ml) or (f) treated or not for 72 hours with bevacizumab. Co-

immunofluorescence analyses of $\beta 1$ integrin (green) and phospho-paxillin(Ser118) (red) were performed. DAPI was used to counterstain the nucleus. Histograms representing quantification of cells exhibiting focal adhesion was performed in rhVEGF₁₆₅/rhVEGF₁₆₅b (e) or bevacizumab (f) treated cells, on at least 300 cells (non-paired Student t test) *p<0.05. (g) Representative F-actin staining of H1299 cells treated, or not (Co), with rhVEGF₁₆₅ or rhVEGF₁₆₅b (1 ng/ml) for 60 min (left panel). Percentages of cells with actin stress fibers are presented for each condition (right panel). n=4 independent experiments. 500 cells were counted per experiment. Values are mean $\pm$ SD (Mann-Whitney test). (h) F-actin staining using phalloidin-TRITC in H1299 cells transfected with *mismatch* or *VEGF₁₆₅b* siRNA and treated or not with BVZ (10 μ g/ml).

Figure 7. A $\beta 1$ integrin/VEGFR2/NRP2 complex promotes VEGF₁₆₅b invasive function in response to bevacizumab. Immunoprecipitation of (a) VEGFR2 or (b) $\beta 1$ integrin in H358 cells treated or not with increasing amounts (0.1, 1 ng/ml) of rhVEGF₁₆₅b for 1 hour. IgG was used as an irrelevant antibody. Numbers represent the results of densitometric quantification of the signal using image J software. The ratio activated $\beta 1$ integrin:total $\beta 1$ integrin in untreated cells was arbitrarily assigned the value 1. For VEGFR2 and neuropilin-2 quantification, the VEGFR2: $\beta 1$ integrin or neuropilin-2: $\beta 1$ integrin ratio was calculated in each condition. The value 1 was arbitrarily assessed in untreated conditions. (c) Upper panel: Immunoblot of neuropilin-2 demonstrating the specificity of the siRNA. Hsp70 was used as a loading control. Lower panel: F-actin staining using phalloidin-TRITC in H1299 cells transfected with *mismatch* (siMis) or *neuropilin-2* (siNRP2) siRNA and treated or not (Co) with rhVEGF₁₆₅b (0.1 ng/ml) for 30 min. (d, e) F-actin staining using phalloidin-TRITC in (d) control or H1299-VEGF₁₆₅b clones transfected with *mismatch* (siMis) or *neuropilin-2* (NRP2)

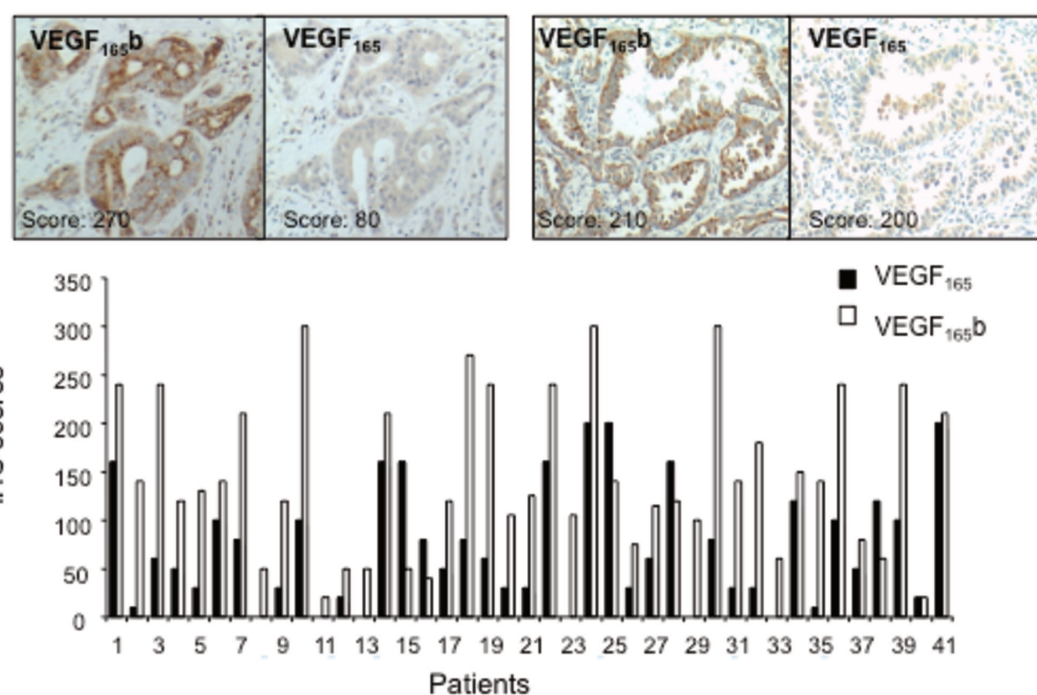
siRNA or (e) H1299 cells transfected with *mismatch* (siMis) or *neuropilin-2* (siNRP2) siRNA and treated, or not, with bevacizumab (10 μ g/ml) for 72 hours. (f) Immunoprecipitation of β 1 integrin in H358 cells transfected with *mismatch* or *VEGF₁₆₅b* siRNA and treated or not (-) with bevacizumab (10 μ g/ml) for 72 hours. Lower panel: efficiency of VEGF₁₆₅b knock-down. IgG was used as an irrelevant antibody. Numbers represent the results of densitometric quantification of the signal using image J software as described above. The value 1 was arbitrarily assigned to the ratios obtained in untreated cells.

Figure 8. A model for the dual functions of VEGF₁₆₅b in NSCLC. In lung tumors, VEGF₁₆₅b can exert both paracrine anti-angiogenic functions on endothelial cells (our former study, (32)), as well as pro-tumoral functions on tumor cells themselves through activation of a β 1 integrin/VEGFR/NRP2 autocrine loop (this study). We propose that in later stages of tumor development, the pro-tumoral proliferative functions of VEGF₁₆₅b may bypass the anti-tumoral angiogenic ones to promote tumor progression. VEGF₁₆₅b-expressing tumor cells also acquire more aggressive and invasive features as evidenced by the appearance of EMT and stem cell markers that could contribute to the metastatic spreading of tumor cells as well as to their self-renewal. Anti-angiogenic therapies impact on *VEGF-A* pre-mRNA splicing and favor the expression of VEGF₁₆₅b in tumor cells that could promote their escape from treatment. Based on preliminary results indicating that VEGF₁₆₅b-overexpressing cells are also more resistant to hypoxia, we propose that hypoxia induced by anti-angiogenic therapies may also contribute to the emergence of VEGF₁₆₅b-expressing tumor cells. As a whole, our data suggest that modulating *VEGF-A* pre-mRNA splicing together with β 1 integrin signaling might offer alternative therapeutic strategies to overcome resistance to anti-angiogenic therapies.

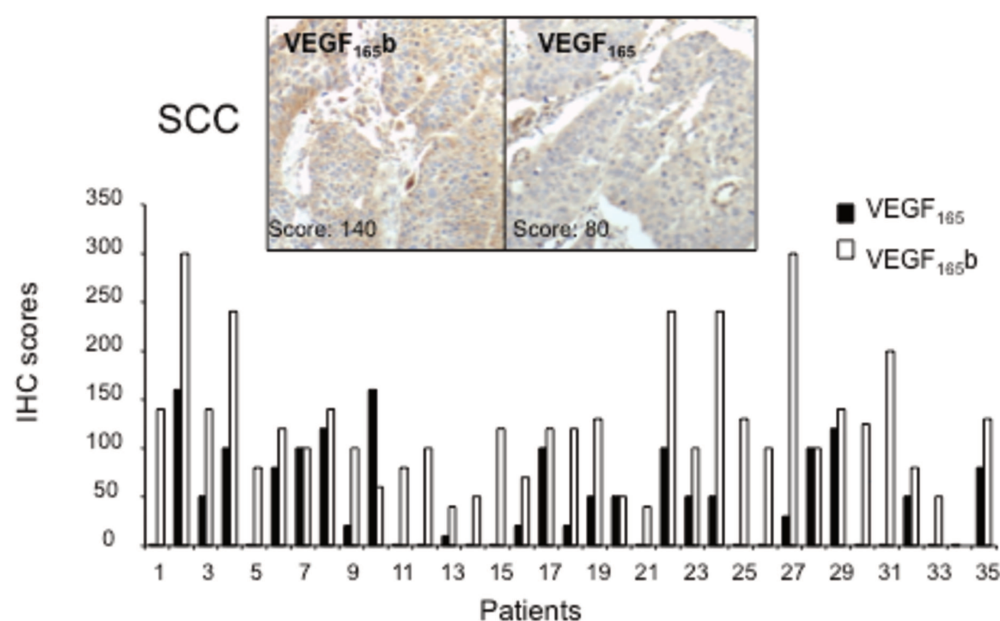
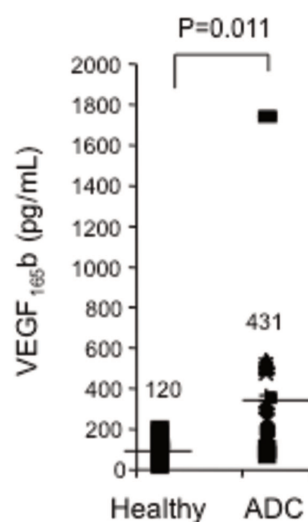
a**b****c****c****d****e****f**

