



# Le phénotype mésenchymateux et la réponse aux agents anti-VEGF dans le cancer colorectal

Anaïs Bouygues

## ► To cite this version:

Anaïs Bouygues. Le phénotype mésenchymateux et la réponse aux agents anti-VEGF dans le cancer colorectal. Physiologie [q-bio.TO]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2017. Français. NNT : 2017PA066463 . tel-01815285

**HAL Id: tel-01815285**

**<https://theses.hal.science/tel-01815285>**

Submitted on 14 Jun 2018

**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 de doctorat de l'Université Pierre et Marie Curie**

Ecole doctorale : Physiologie, physiopathologie  
et thérapeutique

## **LE PHENOTYPE MESENCHYMATEUX ET LA REPONSE AUX AGENTS ANTI-VEGF DANS LE CANCER COLORECTAL**

Présenté et soutenue publiquement par  
**Anaïs BOUYGUES le 12 Décembre 2017**

Devant le jury composé de :

Directeur de thèse : Dr Annette K. Larsen

Président : Dr Aimery de Gramont

Rapporteur : Dr Marc Pocard

Rapporteur : Dr Jean-Baptiste Bachet

Examineur : Pr Alexandre Escargueil

---

## Remerciements

---

### Aux membres du jury,

Je tiens tout d'abord à remercier chaleureusement le **Dr Annette Larsen** qui m'a accueilli au sein de son laboratoire, dans un premier temps pour mon stage de master 2. Vous m'avez ensuite permis de poursuivre mon cursus en thèse dans votre laboratoire en m'offrant un financement de thèse pour ces quatre années. Vous m'avez permis d'acquérir les compétences nécessaires afin de travailler plus tard dans le monde de la recherche. Grâce à vous, j'ai pu participer à des congrès européens et j'ai eu la chance de participer à des articles publiés dans de bons journaux scientifiques. Vous m'avez fait confiance durant toutes ces années et je vous remercie de vos encouragements et de votre bienveillance aussi bien sur le plan professionnel que personnel.

Je remercie le **Pr. Aimery de Gramont** qui me fait l'honneur de présider mon jury de thèse.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude au **Pr. Marc Pocard** et au **Pr. Jean-Baptiste Bachet** pour avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse. Je vous remercie pour votre disponibilité et votre expertise scientifique. Je remercie également le **Pr. Alexandre Escargueil** d'avoir participé à l'examen de ma thèse.

### A mon équipe,

Je remercie le **Dr Michèle Sabbah** et le **Dr Nathalie Ferrand** pour leur présence de tous les jours, leur aide précieuse, leur savoir-faire et leurs conseils. Michèle tu pourras enfin te mettre au régime quand Ambre et moi serons parties ☺

Je tiens à remercier particulièrement tous les doctorants « actuels » et « passés » du laboratoire :

**Paul** pour m'avoir accueilli dans le super bureau et pour avoir été là depuis le début. Pour m'avoir « tout appris », pour les rigolades, les hauts et les bas, les soirées, les danses, les chansons et j'en passe...

**Meriam**, ma choupi d'amour, merci pour ton sourire permanent, pour tous les moments qu'on a passé ensemble même si c'était pas gagné au début. Je suis heureuse d'être ton amie.

**Mauricette**, le plus célèbre des paresseux, pour les délires de tous les jours, les deliveroo et uber eats et les folies au labo (#bureau17)

**Lila**, notre pierre richard à nous, pour tes maladresses et tes expressions qui n'appartiennent qu'à toi...Grâce à toi, nous avons compris d'où vient le téléphone arabe...et n'oublie pas de prendre un jus de pêche

**Ambre**, ma petite glouton, pour ta folie naturelle, pour tes « j'ai faim à 11h30 » et pour m'avoir mise au sport (miracle !)

**Sandrine**, latifa, pour me faire découvrir de si belles chansons en salle de culture, pour le poney et les licornes et la célèbre pagaille qui fait ta notoriété.

J'ai également une pensée pour les bébés thésards qui viennent d'arriver : **Mehdi**, **Katyana** et **Clémentine** ainsi que tous les stagiaires qui ont travaillé dans ce laboratoire (**Marc-antoine**, **Yannick**, **Maude**, **Gwénael**, **Elodie**, **Judith**, **Alexia**, **Célia**, **Arnaud**, **Thomas** etc...). Merci à **Jérôme** pour toutes les grandes discussions sur Slug et pour l'aide en génotypage.

**Au bâtiment Kourilsky,**

Je remercie toutes les personnes que j'ai pu rencontrer au cours de cette thèse :

**Kristell et Olivier** pour les nombreux carrés de chocolat, les discussions et les conseils en tout genre.

**Baptiste et Thomas** (honey badger) pour les repas partagés et les soirées enflammées.

**Tatiana** et tous les animaliers de la PHEA (**Timothé**, **Alizée**, **Quentin**, **Agnès et Laetitia**) pour leur travail au sein de l'animalerie et leur gentillesse.

**Laurent** pour toutes les discussions politiques auxquelles je ne comprenais pas toujours tout.

**Raymond** pour sa disponibilité et son « tit » accent créole ☺

**Paul Patrice**, alias PPL, pour tous ses compliments du matin et sa bonne humeur.

Je remercie également **Sylvie et Fatiha** de la plateforme d'anapath pour les conseils et leurs disponibilités. J'en ai passé des heures à couper des lames dans votre labo ! Je remercie également **Delphine** pour m'avoir appris tout ce qu'il fallait pour maîtriser l'expérimentation animale.

### **A mes amis,**

**Alizée, Mathilde, Charlotte et Dupuis** d'avoir partagé avec moi toute cette aventure parisienne (même si on en a perdu une en cours de route). Merci pour le soutien et la compréhension.

Merci à **Caro** d'être une amie fidèle depuis le lycée.

Merci à ma super voisine **Cendrine** d'être une pipelette sans fin ! A **Manon** pour m'avoir fait découvrir en tout premier la culture cellulaire et la recherche en cancéro. A toute la pharmacie du village, **Samia, Damien, Roger, Olivier, Igor et Diem** pour avoir partagé de bons moments avec moi.

### **A ma famille,**

A mes parents, pour être les meilleurs parents du monde depuis toujours, pour me nourrir avec de bons plats auvergnats depuis mon enfance, pour le soutien et l'amour indéfectible que vous m'apportez. Ma thèse n'aurait pas été ce qu'elle est aujourd'hui sans vous et sans votre confiance pour que j'accomplisse mes rêves.

A ma grand-mère et à ma sœur pour leur soutien.

Pour finir je tiens à remercier **Bibinou** qui partage ma vie depuis bientôt 10 ans (c'est qu'on vieillit !). Merci d'être le meilleur mari du monde, de m'apaiser dans les moments de doute, d'être aux petits soins, de pousser la chansonnette comme un pro et de danser presque aussi bien que Devonte ☺. Merci de partager tous ces moments avec moi depuis toutes ces années.

---

## Sommaire

---

### LISTE DES ABREVIATIONS

### PREAMBULE

### CHAPITRE I : LE CANCER COLORECTAL

- I. Incidence et mortalité
- II. Anatomie du côlon
- III. Facteurs de risque
  - 1. L'âge
  - 2. Les habitudes de vie
  - 3. L'exposition à des polluants et à des substances chimiques
  - 4. Les facteurs individuels
  - 5. Les facteurs familiaux et génétiques
- IV. Symptômes, dépistage et diagnostic
- V. La carcinogénèse colorectale
  - 1. Génétique et cancer du côlon
    - a. L'instabilité chromosomique : cancers LOH+
    - b. L'instabilité microsatellitaire
    - c. L'hyperméthylation des îlots CpG
  - 2. Les voies moléculaires impliquées
    - a. Le gène APC ou la voie Wnt/ $\beta$ -caténine
    - b. Voie du TGF- $\beta$
    - c. Voie TP53
- VI. Classification de la progression tumorale

### CHAPITRE II : LES TRAITEMENTS DU CANCER COLORECTAL

- I. La chirurgie
- II. La chimiothérapie
  - 1. 5-fluorouracile
  - 2. Oxaliplatine
  - 3. Irinotécan
- III. Les thérapies ciblées
  - 1. Les inhibiteurs du VEGF
  - 2. Les inhibiteurs de l'EGFR
  - 3. Combinaison anti-EGFR et anti-VEGF
- IV. Immunothérapie

### CHAPITRE III. L'ANGIOGENESE

- I. Définition
- II. L'angiogénèse tumorale

1. Découverte du lien angiogénèse/cancer
2. Croissance tumorale et transition angiogénique
3. Réseau vasculaire tumoral
4. Régulateurs de l'angiogénèse

## **CHAPITRE IV. LA REGULATION DE L'ANGIOGENESE**

- I. Le VEGF
- II. Les récepteurs du VEGF
  1. VEGFR-1
  2. VEGFR-2
  3. VEGFR-3
  4. NRP-1 et NRP-2
- III. Les autres médiateurs de l'angiogénèse
  1. FGFR
  2. PDGFR
  3. Angiopoïétine et Tie-2
- IV. Signalisation et régulation du VEGF
- V. Thérapies anti-angiogéniques
  1. Bevacizumab
  2. Afibercept
  3. Régorafénib
  4. Ramucirumab
  5. Les marqueurs prédictifs de l'efficacité

## **CHAPITRE V. LA TRANSITION EPITHELIO-MESENCHYMATEUSE**

- I. Définition
- II. EMT et cancers
- III. Hétérogénéité tumorale
- IV. Les facteurs de transcription impliqués

## **OBJECTIFS DES TRAVAUX**

## **ARTICLE**

## **DISCUSSION ET PERSPECTIVES**

## **BIBLIOGRAPHIE**

## **ANNEXES**

---

## *Liste des abréviations*

---

5-FU : 5-fluorouracile

### **A**

ADCC : Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity

ADN : Acide DésoxyriboNucéique

ANGPTL3 : ANGioPoieTin Like 3

APC : Adenomatous Polyposis Coli

ARN : Acide RiboNucléique

### **B**

BAX : Bcl2-Associated X protein

Bcl2 : B-Cell Lymphoma 2

BCG : Bacille Calmette-Guérin

### **C**

CCR : Cancer ColoRectal

CDKN : Cycline Dependant Kinase Inhibitor

CIN : Chromosomal INstability

CpG : Cytosine Phosphate Guanosine

CSC : Cellule souche cancéreuse

CSPG2 : Chondroitin Sulfate ProteoGlycan 2

CTNNB : CaTeNiN  $\beta$

CMS : Consensus Molecular Subtypes

### **D**

DACH : DiAminoCycloHexane

DPD : DihydroPyrimidine Deshydrogenase

DMLA : Dégénérescence Maculaire Liée à l'Age

### **E**

EGF : Epithelial Growth Factor

EGFR : Epithelial Growth Factor Receptor

EMT : Epithelial Mesenchymal Transition

ER : Estrogen Receptor



ERK : Extracellular signal Regulated Kinase

## **F**

FAK : Focal Adhesion Kinase

FdUMP : Fluoro-désoxyUridine MonoPhosphate

FdUTP : Fluoro-désoxyUridine TriPhosphate

FGF : Fibroblast Growth Factor

FIT : Faecal Immunology Test

FUTP : Fluoro-Uridine TriPhosphate

## **G**

GSK3 $\beta$  : Glycogen Synthase Kinase-3 beta

## **H**

HER : Human Epidermal growth factor Receptor

HGF : Hepatocyte Growth Factor

HIF : Hypoxia Inducible Factors

HNPCC : Hereditary Non Polyposis Colon Cancer

## **I**

IgG : Immunoglobuline G

InCa : Institut National Du Cancer

InVS : Institut de Veille Sanitaire

IV : IntraVeineuse

## **K**

K-RAS : Kirsten Rat Sarcoma virus

## **L**

LEF : Lymphoid Enhancer Factor

LOH : Loss Of Heterozygoty

Lv5FU2 : Leucovorin 5 fluoro-uracile

## **M**

MAPK : Mitogen Activated Protein Kinases

MDM2 : Mouse double minute 2 homolog

MDR : MultiDrug Resistance

MET : Mesenchymal epithelial transition

MICI : Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin

MMP : Matrix MetalloProteinases

MMR : MisMatch Repair

MSI : MicroSatellite Instability

MSS : MicroSatellite Stability

MYOD1 : MYOblast Determination protein 1

## **N**

NO : Nitric Oxide

NRP : Neuropilin

## **P**

PAF : Polypose Adénomateuse Familiale

PDGF : Platelet-Derived Growth Factor

PDGFR : Platelet Derived Growth Factor Receptor

PI3K : Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase

PLC $\gamma$  : Phospholipase C  $\gamma$

PIGF : Placental Growth Factor

PPAR $\delta$  : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\delta$

## **R**

RAS : Rat Sarcoma

RER : Replication Error

ROS : Reactive Oxygen Species

## **S**

SMAD : Mothers against Decapentaplegic

SN-38 : 7-Ethyl-10-hydroxycamptothecin

SRC : Sarcoma

STAT3 : Signal Transducers and Activators of Transcription 3

SWI/SNF : SWItch/Sucrose Non-Fermentable

## **T**

TCF : T-Cell Factor

TGF- $\beta$  : Transforming Growth Factor  $\beta$

TGFBRII : Transforming Growth Factor  $\beta$  Receptor II

TNM : Tumor Nodes Metastasis

TP53 : Tumor Protein p53

TPS-1 : TromboSpondin 1

## **V**

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

VEGFR : Vascular Endothelial Growth Factor Receptor

VHL : Von Hippel-Lindau

## **W**

WNT : WiNgless-Type

---

## Préambule

---

Mes travaux de thèse ont été réalisés sous la direction scientifique du Dr. Annette K. Larsen, dans le laboratoire « Biologie et Thérapeutique du Cancer » appartenant à l'unité INSERM U938 au sein du Centre de Recherche Saint-Antoine.