a

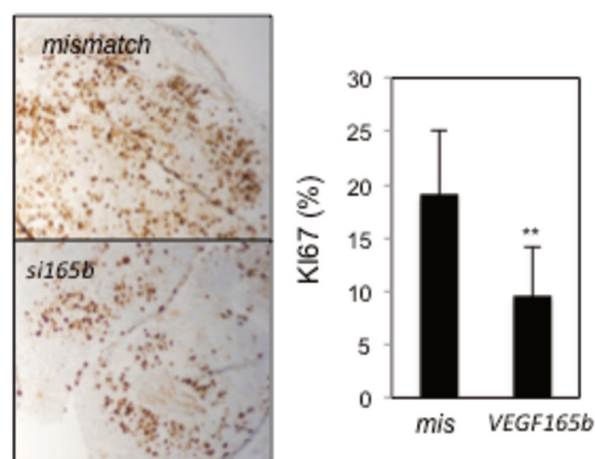
ADC

**b**

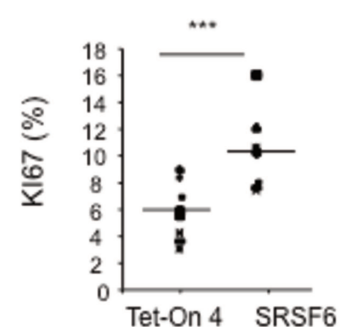
SCC

**c**

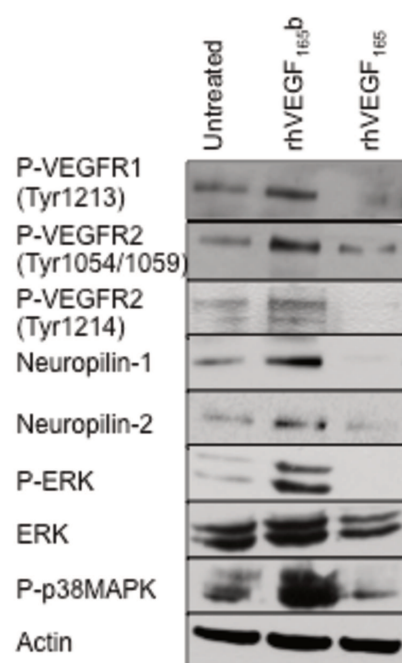
a



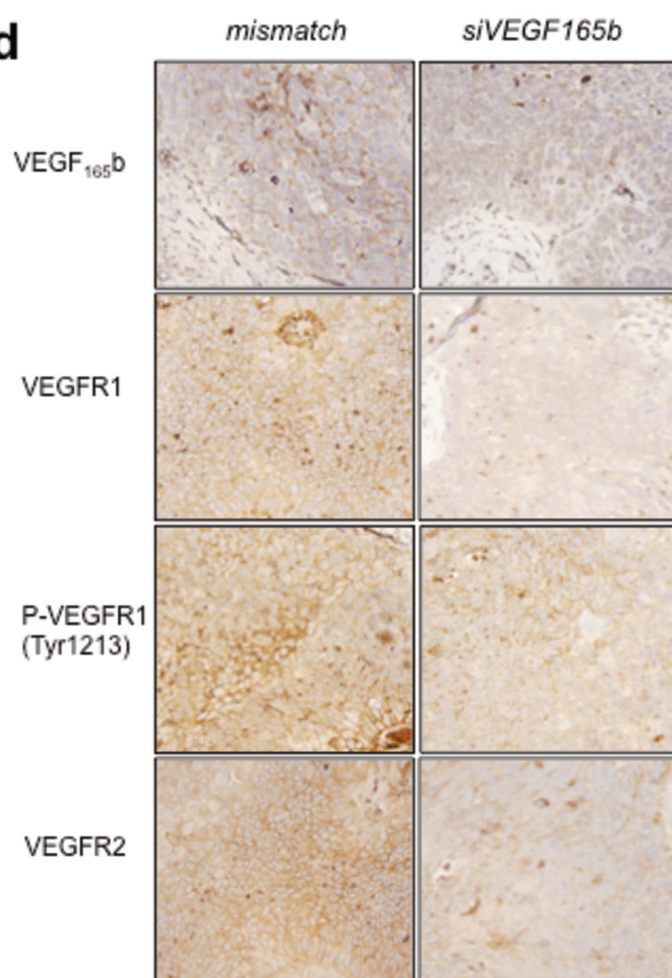
b



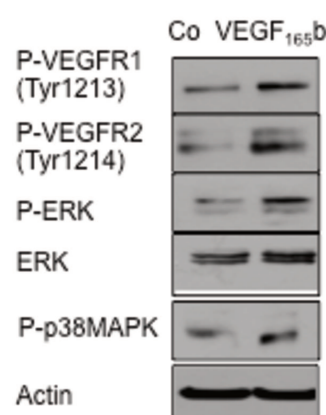
c



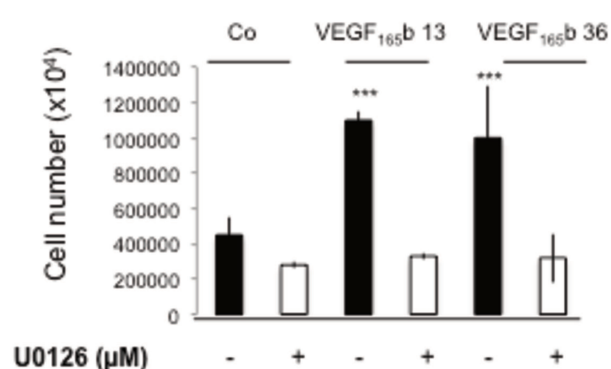
d



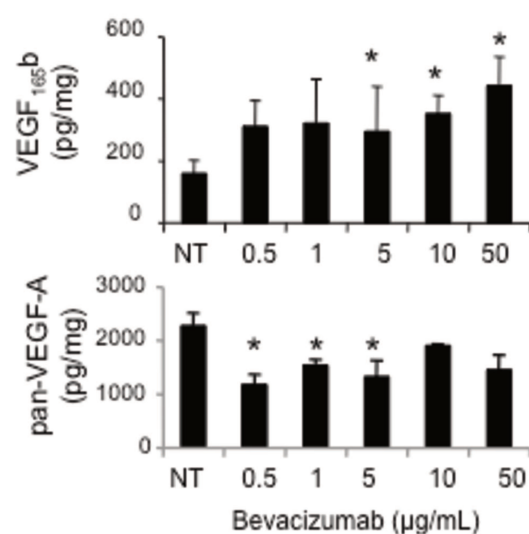
e



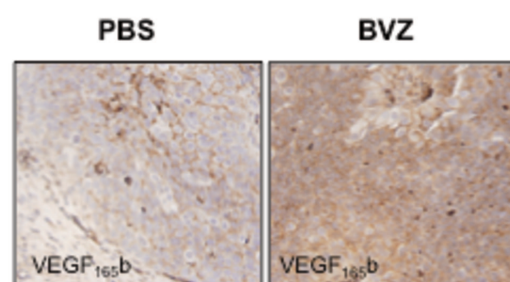
f



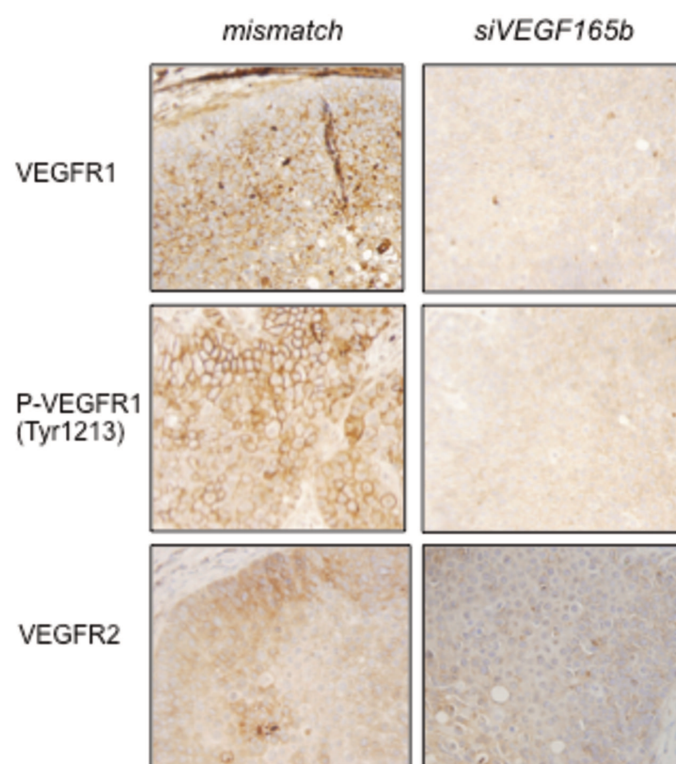
a



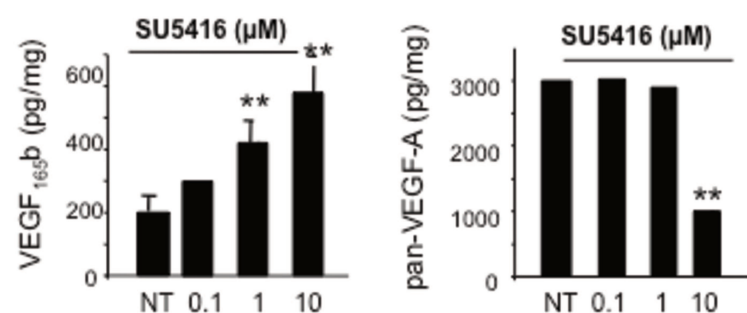
c



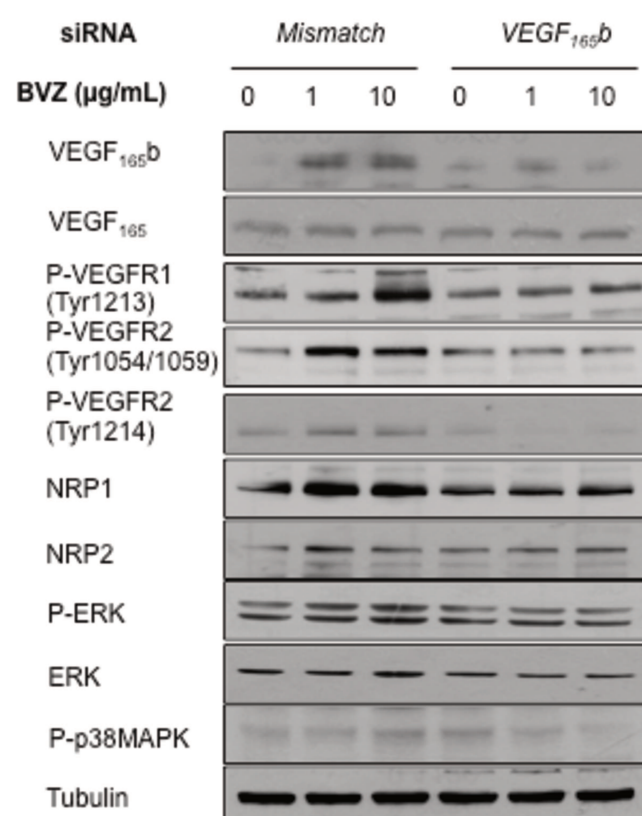
e



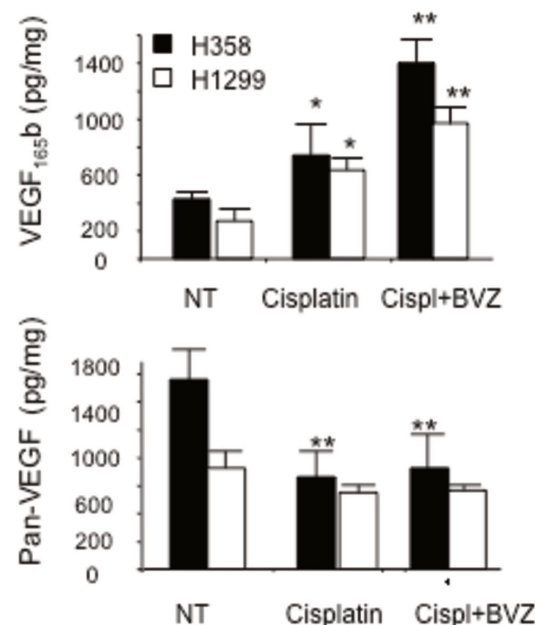
b

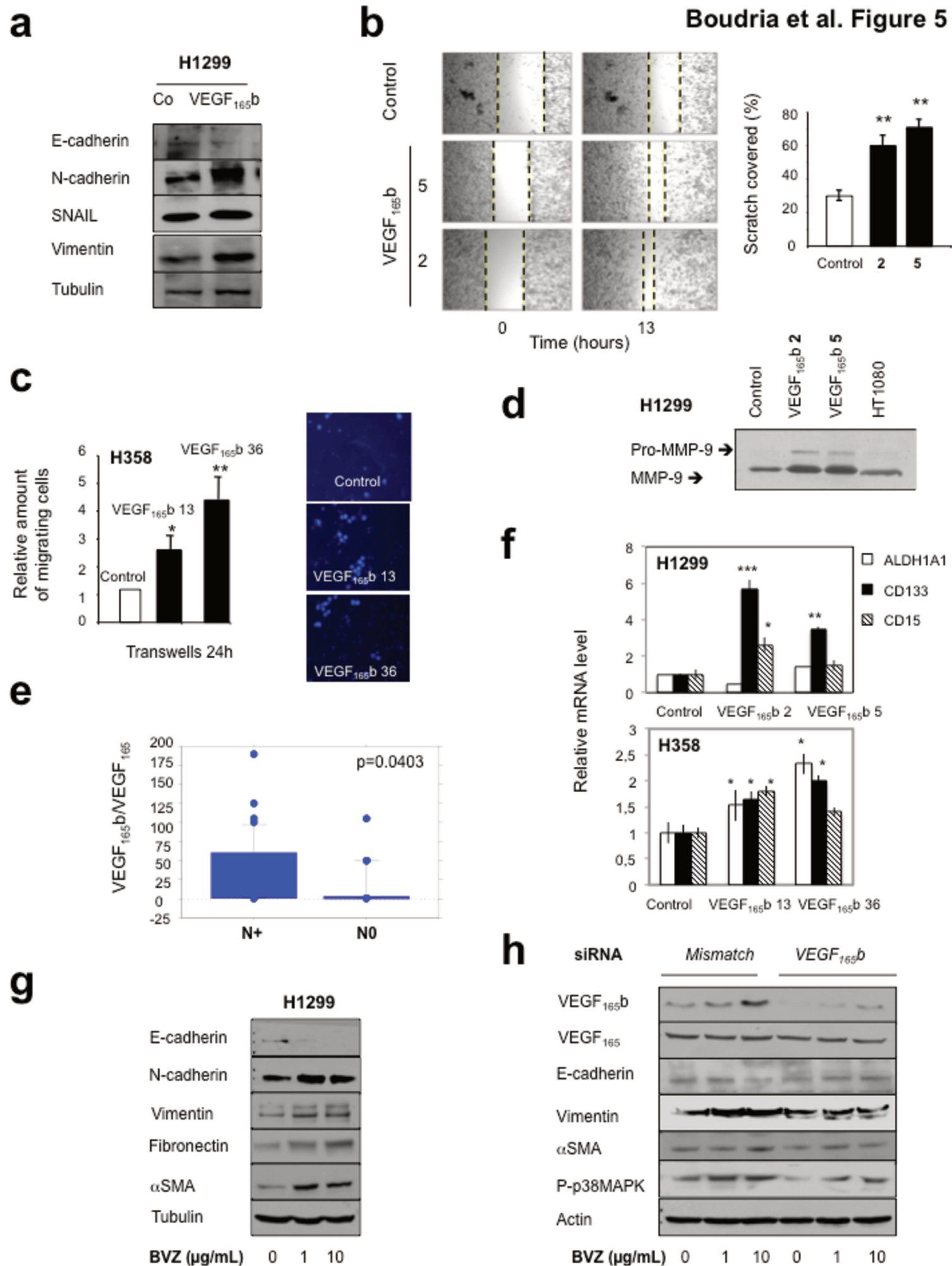


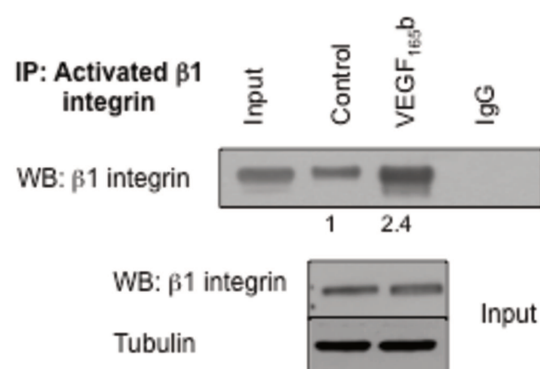
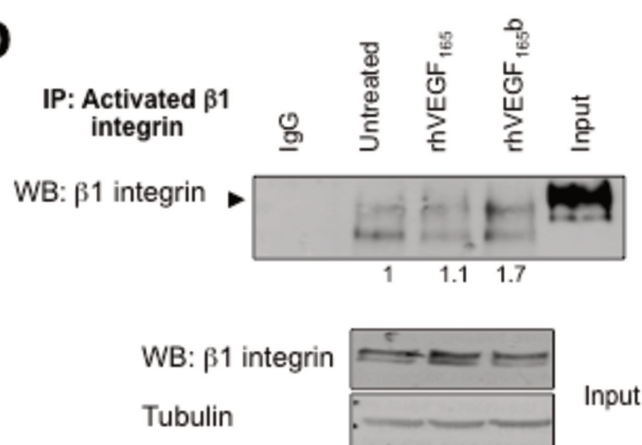
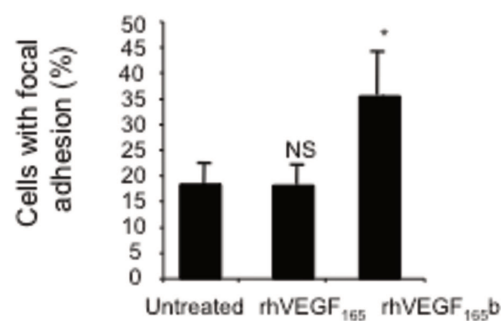
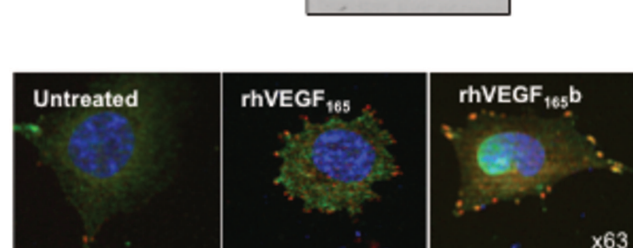
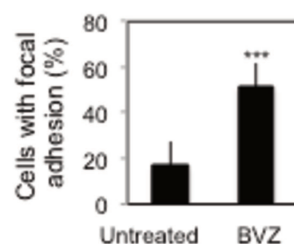
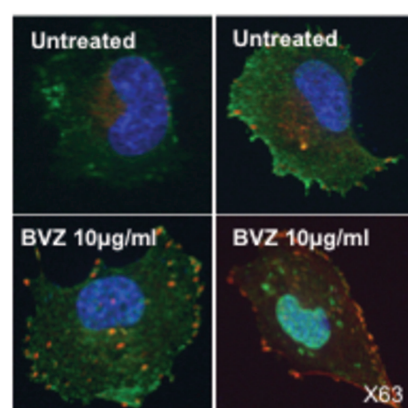
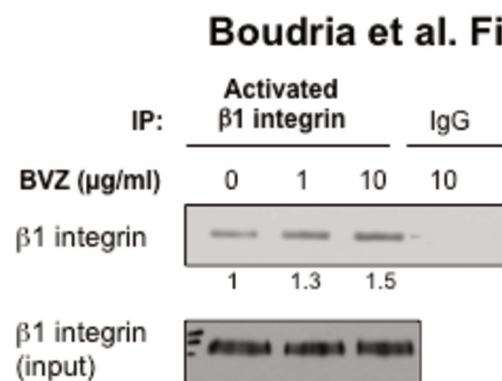
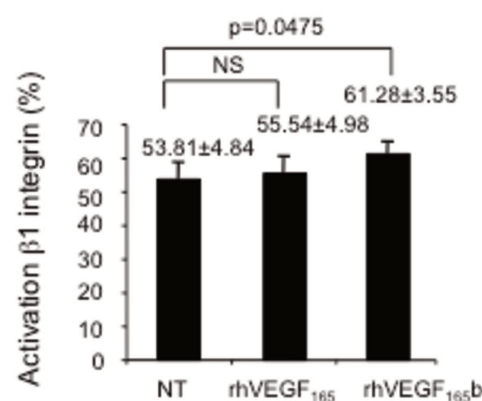
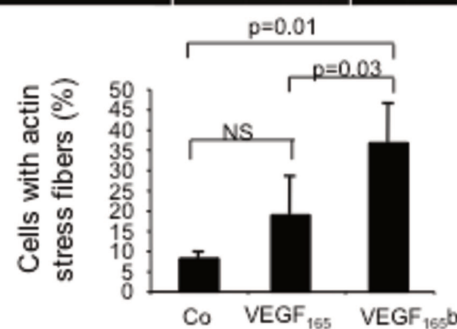
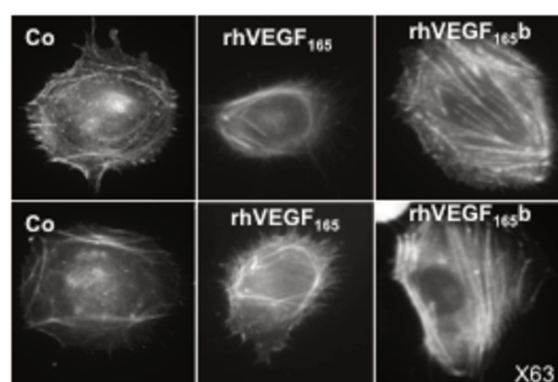
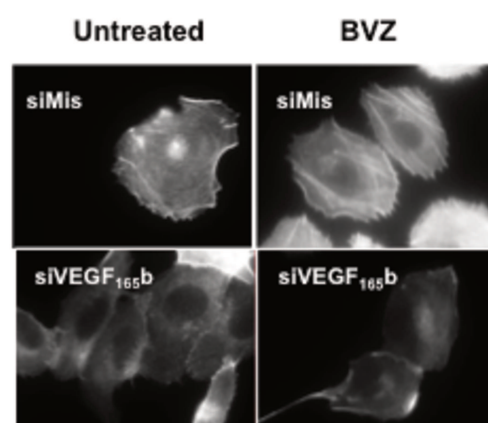
d

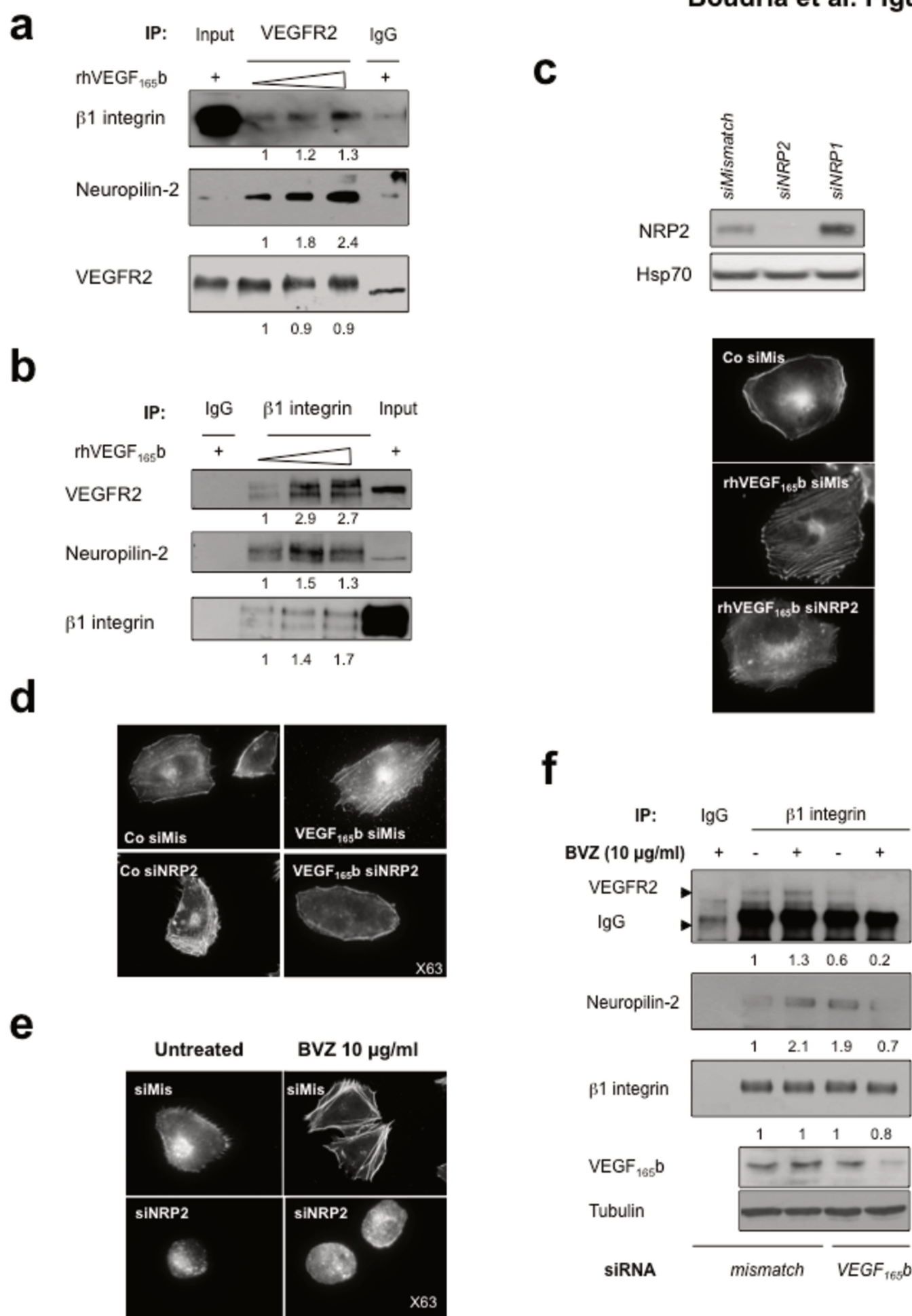


f





a**b****c****d****e****f****g****h**



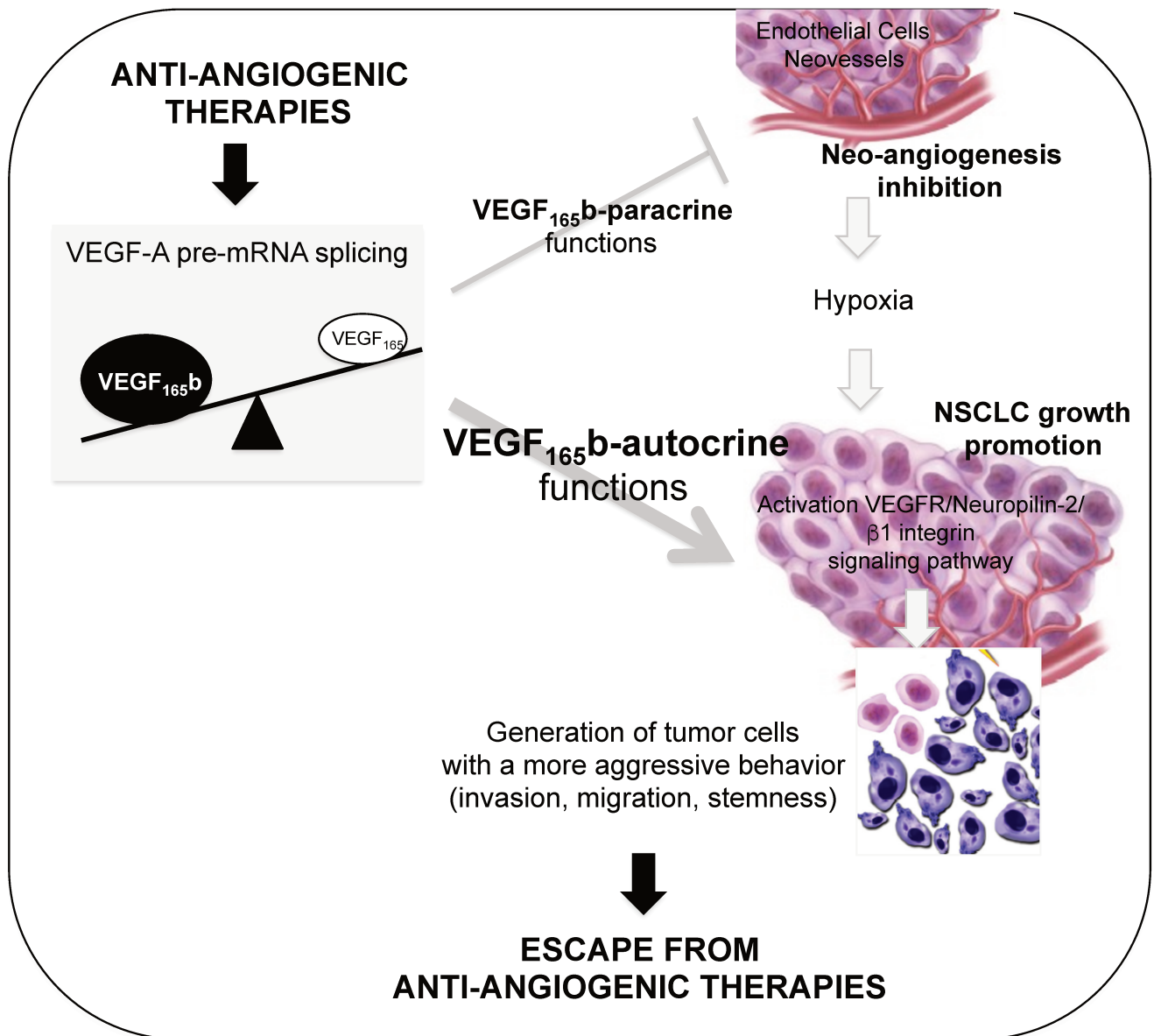


Table 1. Immunohistochemical analysis of VEGF₁₆₅b and VEGF₁₆₅ expression in NSCLCs

VEGF ₁₆₅ ^b expression level					
Histological Type	Nb	Class 0	Class 1	Class 2	P ^b
Adenocarcinoma	41	7 (17%)	20 (49%)	14 (34%)	NS
Squamous carcinoma	35	5 (14%)	24 (68%)	6 (17%)	
Total NSCLCs ^a	76	12 (16%)	44 (58%)	20 (26%)	
VEGF ₁₆₅ expression level					
Histological Type	Nb	Class 0	Class 1	Class 2	P ^b
Adenocarcinoma	41	17 (42%)	14 (34%)	10 (24%)	NS
Squamous carcinoma	35	18 (52%)	13 (37%)	4 (11%)	
Total NSCLCs ^a	76	35 (46%)	27 (36%)	14 (18%)	

Immunostaining scores were calculated by multiplying the number of labeled cells (0 to 100%) by the level of intensity (1 to 3). According to this and as compared to the level detected in normal lung tissues, tumor samples were grouped in three classes (see materials and methods section): VEGF165b: class 0 (low level, score 0-50), class 1 (moderate level, score 51-149), class 2 (high level, score ≥ 150); VEGF165: class 0 (low level, score 0-50), class 1 (moderate level, score 51-100), class 2 (high level, score > 100).

nb=number of cases in each histological type. a Non Small Cell Lung Carcinoma. b χ^2 test. NS: non significant.

Table 2. Immunohistochemical analysis of VEGFR1, VEGFR2, P-VEGFR1(Tyr1213), NRP1 and NRP2 expression in NSCLC

		VEGFR1			VEGFR2			P-VEGFR1(Tyr1213)		
Histological Type	Nb	Class 0	Class 1	P ^b	Class 0	Class 1	P ^b	Class 0	Class 1	P ^b
Adenocarcinoma	38	14 (37%)	24 (63%)	0.028	11 (29%)	27 (71%)	NS	22 (58%)	16 (42%)	NS
Squamous carcinoma	34	21 (62%)	13 (38%)		17 (50%)	17 (50%)		16 (47%)	18 (53%)	
Total NSCLCs ^a	72	35 (49%)	37 (51%)		28 (39%)	44 (62%)		38 (53%)	34 (47%)	

		Neuropilin-1			Neuropilin-2		
Histological Type	Nb	Class 0	Class 1	P ^b	Class 0	Class 1	P ^b
Adenocarcinoma	34	16 (47%)	18 (53%)	NS	13 (38%)	21 (62%)	NS
Squamous carcinoma	34	17 (50%)	17 (50%)		16 (47%)	18 (53%)	
Total NSCLCs ^a	68	33 (48%)	35 (52%)		29 (43%)	39 (57%)	

Immunostaining scores were calculated by multiplying the number of labeled cells (0 to 100%) by the level of intensity (1 to 3).

According to this and as compared to the level detected in normal lung, tumor samples were grouped in two classes for each staining (see materials and methods section): class 0 (low level) and class 1 (high level).

VEGFR1 (class 0, score<125; class 1, score≥125); P-VEGFR1 (class 0, score <75; class 1, score≥75).

VEGFR2 (class 0, score<150; class 1, score≥150).

Neuropilin-1 and neuropilin-2 (class 0, score<125, class 1 score≥125).

nb=number of cases in each histological type. ^aNon Small Cell Lung Carcinoma. ^bχ² test. NS: not significant.

Of note, IHC staining of NRP1/NRP2 could be performed on 34 ADC and 34 SCC only.

Annexe 2

Annexe 3

Chapter 21

VEGF-A Splice Variants: Do They Play a Role

in Tumor Responses to Anti-angiogenic

Therapies?

Beatrice Eymin, Asma Boudria, and Cherine Abou-Faycal

Abstract

It has been known for two decades that *VEGF-A* encodes several VEGF-A splice variants, which are termed VEGF_{xxx}, according to the total number of amino acids in the mature protein. To date, nine VEGF_{xxx} isoforms have been described, displaying different biodistributions and pro-angiogenic activities. Adding another level of complexity to VEGF-A biology, a new family of VEGF-A isoforms, termed VEGF_{xxx}b, which exert anti-angiogenic functions, was discovered in 2002 and only differs from VEGF_{xxx} polypeptides with regard to their C-terminal six amino acids. Therefore, reminiscent of what is observed, for instance, during apoptosis, the alternative splicing of *VEGF-A* pre-mRNA generates two types of isoforms with antagonistic biological functions. As anti-angiogenic therapies target both the VEGF_{xxx} and VEGF_{xxx}b families, *VEGF-A* pre-mRNA splicing may therefore impact tumor responses to these therapies. Consistently, recent clinical studies have highlighted VEGF-A splice variants as predictive biomarkers in response to bevacizumab. Hence, identification of the upstream signaling pathways that control *VEGF-A* pre-mRNA splicing, better characterization of the specific biological functions played by each VEGF-A splice variant, and analysis of the impact of anti-angiogenic therapies on *VEGF-A* pre-mRNA splicing are critical goals. The purpose of this chapter is to summarize the current knowledge in this field.