Le cancer est un problème de santé publique majeur qui affecte tous les pays. Chaque année, on dénombre plus d'un million de nouveaux cas de cancer colorectaux (CCR) dans le monde.

La compréhension des processus biologiques fondamentaux dans le cancer reste un enjeu mondial pour la mise en œuvre d'approches innovantes en termes de prévention, de dépistage précoce et de réponse prédictive aux traitements. Les progrès en biologie moléculaire et cellulaire ainsi que l'essor des connaissances dans le domaine de la cancérologie ont permis l'émergence de nouvelles thérapies dites « thérapies ciblées ».

Ces traitements agissent sur des cibles moléculaires spécifiques et ont pour caractéristiques de cibler au maximum les cellules malignes afin de limiter les effets secondaires et d'augmenter le confort du patient.

Les principaux médicaments de thérapies ciblées utilisés dans le traitement du cancer colorectal sont des anti-angiogéniques qui ciblent la néo-vascularisation des tumeurs en empêchant la croissance et la dissémination des cellules tumorales sur des sites secondaires en ciblant la voie du VEGF (vascular endothelial growth factor). Malgré l'efficacité démontrée de ces traitements, il manque toujours à l'heure actuelle le développement et la validation de marqueurs prédictifs d'efficacité de ces molécules. En effet, certains patients répondent très bien tandis que d'autres y sont réfractaires. Donc l'utilisation des marqueurs prédictifs serait indispensable pour une meilleure prise en charge des patients.

D'autre part, ces dernières années, la classification des CCR a évolué grâce à plusieurs études d'expression génique, menées en parallèle, qui ont permis d'individualiser de nouveaux groupes de pronostic variable, soulignant l'hétérogénéité des CCR. Ces résultats ont donné naissance à une classification de consensus comportant 4 groupes dont un groupe CMS4 de type mésenchymateux.

Dans ce contexte, le but de ma thèse a été d'étudier le possible lien entre le phénotype mésenchymateux et la réponse aux médicaments ciblant le VEGF (Bevacizumab et Aflibercept).

Une première partie introductive sera consacrée au cancer colorectal et à sa carcinogénèse. Dans un second chapitre, nous présenterons les différentes approches thérapeutiques pouvant être utilisées pour traiter les CCR puis l'angiogénèse et sa régulation seront ensuite présentées. Le dernier chapitre sera consacré à la transition épithélio-mésenchymateuse et à son implication dans le CCR. Enfin, dans un dernier temps nous poserons les limites et perspectives de ce travail de thèse.

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

---

## Chapitre I : Le cancer colorectal

---

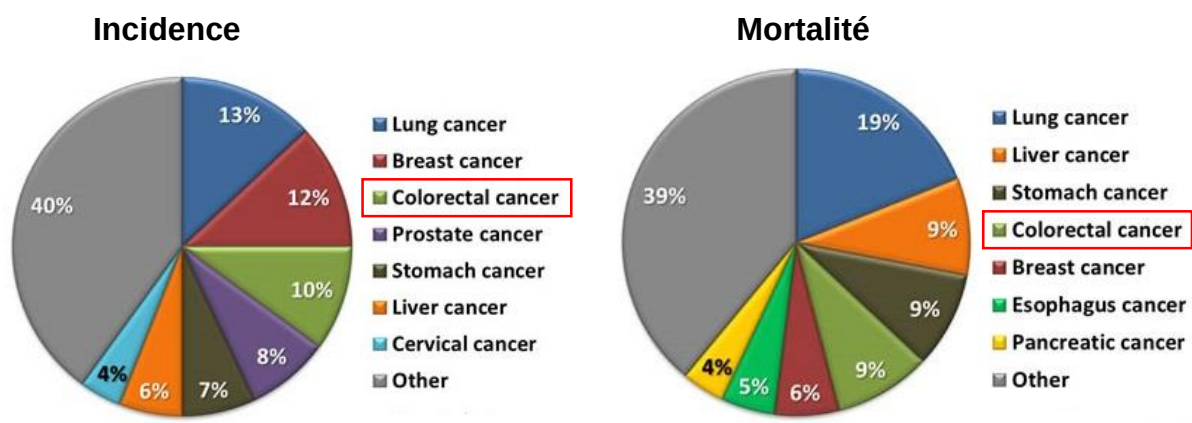
### I. Incidence et mortalité

La France fait partie des pays pour lesquels le risque de cancer du colorectal (CCR) est élevé avec plus de 42 000 nouveaux cas estimés en 2012.

En France, le cancer colorectal se situe, tous sexes confondus, au troisième rang des cancers les plus fréquents. Chez l'homme, il se place au troisième rang (derrière celui de la prostate et du poumon) en termes d'incidence et au deuxième rang (derrière le cancer du poumon) en termes de mortalité. Chez la femme, il se situe au deuxième rang (derrière le cancer du sein) en termes d'incidence et au troisième rang (derrière le cancer du sein et du poumon) en termes de mortalité (*INCa, 2013 [www.e-cancer.fr](http://www.e-cancer.fr)*).

Il survient en grande majorité chez les personnes âgées de 50 ans et plus. D'après les estimations, le nombre de cancers colorectaux devrait augmenter dans les prochaines années pour atteindre 45 000 nouveaux cas annuels en 2020.

Au niveau mondial, le cancer colorectal se situe au troisième rang en termes d'incidence avec 1.4 millions de nouveaux cas par an et au quatrième rang en termes de mortalité avec 800 000 décès par an (*Globocan 2012 [www.globocan.iarc.fr](http://www.globocan.iarc.fr)*).



**Figure 1 : Incidence et mortalité des principaux cancers dans le monde (Globocan, 2012)**

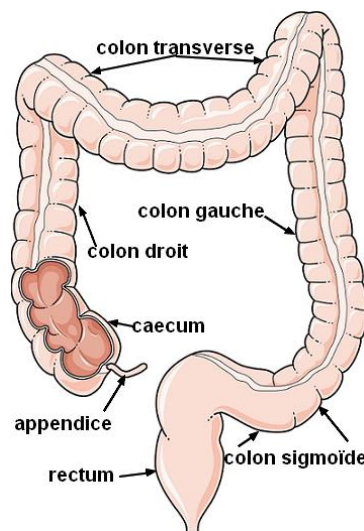
L'incidence ne varie pas de façon significative ces dernières années contrairement à la mortalité qui diminue depuis les années 1980 notamment grâce à un dépistage plus précoce (Mandel et al. 2000) et aux progrès thérapeutiques avec l'arrivée de la chimiothérapie et, plus récemment, des thérapies ciblées (Peeters and Price 2012).

## II. Anatomie du côlon

Le côlon ou gros intestin mesure en moyenne 1,5 m pour un diamètre moyen de 7 cm. Il forme un cadre autour de l'intestin grêle, en bordure de la cavité abdominale.

Son rôle est de terminer la digestion, de récupérer l'eau du chyme intestinal et d'évacuer les déchets résiduels vers le rectum.

Le côlon se divise en plusieurs segments : le côlon ascendant ou droit ; le côlon transverse ; le côlon descendant ou gauche ; le côlon sigmoïde (*Figure 2*).



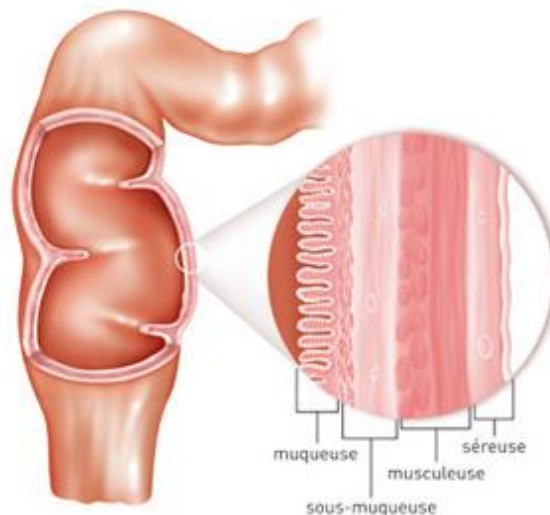
**Figure 2 : Anatomie du côlon (d'après [www.chorus-chirurgical.fr](http://www.chorus-chirurgical.fr))**

Un cancer peut se développer dans n'importe quelle portion du côlon. Néanmoins, dans plus de la moitié des cas, le cancer touche le côlon sigmoïde.

La paroi du côlon est constituée de quatre couches différentes qui se superposent (*figure 3*) :

- La muqueuse (couche la plus interne) : le côlon n'a pas de villosités mais uniquement des cryptes ou glandes dites « de Lieberkuhn » (cellules caliciformes, majoritaires et entérocytes) qui constituent l'unité fonctionnelle du côlon.

- La sous-muqueuse : tissu conjonctif vascularisé, réseau de nerfs sympathiques.
- La musculuse (deux couches de muscles) : elle comprend une couche circulaire interne et une couche longitudinale externe, constituées de cellules musculaires lisses. Entre ces deux couches, on observe des plexus nerveux, les plexus d'Auerbach, responsables de l'innervation végétative du tube digestif.
- La couche séreuse (couche externe) : au niveau du côlon, la sous-séreuse correspond à un tissu adipeux et vascularisé, bordé de la séreuse (péritoine) en périphérie. Au niveau du moyen et du bas rectum, il n'existe pas à proprement parler de séreuse (pas de péritoine). Le tissu adipeux périrectal au-delà de la musculuse est nommé mésorectum.



**Figure 3 : Structure du côlon (d'après [www.e-cancer.fr](http://www.e-cancer.fr))**

L'homéostasie de l'épithélium colique est basée sur un renouvellement rapide et constant de la monocouche épithéliale. A partir des cellules souches, les cellules vont proliférer et se différencier tout en remontant le long de la glande, puis vont être exfoliées en haut. On parle de turn-over cellulaire. La durée du turnover cellulaire intestinal est de 2 à 7 jours (Crosnier et al. 2006).

La prolifération anarchique de cellules peut aboutir à la formation d'un cancer colorectal. La première anomalie décelable sera les lésions pré-néoplasiques qui pourront évoluer vers un adénome puis un adénocarcinome qui constituent la plupart de cancers colorectaux.



### **III. Facteurs de risque**

#### **1. L'âge**

Le cancer colorectal est un cancer dont la fréquence augmente avec l'âge. Il est ainsi rarement diagnostiqué avant 45 ans. L'âge moyen au moment du diagnostic est de 70 ans.

#### **2. Les habitudes de vie**

Le cancer colorectal semble être associé à un régime alimentaire pauvre en fibres ainsi qu'à une consommation importante de viande rouge, de charcuterie, de graisses animales et de boissons alcoolisées (Shaukat et al. 2017). Le tabagisme augmente modérément mais significativement le risque de cancer colorectal, surtout lorsqu'il est important et dure depuis longtemps (Hooker et al. 2008). Enfin, la sédentarité et le surpoids sont deux facteurs de risque identifiés ; à l'inverse, une activité physique régulière est un facteur protecteur. Les risques de développer un cancer du côlon auxquels sont exposés des sujets ayant une forte activité physique sont de 18 % et 20 % inférieurs, respectivement chez l'homme et la femme, à ceux dont l'activité physique est minimale. Cette corrélation n'est pas retrouvée dans le cas du cancer du rectum (Samad et al. 2005).