B. Eymin (✉) • A. Boudria • C. Abou-Faycal

INSERM U823, Team 2 Molecular Basis of Lung Cancer Progression,

Institute Albert Bonniot, Grenoble, France

e-mail: beatrice.eymin@ujf-grenoble.fr

25 **21.1 Proteome Diversity Through Pre-mRNA Alternative**
26 **Splicing: *VEGF-A* Does Not Escape the Rule**

27 Deep sequencing of the human transcriptome has provided evidence that up to 90 %
28 of human multi-exon genes undergo pre-mRNA alternative splicing (AS) (Pan et al.
29 2008), and the role of AS in both physiological and pathological processes, such as
30 cancer, is now well documented. For instance, many splice variants have been found
31 to be misregulated in cancers (David and Manley 2010), among them *VEGF-A*-
32 encoded splice variants.

33 **21.1.1 The *VEGF*_{xxx} Family**

34 **21.1.1.1 General Presentation**

35 The human *VEGF-A* gene is located on chromosome 6 at 6p21.3 and spans 14 kb,
36 with eight exons separated by seven introns (Vincenti et al. 1996) (Fig. 21.1). Two
37 years after its discovery, *VEGF-A* was found to encode multiple protein isoforms

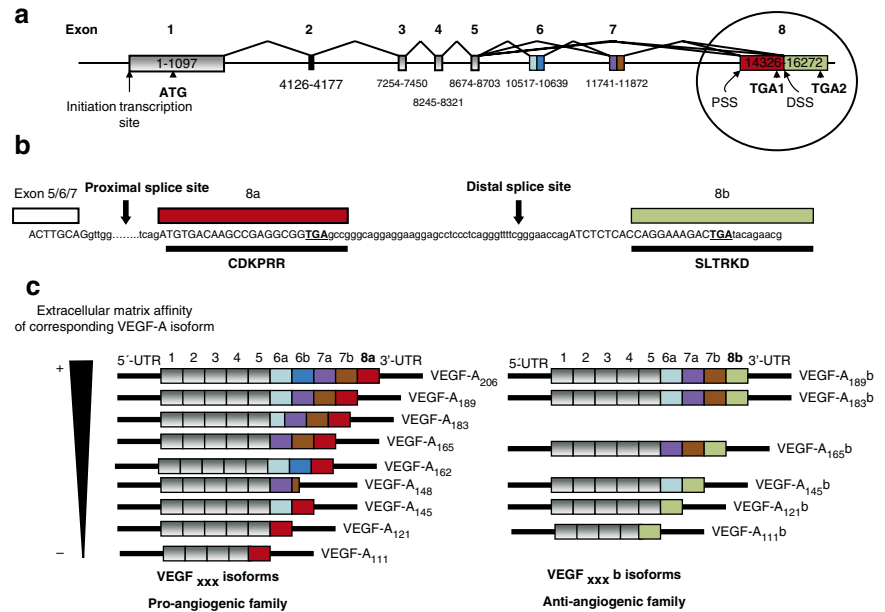


Fig. 21.1 (a) The human *VEGF-A* gene structure, consisting of eight exons and seven introns. (b) Focus on the C-terminal exon 8 of *VEGF-A*, the splicing of which generates either the VEGF_{xxx} or VEGF_{xxx}b subfamily. The proximal splice site (PSS) and distal splice site (DSS) are indicated. The nucleotide and amino acid sequences for exons 8a and 8b are depicted. (c) Illustration of all *VEGF-A* splice variants in each subfamily. The extracellular matrix affinity of the corresponding *VEGF-A* isoforms is indicated

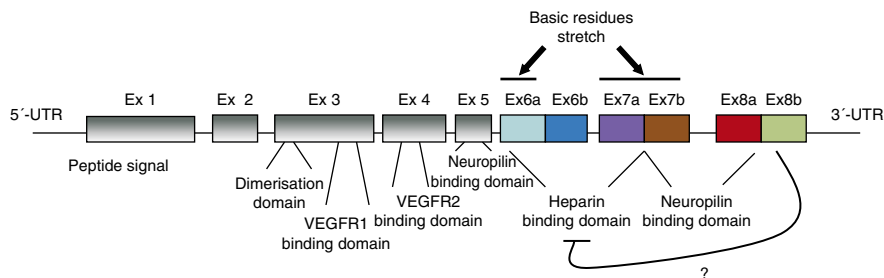


Fig. 21.2 Scheme of the functional domains of the VEGF-A protein encoded by each exon. The basic residues that confer affinity to heparin-containing proteoglycans are indicated. Because VEGF_{165b} does not bind heparin, it has been proposed that exon 8b could exert a negative effect on heparin binding. Alternatively, exon 8a is required for heparin binding. Exons 3 and 4 encode VEGFR1 and VEGFR2 binding domains. Exons 5, 7, and 8a encode sequences that are required for VEGF-A binding to neuropilins. As a consequence, VEGF_{xxx}b isoforms do not bind neuropilins

through exonic alternative splicing (Houck et al. 1991). To date, nine human VEGF-A splice variants, termed VEGF_{xxx} (where xxx represents the total number of amino acids in the mature protein after signal sequence cleavage), have been described: VEGF₁₁₁, VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₄₈, VEGF₁₆₂, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₃, VEGF₁₈₉, and VEGF₂₀₆ (Ferrara 2004). At the structural level (Fig. 21.1), with the exception of VEGF₁₁₁ (containing exons 1–4), all VEGF_{xxx} isoforms contain exons 1–5 and differ only by the inclusion/exclusion of exon 6a, 6b, or 7. Hence, VEGF₁₈₉ lacks the residues encoded by exon 6b, VEGF₁₆₅ those encoded by exon 6, and VEGF₁₂₁ those encoded by exons 6 and 7. Exons 6a and 7 encode highly conserved sequences that are rich in basic residues that confer an affinity for heparin-containing proteoglycans (Fig. 21.2). Therefore, VEGF₁₂₁ is an acidic protein that does not bind heparin and is highly diffusible, whereas the VEGF₂₀₆, VEGF₁₈₉, VEGF₁₈₃, VEGF₁₆₂, and VEGF₁₄₅ isoforms tightly bind to the heparan sulfate that is present at the cell surface and extracellular matrix (ECM) (Houck et al. 1992). The VEGF₁₆₅ isoform displays an intermediate pattern, as it contains only 15 basic amino acids within the 44 residues encoded by exon 7, and it is estimated that approximately 50–70 % of the VEGF₁₆₅ pool is anchored at the cell surface or ECM (Houck et al. 1992). The VEGF-A isoforms in the ECM constitute a reservoir of growth factor that can be slowly released after exposure to heparin, heparan sulfate, and heparinases or more rapidly mobilized by specific proteolytic enzymes, such as plasmin and urokinase-type plasminogen activator (uPA) (Plouet et al. 1997). Importantly, the loss of the heparin-binding domain after proteolytic cleavage reduces the mitogenic activity of VEGF-A (Keyt et al. 1996). Therefore, VEGF-A pre-mRNA splicing controls both the biodistribution and bioactivity of VEGF-A, allowing the establishment of a gradient of VEGF-A during tumor angiogenesis, with the most diffusible isoform acting at distance to promote vascular recruitment, whereas the matrix-bound isoforms promote the local expansion of capillary beds (Grunstein et al. 2000).

All VEGF-A isoforms are secreted as antiparallel homodimers covalently linked by two disulfide bridges between Cys-51 and Cys-60 (Muller et al. 1997). At the structural level, all isoforms possess a dimerization domain and a VEGFR1 or

VEGFR2 binding domain (Fig. 21.2). However, the isoforms display different binding affinities for the VEGF receptors, VEGFR1 (Flt-1) and VEGFR2 (KDR/Flk-1), and for their co-receptors, neuropilin-1 (NRP1) and neuropilin-2 (NRP2) (Roskoski 2007). Hence, VEGF₁₆₅ binds to VEGFR1 and VEGFR2, whereas VEGF₁₈₉ preferentially binds to VEGFR1 unless cleaved by proteases. VEGF₁₂₁ exhibits a modestly reduced affinity for VEGFR1 and VEGFR2 in the presence of heparin when compared with VEGF₁₆₅. Although all VEGF₁₈₉, VEGF₁₆₅, and VEGF₁₂₁ isoforms are able to bind NRP1 (Delcombel et al. 2013), only VEGF₁₆₅ bridges the formation of VEGFR2/NRP1 ternary complexes (Soker et al. 2002), whereas VEGFR2 enhances the interaction between NRP1 and VEGF₁₆₅ only (Pan et al. 2007a). Therefore, as compared with the other VEGF_{xxx} isoforms, VEGF₁₆₅ displays optimal features in terms of biological potency. Indeed, VEGF₁₆₅ is the only isoform that can fully rescue the tumorigenic phenotype in mouse VEGF^{-/-} cells (Grunstein et al. 2000). Interestingly, matrix-bound VEGF₁₆₅, but not soluble VEGF₁₆₅, is able to trigger a sustained phosphorylation of VEGFR2 in endothelial cells, followed by a specific activation of the p38 MAPK pathway (Chen et al. 2010). These data suggest that VEGF_{xxx} isoforms transactivate specific downstream VEGFR-dependent signaling pathways depending on their ECM-binding ability.

21.1.1.2 VEGF_{xxx} Isoforms: Distinct Functions and Pattern of Expression in Tumors

As determined by the cDNA analysis of a variety of cell types and tissues and tumor specimens, most VEGF-producing cells appear to preferentially express VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, and VEGF₁₈₉ mRNAs, with VEGF₁₆₅ being the predominant isoform. VEGF₁₂₁ mRNA is abundant in the lung and kidney, and VEGF₁₈₉ mRNA is highly expressed in cardiac and vascular tissues, albeit to a lesser extent than VEGF₁₆₅ and VEGF₁₂₁ (Zygalaki et al. 2008). VEGF₁₈₉ mRNA is preferentially expressed under conditions of increased stretch-induced cell tension and is thought to play a role in vascularization during bone repair (Faure et al. 2008). VEGF₁₈₃ also has a wide tissue distribution and may have avoided earlier detection through confusion with VEGF₁₈₉ (Jingjing et al. 1999). By contrast, VEGF₁₄₅ and VEGF₂₀₆ mRNAs are rarely expressed and are seemingly restricted to cells of placental origin (Cheung et al. 1995).

In tumors, RT-PCR or RT-QPCR analyses have further revealed differential patterns of VEGF_{xxx} expression and have correlated this pattern with clinicopathological features. In lung and colon carcinomas, VEGF₁₆₅ and VEGF₁₂₁ mRNAs appear to be the most predominant transcripts (Zygalaki et al. 2007). VEGF₁₆₅ mRNA expression in many tumor types has been associated with progression, invasion and metastasis, microvessel density, decreased survival rate, and a poor prognosis. In colon, renal cell, and lung carcinomas, the expression of VEGF₁₈₉ mRNA was associated with a worse prognosis (Ohta et al. 1996), and only VEGF₁₈₉ mRNA expression was found to be an independent prognostic indicator in a series of 130 non-small cell lung carcinomas (NSCLCs) (Matsuyama et al. 2009). VEGF₁₈₉ was also found to be necessary for the growth of NSCLC xenografts in vivo,

with VEGF₁₈₉-overexpressing tumors being larger and displaying higher vessel per- 110
fusion and permeability than those overexpressing either VEGF₁₂₁ or VEGF₁₆₅ (Yuan 111
et al. 2001). However, in lung cancer, high levels of *VEGF*₁₂₁ mRNA have also been 112
associated with a poor prognosis and lymph node metastasis (Oshika et al. 1998), 113
and VEGF₁₂₁ was found to promote lymphangiogenesis via the secretion of VEGF-C 114
(Kawai et al. 2008). In addition, expression of *VEGF*₁₂₁ mRNA was associated with 115
the tumor progression of bladder and renal cell carcinoma (Li et al. 2000; Ljungberg 116
et al. 2003) and with a worse prognosis in acute myeloid leukemia (Mourah et al. 117
2009), and the VEGF₁₂₁ isoform was found to be the most tumorigenic in prostate 118
and breast cancers (Catena et al. 2007). In 2007, it was reported that VEGF₁₁₁ mRNA 119
was expressed in various tumor cell lines following treatment with such genotoxic 120
agents as UV-B, camptothecin, and mitomycin C (Mineur et al. 2007). 121

Altogether, these data demonstrate that *VEGF-A* pre-mRNA splicing likely 122
contributes to tumorigenesis by providing another way to finely regulate VEGF-A 123
bioactivity in addition to the activation of *VEGF-A* transcription. Such a notion is 124
fully consistent with the data of Tozer and colleagues, which provided evidence that 125
mouse fibrosarcoma cells that express only a single isoform of VEGF_{xxx} produce 126
tumors with different vascularization patterns, vessel wall structure, and barrier 127
function (Tozer et al. 2008). 128

21.1.2 The VEGF_{xxx}b Family: Six Amino Acids That Make the Difference 129 130

21.1.2.1 General Presentation 131

In 2002, a new family of VEGF-A splice variants, termed VEGF_{xxx}b, was discov- 132
ered (Bates et al. 2002). VEGF_{xxx}b splice variants share 94–98 % homology with 133
VEGF_{xxx} and result from the use of an alternative 3' splice acceptor site in the final 134
exon 8 of *VEGF-A* (Fig. 21.1). Hence, the use of a proximal splice site (PSS) in 135
exon 8 leads to the inclusion of exon 8a and generates the VEGF_{xxx} family, whereas 136
the use of a distal splice site (DSS) located 66 nucleotides further downstream from 137
PSS allows the inclusion of exon 8b and the generation of VEGF_{xxx}b transcripts. At 138
the protein level, VEGF_{xxx} and VEGF_{xxx}b isoforms display the same lengths and 139
amino acid sequences and differ only at the level of their C-terminal six amino 140
acids. Indeed, exon 8a in VEGF_{xxx} mRNAs encodes a CDKPRR sequence, whereas 141
exon 8b in VEGF_{xxx}b transcripts encodes an SLTRKD sequence (Ladomery et al. 142
2007). This distinct C-terminal extremity strongly affects the VEGF-A tertiary 143
structure (Cui et al. 2004), as the Cys-160 that forms a disulfide bond with Cys-146 144
in exon 7 is replaced by an aspartic acid residue. In addition, the two highly charged 145
arginine residues of the VEGF_{xxx} proteins are replaced by a lysine and aspartic acid 146
in the VEGF_{xxx}b proteins, with a substitution of a proline by an arginine. As a con- 147
sequence, the VEGF_{xxx}b isoforms retain both the VEGF tyrosine kinase receptor 148
binding and dimerization domains but do not bind neuropilins and are not able to 149

fully activate VEGFR-dependent signaling pathways (Cebe Suarez et al. 2006; Kawamura et al. 2008; Delcombel et al. 2013). Indeed, VEGF₁₆₅b does not exert its effect at full rotation on VEGFR2, which results in the rapid blockage of the ATP binding site, leading to transient and non-efficient VEGFR2 autophosphorylation (Harper and Bates 2008). Thus, although VEGF₁₆₅b is able to stimulate endothelial cell proliferation and subsequent ERK activation under certain conditions, this occurs with less potency than with VEGF₁₆₅ (Catena et al. 2010). In addition, unlike VEGF₁₆₅, which induces VEGFR2 internalization and recycling to the plasma membrane through Rab11 vesicles by a mechanism involving NRPI, VEGF₁₆₅b promotes the accumulation of phospho-VEGFR2 in Rab7 vesicles, which is indicative of receptor degradation (Ballmer-Hofer et al. 2011). At the biological level, in vitro endothelial proliferation and migration assays, ex vivo isolated resistance vessel myographs, and in vivo neovascular and tumor growth models, VEGF₁₆₅b acts as a dominant negative isoform that specifically competes with and inhibits VEGF₁₆₅ effects on endothelial cell proliferation, migration, and vasodilatation, thereby inhibiting angiogenesis and tumor growth (Bates et al. 2002; Woolard et al. 2004; Rennel et al. 2008). VEGF₁₂₁b also inhibits the migration of endothelial cells and reduces xenografted tumor growth through a direct effect on endothelial cells (Rennel et al. 2009). Interestingly, VEGF₁₆₅b failed to bind heparin despite possessing exon 7 (Delcombel et al. 2013), implicating exon 8a or an inhibitory function of exon 8b in this interaction. Therefore, as compared with VEGF_{xxx}, VEGF_{xxx}b isoforms could also possess distinct bioavailability.