#### **3. L'exposition à des polluants et à des substances chimiques**

Une corrélation a été observée entre l'exposition prolongée à l'amiante et la survenue de cancer colorectal (Paris et al. 2017).

#### **4. Les facteurs individuels**

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), comme la maladie de Crohn et la colite ulcéreuse, augmentent le risque de cancer, notamment lorsqu'elles évoluent depuis plus de 10 ans (Bernstein et al. 2001). Les femmes ayant été atteintes d'un cancer du sein, de l'ovaire ou de l'utérus ont également un sur-risque modéré de développer un nouveau cancer au niveau du côlon ou du rectum (Lu et al. 2001).

## **5. Les facteurs familiaux et génétiques**

Le risque d'avoir un cancer colorectal est plus élevé lorsqu'un ou plusieurs parents du premier degré ont déjà été atteints par la maladie, notamment avant l'âge de 50 ans (Jasperson et al. 2010). Selon l'Institut de veille sanitaire (InVS), les cancers colorectaux héréditaires représentent moins de 5 % des cas, et surviennent principalement avant 40 ans, plus particulièrement au niveau du côlon droit (Steinke et al. 2013).

Deux formes familiales, liées à des mutations génétiques spécifiques, sont identifiées :

- La polypose recto-colique familiale (Familial adenomatous polyposis), maladie associée à la mutation du gène APC, gène suppresseur de tumeur, sur le bras long du chromosome 5. Cette mutation est responsable de l'apparition de centaines de polypes à l'âge adulte (Powell et al. 1993).
- Le syndrome de Lynch, ou cancer héréditaire du côlon sans polypose (HNPCC, Hereditary non polyposis colon cancer), caractérisé par des mutations dans les gènes impliqués dans le système de réparation des mésappariements de l'ADN (famille des gènes MMR). Ces mutations entraînent des accumulations d'insertions/délétions qui peuvent être sur des gènes pro-oncogéniques ou suppresseurs de tumeurs. Cette maladie se caractérise par des tumeurs colorectales précoces mais aussi moins fréquemment par des cancers de l'intestin grêle, de l'endomètre, de l'ovaire, des voies urinaires, de l'estomac et des voies biliaires (Lynch and Smyrk 1996).

## **IV. Symptômes, dépistage et diagnostic**

Les cancers colorectaux se développent souvent en silence, sans provoquer de symptôme particulier. Ils peuvent rester longtemps imperceptibles. Néanmoins, certains signes peuvent être révélateurs d'un cancer :

- Les troubles persistants ou soudains du transit intestinal : constipation soudaine ou qui s'aggrave, diarrhée qui se prolonge, augmentation du volume abdominal, selles plus étroites que d'habitude, des vomissements etc...
- Des saignements et douleurs, crampes

- Les symptômes plus rares : glaires émises par l'anus, anémie

Depuis mai 2015, le dépistage organisé du cancer colorectal consiste en la réalisation d'un test immunologique appelé FIT (faecal immunology test), rapide et indolore à effectuer chez soi. Le prélèvement sera ensuite envoyé en laboratoire pour être analysé.

Le test immunologique repose sur la détection de l'hémoglobine humaine grâce à l'utilisation d'anticorps mono ou poly-clonaux spécifiques de la globine (Barrows 1978). La méthode présente un certain nombre d'avantages : elle est sélective d'un saignement d'origine colorectale et humaine, s'affranchit de contraintes alimentaires et permet une lecture automatisée. Si le résultat de ce test est positif, une coloscopie sera alors prescrite.

La coloscopie constitue l'examen de référence pour visualiser l'intérieur de l'intestin. Il permet aussi de déceler et retirer d'éventuels polypes avant qu'ils n'évoluent en cancer. Si la paroi du côlon présente des irrégularités, une biopsie sera effectuée. Seul l'examen anatomopathologique permet de conclure de façon définitive si les lésions prélevées sont cancéreuses ou non.

Dans le cas où un cancer est diagnostiqué, l'examen des cellules et des tissus prélevés aura pour objectif de préciser le type de cancer dont il s'agit ainsi que de déterminer l'atteinte des couches de la paroi du côlon ou du rectum où les cellules cancéreuses se sont développées. Cela donne une première indication sur l'étendue de la maladie et contribue à définir le stade du cancer.

## **V. La carcinogénèse colorectale**

Les cellules de la muqueuse digestive, et en particulier les cellules de la muqueuse colorectale, ont un taux de prolifération élevé aboutissant au renouvellement de l'épithélium en 3 à 6 jours. Plusieurs milliards de cellules sont ainsi renouvelées, ce qui représente autant de divisions cellulaires, de réplication de l'ADN, et donc d'erreurs de réplifications réparées, ou non, par des systèmes multiples en général très efficaces. Ces anomalies de réplication sont en général sans conséquences. Cependant, lorsqu'elles touchent des gènes importants dans le contrôle du fonctionnement cellulaire, elles peuvent être le point de départ d'un processus de carcinogénèse. La carcinogénèse colorectale résulte de l'acquisition par

les cellules de l'épithélium colorectal d'anomalies génétiques aboutissant à une dérégulation de la prolifération et de la mobilité/invasivité des cellules (Kinzler et Vogelstein 1996; Jones et Baylin 2002). Ces anomalies génétiques sont acquises de façon progressive, ce qui a permis de définir des séquences d'apparition de mutations.

## **1. Génétique et cancer du côlon**

Classiquement, il a été identifié trois voies initiatrices de la cancérogénèse colorectale.

### **a. L'instabilité chromosomique : cancers LOH+**

C'est le mécanisme moléculaire de cancérogénèse le plus fréquent dans le cancer colorectal : il concerne 80 à 85% des cancers colorectaux sporadiques et il est observé de façon prononcée au cours de la PAF (Lengauer et al. 1998). Ces cancers sont appelés LOH+ (Loss of Heterozygoty) ou MSS (Microsatellite Stability) ou CIN (Chromosomal Instability).

Les cellules cancéreuses ont un contenu anormalement élevé en ADN (hyperploïdie), des pertes chromosomiques fréquentes (17p, 18q et 5q) et des mutations fréquentes des gènes APC, p53 et K-RAS (Fearon et Vogelstein 1990 ; Baker et al. 1989). Plus récemment, plusieurs études ont décrit des mutations dans le domaine exonucléase de l'ADN polymérase  $\epsilon$  (The Cancer Genome Atlas Network 2012).

Le gène APC est un gène suppresseur de tumeur garde barrière (Aoki et Taketo 2007). Sa mutation constitutionnelle est responsable de la PAF (Kinzler et Vogelstein 1996). La mutation de ce gène est précoce dans le développement du cancer colorectal : son inactivation entraîne une prolifération accrue des cellules de l'épithélium colique (Otori et al. 1998).

La mutation du gène KRAS est elle aussi précoce dans la séquence adénome-cancer. Il s'agit d'un oncogène et sa mutation activatrice entraîne une augmentation de l'activité cellulaire avec transformation d'une hyperprolifération des cellules épithéliales en adénome (Santini et al. 2008).

Le gène suppresseur de tumeur TP53 code pour la protéine p53 dont le rôle est celui de « gardien du génome ». Elle bloque le cycle cellulaire, permettant la réparation des lésions de l'ADN, et induisant la mort cellulaire si les lésions n'ont pu être réparées

(Lane 1992). Sa mutation inactivatrice est plus tardive dans le développement du cancer colorectal autorisant la survenue d'altérations génétiques multiples (Leslie et al. 2002).

### **b. L'instabilité microsatellitaire**

Ce mécanisme moléculaire de cancérogénèse concerne ≈15% des cancers colorectaux sporadiques et est observé de façon caricaturale dans le cadre du syndrome de Lynch (Thibodeau et al. 1993).

Ces cancers sont appelés RER+ (replication error) ou MSI (microsatellite instability). Les cellules cancéreuses ont typiquement un contenu en ADN normal (diploïdie), ont rarement des pertes chromosomiques et ont des anomalies des gènes MMR. Les gènes MMR codent pour des protéines dont le rôle est de détecter et de réparer les erreurs de réplication de l'ADN survenues au cours de la mitose (Vaish et Mittal 2002).

La mutation ou la méthylation de la région promotrice des gènes MMR induit une déficience de ce système de réparation et les mutations vont s'accumuler, préférentiellement au niveau des microsatellites, régions du génome particulièrement sujettes aux erreurs de réplication.

La cellule acquiert un phénotype hypermutateur qui prédispose à la survenue de mutations dans certains oncogènes (gène pro-apoptotique BAX (Duval et Hamelin 2002)) ou gènes suppresseurs de tumeurs (gène du récepteur de type II du TGF- $\beta$  (Markowitz et al. 1995)).

La chronologie des mutations des cancers MSI est mal connue : la mutation du récepteur de type II du TGF- $\beta$  apparaît la plus précoce.

Au plan clinique, les cancers MSI sont plus souvent localisés dans le côlon proximal (transverse et droit). Les cancers de phénotype MSI ont un meilleur pronostic et une moindre sensibilité à la chimiothérapie par le 5-FU que les cancers de type MSS (microsatellite stability) (Guastadisegni et al. 2010).

Les cancers colorectaux peuvent être classés en 3 groupes selon le degré d'instabilité des microsatellites :

- les cancers MSI-H ont un haut niveau d'instabilité,
- les cancers MSI-L ont un faible niveau d'instabilité

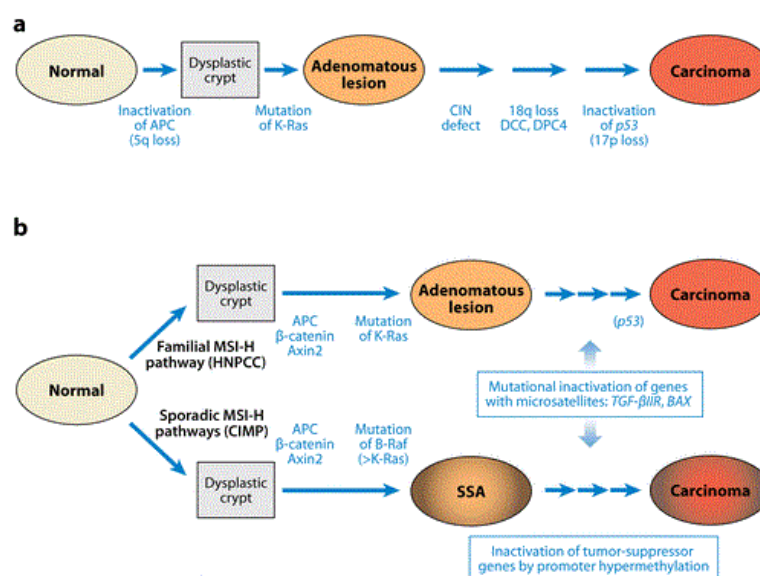
- les cancers MSS n'ont pas d'instabilité.

Les cancers MSI-H ont un meilleur pronostic spontané que les cancers MSI-L et MSS dans les stades 2 et 3 mais pas dans les stades 4 (Goldstein et al. 2014). Ils sont associés à un moindre risque de métastases (Gatalica et al. 2016).

### c. L'hyperméthylation des îlots CpG

D'autres mécanismes d'altérations de l'ADN sont impliqués dans la carcinogenèse du côlon.

Le principal est la méthylation des îlots CpG (Cytosine phosphate Guanosine) dans la région promotrice de gènes suppresseurs de tumeur. L'hyperméthylation entraîne la désacétylation des histones ainsi qu'une condensation de la chromatine empêchant la transcription active du gène suppresseur de tumeur (Issa 2004). Ce faisant, l'absence du gène suppresseur de tumeur permet de franchir un pas de plus dans la cascade d'évènement induisant la formation du cancer colorectal. Les gènes impliqués dans ce phénomène sont divers et incluent autant les gènes de faibles pénétrances que de fortes pénétrances (Xu et al. 2004). L'hyperméthylation des promoteurs est un phénomène très répandu dans le cancer colorectal. Plus d'une trentaine de gènes ont jusqu'à maintenant été identifiée comme étant porteur de cette aberration épigénétique (par exemple CSPG2, ER- $\alpha$ , MYOD1) (Kondo et Issa 2004).



**Figure 4 : Modèle génétique du CCR (d'après Fearon 2011)**

## 2. Les voies moléculaires impliquées

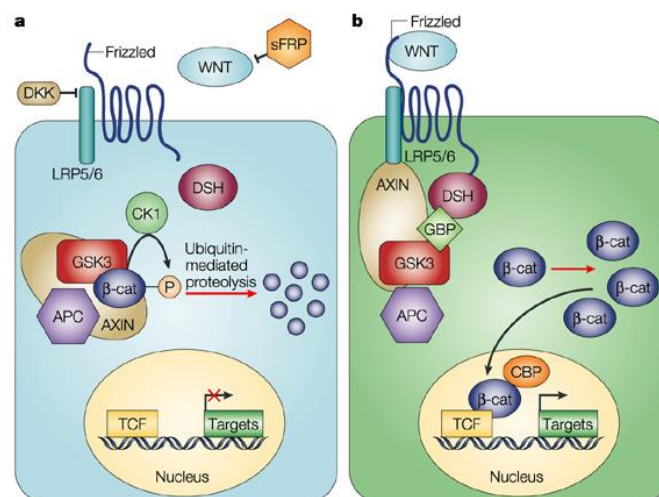
### a. Le gène APC ou la voie Wnt/ $\beta$ -caténine

La mutation du gène APC est l'évènement le plus précoce de la cancérogenèse colorectale.

L'inactivation de ce gène intervient dans 70 à 80 % des cancers sporadiques et dans 100 % des cas de cancers héréditaires de type PAF (Fearhead et al. 2001).

Le gène APC est un gène suppresseur de tumeurs localisé sur le chromosome 5q et qui code pour une protéine de 300 kDa (Bodmer et al. 1987). Cette protéine est impliquée dans de nombreuses voies moléculaires essentielles au bon fonctionnement de la cellule. Elle régule la  $\beta$ -caténine et contrôle l'activation de nombreux gènes dont certains interviennent dans la prolifération cellulaire, le maintien de l'intégrité du cytosquelette de la cellule et joue un rôle dans l'instabilité chromosomique (*Figure 5*).

La voie Wnt est une des voies de signalisation majeure dans le processus d'embryogenèse et de cancérogenèse (Gregorieff et Clevers 2005). Dans le cas du processus normal de développement, l'activation des récepteurs frizzled par la fixation du ligand Wnt conduit à la phosphorylation de la protéine Dishevelled qui, par son association à l'axine, empêche la GSK3 $\beta$  de phosphoryler ses substrats dont la  $\beta$ -caténine, qui sera alors transloquée dans le noyau où elle s'associe aux facteurs de transcription TCF/LEF pour activer la transcription de gènes cibles (C-myc, Cycline D1 ou C-jun, MMP7, PPAR $\delta$ ) (Behrens et al. 1996). En l'absence du ligand Wnt, la GSK3 $\beta$  phosphoryle la  $\beta$ -caténine dans le complexe axine/APC, qui sera ubiquitinylée et dégradée par le protéasome.



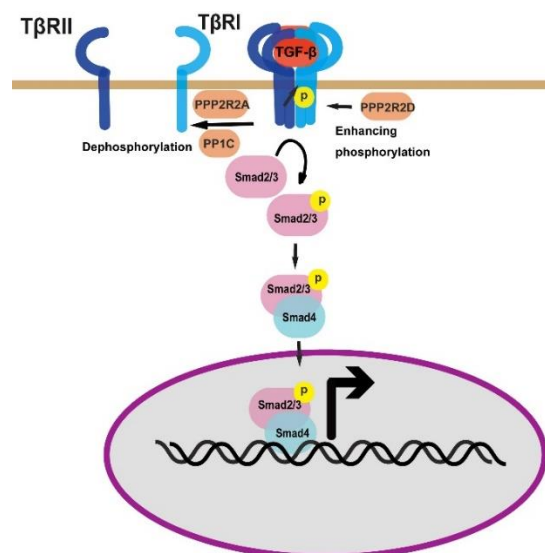
**Figure 5 : Signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine (d'après Moon et al. 2004)**

Dans les cancers, la voie Wnt peut être activée en absence du ligand par la mutation de gènes codant pour les protéines de cette voie. Le plus souvent, il s'agit de l'inactivation par mutation du gène APC induisant la synthèse d'une protéine APC tronquée incapable d'interagir et de neutraliser la  $\beta$ -caténine et/ou l'Axine. Mais dans 15% des tumeurs sporadiques ayant une protéine APC intacte, il peut aussi s'agir de mutations au niveau de séquences répétées du gène de l'Axine, celles activatrices, dans l'exon 3 du gène codant pour la  $\beta$ -caténine (CTNNB1) au niveau des sites de phosphorylation (Samowitz et al. 1999) ou de TCF4 (Shimizu et al. 2002).

### b. Voie du TGF- $\beta$

Au niveau cellulaire, la voie de signalisation du TGF- $\beta$  est impliquée dans différents processus biologiques tels que la prolifération, la différenciation, la migration et l'invasion, l'adhésion et l'apoptose (Sporn et al. 1986).

La liaison du TGF- $\beta$  à son récepteur TGFBRII permet le recrutement et l'activation par phosphorylation du récepteur de type I. En fonction du ligand initial, le récepteur activé phosphoryle des protéines SMAD (SMAD 2 et 3 / SMAD 1, 5 et 8) et les phospho-SMAD s'associent à SMAD4 (*Figure 6*). Les complexes formés sont transloqués dans le noyau où ils induisent la transcription de gènes cibles.



**Figure 6 : Phosphorylation des récepteurs TGF- $\beta$  (d'après Huang et Chen 2012)**



Certains gènes cibles de la voie TGF- $\beta$  sont des gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire comme CDKN1A (p21), CDKN1B (p27) et CDKN2B (p15). Leurs activations entraînent l'arrêt de la croissance cellulaire. Dans l'épithélium intestinal normal, TGF- $\beta$  joue un rôle suppresseur de tumeur en inhibant la prolifération cellulaire, l'invasion et les métastases et en induisant l'apoptose.

Cependant, à des stades tardifs de la carcinogenèse colorectale, le TGF- $\beta$  joue le rôle de promoteur tumoral et est hautement exprimé (Massague 2008).

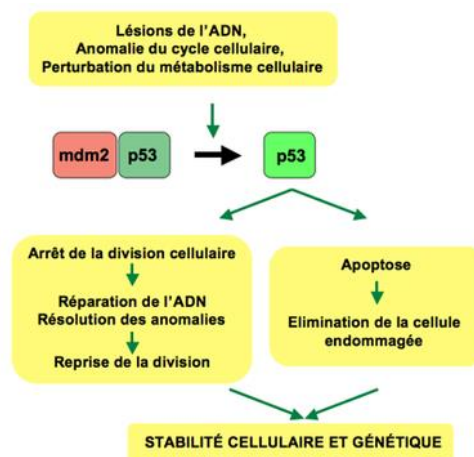
La mutation la plus fréquemment retrouvée est celle du récepteur II au TGF- $\beta$  (Gordon et Blobe 2008).

### c. Voie TP53

Le gène TP53 suppresseur de tumeur situé en 17p est inactivé à la fois par des pertes alléliques et des mutations ponctuelles dans 60 à 80% des cancers colorectaux CIN. Les mutations de ce gène impliquées dans la séquence adénôme-carcinome surviennent généralement tardivement dans la carcinogenèse colorectale (Baker et al. 1990). Dans une cellule normale, la protéine p53 est rapidement ubiquitylée puis dégradée par le protéasome.

La protéine P53 est considérée comme la protéine gardienne du génome (*Figure 7*) :

- Elle est le pivot régulateur central du cycle cellulaire : lorsque des mutations de l'ADN sont présentes en grand nombre, la protéine p53 permet l'arrêt momentané du cycle cellulaire en phase G1 afin de permettre à la cellule de réparer les erreurs.
- Elle induit l'apoptose en régulant positivement le gène Bax et négativement le gène Bcl2 (Levine et Oren 2009).



**Figure 7 : Voie de signalisation TP53 (d'après Thierry Soussi)**

## II. Classification de la progression tumorale

Au moment du diagnostic, Il est important de déterminer le stade du cancer, c'est-à-dire l'étendue de la maladie, en regardant jusqu'où les cellules cancéreuses se sont propagées.

Trois critères sont pris en compte :

- **La taille et la profondeur de la tumeur**

Lorsque des cellules cancéreuses apparaissent, elles sont d'abord localisées sur la surface interne de la paroi du côlon ou du rectum (la muqueuse). Puis, petit à petit, elles atteignent les couches plus profondes.

Étudier la taille et surtout la profondeur de la tumeur donne donc une indication sur le degré d'évolution de la maladie. En général, plus la tumeur est localisée et « superficielle », plus elle sera facile à traiter.

- **L'atteinte ou non des ganglions lymphatiques et le nombre de ganglions atteints**

Les cellules cancéreuses peuvent s'échapper du côlon ou du rectum pour atteindre d'autres localisations. Les ganglions lymphatiques, situés dans la graisse qui entoure le côlon ou le rectum, peuvent alors être touchés.

Si aucun ganglion n'est atteint, cela signifie que le cancer est à un stade précoce et qu'il est resté localisé. Si des ganglions sont atteints, cela signifie que la maladie a commencé à se disséminer.

Le nombre de ganglions envahis permet d'en savoir plus sur le degré de propagation du cancer. Moins il y en a, meilleures sont les chances de guérison.

- **La présence ou non de métastases**

Les cellules cancéreuses peuvent envahir d'autres organes que les ganglions lymphatiques et y développer des métastases.

Les organes les plus souvent touchés par des métastases lors d'un cancer colorectal sont le foie, les poumons et le péritoine. Les cancers colorectaux qui présentent des métastases sont plus difficiles à soigner.

- **Les stades selon la classification TNM**

Ces trois critères – taille et profondeur de la tumeur, atteinte ou non des ganglions lymphatiques et nombre de ganglions atteints, présence ou non de métastases – permettent de définir le stade du cancer selon la classification internationale TNM « Tumor, Nodes, Metastasis » (Sobin et Fleming 1997) :

- Stade 0 : la tumeur est in situ, ce qui signifie qu'elle est très superficielle et qu'elle n'envahit pas la sous-muqueuse, que les ganglions lymphatiques ne sont pas atteints et qu'il n'y a pas de métastase à distance.

- Stade I : la tumeur envahit la deuxième couche (sous-muqueuse) ou la couche musculaire (muscleuse) de la paroi du côlon ou du rectum, les ganglions lymphatiques ne sont pas atteints et il n'y a pas de métastase à distance.

- Stade II : les cellules cancéreuses ont traversé plusieurs couches de la paroi du côlon ou du rectum, mais aucun ganglion n'est atteint et il n'y a pas de métastase.

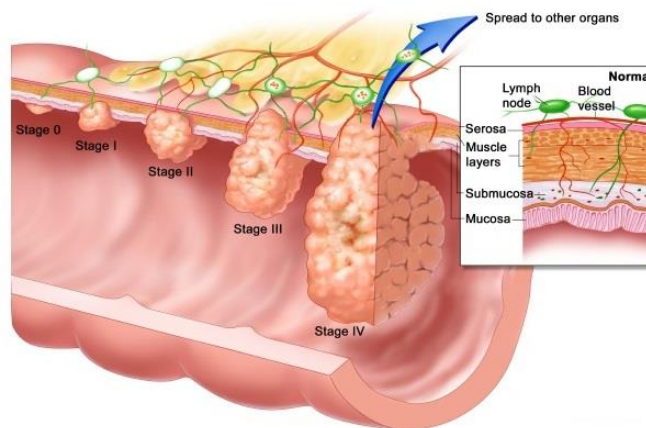
- Stade III : les cellules cancéreuses ont envahi les ganglions lymphatiques proches de la tumeur.