21.1.2.2 VEGF_{xxx}b Isoforms: Do They Exhibit a Differential Pattern of Expression in Tumors?

VEGF₁₆₅b mRNA was the first VEGF_{xxx}b mRNA identified by RT-PCR in kidney cortex tissue (Bates et al. 2002). Subsequently, VEGF₁₂₁b (Rennel et al. 2009), VEGF₁₄₅b (Perrin et al. 2005), and VEGF₁₈₉b mRNAs (Miller-Kasprzak and Jagodzinski 2008) were identified in various human tissues. Indeed, VEGF_{xxx}b isoforms are thought to form over 50 % of the total VEGF-A protein in normal, non-angiogenic tissues, such as the dorsal root ganglia (71 %), lung (82 %), colon (>95 %), skin (>95 %) (Qiu et al. 2009), and vitreous (66 %) (Perrin et al. 2005). By contrast, VEGF_{xxx}b represents a small proportion of total VEGF-A in placenta (1.4 %) (Bates et al. 2006). Importantly, although VEGF_{xxx} isoforms are overexpressed in many tumor types, the VEGF_{xxx}b isoforms appear to be mainly downregulated in several cancers, including melanoma (Pritchard-Jones et al. 2007) and prostate (Woolard et al. 2004), colon (Varey et al. 2008), kidney (Bates et al. 2002), and Wilms' (Amin et al. 2011) carcinomas. In colorectal tumors, the downregulation of VEGF₁₆₅b was associated with advanced stages, vascular invasion, and lymph node metastases (Diaz et al. 2008), and the absence of VEGF_{xxx}b expression was found to predict metastatic spread in melanoma patients (Pritchard-Jones et al. 2007). Moreover, VEGF₁₆₅b expression was downregulated as compared with VEGF₁₆₅ in neuroblastoma, and rhVEGF₁₆₅b was found to reduce neuroblastoma tumor growth rate in established xenografts (Peiris-Pages et al. 2010).

Therefore, a switch between the VEGF_{xxx} and VEGF_{xxx}b isoforms in favor of VEGF_{xxx} exists in human tumors. Regardless, the persistence of VEGF_{xxx}b expression, together with VEGF_{xxx}, has also been reported in tumors. This is indeed the case in 70 % of clear renal cell carcinomas (Grepin et al. 2012) and in breast cancers in which the VEGF_{xxx}b isoforms are upregulated compared to nonmalignant breast tissues (Catena et al. 2010). VEGF₁₆₅b expression was also detected in stromal cells surrounding colorectal cancers and correlated with lower microvessel density (Tayama et al. 2011). Moreover, Bates and colleagues recently showed that a differential pattern of VEGF₁₆₅b protein expression exists in colon carcinoma, with tumors displaying low or high levels as compared with normal tissues (Bates et al. 2012). Accordingly, we observed that approximately 35 and 15 % of NSCLCs display low and high level of VEGF₁₆₅b protein expression, respectively, as compared with normal lung tissues (Boudria et al. in preparation). More interestingly, we found a significant association between high levels of VEGF₁₆₅b and lymph node metastases in NSCLC. Thus, the role of VEGF_{xxx}b isoforms during tumorigenesis might be more complex than previously imagined.

[AU2]

21.1.2.3 Analysis of VEGF-A Splice Isoforms in Tumors: What We Should Keep in Mind

As shown above, the analysis of distinct VEGF_{xxx} isoforms in human tumors has been mainly performed by RT-PCR or RT-QPCR using primers specifically designed to amplify each VEGF_{xxx} splice variant. However, in the vast majority of these studies, these primers were later shown to also co-amplify VEGF_{xxx}b mRNAs. The same is true regarding the analysis of the VEGF_{xxx} protein isoforms. Indeed, the antibodies used in the vast majority of in situ studies are pan-VEGF antibodies that recognize all VEGF-A isoforms, including VEGF_{xxx}b isoforms. Hence, the commercial antibodies previously thought to specifically target VEGF_{xxx} isoforms were later found to cross-react with rhVEGF_{xxx}b proteins. To date, there is no tool for the specific detection of VEGF_{xxx} protein isoforms by Western blotting, as the use of a pan-VEGF antibody will allow the discrimination among VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, and VEGF₁₈₉ but not between the VEGF_{xxx} and VEGF_{xxx}b isoforms. Nonetheless, mouse monoclonal antibodies directed against the C-terminal nine amino acids of VEGF₁₆₅b (CTRSLTRKD) have been developed; one (MVRL56/1), now commercially available, exhibits specificity for the VEGF₁₆₅b isoform versus VEGF₁₆₅ and does not cross-react with VEGF₁₆₅ or VEGF₁₂₁ recombinant proteins (Woolard et al. 2004). Therefore, until tools allowing the specific detection of VEGF_{xxx} isoforms become available, a concomitant analysis of both total VEGF-A (using a pan-VEGF-A antibody) and VEGF_{xxx}b (using the specific MVRL56/1 anti-VEGF_{xxx}b antibody) proteins should be performed before drawing conclusions regarding the status of VEGF-A in tumors. In addition, because VEGF-A is regulated at multiple posttranscriptional levels in addition to pre-mRNA splicing and it is not known whether the mRNA and protein levels are strictly correlated, concomitant analyses of both VEGF_{xxx}/VEGF_{xxx}b mRNA and protein levels should also be performed.

[AU3]

234 **21.1.3 Molecular Mechanisms Regulating VEGF-A**
235 **Pre-mRNA Splicing**

236 Several transcription factors, such as hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1), inflam-
237 matory cytokines, growth factors, or oncogenes, have been identified as upstream
238 transcriptional activators of *VEGF-A* (Ferrara 2004). By contrast, although
239 *VEGF-A* splice isoforms were described for the first time in 1989, very little is
240 known about the molecular mechanisms that control *VEGF-A* pre-mRNA splicing
241 (Fig. 21.3).

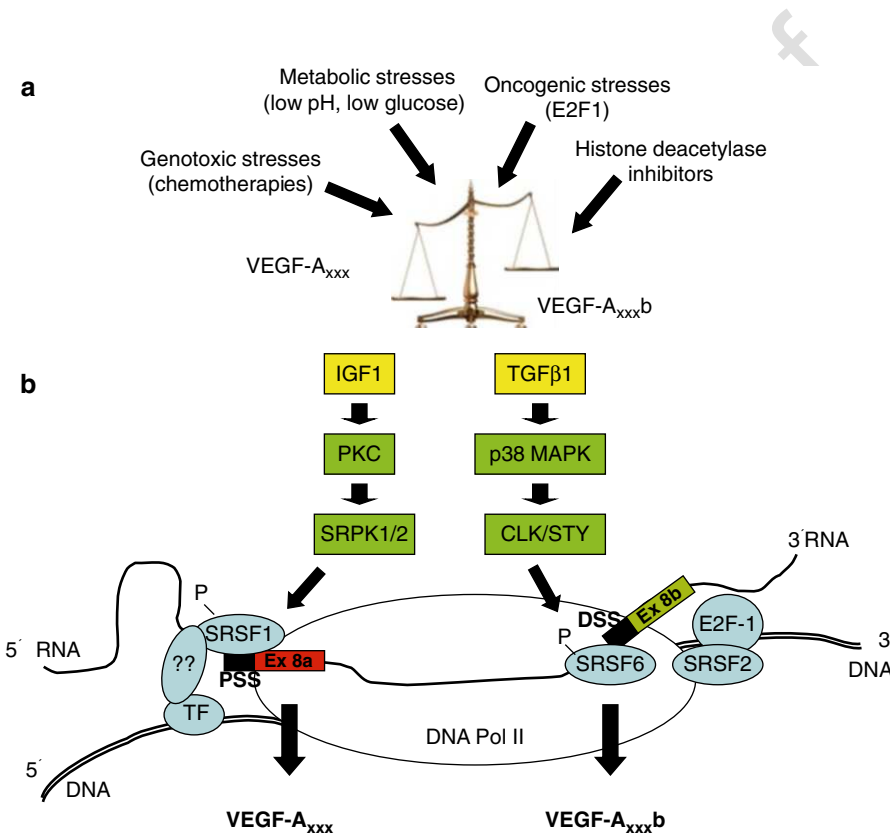


Fig. 21.3 (a) The upstream stimuli that have been shown to modify the balance between VEGF_{xxx} and VEGF_{xxx,b} isoforms. (b) The cellular signaling pathways that affect the choice between the proximal splice site (PSS) and distal splice site (DSS) in exon 8, thereby allowing the expression of either the VEGF_{xxx} or VEGF_{xxx,b} splice variant. The SRSF1 protein favors PSS selection, whereas the SRSF6 or SRSF2 protein favors DSS. The potential link between RNA and DNA machineries is illustrated. In this setting, transcription factors, such as E2F1, could cooperate with SR proteins to control pre-mRNA splicing. In addition, the elongation rate of DNA polymerase II could also affect pre-mRNA splicing. *TF* transcription factor

21.1.3.1 Molecular Determinants of *VEGF_{xxx}* Pre-mRNA Splicing 242

It was previously shown that the splicing factor SAM68 (Cohen et al. 2005), 243
the U2AF65-related protein CAPER (Dowhan et al. 2005), and a putative chloride 244
channel, pICn (Li et al. 2004), control *VEGF_{xxx}* pre-mRNA splicing. Progesterone 245
selectively was reported to increase the expression of the *VEGF₁₈₉* isoform in 246
the human uterus (Ancelin et al. 2002). Moreover, an exonic splicing silencing 247
(ESS) sequence was recently described in exon 6a, though the regulatory proteins 248
interacting with it remain unknown (Wang et al. 2009). In endometrial cancer cells, 249
low pH (acidosis) significantly upregulated the *VEGF₁₂₁* mRNA level when com- 250
pared with the *VEGF₁₄₅*, *VEGF₁₆₅*, and *VEGF₁₈₉* isoforms through a mechanism 251
involving the p38 MAPK pathway and splicing factors of the SR proteins family, 252
namely, SRSF1 (formerly SF2/ASF), SRp20, and SRp40 (Elias and Dias 2008). 253
In addition, incubation with phorbol myristate acetate (PMA), an activator of 254
PKC activity, induced the expression of *VEGF₂₀₆* in human skin mast cells, which 255
normally express the *VEGF₁₂₁*, *VEGF₁₆₅*, and *VEGF₁₈₉* isoforms (Grutzkau 256
et al. 1998). As previously discussed, *VEGF₁₁₁* mRNA was specifically induced by 257
genotoxic stress in several tumor cell lines and human xenografts in nude mice upon 258
treatment with camptothecin (Mineur et al. 2007); however, the molecular mecha- 259
nisms involved remain unknown. 260

21.1.3.2 Molecular Pathways That Control the Balance Between 261
VEGF_{xxx} and *VEGF_{xxx}b* Splice Variants 262

Bates's group has mainly contributed to the identification of upstream regulators 263
of the *VEGF_{xxx}b* isoforms. In 2008, Nowak and colleagues first demonstrated in 264
primary epithelial cells that insulin growth factor (IGF1) and tumor necrosis factor 265
alpha (TNF- α) treatment favor the selection of the PSS, thereby increasing *VEGF_{xxx}* 266
production, whereas tumor growth factor beta 1 (TGF- β 1) favors DSS selection, 267
increasing *VEGF_{xxx}b* (Nowak et al. 2008) (Fig. 21.3). Using epithelial cells overex- 268
pressing various SR proteins, these authors further demonstrated that SRSF1 favors 269
PSS selection by binding a 35-nucleotide sequence of exon 8a upstream of PSS, 270
whereas SRSF6 (formerly SRp55) favors DSS by binding to a 35-nucleotide region 271
of the 3'UTR immediately downstream of the stop codon in exon 8b. TGF- β 1 action 272
requires the activity of p38 MAPK and CLK/STY kinases, whereas IGF1 involves 273
both PKC and SRPK1/2, the latter being the specific kinases of SR proteins (Nowak 274
et al. 2010). Consistent with a crucial role of SR proteins in controlling the balance 275
between *VEGF_{xxx}* and *VEGF_{xxx}b* isoforms both under normal and pathological con- 276
ditions, elevated *VEGF₁₆₅b* expression was correlated with the increased expression 277
of TGF- β 1 and SRSF6 in keratinocytes, fibroblasts, endothelial cells, and perivas- 278
cular inflammatory cells of patients suffering from systemic sclerosis (Manetti et al. 279
2011). In addition, we provided the first evidence that the transcription factor E2F1 280
favors *VEGF₁₆₅b* expression via a mechanism involving SRSF2 (formerly SC35), 281

another SR protein, in lung adenocarcinoma cell lines and xenografts in nude mice (Merdzhanova et al. 2010). Later, Bates and colleagues showed that mutations in WT1, the Wilms' tumor suppressor gene, suppress VEGF_{165b} expression and cause abnormal gonadogenesis, renal failure, and Wilms' tumors (Amin et al. 2011). In WT1 mutants, SRPK1 was upregulated through the derepression of its transcription, leading to the phosphorylation and nuclear accumulation of SRSF1, thereby favoring VEGF_{xxx} isoforms. Interestingly, sodium butyrate (NaBu), a histone deacetylase inhibitor, increased VEGF_{121b}, VEGF_{165b}, and VEGF_{189b} mRNA and protein levels in immortalized human lung microvascular endothelial cells (HLMCEs) (Ciura and Jagodzinski 2010). As we demonstrated that the treatment of human lung adenocarcinoma cell lines with NaBu or cisplatin increased the expression level of SRSF2 (Edmond et al. 2011a, b), it is tempting to speculate that therapies could modify VEGF-A pre-mRNA splicing through the modulation of SR protein expression (see Sect. 21.2.2). In addition, as pre-mRNA splicing is known to occur co-transcriptionally, one might postulate that SR proteins could cooperate with the transcription factors that control VEGF-A transcription to modulate VEGF-A pre-mRNA splicing, as what we found for E2F1 and SRSF2. Whether HIF1 plays a role in this scenario remains a very intriguing question.

21.2 Does VEGF-A Pre-mRNA Splicing Play a Role in the Response to Anti-angiogenic Therapies?

21.2.1 Anti-angiogenic Therapy Failure: Patient Selection Is Critical

One of the main problems with the use of anti-angiogenic therapies is the absence of effective predictive biomarkers. In a meta-analysis of published randomized controlled trials (RCTs), Ranpura and colleagues showed that the addition of bevacizumab is associated with an increased risk of fatal adverse events (FAEs) in patients receiving taxanes or platinum salts compared with chemotherapy alone (Ranpura et al. 2011) and was not restricted to an anti-VEGF antibody. Indeed, another meta-analysis derived from 10 randomized RCTs including 4,679 patients receiving either sorafenib, sunitinib, or pazopanib also found an increased risk of FAEs following the use of these VEGFR TKIs compared with control patients (Schutz et al. 2012). Therefore, biomarkers are urgently needed to select patients that will benefit from such therapies. In addition, a better understanding of the molecular mechanisms involved in primary or acquired tumor resistance to these therapies is crucial in the development of new therapeutic strategies.

21.2.2 Anti-angiogenic Therapies Used Alone or in Combination Regulate VEGF-A Pre-mRNA Splicing 319 320

Several clinical studies have shown acute increases or decreases in circulating total VEGF-A levels after bevacizumab delivery (Lambrechts et al. 2013). By contrast, the impact of anti-angiogenic therapies on VEGF-A pre-mRNA splicing has not yet been investigated. We recently addressed this question and provided the first evidence that treating human lung adenocarcinoma cell lines with bevacizumab alters the VEGF₁₆₅b/pan-VEGF ratio in favor of VEGF₁₆₅b (Boudria et al. in preparation). Similar results were obtained when SU5416, a VEGFR TKI, was used. Consistent with our data, intravitreal bevacizumab injection in an oxygen-induced retinopathy mouse model also increased the relative protein expression of the VEGF₁₆₅b isoform while inhibiting the protein level of total VEGF-A isoforms (Shi et al. 2013). Although these results must be extended to other tumor types and/or other VEGFR TKIs, such as sorafenib or sunitinib, they demonstrate the impact of anti-angiogenic therapies on VEGF-A pre-mRNA splicing.

Bevacizumab is never used alone and is always combined with conventional chemotherapies for the treatment of breast, lung, colon, and kidney carcinomas. However, as it has been shown that chemotherapies increase VEGF-A mRNA expression in cancer cells (Fan et al. 2008), it is possible that chemotherapies either used alone or in combination with anti-angiogenic therapies also impact VEGF-A pre-mRNA splicing. In NSCLCs, bevacizumab is combined with platinum salts (cisplatin or carboplatin) and with paclitaxel or gemcitabine. Interestingly, we found that treating NSCLC cell lines with these drugs significantly increased the VEGF₁₆₅b protein level, though it decreased the expression of total VEGF-A (Boudria et al. in preparation). More interestingly, when bevacizumab was added to these chemotherapies, a stronger accumulation of VEGF₁₆₅b protein was observed in these cells, and VEGF₁₆₅b prevented cisplatin-induced apoptosis. Therefore, the combination of bevacizumab and cisplatin could select tumor cells that are more resistant to apoptosis through the upregulation of VEGF₁₆₅b. Of note, cells overexpressing VEGF₁₆₅b were also less sensitive to hypoxia-induced apoptosis, thereby suggesting that VEGF₁₆₅b could be a general inhibitor of apoptosis. Our results are consistent with recent data demonstrating that VEGF₁₆₅b exerts a neuroprotective function in hippocampal, cortical, and retinal neurons by activating VEGFR2 and p42/44 MAPK and preventing apoptosis (Beazley-Long et al. 2013).

Therefore, such anti-angiogenic therapies as bevacizumab, alone or in combination with chemotherapies, appear able to control VEGF-A pre-mRNA splicing and to favor the expression of VEGF_{xxx}b isoforms, at least in NSCLC cell lines. Such an effect might play a role in tumor adaptative resistance (see Sects. 21.2.3 and 21.2.4). Whether SR proteins are involved in this alternative switch remains largely unknown, but we observed that cisplatin, bevacizumab, and SU5416 increased SRSF2 and SRSF6 protein levels in our cellular models, a result that was consistent with VEGF_{xxx}b accumulation.

In addition, whether chemotherapies and/or anti-angiogenic therapies control the expression level of distinct VEGF_{xxx}/VEGF_{xxx}b splice variants from each VEGF-A subfamily remains to be determined.

21.2.3 VEGF-A Splice Variants: Can They Predict Responses to Anti-angiogenic Treatments?

21.2.3.1 The VEGF_{xxx}b/Pan-VEGF Ratio: A Predictive Biomarker of Responses to Bevacizumab

The discovery of the VEGF_{xxx}b subfamily has complicated the simple view that targeting VEGF-A could be beneficial to patients. Hence, VEGF-A was found to encode both “bad” (pro)- and “good” (anti)-angiogenic isoforms, which are both targeted by bevacizumab with the same affinity, leading to the question of whether VEGF-A pre-mRNA splicing is the key to anti-angiogenic therapeutics (Harper and Bates 2008). The first evidence demonstrating that VEGF₁₆₅b expression has an impact on the efficacy of bevacizumab came from the study of Varey and colleagues (Varey et al. 2008), who showed that xenografts in mice derived from human VEGF₁₆₅b-overexpressing colon cancer cells grow more slowly than those bearing VEGF₁₆₅-overexpressing cancer cells. Consistent with an impairment of tumor angiogenesis, the VEGF₁₆₅b-overexpressing xenografts were less vascularized and displayed greater areas of necrosis. More importantly, the authors further demonstrated that the dose of bevacizumab required to prevent tumor growth in VEGF₁₆₅-overexpressing tumors had no effect on the VEGF₁₆₅b-expressing tumors. This in vitro model predicting that bevacizumab would be less efficient in colorectal cancer patients who exhibited an excess of VEGF_{xxx}b over VEGF_{xxx} compared with those with an excess of VEGF_{xxx} was recently validated in situ. In 149 metastatic colorectal cancer patients from the E3200 clinical trial of FOLFOX4±bevacizumab, the unadjusted analysis of the progression-free survival (PFS) showed a significantly better outcome for patients with intra-tumoral VEGF₁₆₅b/VEGF_{total} ratio scores below the median treated with FOLFOX4+BVZ compared with FOLFOX4 alone (Bates et al. 2012). Although these data need to be extended to a larger series of patients and to other tumor types, they suggest that a low VEGF₁₆₅b/VEGF_{total} ratio might be a predictive marker for response to bevacizumab, at least in metastatic colorectal cancer. In addition, studies investigating the predictive potential of VEGF_{xxx}b in response to other anti-angiogenic therapies used clinically, such as VEGFR TKIs, are lacking. As the VEGF_{xxx}b isoforms antagonize VEGFR1/VEGFR2 angiogenic signaling, one might predict that patients with significant levels of VEGF_{xxx}b would be less sensitive to VEGFR TKIs.

Importantly, a lack of correlation between intra-tumoral and plasma VEGF-A protein levels was recently demonstrated (Hegde et al. 2013); however, it is not known to date whether this is also true for VEGF_{xxx}b isoforms. Therefore, both the circulating

and tumoral VEGF_{total} and VEGF_{xxx}b levels should be taken into account when seeking
a correlation between VEGF-A status and tumor response to anti-angiogenic treat-
ments in situ.

**21.2.3.2 Plasma Level of Short VEGF-A Isoforms but Not of Total
VEGF-A Predicts Outcome After Anti-angiogenic Therapies**

In NSCLC and colorectal and renal cell carcinomas, an association between a high
circulating VEGF-A level and a shortened progression-free or overall survival was
recently described, regardless of bevacizumab treatment (Hegde et al. 2013).
Therefore, the plasma levels of total VEGF-A can serve as a prognostic rather than
a predictive marker. However, when an ELISA assay that preferentially detects
short VEGF-A isoforms (VEGF₁₂₁ and VEGF₁₁₁) was used, an association between
high basal plasma levels of VEGF₁₂₁ and improved PFS and/or overall survival (OS)
after bevacizumab treatment was found in breast, pancreatic, and gastric carcinomas
but not in metastatic colorectal, renal, and lung cancers (Lambrechts et al. 2013).
Therefore, VEGF₁₂₁ appears to be a promising candidate biomarker for bevaciz-
umab response, at least in certain cancers. As previously discussed, the discrepancy
between tumors might reflect a distinct role of the VEGF_{xxx} isoforms depending
on the tumor type and/or chemotherapies combined with anti-angiogenic treatments.
In addition, the use of citrated plasma, which has minimal effect on platelet activa-
tion, rather than EDTA-treated plasma could also affect the results.

**21.2.4 VEGF-A Splice Variants as Predictive Biomarkers
for Anti-angiogenic Therapies: How Does It Work?**

21.2.4.1 Paracrine Effects on Endothelial Cells

Several hypotheses have been proffered regarding VEGF₁₆₅b potential as a predic-
tive biomarker for bevacizumab response. First, it has been proposed that the con-
centration of effective bevacizumab could be lowered in patients with higher
VEGF₁₆₅b concentrations, as more of the antibody is bound to VEGF₁₆₅b and not to
VEGF₁₆₅, thereby diminishing the anti-angiogenic activity of VEGF₁₆₅b while
increasing the amount of free pro-angiogenic VEGF₁₆₅. Conversely, patients with
lower VEGF₁₆₅b levels may have a more angiogenic-progressive tumor than the
high VEGF₁₆₅b group, thereby rendering the tumor more susceptible to bevaciz-
umab+
[AU5] FOLFOX (Bates et al. 2012). This more angiogenic profile could also
explain why patients with higher levels of soluble VEGF₁₂₁ are more susceptible to
bevacizumab, as this diffusible short isoform may more accurately reflect the levels
of bioactive VEGF-A and the vascular dependence of the tumor. This hypothesis is
also consistent with another study identifying a VEGF-dependent gene signature

specifically expressed in the tumor vascular compartment in which high expression correlated with enhanced VEGF-A downstream bioactivity and with an increased response to bevacizumab in colorectal cancers (Brauer et al. 2013). Alternatively, as bevacizumab does not prevent interaction between VEGF-A and NRP1 or NRP2, blocking the VEGF-A/VEGFR signaling pathways could induce compensatory mechanisms leading to the activation of VEGF-/NRP-dependent networks. Consistently, it has been shown that anti-NRP1 antibodies have an additive effect on anti-VEGF therapy in reducing tumor growth through vessel normalization (Pan et al. 2007b). As the VEGF_{xxx} and VEGF_{xxx}b isoforms do not display the same affinity for NRP, such a compensatory response to anti-angiogenic therapies could thereby be dependent on the balance between both VEGF-A subfamilies.

21.2.4.2 Autocrine Effects on Tumor Cells

Compared with the large number of publications related to VEGF-A endothelial functions, only a few studies have analyzed its autocrine effects on tumor cells that express VEGFR and/or NRP. Moreover, almost nothing is known regarding the functions of distinct VEGF-A splice variants in this setting. This situation is somewhat surprising because anti-angiogenic therapies, first designed to target endothelial cells, might directly impact the tumors themselves via the regulation of this autocrine loop. Alternatively, VEGF-A-regulated autocrine loops could contribute to primary or acquired resistance to these therapies.

VEGF-A: Not Only a Pro-tumoral Factor in Tumor Cells?

It is currently acknowledged that VEGF-A exerts pro-proliferative/survival functions on tumor cells (Lichtenberger et al. 2010). As an example, the VEGF-A/VEGFR2/NRP1 autocrine loop was found to promote glioma stemlike cell viability and tumor growth and to limit the impact of bevacizumab treatment (Hamerlik et al. 2012). However, recent studies have highlighted unexpected VEGF-A antitumoral functions, increasing the complexity of the approach that blocking VEGF-A would always be beneficial. Indeed, VEGF₁₈₉ was found to induce NRP1-dependent apoptosis in breast cancer cell lines, whereas VEGF₁₆₅ acted as a survival factor (Vintonenko et al. 2011). In addition, the combination of high VEGF-A, VEGFR1, and VEGFR2 protein expression was associated with an improved progression-free survival in early squamous cell carcinoma of the lung in those who are not eligible for bevacizumab treatment owing to severe complications (Pajares et al. 2012). It is noteworthy that this effect was independent of endothelial cells, as no correlation was found between VEGF or its receptors and microvessel density. More strikingly, VEGF₁₆₅ was highlighted as a negative regulator of tumor cell invasion in glioblastoma through the inhibition of c-Met activity (Lu et al. 2012). In resistant glioblastoma patients, bevacizumab increased MET activation and contributed to the emergence of cells with a more invasive phenotype, which

correlated with the expression of mesenchymal markers (Lu et al. 2012; Jahangiri et al. 2013). Taken together, these data highlight the distinct autocrine functions of VEGF_{xxx} splice variants in tumors and their potential as determinants of tumor responses to anti-angiogenic therapies.

VEGF_{165b}: A Pro-invasive Factor in NSCLCs

In human lung adenocarcinoma cell lines and mouse xenografts, we found that bevacizumab treatment triggered a more invasive phenotype that correlated with the activation of both the VEGFR1 and VEGFR2 signaling pathways and with the acquisition of some mesenchymal markers and the secretion of metalloproteases (Boudria et al. in preparation). Importantly, because the specific neutralization of VEGF_{165b} by siRNA was found to reverse the effects mediated by bevacizumab and to inhibit tumor growth, all these effects were dependent on VEGF_{165b}, but not VEGF₁₆₅, expression. Conversely and consistent with VEGF_{165b} controlling a pro-tumoral autocrine loop in NSCLCs, xenografts derived from VEGF_{165b}-overexpressing cells, despite being less angiogenic, grew more rapidly than control tumors and displayed markers of EMT. Altogether, our data support a model in which bevacizumab induces a more invasive phenotype through the activation of a VEGF_{165b}-dependent autocrine loop (Boudria et al. in preparation). Our results are somewhat consistent with the results of Catena and colleagues who showed that the stable overexpression of either VEGF_{121b} or VEGF_{165b} protein in A549 human lung adenocarcinoma cells resulted in a significant increase in tumor development over the controls, even though no significant differences in vascular density were found. Additionally, in prostate PC-3 xenografted tumors, a reduction, as opposed to an increase, in the number of apoptotic cells was observed when VEGF_{xxx}b-overexpressing cells were injected, as compared with controls (Catena et al. 2010). Although we were not able to examine the correlation between VEGF_{165b} status and response to bevacizumab in situ in NSCLC patients, our findings correlate well with our observations associating high VEGF_{165b} protein levels with lymph node metastases in NSCLC. The data also suggested that NSCLC patients with high VEGF_{165b} levels could be less sensitive to bevacizumab, whereas bevacizumab could contribute to the emergence of more invasive tumor cells in patients displaying lower VEGF_{165b} levels. Therefore, the balance between VEGF_{xxx} and VEGF_{xxx}b isoforms also controls the autocrine loops potentially involved in tumor responses to anti-angiogenic therapies.