- Stade IV : le cancer s'est propagé au-delà du côlon ou du rectum, vers des emplacements ou des organes éloignés, généralement le foie ou les poumons.

| Classification TNM |                                                                                                                      |           |                                                                    |
|--------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|--------------------------------------------------------------------|
| <b>Tis</b>         | Le cancer ne touche que la première couche de la paroi interne du côlon ou du rectum.                                | <b>N0</b> | Les ganglions lymphatiques ne sont pas atteints.                   |
| <b>T1</b>          | Le cancer a traversé les premières couches de la paroi du côlon ou du rectum.                                        | <b>N1</b> | Le cancer a touché entre un et trois ganglions lymphatiques.       |
| <b>T2</b>          | Le cancer a atteint l'épaisse paroi musculaire du côlon ou du rectum.                                                | <b>N2</b> | Le cancer a touché quatre ganglions lymphatiques ou plus.          |
| <b>T3</b>          | Le cancer a envahi toute la paroi du côlon ou du rectum.                                                             | <b>M0</b> | Le cancer ne s'est pas propagé à un ou plusieurs organes éloignés. |
| <b>T4</b>          | Le cancer a franchi complètement la paroi du côlon ou du rectum et s'est propagé aux tissus ou organes environnants. | <b>M1</b> | Le cancer s'est propagé à un ou plusieurs organes éloignés.        |

**Figure 8 : Système de classification TNM**

En plus du stade *in situ* (stade 0), un total de quatre stades sont à identifier dans cette classification en fonction des lésions cancéreuses : la tumeur envahit la sous muqueuse (I), la tumeur envahit la muscleuse (II), les ganglions sont atteints (III), la tumeur s'étend au tissu voisin et peut induire des métastases (IV) (Figure 9).



**Figure 9 : Classification des lésions cancéreuses**

- **Nouvelle classification moléculaire**

Ces dernières années, plusieurs études d'expression génique, menées en parallèle, ont permis d'individualiser de nouveaux groupes de pronostic variable, soulignant l'hétérogénéité des CCR. Ces résultats ont donné naissance à une classification de consensus (Consensus Molecular Subtypes) comportant 4 groupes (*Figure 10*) :

- CMS1 (14%) : CCR MSI+, caractérisé par une augmentation d'expression des gènes de l'immunité
- CMS2 (37%) : CCR CIN+ avec mutation de TP53 et activation de la voie Wnt et Myc
- CMS3 (13%) : CCR avec un taux élevé de mutations KRAS et dérégulation métabolique
- CMS4 (23%) : CCR de type mésenchymateux, avec activation des voies TGF et VEGF (angiogénèse) et augmentation des gènes de l'EMT (invasion)

| CMS1<br>MSI immune                 | CMS2<br>Canonical      | CMS3<br>Metabolic                    | CMS4<br>Mesenchymal                                         |
|------------------------------------|------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------------------------------|
| 14%                                | 37%                    | 13%                                  | 23%                                                         |
| MSI, CIMP high, hypermutation      | SCNA high              | Mixed MSI status, SCNA low, CIMP low | SCNA high                                                   |
| <i>BRAF</i> mutations              |                        | <i>KRAS</i> mutations                |                                                             |
| Immune infiltration and activation | WNT and MYC activation | Metabolic deregulation               | Stromal infiltration, TGF- $\beta$ activation, angiogenesis |
| Worse survival after relapse       |                        |                                      | Worse relapse-free and overall survival                     |

**Figure 10 : CMS des CCR (d'après Guinney et al. 2015)**

De plus les CCR CMS1 sont fréquemment diagnostiqués au sein du côlon droit (comme les CMS3) et présentent la meilleure survie sans récurrence ; contrairement au groupe CMS2 qui est associé au côlon gauche. Le groupe CMS4 est associé aux stades avancés et présente la moins bonne survie sans récurrence.

Ces signatures récentes n'ont pas encore d'application clinique ; il semble nécessaire de simplifier la pratique de séquençage pour une utilisation quotidienne en clinique. Des signatures prédictives de l'efficacité des chimiothérapies et des thérapies ciblées sont également en cours d'analyse.

---

## Chapitre II : Les traitements du cancer colorectal

---

Différents types de traitements peuvent être utilisés pour traiter un cancer colorectal : la chirurgie, la radiothérapie (pour les cancers du rectum), la chimiothérapie, les thérapies ciblées et plus récemment l'immunothérapie.

Les traitements contre le cancer peuvent avoir différents objectifs, selon le traitement choisi et selon le stade du cancer :

- Guérir le cancer en supprimant la totalité des cellules cancéreuses
- Empêcher le cancer de se développer et de se propager
- Réduire le risque de récurrence
- Améliorer le confort et la qualité de vie de la personne malade, en traitant les troubles causés par le cancer ou les traitements et en atténuant les symptômes liés à la maladie, comme la douleur.

Il arrive parfois qu'un seul type de traitement soit nécessaire. Dans d'autres cas, une association de traitements est nécessaire pour mieux maîtriser la maladie. On peut ainsi réaliser une chirurgie et compléter ensuite le traitement par une chimiothérapie. Le traitement complémentaire est appelé traitement adjuvant. Son objectif est de compléter l'action du traitement principal et de renforcer son efficacité.

### I. La chirurgie

La chirurgie est le traitement principal du cancer du côlon. Elle consiste à enlever la portion du côlon atteinte par la tumeur et le réseau de ganglions correspondant (on parle de curage ganglionnaire). Suivant la localisation et l'étendue de la tumeur, une portion plus ou moins grande du côlon est retirée.

L'intervention se déroule de la même façon par laparotomie ou par coelioscopie. Elle commence par une phase d'observation pendant laquelle le chirurgien examine le côlon et la cavité abdominale afin de confirmer l'absence d'extension locorégionale de la tumeur et l'absence de métastase au niveau du foie.

Après cette phase d'observation, le chirurgien retire le segment du côlon où se situe la tumeur, ainsi que la partie du mesocôlon, le tissu graisseux qui contient les vaisseaux sanguins et les ganglions, reliée à ce segment.

Si la tumeur est située dans la moitié droite du côlon, le chirurgien retire le côlon droit et la moitié droite du côlon transverse (hémicolectomie droite).

Si la tumeur est située dans la moitié gauche du côlon, le chirurgien enlève le côlon gauche et la moitié gauche du côlon transverse (hémicolectomie gauche).

Si la tumeur est située dans la dernière portion du côlon, juste avant le rectum, le chirurgien retire le côlon sigmoïde (sigmoïdectomie).

Dans des cas plus rares, la totalité du côlon est enlevée (colectomie totale).

L'objectif de la chirurgie est de réaliser l'ablation de la tumeur du côlon en obtenant des marges de la paroi du côlon saines et un curage ganglionnaire satisfaisant. En effet, la qualité de l'exérèse chirurgicale est un facteur pronostique de récurrence locale et de survie.

Pour cette raison, dans tous les cas, une portion saine du côlon (au moins 5 centimètres) doit être retirée de part et d'autre de la tumeur pour assurer une marge de sécurité et réduire le risque de récurrence.

Certaines métastases peuvent être retirées par chirurgie. On dit alors qu'elles sont résecables.

Les possibilités de pratiquer une chirurgie dépendent de la localisation et du nombre de métastases :

- Si les métastases sont situées au niveau du péritoine et qu'elles sont peu nombreuses et très localisées, elles peuvent être retirées en même temps que la tumeur primitive.
- Si les métastases sont situées au niveau du foie, elles sont parfois retirées en même temps que la tumeur primitive, mais le plus souvent une deuxième intervention est programmée deux ou trois mois plus tard pour les retirer. Dans ce cas, une chimiothérapie est proposée entre les deux opérations pour réduire la taille des métastases et faciliter leur exérèse.

En cas de métastases résécables au niveau des poumons, l'intervention chirurgicale est toujours réalisée en deux temps avec une chimiothérapie entre les deux opérations.

Si les métastases ne sont pas opérables en raison de leur nombre ou de leur inaccessibilité, des traitements par chimiothérapies et thérapies ciblées sont proposés.

## **II. La chimiothérapie**

La chimiothérapie correspond à l'administration de médicaments ciblant les cellules cancéreuses, plus particulièrement en agissant sur les mécanismes de division cellulaire de manière non spécifique.

Plusieurs classes de médicaments sont disponibles : agents alkylants, antimétabolites et inhibiteurs de topo-isomérases.

Tous ces médicaments ont pour but de détruire les cellules cancéreuses ou d'empêcher leur multiplication.

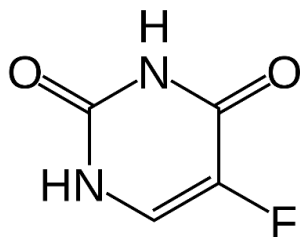
Ces traitements peuvent être administrés avant une opération de chirurgie afin de réduire le volume tumoral et de faciliter l'exérèse de la tumeur (chimiothérapie néo-adjuvante) ou après la chirurgie pour éliminer les cellules résiduelles (chimiothérapie adjuvante).

Les 3 principaux médicaments cytotoxiques utilisés dans le traitement du cancer colorectal sont : le 5-fluorouracile, l'oxaliplatine et l'irinotécan (Gill et al. 2003).

### **1. 5-fluorouracile (5-FU®)**

Utilisé depuis les années cinquante, le 5-FU est le traitement de référence utilisé dans le traitement du CCR et, est actuellement encore, un des médicaments les plus prescrits en cancérologie (Seitz et Rougier 1994 ; Rougier et Ducreux 1997). Le 5-FU appartient à la classe des anti-métabolites de type anti-pyrimidique dont le mécanisme d'action principal est de bloquer la méthylation de l'uracile en thymine aboutissant à une inhibition de la synthèse de l'ADN (Diasio et Harris 1989 ; Pinedo et Peters 1988). Il s'agit d'un dérivé fluoré de l'uracile, synthétisé en 1957 par Heidelberger et Duschinsky (Duschinsky et al. 1957).

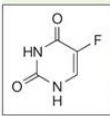




**Figure 11 : Structure chimique du 5-FU**

L'activité pharmacologique du 5-FU nécessite au préalable un métabolisme intracellulaire. Le 5-FU n'étant pas utilisable par voie orale pour des raisons de mauvaise biodisponibilité liée à la présence de dihydropyrimidine déshydrogénase (DPD) intestinale (enzyme du catabolisme du 5-FU), des précurseurs oraux du 5-FU ont été développés. Les progrès initiaux observés dans le domaine de la chimiothérapie du CCR sont le résultat de l'optimisation de cet ancien médicament associée à la prescription concomitante d'un modulateur de son mécanisme d'action : l'acide folinique (Lokich et al. 1989 ; Poon et al. 1989). Plus récemment, l'utilisation de précurseurs oraux du 5-FU a modifié et enrichi les options thérapeutiques de la prise en charge du cancer colorectal, et plus récemment, du cancer gastrique. Deux précurseurs oraux du 5-FU sont actuellement disponibles et utilisés en oncologie digestive : le Xeloda® (capécitabine) et l'UFT® (association tégaflur-uracile).

Le 5-FU agit principalement en phase S du cycle cellulaire. Le 5-FU se substitue à l'uracile constituant essentiel des acides nucléiques ADN et ARN. Le 5-FU est transformé par l'organisme en 3 principaux métabolites actifs : le FdUMP (5-fluoro-2'-désoxyuridine-monophosphate, le FdUTP (5-fluoro-2'-désoxyuridine-triphosphate) et le FUTP (fluorouridine-triphosphate). Ces métabolites bloquent la synthèse de l'ARN et inhibent une enzyme, la thymidylate synthétase, qui, en retour, bloque la synthèse de la thymidine, à partir l'uracile. Seul le 5FdUMP est inhibiteur de la thymidylate synthétase (Matuo et al. 2010, Matuo et al. 2009) (*Figure 12*).



**Figure 12 : Métabolisme du 5-FU (d'après Longley et al. 2003)**

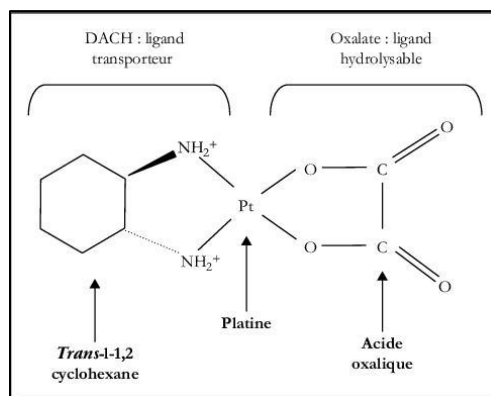
Ce médicament est généralement bien toléré avec des toxicités sévères inférieures à 5%. Les principaux effets toxiques sont des diarrhées, des stomatites, une toxicité cardiaque. Cependant, les patients présentant un déficit en DPD peuvent développer des toxicités sévères allant jusqu'au coma.