Taken together, all these studies provide evidence that both VEGF-A-dependent paracrine and autocrine loops must be taken into account when investigating the overall response to anti-angiogenic therapies. In addition, until more details are known regarding the role and expression of distinct VEGF-A splice variants, it should be considered that the impact of anti-angiogenic therapies could be drastically different, even deleterious, depending on the tumor type and/or which VEGF-A splice variant is expressed.

21.2.5 *Pre-mRNA Splicing: A Reservoir of Biomarkers for Anti-angiogenic Treatments*

In addition to VEGF-A, many proteins involved in the angiogenic cascade are alternatively spliced isoforms. As an example, the pre-mRNA alternative splicing of VEGFR1, VEGFR2, or NRP1 generates soluble splice receptors that can, or are predicted to, act as natural inhibitors. Consistent with a role of these splice variants in responses to anti-angiogenic treatments, posttreatment changes in plasma sVEGFR2 were significantly correlated with tumor shrinkage in NSCLC patients treated with pazopanib (Nikolinakos et al. 2010). In addition, sVEGFR1 plasma levels were inversely correlated with the outcome of patients treated with either bevacizumab or anti-VEGFR TKIs in rectal, metastatic colorectal, and breast cancers and hepatocellular carcinoma (Lambrechts et al. 2013). Conversely, low intra-tumoral VEGFR1 expression was found to correlate with improved progression-free or overall survival after bevacizumab delivery in colorectal and gastric carcinomas, respectively. Therefore, it appears that a switch in *VEGFR1* pre-mRNA splicing occurs in tumors and could play a role in the response to anti-angiogenic therapies. Such an effect could be related to a recent study demonstrating that VEGF-A itself induces the expression of sVEGFR1 while leaving expression of the full-length VEGFR1 unchanged in human vascular endothelial cells via a mechanism involving the VEGFR2 protein kinase cMEK signaling pathway (Saito et al. 2013). Although further analyses dissecting the role played by these splice variants during the response to anti-angiogenic therapies are needed, it is likely that pre-mRNA splicing will highlight new potential biomarkers in the future (Fig. 21.4).

21.2.6 *Combining Anti-angiogenic Therapies with Drugs Targeting the Pre-mRNA Splicing Machinery: New Therapeutic Strategies in the Future*

Based on the above data, one might propose that novel therapeutic strategies combining both anti-angiogenic therapies with drugs targeting the pre-mRNA splicing machinery should be developed (Fig 21.4). SRPK inhibitors are among these new drug candidates, as their use is thought to reduce the synthesis of pro-angiogenic isoforms of VEGF-A, consequently decreasing angiogenesis. Consistent with such a hypothesis, selective SRPK inhibitors reduce choroidal neovascularization in vivo when administered topically (eye drop) in rats and mice with exudative age-related macular degeneration (wet AMD) (Gammons et al. 2013). In addition, the injection of SRPIN340, an SRPK1/2 inhibitor, reduced angiogenesis in a mouse model of retinal neovascularization (Nowak et al. 2010). SRPKs could also be a good target in cancer as they are overexpressed in many tumor types compared with normal tissues, including NSCLC (Gout et al. 2012). Indeed, SRPK1 inhibition prevented

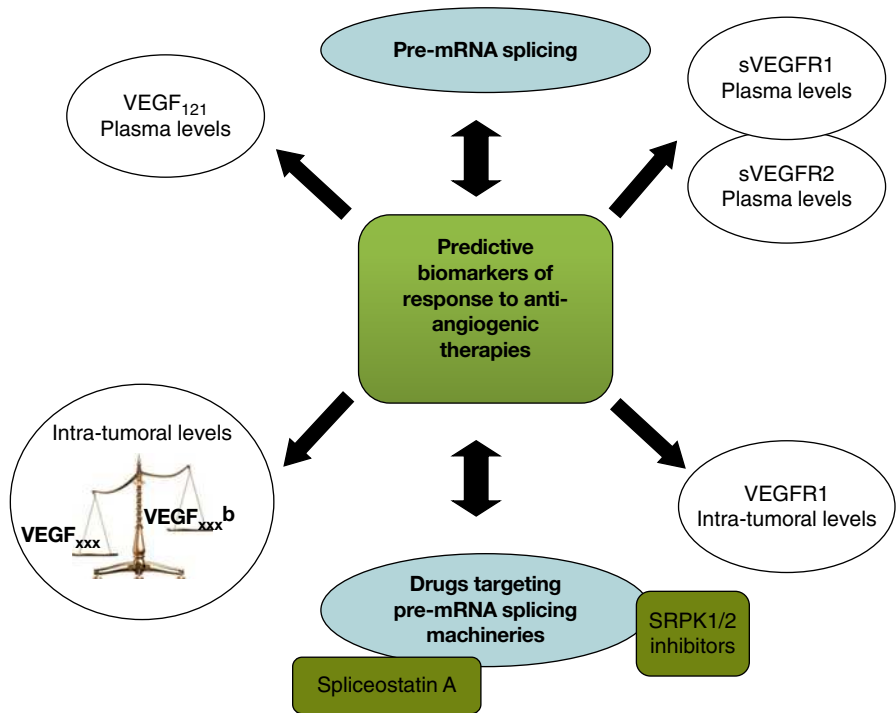


Fig. 21.4 Relationships between pre-mRNA splicing and the response to anti-angiogenic therapies. Pre-mRNA splicing is proposed as a reservoir for predictive biomarkers. New therapeutic strategies combining both anti-angiogenic therapies and drugs targeting the pre-mRNA splicing machineries are illustrated as such a combination that could modulate the expression level of these pre-mRNA splice variants and thereby improve patient outcomes

angiogenesis and associated tumor growth in Wilms' tumors (Amin et al. 2011). Although decreasing the expression of pro-angiogenic VEGF_{xxx} isoforms while increasing that of anti-angiogenic VEGF_{xxx}^b might not always be beneficial (see Sect. 21.2.4), SRPK inhibitors could cooperate with anti-angiogenic therapies to prevent neovascularization and tumor growth in certain tumor types. More generally, pharmacological inhibitors of other components of the spliceosome are currently tested in cancer, one of which, spliceostatin A, was found to block angiogenesis by reducing the total amount of VEGF transcript (Furumai et al. 2010). Therefore, additional experiments are needed to select the most appropriate drug and combination. In addition, further experiments are needed to improve our fundamental knowledge regarding the contribution of pre-mRNA splicing to angiogenesis and response to anti-angiogenic therapies. To this end, the development of new tools/assays that recognize specific VEGF-A splice variants is crucial to clarify what, if any, role distinct VEGF-A splice isoforms have during the tumorigenic process and the response to anti-angiogenic therapies.

References

- Amin EM, Oltean S, Hua J et al (2011) WT1 mutants reveal SRPK1 to be a downstream angiogenesis target by altering VEGF splicing. *Cancer Cell* 20:768–780
- Ancelin M, Buteau-Lozano H, Meduri G et al (2002) A dynamic shift of VEGF isoforms with a transient and selective progesterone-induced expression of VEGF189 regulates angiogenesis and vascular permeability in human uterus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:6023–6028
- Ballmer-Hofer K, Andersson AE, Ratcliffe LE et al (2011) Neuropilin-1 promotes VEGFR-2 trafficking through Rab11 vesicles thereby specifying signal output. *Blood* 118:816–826
- Bates DO, Catalano PJ, Symonds KE et al (2012) Association between VEGF splice isoforms and progression-free survival in metastatic colorectal cancer patients treated with bevacizumab. *Clin Cancer Res* 18:6384–6391
- Bates DO, Cui TG, Doughty JM et al (2002) VEGF165b, an inhibitory splice variant of vascular endothelial growth factor, is down-regulated in renal cell carcinoma. *Cancer Res* 62:4123–4131
- Bates DO, MacMillan PP, Manjaly JG et al (2006) The endogenous anti-angiogenic family of splice variants of VEGF, VEGFxxx_b, are down-regulated in pre-eclamptic placentae at term. *Clin Sci (Lond)* 110:575–585
- Beazley-Long N, Hua J, Jehle T et al (2013) VEGF-A165b is an endogenous neuroprotective splice isoform of vascular endothelial growth factor A in vivo and in vitro. *Am J Pathol* 183:918–929
- Brauer MJ, Zhuang G, Schmidt M et al (2013) Identification and analysis of in vivo VEGF downstream markers link VEGF pathway activity with efficacy of anti-VEGF therapies. *Clin Cancer Res* 19:3681–3692
- Catena R, Larzabal L, Larrayoz M et al (2010) VEGF(1)(2)(1)b and VEGF(1)(6)(5)b are weakly angiogenic isoforms of VEGF-A. *Mol Cancer* 9:320–327
- Catena R, Muniz-Medina V, Moralejo B et al (2007) Increased expression of VEGF121/VEGF165–189 ratio results in a significant enhancement of human prostate tumor angiogenesis. *Int J Cancer* 120:2096–2109
- Cebe Suarez S, Pieren M, Cariolato L et al (2006) A VEGF-A splice variant defective for heparan sulfate and neuropilin-1 binding shows attenuated signaling through VEGFR-2. *Cell Mol Life Sci* 63:2067–2077
- Chen TT, Luque A, Lee S et al (2010) Anchorage of VEGF to the extracellular matrix conveys differential signaling responses to endothelial cells. *J Cell Biol* 188:595–609
- Cheung CY, Singh M, Ebaugh MJ et al (1995) Vascular endothelial growth factor gene expression in ovine placenta and fetal membranes. *Am J Obstet Gynecol* 173:753–759
- Ciura J, Jagodzinski PP (2010) Butyrate increases the formation of anti-angiogenic vascular endothelial growth factor variants in human lung microvascular endothelial cells. *Mol Biol Rep* 37:3729–3734
- Cohen CD, Doran PP, Blattner SM et al (2005) Sam68-like mammalian protein 2, identified by digital differential display as expressed by podocytes, is induced in proteinuria and involved in splice site selection of vascular endothelial growth factor. *J Am Soc Nephrol* 16:1958–1965
- Cui TG, Foster RR, Saleem M et al (2004) Differentiated human podocytes endogenously express an inhibitory isoform of vascular endothelial growth factor (VEGF165b) mRNA and protein. *Am J Physiol Renal Physiol* 286:767–773
- David CJ, Manley JL (2010) Alternative pre-mRNA splicing regulation in cancer: pathways and programs unhinged. *Genes Dev* 24:2343–2364
- Delcombel R, Janssen L, Vassy R et al (2013) New prospects in the roles of the C-terminal domains of VEGF-A and their cooperation for ligand binding, cellular signaling and vessels formation. *Angiogenesis* 16:353–371
- Diaz R, Pena C, Silva J et al (2008) p73 Isoforms affect VEGF, VEGF165b and PEDF expression in human colorectal tumors: VEGF165b downregulation as a marker of poor prognosis. *Int J Cancer* 123:1060–1067

- Dowhan DH, Hong EP, Auboeuf D et al (2005) Steroid hormone receptor coactivation and alternative RNA splicing by U2AF65-related proteins CAPERalpha and CAPERbeta. *Mol Cell* 17: 429–439
- Edmond V, Brambilla C, Brambilla E et al (2011a) SRSF2 is required for sodium butyrate-mediated p21(WAF1) induction and premature senescence in human lung carcinoma cell lines. *Cell Cycle* 10:1968–1977
- Edmond V, Moysan E, Khochbin S et al (2011b) Acetylation and phosphorylation of SRSF2 control cell fate decision in response to cisplatin. *EMBO J* 30:510–523
- Elias AP, Dias S (2008) Microenvironment changes (in pH) affect VEGF alternative splicing. *Cancer Microenviron* 1:131–139
- Fan F, Gray MJ, Dallas NA et al (2008) Effect of chemotherapeutic stress on induction of vascular endothelial growth factor family members and receptors in human colorectal cancer cells. *Mol Cancer Ther* 7:3064–3070
- Faure C, Linossier MT, Malaval L et al (2008) Mechanical signals modulated vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) alternative splicing in osteoblastic cells through actin polymerisation. *Bone* 42:1092–1101
- Ferrara N (2004) Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev* 25:581–611
- Furumai R, Uchida K, Komi Y et al (2010) Spliceostatin A blocks angiogenesis by inhibiting global gene expression including VEGF. *Cancer Sci* 101:2483–2489
- Gammons MV, Federov O, Ivison D et al (2013) Topical anti-angiogenic SRPK1 inhibitors reduce choroidal neovascularization in rodent models of exudative-AMD. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 54:6052–6062
- Gout S, Brambilla E, Boudria A et al (2012) Abnormal expression of the pre-mRNA splicing regulators SRSF1, SRSF2, SRPK1 and SRPK2 in non small cell lung carcinoma. *PLoS One* 7:e46539
- Grepin R, Guyot M, Jacquin M et al (2012) Acceleration of clear cell renal cell carcinoma growth in mice following bevacizumab/Avastin treatment: the role of CXCL cytokines. *Oncogene* 31:1683–1694
- Grunstein J, Masbad JJ, Hickey R et al (2000) Isoforms of vascular endothelial growth factor act in a coordinate fashion To recruit and expand tumor vasculature. *Mol Cell Biol* 20:7282–7291
- Grutzkau A, Kruger-Krasagakes S, Baumeister H et al (1998) Synthesis, storage, and release of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor (VEGF/VPF) by human mast cells: implications for the biological significance of VEGF206. *Mol Biol Cell* 9:875–884
- Hamerlik P, Lathia JD, Rasmussen R et al (2012) Autocrine VEGF-VEGFR2-Neuropilin-1 signaling promotes glioma stem-like cell viability and tumor growth. *J Exp Med* 209:507–520
- Harper SJ, Bates DO (2008) VEGF-A splicing: the key to anti-angiogenic therapeutics? *Nat Rev Cancer* 8:880–887
- Hegde PS, Jubb AM, Chen D et al (2013) Predictive impact of circulating vascular endothelial growth factor in four phase III trials evaluating bevacizumab. *Clin Cancer Res* 19:929–937
- Houck KA, Ferrara N, Winer J et al (1991) The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol Endocrinol* 5:1806–1814
- Houck KA, Leung DW, Rowland AM et al (1992) Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *J Biol Chem* 267:26031–26037
- Jahangiri A, De Lay M, Miller LM et al (2013) Gene expression profile identifies tyrosine kinase c-Met as a targetable mediator of antiangiogenic therapy resistance. *Clin Cancer Res* 19: 773–1783
- Jingjing L, Xue Y, Agarwal N et al (1999) Human Muller cells express VEGF183, a novel spliced variant of vascular endothelial growth factor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40:752–759
- Kawai H, Minamiya Y, Ito M et al (2008) VEGF121 promotes lymphangiogenesis in the sentinel lymph nodes of non-small cell lung carcinoma patients. *Lung Cancer* 59:41–47
- Kawamura H, Li X, Harper SJ et al (2008) Vascular endothelial growth factor (VEGF)-A165b is a weak in vitro agonist for VEGF receptor-2 due to lack of coreceptor binding and deficient regulation of kinase activity. *Cancer Res* 68:4683–4692