Le taux de réponse objective a été amélioré grâce à la modulation du 5-FU par acide folinique, par d'autres agents cytotoxiques (dérivés du platine, méthotrexate) ou par d'autres schémas d'administration (perfusion continue selon différents protocoles, chronomodulation) permettant notamment une augmentation de la dose de 5-FU.

Les études de phase III associant le 5-FU à l'irinotécan ou à l'oxaliplatine rapportent des survies médianes de 16 à 19 mois (De Gramont et al. 2000 ; Douillard et al. 2000 ; Lévi et al. 1995).

## 2. Oxaliplatine (Eloxatin®)

L'oxaliplatine (1R, 2R-diaminocyclohexane) est un agent alkylant synthétisé dès les années 1970, dont la structure chimique se distingue des composés classiques du platine par la présence d'un radical porteur cyclique "DACH" (diaminocyclohexane) (*Figure 13*).



**Figure 13 : Structure chimique de l'oxaliplatine**

L'oxaliplatine interagit principalement au niveau de l'ADN, induisant des lésions primaires (adduits) qui bloquent sa réplication et sa transcription en ARN. Le type le plus fréquent d'adduits est représenté par les ponts intrabrins, qui établissent des liaisons covalentes irréversibles entre deux résidus guanines (Eastman 1986). Les autres types d'adduits sont les ponts interbrins et les liaisons aux protéines satellites de l'ADN (Woynarowski et al. 1997).

Des lésions de cassure simple-brin, qui sont probablement des lésions secondaires, sont également observées dans les cellules traitées par l'oxaliplatine. De manière intéressante, en dépit d'un nombre de lésions plus limité, l'oxaliplatine est aussi puissant que le cisplatine concernant l'induction *in vitro* de l'inhibition de croissance et la survenue du processus d'apoptose cellulaire (Faivre et Woynarowski 1998). Cependant l'activité du cisplatine est très faible dans les lignées cellulaires de côlon et il n'est pas actif dans le traitement des CCR.

L'activité de l'oxaliplatine en première ligne chez des patients ayant un cancer colorectal métastatique a été évaluée au cours de deux études de phase II (Becouarn et al. 1998 ; Diaz-Rubio et al. 1998). L'oxaliplatine était administré à la dose de 130mg/m<sup>2</sup> i.v. toutes les trois semaines. Même si l'activité de l'oxaliplatine en monothérapie dans le cancer colorectal a été démontrée, c'est en association avec le 5-FU que les résultats ont été les plus significatifs.

L'activité clinique de l'association 5-FU/acide folinique/oxaliplatine a été démontrée par les études de chrono-thérapie ainsi que par les schémas de type FOLFOX (Bleiberg et al. 1998).

Ce n'est que plus tard qu'ont été réalisés les essais *in vitro* sur des lignées cellulaires de cancer du côlon et *in vivo* sur des xénogreffes de cancers coliques humains (Raymond et al. 1997) démontrant une synergie entre l'oxaliplatine et le 5-FU, indépendamment de toute chronomodulation.

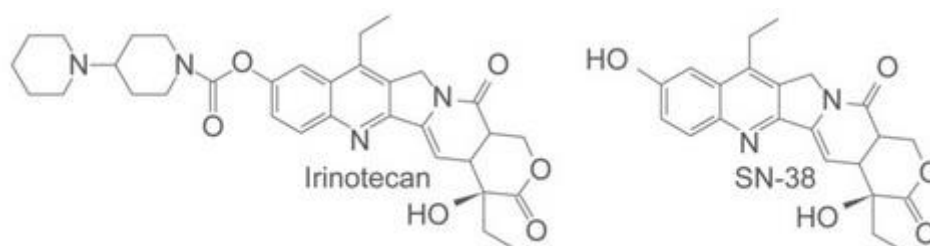
Le mécanisme exact de cette synergie est peu connu, mais certains résultats expérimentaux suggèrent que l'oxaliplatine inhibe la dihydropyrimidine déshydrogénase diminuant ainsi le catabolisme du 5-FU (Fischel et al. 2002).

Les principaux effets indésirables de l'oxaliplatine sont des nausées et vomissements ainsi que des neuropathies périphériques qui peuvent perdurer longtemps.

### 3. Irinotécan (Campto®)

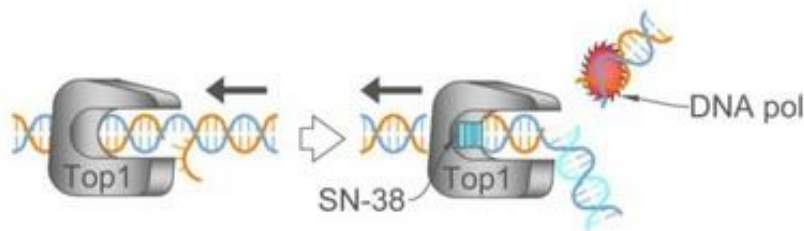
L'irinotécan est un dérivé hémisynthétique de la camptothécine. La camptothécine est un alcaloïde pentacyclique isolé de *Camptotheca acuminata* un arbre ornemental très répandu en Chine (Wall et al. 1976).

Il s'agit d'un agent antinéoplasique qui agit comme inhibiteur spécifique de l'ADN topo-isomérase I. L'irinotécan est métabolisé par la carboxylestérase dans la plupart des tissus (mais principalement le foie) en un métabolite actif, le SN-38, qui s'est révélé 100 fois plus actif que l'irinotécan sur la topo-isomérase I purifiée et plus cytotoxique sur plusieurs lignées de cellules tumorales murines ou humaines.



**Figure 14 : Structure chimique de l'irinotécan et de son métabolite actif**

L'inhibition de l'ADN topo-isomérase I par l'irinotécan ou le SN-38 induit des lésions simple brin de l'ADN qui bloquent la fourche de réplication de l'ADN. Celle-ci convertie les lésions simples brins en lésions doubles brins ce qui entraîne l'activité cytotoxique (Figure 15). Celle-ci est fonction du temps de contact avec les cellules et est spécifique de la phase S.



**Figure 15 : Mécanisme d'action de l'irinotécan (d'après Kline et El-Deiry 2013)**

*In vitro*, l'irinotécan et le SN-38 ne sont pas significativement reconnus par la P-glycoprotéine MDR et exercent des effets cytotoxiques sur des lignées cellulaires résistantes à la doxorubicine et à la vinblastine.

De plus son activité cytotoxique sur les cellules, l'irinotécan a également une action sur l'angiogénèse en inhibant la néo-vascularisation par diminution d'expression des protéines HIF et VEGF et par conséquent de leurs cibles transcriptionnelles (Kamiyama et al. 2005).

L'irinotecan est généralement administré en association avec le 5-FU sous le protocole FOLFIRI qui permet une amélioration significative du traitement (Douillard et al. 2000). Les principaux effets indésirables de cette molécule sont des diarrhées et vomissements ainsi que des neutropénies.

### III. Les thérapies ciblées

Le manque de spécificité des agents de chimiothérapies vis-à-vis des cellules tumorales limite leurs utilisations et engendrent une toxicité importante pour le patient. Au gré des découvertes, de nouvelles cibles sont identifiées et de nouvelles thérapies se sont développées.

Les thérapies ciblées sont des molécules qui bloquent des protéines, facteurs de croissance ou récepteurs exprimés par les cellules cancéreuses afin d'empêcher leur prolifération ou leur dissémination. Ces molécules sont le plus souvent des anticorps monoclonaux (protéines recombinantes TRAP) ou des petites molécules inhibitrices de tyrosine kinase.

#### 1. Les inhibiteurs du VEGF

Le VEGF (vascular endothelial growth factor) est la deuxième protéine phare ciblée par les médicaments de thérapies ciblées. Il est l'effecteur principal de

l'angiogénèse ; processus fondamental de formation de nouveaux vaisseaux permettant la croissance tumorale et le développement métastatique.

Le bevacizumab est un anticorps monoclonal anti-VEGF. Il se lie au VEGF, inhibant de ce fait la liaison du VEGF à ses récepteurs. Il s'agit du premier médicament anti-angiogénique mis sur le marché. Le bevacizumab a montré un réel intérêt chez les patients en stade métastatique, seul ou en combinaison avec les protocoles FOLFOX ou FOLFIRI (Hurwitz et al. 2004 ; Giantonio et al. 2007).

D'autres molécules inhibitrices du VEGF sont également approuvées comme l'aflibercept, le sunitinib, le sorafénib, le régorafénib et le nintedanib.

## **2. Les inhibiteurs de l'EGFR**

Le récepteur de l'epidermal growth factor (EGFR) exerce un rôle important dans la croissance tumorale (Spano et al. 2005). Ce récepteur est surexprimé dans un grand nombre de tumeurs solides et sa surexpression est associée à la résistance acquise aux chimiothérapies (Petitprez et Larsen 2013).

Les voies de signalisation de l'EGFR sont impliquées dans le contrôle de la survie cellulaire, de la progression du cycle cellulaire, de l'angiogénèse, de la migration et de l'invasion cellulaire ainsi que du potentiel métastatique des cellules (Huber 2007 ; Singh et Harris 2005 ; Holbro et Hynes 2004).

Les deux médicaments approuvés ciblant l'EGFR sont le cétuximab et le panitumumab.

Le cétuximab est un anticorps monoclonal chimérique IgG1 spécifiquement dirigé contre le récepteur du facteur de croissance épidermique. Il se lie à l'EGFR avec une affinité qui est approximativement 5 à 10 fois supérieure à celle des ligands endogènes (Goldstein et al. 1995). Le cétuximab bloque la liaison des ligands endogènes de l'EGFR aboutissant à une inhibition de la fonction du récepteur. De plus, il induit l'internalisation de l'EGFR, ce qui entraîne une régulation négative de l'EGFR (Sunada et al. 1986). Le cétuximab recrute également les cellules immunes effectrices cytotoxiques contre les cellules tumorales exprimant l'EGFR (cytotoxicité médiée par les cellules dépendantes des anticorps-ADCC) (Seo et al. 2014). Le cétuximab ne se lie pas aux autres récepteurs de la famille HER.

La protéine produite par le proto-oncogène RAS (rat sarcoma) joue un rôle central dans la transduction des signaux de l'EGFR en aval. Au sein des tumeurs, l'activation

des gènes RAS par l'EGFR contribue à l'augmentation de la prolifération, de la survie et de la production des facteurs angiogéniques favorisée par l'EGFR.

Les gènes RAS constituent l'une des familles d'oncogènes le plus fréquemment activées dans le cadre des cancers humains. Les mutations des gènes RAS au niveau de certains hot-spots des exons 2, 3 et 4 engendrent une activation constitutive des protéines RAS indépendamment des signaux de l'EGFR. La mutation Ras est donc devenue un facteur prédictif de réponse au traitement par le cétuximab (Lièvre et al. 2006).

Le principal effet indésirable de ce médicament est une toxicité cutanée. Le développement de ces rashs cutanés a été corrélé avec une réponse positive au traitement (Liu et al. 2013) mais ce concept a été récemment remis en cause.

D'autres inhibiteurs de tyrosine kinase ont également été développés tels que le géfitinib ou l'erlotinib mais ces deux molécules sont principalement utilisées dans le traitement des cancers bronchiques.