- Keyt BA, Berleau LT, Nguyen HV et al (1996) The carboxyl-terminal domain (111-165) of vascular endothelial growth factor is critical for its mitogenic potency. *J Biol Chem* 271:7788–7795
- Ladomery MR, Harper SJ, Bates DO (2007) Alternative splicing in angiogenesis: the vascular endothelial growth factor paradigm. *Cancer Lett* 249:133–142
- Lambrechts D, Lenz HJ, de Haas S et al (2013) Markers of response for the antiangiogenic agent bevacizumab. *J Clin Oncol* 31:1219–1230
- Li H, Yonekura H, Kim CH et al (2004) Possible participation of pICln in the regulation of angiogenesis through alternative splicing of vascular endothelial growth factor receptor mRNAs. *Endothelium* 11:293–300
- Li N, Kanda K, Fukumori T et al (2000) Expression of vascular endothelial growth factor isoforms and platelet-derived endothelial cell growth factor in bladder cancer. *Urol Oncol* 6:10–15
- Lichtenberger BM, Tan PK, Niederleithner H et al (2010) Autocrine VEGF signaling synergizes with EGFR in tumor cells to promote epithelial cancer development. *Cell* 140:268–279
- Ljungberg B, Jacobsen J, Haggstrom-Rudolfsson S et al (2003) Tumour vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA in relation to serum VEGF protein levels and tumour progression in human renal cell carcinoma. *Urol Res* 31:335–340
- Lu KV, Chang JP, Parachoniak CA et al (2012) VEGF inhibits tumor cell invasion and mesenchymal transition through a MET/VEGFR2 complex. *Cancer Cell* 22:21–35
- Manetti M, Guiducci S, Romano E et al (2011) Overexpression of VEGF165b, an inhibitory splice variant of vascular endothelial growth factor, leads to insufficient angiogenesis in patients with systemic sclerosis. *Circ Res* 109:e14–e26
- Matsuyama M, Chijiwa T, Inoue Y et al (2009) Alternative splicing variant of vascular endothelial growth factor-A is a critical prognostic factor in non-small cell lung cancer. *Oncol Rep* 22:1407–1413
- Merdzhanova G, Gout S, Keramidas M et al (2010) The transcription factor E2F1 and the SR protein SC35 control the ratio of pro-angiogenic versus antiangiogenic isoforms of vascular endothelial growth factor-A to inhibit neovascularization in vivo. *Oncogene* 29:5392–5403
- Miller-Kasprzak E, Jagodzinski PP (2008) 5-Aza-2'-deoxycytidine increases the expression of anti-angiogenic vascular endothelial growth factor 189b variant in human lung microvascular endothelial cells. *Biomed Pharmacother* 62:158–163
- Mineur P, Colige AC, Deroanne CF et al (2007) Newly identified biologically active and proteolysis-resistant VEGF-A isoform VEGF111 is induced by genotoxic agents. *J Cell Biol* 179:1261–1273
- Mourah S, Porcher R, Lescaille G et al (2009) Quantification of VEGF isoforms and VEGFR transcripts by qRT-PCR and their significance in acute myeloid leukemia. *Int J Biol Markers* 24:22–31
- Muller YA, Li B, Christinger HW et al (1997) Vascular endothelial growth factor: crystal structure and functional mapping of the kinase domain receptor binding site. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:7192–7197
- Nikolinakos PG, Altorki N, Yankelevitz D et al (2010) Plasma cytokine and angiogenic factor profiling identifies markers associated with tumor shrinkage in early-stage non-small cell lung cancer patients treated with pazopanib. *Cancer Res* 70:2171–2179
- Nowak DG, Amin EM, Rennel ES et al (2010) Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) splicing from pro-angiogenic to anti-angiogenic isoforms: a novel therapeutic strategy for angiogenesis. *J Biol Chem* 285:5532–5540
- Nowak DG, Woolard J, Amin EM et al (2008) Expression of pro- and anti-angiogenic isoforms of VEGF is differentially regulated by splicing and growth factors. *J Cell Sci* 121:3487–3495
- Ohta Y, Endo Y, Tanaka M et al (1996) Significance of vascular endothelial growth factor messenger RNA expression in primary lung cancer. *Clin Cancer Res* 2:1411–1416
- Oshika Y, Nakamura M, Tokunaga T et al (1998) Expression of cell-associated isoform of vascular endothelial growth factor 189 and its prognostic relevance in non-small cell lung cancer. *Int J Oncol* 12:541–544
- Pajares MJ, Agorreta J, Larrayoz M et al (2012) Expression of tumor-derived vascular endothelial growth factor and its receptors is associated with outcome in early squamous cell carcinoma of the lung. *J Clin Oncol* 30:1129–1136

- Pan Q, Chanthery Y, Liang WC et al (2007a) Blocking neuropilin-1 function has an additive effect with anti-VEGF to inhibit tumor growth. *Cancer Cell* 11:53–67
- Pan Q, Chathery Y, Wu Y et al (2007b) Neuropilin-1 binds to VEGF121 and regulates endothelial cell migration and sprouting. *J Biol Chem* 282:24049–24056
- Pan Q, Shai O, Lee LJ et al (2008) Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. *Nat Genet* 40:1413–1415
- Peiris-Pages M, Harper SJ, Bates DO et al (2010) Balance of pro- versus anti-angiogenic splice isoforms of vascular endothelial growth factor as a regulator of neuroblastoma growth. *J Pathol* 222:138–147
- Perrin RM, Konopatskaya O, Qiu Y et al (2005) Diabetic retinopathy is associated with a switch in splicing from anti- to pro-angiogenic isoforms of vascular endothelial growth factor. *Diabetologia* 48:2422–2427
- Plouet J, Moro F, Bertagnolli S et al (1997) Extracellular cleavage of the vascular endothelial growth factor 189-amino acid form by urokinase is required for its mitogenic effect. *J Biol Chem* 272:13390–13396
- Pritchard-Jones RO, Dunn DB, Qiu Y et al (2007) Expression of VEGF(xxx)b, the inhibitory isoforms of VEGF, in malignant melanoma. *Br J Cancer* 97:223–230
- Qiu Y, Hoareau-Aveilla C, Oltean S et al (2009) The anti-angiogenic isoforms of VEGF in health and disease. *Biochem Soc Trans* 37:1207–1213
- Ranpura V, Hapani S, Wu S (2011) Treatment-related mortality with bevacizumab in cancer patients: a meta-analysis. *JAMA* 305:487–494
- Rennel ES, Waine E, Guan H et al (2008) The endogenous anti-angiogenic VEGF isoform, VEGF165b inhibits human tumour growth in mice. *Br J Cancer* 98:1250–1257
- Rennel ES, Varey AH, Churchill AJ et al (2009) VEGF(121)b, a new member of the VEGF(xxx)b family of VEGF-A splice isoforms, inhibits neovascularisation and tumour growth in vivo. *Br J Cancer* 101:1183–1193
- Roskoski R Jr (2007) Vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in tumor progression. *Crit Rev Oncol Hematol* 62:179–213
- Saito T, Takeda N, Amiya E et al (2013) VEGF-A induces its negative regulator, soluble form of VEGFR-1, by modulating its alternative splicing. *FEBS Lett* 587:2179–2185
- Schutz FA, Je Y, Richards CJ et al (2012) Meta-analysis of randomized controlled trials for the incidence and risk of treatment-related mortality in patients with cancer treated with vascular endothelial growth factor tyrosine kinase inhibitors. *J Clin Oncol* 30:871–877
- Shi X, Zhao M, Xie WK et al (2013) Inhibition of neovascularization and expression shift of pro-/anti-angiogenic vascular endothelial growth factor isoforms after intravitreal bevacizumab injection in oxygen-induced-retinopathy mouse model. *Chin Med J (Engl)* 126:345–352
- Soker S, Miao HQ, Nomi M et al (2002) VEGF165 mediates formation of complexes containing VEGFR-2 and neuropilin-1 that enhance VEGF165-receptor binding. *J Cell Biochem* 85:357–368
- Tayama M, Furuhashi T, Inafuku Y et al (2011) Vascular endothelial growth factor 165b expression in stromal cells and colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 17:4867–4874
- Tozer GM, Akerman S, Cross NA et al (2008) Blood vessel maturation and response to vascular-disrupting therapy in single vascular endothelial growth factor-A isoform-producing tumors. *Cancer Res* 68:2301–2311
- Varey AH, Rennel ES, Qiu Y et al (2008) VEGF 165 b, an antiangiogenic VEGF-A isoform, binds and inhibits bevacizumab treatment in experimental colorectal carcinoma: balance of pro- and antiangiogenic VEGF-A isoforms has implications for therapy. *Br J Cancer* 98:1366–1379
- Vincenti V, Cassano C, Rocchi M et al (1996) Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3. *Circulation* 93:1493–1495
- Vintonenko N, Pelaez-Garavito I, Buteau-Lozano H et al (2011) Overexpression of VEGF189 in breast cancer cells induces apoptosis via NRP1 under stress conditions. *Cell Adh Migr* 5:332–343
- Wang R, Crystal RG, Hackett NR et al (2009) Identification of an exonic splicing silencer in exon 6A of the human VEGF gene. *BMC Mol Biol* 10:103–109

- 784 Woolard J, Wang WY, Bevan HS et al (2004) VEGF165b, an inhibitory vascular endothelial
785 growth factor splice variant: mechanism of action, in vivo effect on angiogenesis and endoge-
786 nous protein expression. *Cancer Res* 64:7822–7835
- 787 Yuan A, Lin CY, Chou CH et al (2001) Functional and structural characteristics of tumor angio-
788 genesis in lung cancers overexpressing different VEGF isoforms assessed by DCE- and SSCE-
789 MRI. *PLoS One* 6:e16062
- 790 Zygalki E, Kaklamanis L, Nikolaou NI et al (2008) Expression profile of total VEGF, VEGF
791 splice variants and VEGF receptors in the myocardium and arterial vasculature of diabetic and
792 non-diabetic patients with coronary artery disease. *Clin Biochem* 41:82–87
- 793 Zygalki E, Tsaroucha EG, Kaklamanis L et al (2007) Quantitative real-time reverse transcription
794 PCR study of the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) splice variants and
795 VEGF receptors (VEGFR-1 and VEGFR-2) in non small cell lung cancer. *Clin Chem* 53:
796 1433–1439

Le sVEGFR1 : quel rôle dans la réponse aux thérapies antiangiogéniques dans les carcinomes pulmonaires squameux ?

Le VEGF-A joue un rôle clé au cours de l'angiogenèse physiologique mais aussi de la néo-vascularisation tumorale essentielle à la croissance des tumeurs malignes. Le VEGF-A et ses récepteurs (VEGFR1/2) représentent une cible de première importance pour le développement de thérapies anti-tumorales, et un certain nombre de médicaments anti-angiogéniques (AAG) inhibant le VEGF-A ou ses récepteurs sont actuellement utilisés en clinique dans le traitement des carcinomes pulmonaires. Parmi les thérapies anti-angiogéniques ciblant le VEGF-A, on peut lister : soit l'anticorps monoclonal anti-VEGF-A Bevacizumab (Avastin[®]) ou bien les inhibiteurs pharmacologiques de l'activité tyrosine kinase des VEGFR: les VEGFR-TKI. Seuls les patients porteurs d'adénocarcinomes pulmonaires peuvent bénéficier de thérapies AAG, les patients porteurs de carcinomes squameux SCC présentant de sévères complications (hémorragies pulmonaires). Le sVEGFR1-i13 est un variant tronqué du VEGFR1 qui ne contient que les premiers six motifs N-terminaux extracellulaires de type Ig du domaine extracellulaire et il est dépourvu des domaines transmembranaire et tyrosine kinase. Le sVEGFR1 a été initialement considéré comme un facteur anti-angiogénique qui neutralise les fonctions du VEGF-A dans les cellules endothéliales. Les hauts niveaux ont été corrélés avec un mauvais pronostic et une mauvaise réponse aux thérapies dans plusieurs types de cancer. Nous avons montré *in vitro* dans 4 lignées cellulaires de SCC que le bevacizumab, ainsi que les inhibiteurs VEGF-TKI (Semaxanib, KI8751) augmentent les niveaux intra- et extra-cellulaires du sVEGFR1-i13. Nous avons confirmé ces résultats *in vivo* dans des modèles murins de xénogreffes squameux induits par NCTU. De façon intéressante, l'augmentation du sVEGFR1-i13 en réponse aux thérapies anti-angiogéniques est spécifique des modèles squameux et n'est pas observée dans les modèles d'adénocarcinome *in vitro* et *in vivo*. Sur le plan moléculaire, nous avons montré que le VEGF₁₆₅ par l'intermédiaire de SOX2 régule l'expression du sVEGFR1-i13 en réponse aux thérapies AAG. De plus, nous avons identifié une boucle autocrine $\beta 1$ intégrine / VEGFR1 / VEGFR2 par laquelle sVEGFR1-i13 contrôle différenciellement la prolifération cellulaire et la survie, permettant notamment de distinguer les cellules SCC sensibles ou résistantes aux thérapies AAG. Enfin, dans une série de 77 cancers bronchiques non à petites cellules, nous avons montré que 11% et 44% des patients SCC expriment de bas ou de hauts niveaux de sVEGFR1-i13 respectivement. Les hauts niveaux ont été corrélés avec des stades pTNM avancés. Dans l'ensemble, nos résultats sont la première preuve que les thérapies AAG augmentent l'expression du sVEGFR1-i13 dans les cellules SCC. En outre, nos données mettent en évidence une fonction pro-tumorale inattendue du sVEGFR1-i13 grâce à l'activation d'une boucle autocrine VEGFR/ $\beta 1$ intégrine. Ces résultats pourraient aider à comprendre pourquoi les patients SCC répondent différemment aux AAG que les patients ADC et d'identifier les patients SCC qui pourraient être éligibles à ces thérapies.

Mots clés : CBNPC, thérapies anti-angiogéniques, sVEGFR1, intégrine $\beta 1$

Centre de recherche Institute for Advanced Biosciences (IAB)

INSERM U1209–CNRS UMR 5309

Equipe : épissage alternatif des ARNs, signalisation cellulaire et réponse aux thérapies »

École Doctorale Chimie et Sciences pour le Vivant – Université Grenoble Alpes