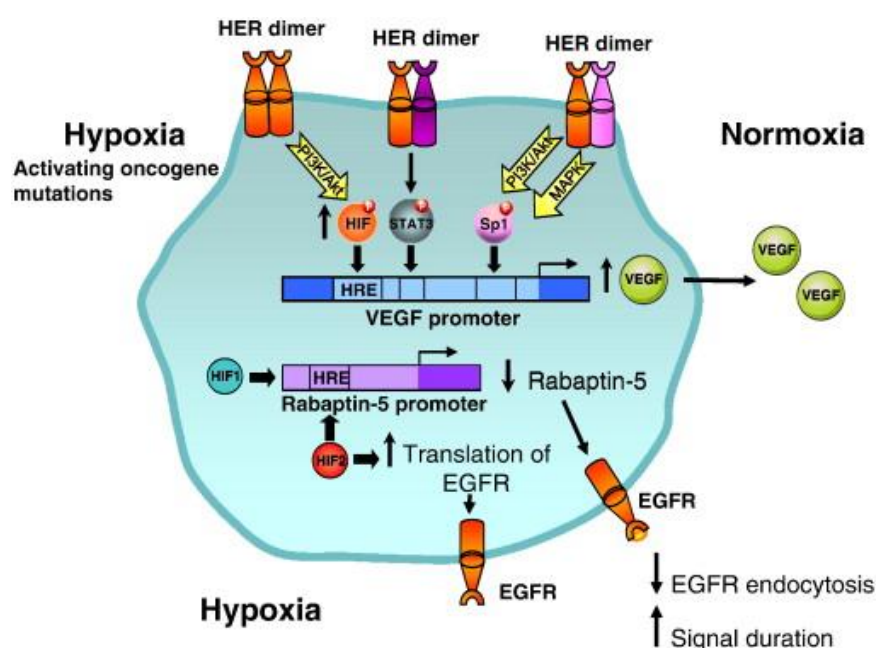
Hormis le statut Ras, les scientifiques s'intéressent de plus en plus à l'impact de la localisation de la tumeur primitive. Plusieurs études récentes suggèrent que le cancer colorectal métastatique (mCRC) provenant de différentes parties du colon (côté gauche ou côté droit) auraient des résultats cliniques différents qui pourrait, en partie, être un reflet de l'origine embryonnaire différente du tissu normal formant le côté gauche et le côté droit du côlon. Dans le mCRC, les patients avec des tumeurs localisées à droite ont généralement un plus mauvais pronostic que ceux avec des tumeurs côté gauche (Loupakis et al. 2015 ; Arnold et al. 2017). De plus, une analyse rétrospective de plusieurs études cliniques suggère que les anticorps anti-EGFR seraient plus actifs contre les tumeurs côté gauche Ras wt comparativement aux tumeurs côté droit Ras wt (Arnold et al. 2017 ; Holch et al. 2017 ; Cao et al. 2017). De façon intéressante, il a été décrit que le ciblage du VEGF peut également être différent entre les tumeurs du côté droit et du côté gauche. C'est en particulier le cas pour le bevacizumab qui aurait un bénéfice sur la survie uniquement pour les tumeurs rectales (Boisen et al. 2013 ; He et al. 2017), ceci suggérant que les tumeurs des côtés droit et gauche peuvent répondre différemment aux agents anticancéreux ciblant l'EGFR et le VEGF.

Néanmoins, des études supplémentaires sont nécessaires afin de confirmer ces données.

### 3. Combinaison anti-EGFR et anti-VEGF

Le premier lien entre l'activité des récepteurs EGFR et l'expression du VEGF a été documenté il y a plus de 20 ans quand il a été démontré que deux ligands des EGFR, l'EGF et le TGF $\alpha$ , pouvaient stimuler l'expression du VEGF dans les cellules gliales et dans les kératinocytes hyperprolifératifs.

L'EGF régule l'expression du VEGF via la voie de signalisation MAPK/PI3K entraînant l'activation de trois facteurs de transcription : STAT3, Sp1 et HIFs (Larsen et al. 2011).



**Figure 16 : Interaction entre la signalisation EGFR et VEGF (d'après Larsen et al. 2011)**

De ce fait, plusieurs études précliniques ont montré des résultats intéressants en combinant différentes molécules anti-EGFR avec des molécules anti-VEGF (inhibiteurs de tyrosine kinase ou anticorps monoclonaux). Malgré les résultats encourageant de l'étude BOND2 (combinaison de bévacizumab et de cétuximab) (Saltz et al. 2007), les études plus récentes PACCE et CAIRO2, n'ont pas montré de bénéfice dans la combinaison bevacizumab/chimiothérapie comparativement aux traitements seuls, même chez les patients KRAS sauvage (Hecht et al. 2009 ; Tol et al. 2008).

Cependant, une étude combinant deux petites molécules, l'afatinib et le nintedanib, a montré une efficacité synergique dans des modèles de cancers colorectaux



réfractaires à une combinaison des deux anticorps monoclonaux (Poindessous et al. 2011).

Plus récemment, l'étude DREAM a néanmoins démontré une efficacité de la combinaison bevacizumab /erlotinib chez les patients atteints de cancers colorectaux métastatiques (Tournigand et al. 2015).

## IV. Immunothérapie

L'immunothérapie consiste à utiliser les défenses immunitaires de l'organisme pour qu'elles s'attaquent aux cellules cancéreuses et les détruisent. Différentes approches ont été utilisées pendant des décennies, avant de s'orienter récemment vers une nouvelle stratégie prometteuse : activer les cellules immunitaires avec des médicaments pour rompre leur tolérance vis-à-vis des cellules cancéreuses et stimuler ainsi leur destruction par l'organisme. Après avoir prouvé son efficacité sur le mélanome métastatique (Hodi et al. 2010), cette nouvelle approche commence à montrer de bons résultats dans d'autres types de cancers (Voena et Chiarle 2016).

La révolution actuelle de l'immunothérapie a été inaugurée par le développement en clinique d'anticorps monoclonaux, dont l'objectif est de bloquer des récepteurs impliqués dans la tolérance immunitaire. Il s'agit donc de thérapies ciblant le système immunitaire et non pas la cellule cancéreuse elle-même, avec l'objectif de permettre le développement d'une réaction immunitaire anti-tumorale.

Parmi les molécules utilisées, on trouve :

- le rituximab qui est utilisé pour traiter les lymphomes qui résistent à la chimiothérapie ou en cas de récives
- l'ipilimumab et le pembrolizumab pour traiter les mélanomes ayant entraîné des métastases
- le nivolumab, lui aussi contre les mélanomes mais également contre les cancers avancés du rein, du poumon et les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou

L'immunothérapie peut être utilisée sous forme de traitement d'attaque (traitement général) ou de façon préventive pour éviter les récives (traitement local à l'aide d'injections).

On l'utilise d'un point de vue préventif dans le cadre du cancer de la vessie (et de plus en plus de la plèvre et du col de l'utérus à un stade métastatique) pour réduire les risques de rechutes suite à une ablation par chirurgie. Le traitement est local puisqu'il s'agit de stimuler l'immunité uniquement au niveau vésical en y injectant du BCG.

D'un point de vue curatif, l'immunothérapie consiste à injecter des activateurs du système immunitaire (anticorps, cytokines, immunoglobulines, interleukine-2 ou interférons produits par génie génétique) dans l'ensemble de l'organisme. Le traitement est général puisque le corps entier va en bénéficier.

L'immunothérapie est une méthode porteuse d'espoir. Néanmoins, la durée de vie globale des patients n'est que faiblement augmentée alors que les effets indésirables sont très importants avec notamment des syndromes grippaux fréquents, des nausées et des maux de ventre, des troubles cutanés, une importante rétention d'eau, des dépressions, une importante fatigue et une perte d'appétit et donc de poids, des troubles thyroïdiens et hépatiques, des troubles de la formule sanguine, etc.

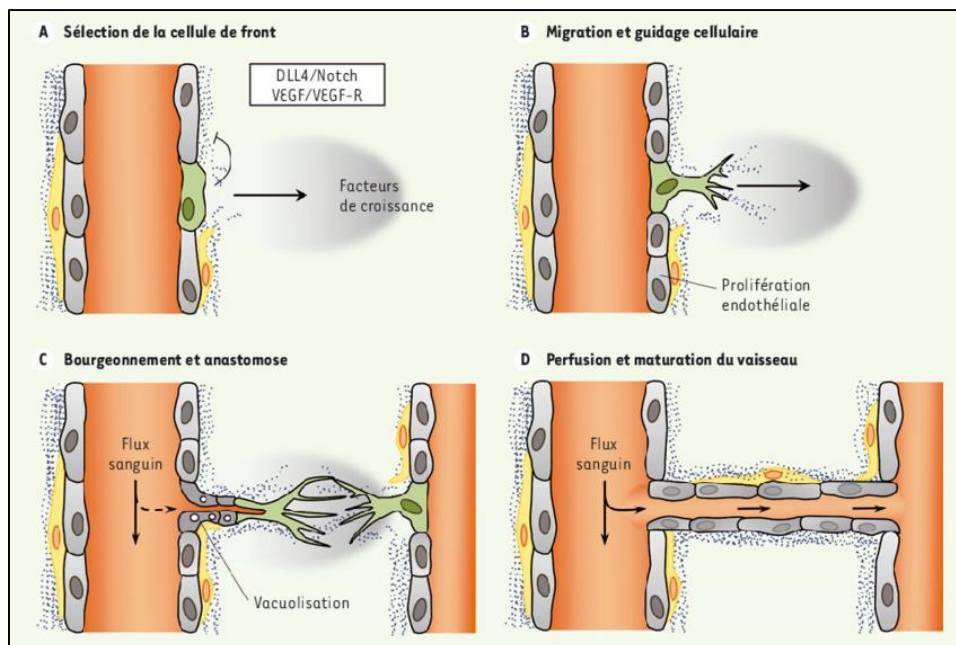
---

## Chapitre III : L'angiogénèse

---

### I. Définition

L'angiogénèse se définit comme la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants. Ceci est avant tout un phénomène physiologique indispensable à de nombreux processus biologiques. L'activité angiogénique est prédominante lors du développement embryonnaire et post natal. La formation du réseau vasculaire s'établit selon deux étapes distinctes. Une première étape de vasculogénèse permet la formation d'un réseau primitif à partir de cellules progénitrices endothéliales (ou angioblastes). Ce phénomène est restreint à une étape précoce du développement vasculaire. L'étape d'angiogénèse, à proprement parler, permet ensuite de créer de nouveaux vaisseaux sanguins et donc d'étendre le réseau vasculaire. Le développement de ce réseau mature se fait par élongation, bourgeonnement, division et remodelage des vaisseaux existants (Swift et Weinstein 2009 ; Carmeliet 2000).



**Figure 17 : Les étapes de l'angiogénèse normale (d'après Treps et Gavard 2015)**

En raison de la longévité des cellules endothéliales, à l'âge adulte, le système vasculaire est généralement à l'état quiescent. En effet, l'activité angiogénique n'intervient que de façon locale ou transitoire. On retrouve notamment ce phénomène lors des menstruations, de la grossesse (Otani et al. 1999), du processus de cicatrisation (Tonnesen et al. 2000), de la réparation osseuse ou encore au niveau des cellules musculaires lors d'exercices physiques prolongés (Gustafsson et al. 1999). Bien qu'à l'état quiescent, l'angiogénèse peut donc être activée à l'âge adulte lors de stimuli particuliers.

L'angiogénèse est un processus finement régulé par un nombre important de facteurs activateurs ou inhibiteurs. Lors de dérèglement ou dysfonctionnement du système de régulation, ce phénomène peut devenir pathologique et être impliqué dans le développement de nombreuses maladies.

L'angiogénèse est nécessaire au développement tumoral et est également impliqué dans d'autres processus pathologiques tels que la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA), certains problèmes cardiaques ou respiratoires, les phénomènes d'inflammations, certaines infections, ou encore l'obésité (Carmeliet et Jain 2000).

## **II. L'angiogénèse tumorale**

### **1. Découverte du lien angiogénèse/cancer**

Le lien entre cancer et angiogénèse est établi depuis longtemps. Il y a plus d'un siècle, il a été mis en évidence que la croissance tumorale était généralement accompagnée d'une augmentation de la vascularisation (Goldmann 1908). Plus tard, il a été proposé que la croissance tumorale était fortement dépendante du développement vasculaire. En 1968, il a été décrit que les cellules cancéreuses pouvaient produire des substances angiogéniques et ainsi induire, à distance, la formation de nouveaux vaisseaux sanguins (Greenblatt et Shubi 1968 ; Ehrmann et Knoth 1968).

Enfin, en 1971, le lien entre cancer et angiogénèse fut confirmé par le Dr. Folkman ; il émit l'hypothèse qu'inhiber l'angiogénèse, et donc la croissance vasculaire, appauvrirait la tumeur en oxygène et nutriments et bloquerait donc le développement tumoral par induction d'hypoxie au sein de la tumeur (Folkman 1971). A partir de cette

théorie est né le concept de thérapie anti-angiogénique ciblée. Suite à ces observations et hypothèses, de nombreuses études ont été réalisées afin de déterminer les facteurs responsables de l'angiogénèse. Ceci a conduit à l'identification de nombreux régulateurs de l'angiogénèse dont certains représentent aujourd'hui des cibles thérapeutiques.

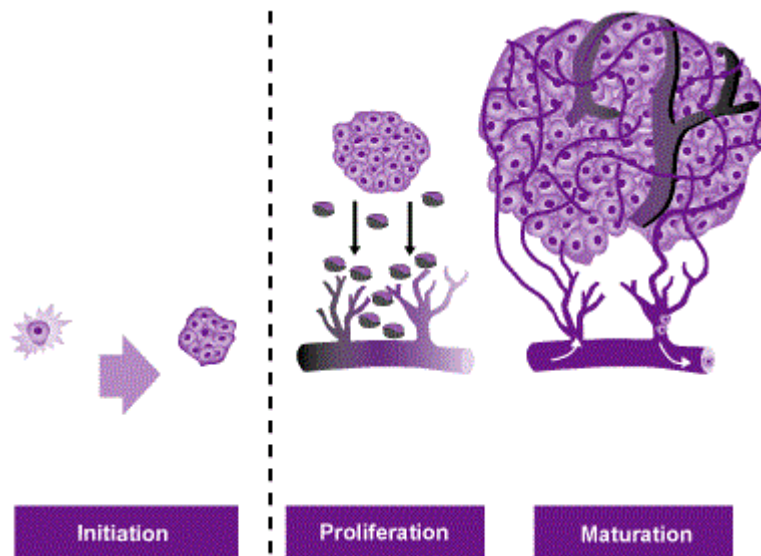
## **2. Croissance tumorale et transition angiogénique**

Il est établi que la croissance tumorale n'est pas linéaire et se déroule selon deux phases distinctes : une première étape dite avasculaire suivie d'une seconde dans laquelle la vascularisation, et donc l'angiogénèse, jouent un rôle essentiel (Bergers et Benjamin 2003).

Dans la plupart des cas, les cellules tumorales entament leur croissance dans un environnement avascularisé. Jusqu'à une taille généralement de quelques millimètres cube, l'apport en nutriment et en oxygène est assuré par simple diffusion passive. Les tumeurs atteignent ensuite un état dormant qui se caractérise par un équilibre entre prolifération et apoptose (ou nécrose). Cette phase de dormance tumorale a été mise en évidence lors d'autopsie de patients décédés suite à des causes autres que le cancer (Black et Welch 1993). Ce résultat suppose que seule une partie des tumeurs dormantes entre dans la seconde phase de croissance vascularisée. Afin de se développer pleinement, les tumeurs acquièrent ensuite un phénotype angiogénique (Gullino 1978).

Le passage des cellules cancéreuses dites dormantes vers un état plus invasif est appelé transition angiogénique ou switch angiogénique (Hanahan et Folkman 1996). Ce phénomène se traduit par la libération de facteurs proangiogéniques.

Ceci conduit à une rupture de l'équilibre entre les régulateurs pro et antiangiogéniques et ainsi à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins nécessaires au développement tumoral et à la dissémination métastatique (Bergers et Benjamin 2003).



**Figure 18 : Transition angiogénique**

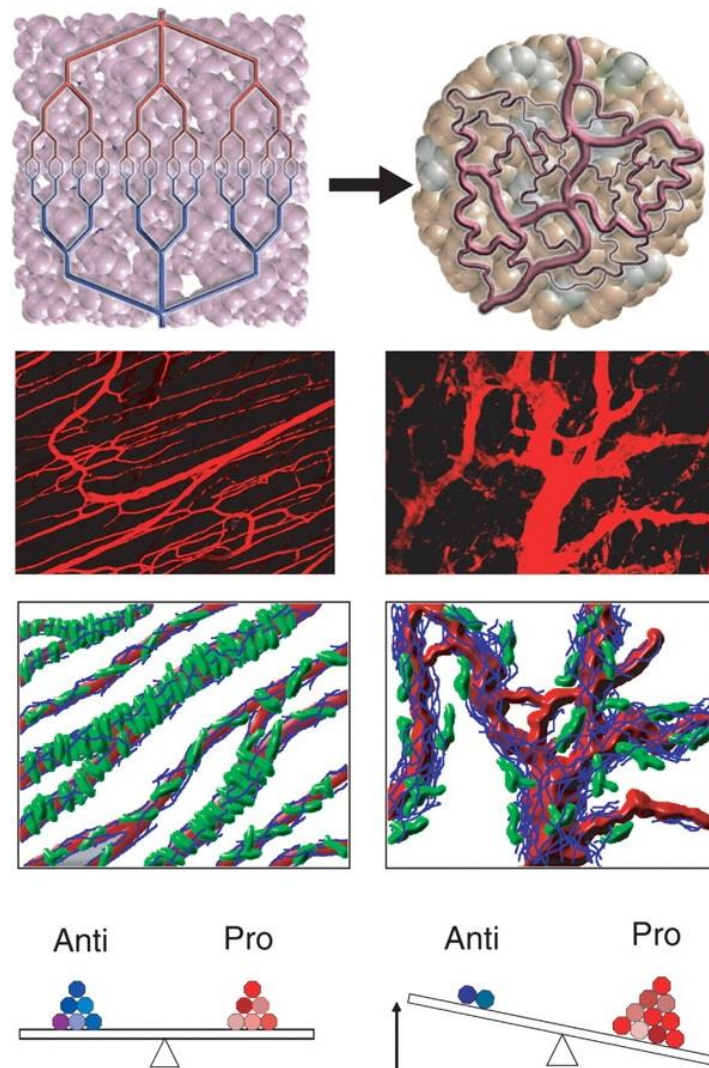
Différents stimuli peuvent être à l'origine de cette transition et de l'initiation de l'angiogénèse : stress métabolique, stress mécanique, réponse immune et inflammatoire ou encore par exemple des mutations géniques (activation d'oncogènes ou délétion de gènes suppresseurs de tumeurs) (Kerbel 2000 ; Carmeliet 1999).

Parmi ces différents facteurs, l'hypoxie semble être un élément clé. Comme toutes cellules, les cellules cancéreuses ont besoin d'apport en oxygène et nutriments pour leur croissance. A partir d'un certain stade de développement de la tumeur, des cellules tumorales se trouvent trop éloignées des vaisseaux sanguins et l'apport par simple diffusion passive ne peut plus avoir lieu. Ces cellules se retrouvent donc en situation d'hypoxie, libèrent des facteurs pro-angiogéniques et ainsi induisent le phénomène d'angiogénèse (Carmeliet et Jain 2000). Cette transition angiogénique peut avoir lieu à différents stades de la progression tumorale en fonction du type de tumeurs et de l'environnement. Elle peut notamment avoir lieu à des stades précoces de la progression (lésions pré-cancéreuses) (Bergers et Benjamin 2003).

### **3. Réseau vasculaire tumoral**

Les vaisseaux sanguins produits lors de l'angiogénèse tumorale sont anormaux à la fois d'un point de vue structural et fonctionnel. Contrairement aux vaisseaux normaux, ils sont hautement désorganisés, tortueux, gonflés et leurs diamètres irréguliers. Ils sont caractérisés par des branchements et interconnexions excessifs. Leurs parois

sont également fragiles et irrégulières. Elles présentent des ouvertures en raison de jonctions intercellulaires lâches et élargies. La membrane basale est discontinue et incomplète ce qui conduit à une perméabilité accrue de ces vaisseaux (Carmeliet et Jain 2000).



**Figure 19 : Réseau vasculaire normal (gauche) et pathologique (droite).  
Représentation schématique de la balance entre facteurs pro et anti-angiogéniques (d'après Jain 2005)**

Ces anomalies structurales ont des conséquences fonctionnelles. La structure de ces vaisseaux conduit à un flux sanguin irrégulier et chaotique (Baish et Jain 2000). Ceci conduit, malgré la néovascularisation, à maintenir un état d'hypoxie et une acidité dans certaines régions des tumeurs. Ce phénomène favorise donc une surproduction de facteurs pro-angiogéniques et participe ainsi à une persistance et une exacerbation de

l'architecture anormale de ces vaisseaux. L'ensemble de ces caractéristiques favorisent l'invasion des cellules tumorales et donc le processus métastatique. Ces anomalies structurales et fonctionnelles ont également un effet sur les traitements anti-cancéreux classiques. La détérioration de l'apport sanguin ainsi que l'hypertension interstitielle qui résulte de l'architecture de ce réseau interfèrent non seulement avec l'apport en oxygène mais également avec la diffusion des agents thérapeutiques cytotoxiques. L'hypoxie et les différences de pH au sein des tumeurs peuvent induire l'apparition de résistances aux traitements par chimiothérapie et radiothérapies (Jain 2005 ; Helmlinger 1997). Etrangement, l'un des avantages de l'utilisation d'agents anti-angiogéniques est de conduire très transitoirement à une normalisation du réseau vasculaire tumoral. Celle-ci peut ainsi réduire les problèmes d'hypoxie et ainsi accroître non seulement la diffusion en oxygène mais également celle en agents cytotoxiques. Par conséquent, l'utilisation de thérapies anti-angiogéniques en association avec des traitements plus conventionnels peut ainsi renforcer l'efficacité des traitements de chimiothérapie et radiothérapie (Jain 2005).

#### **4. Régulateurs de l'angiogénèse**

L'angiogénèse apparaît donc comme un phénomène complexe, finement régulé par divers activateurs (facteurs pro-angiogéniques) et inhibiteurs (facteurs anti-angiogéniques). Depuis la mise en évidence du rôle clé de l'angiogénèse dans la croissance tumorale, de nombreux régulateurs endogènes ont été identifiés et étudiés. De nombreux facteurs pro-angiogéniques agissant directement ou non sur la prolifération et la différenciation des cellules endothéliales ont été mis en évidence, en particulier : le VEGF, le FGF (Fibroblast Growth Factor), le PDGF (Platelet-Derived Growth Factor), l'angiogénine, le NO (Gacche et Meshram 2014). De la même manière, un large nombre de facteurs endogènes anti-angiogéniques ont été caractérisés ces dernières années : la TPS-1 (thrombospondine-1), l'angiostatine, les VEGFR solubles et l'endostatine (Ribatti 2009).

Ces différents régulateurs peuvent être produits soit par les cellules tumorales, soit par les cellules de l'environnement (cellules du stroma, de la matrice extracellulaire). Parmi ces régulateurs, les deux molécules les plus étudiées sont d'une part le facteur pro-angiogénique VEGF et d'autre part le facteur anti-angiogénique TPS-1.



En conditions pathologiques et en particulier lors de cancers, l'équilibre entre ces facteurs pro et anti-angiogéniques est rompue en faveurs des inducteurs de l'angiogénèse (Baeriswyl et Christofori 2009 ; Bergers et Benjamin 2003). Ces régulateurs, et notamment le VEGF, induisent une cascade d'évènements (dégradation de la membrane basale, augmentation de la perméabilité, dégradation de la matrice extracellulaire) conduisant à la migration, l'invasion et la prolifération cellulaires nécessaires au mécanisme de l'angiogénèse et donc à la croissance tumorale (Gacche et Meshram 2014).

---

## Chapitre IV : La régulation de l'angiogénèse

---

Parmi les facteurs pro-angiogéniques, le VEGF semble être l'un des acteurs principaux de l'angiogénèse tumorale. Il exerce son activité pro-angiogénique en se fixant à la surface de récepteurs à activité tyrosine kinase (VEGFR).

### I. Le VEGF

La famille des VEGF est constituée de sept protéines : les VEGF A, B, C, D, E, F et le PlGF (Placental Growth Factor). Chacune de ces protéines a un rôle et un mode d'action différent.

Le VEGF-A (appelé VEGF) est le membre de la famille des VEGFs le plus étudiés. Différents isoformes de cette protéine existent (Takahashi et Shibuya 2005) : VEGF-121, VEGF-145, VEGF-148, VEGF-162, VEGF-165, VEGF-183, VEGF-189 et VEGF-206. Ces isoformes résultent d'un épissage alternatif de l'ARN. Elles ont en commun les 115 premiers acides aminés en position N-terminale ainsi que pour la plupart les six résidus en C-terminal. Le VEGF-165 est la forme dominante chez l'homme. Celui-ci est donc couramment appelé VEGF.

Structuralement, le VEGF est une glycoprotéine homodimérique antiparallèle de 45 kDa dont les deux monomères sont reliés par deux ponts disulfures.

Il exerce son activité biologique par sa liaison aux récepteurs tyrosine kinase transmembranaires incluant : VEGFR-1/Flt-1, VEGFR-2/Flk-1 et les récepteurs à la neuropillines : NRP-1 et NRP-2.

Le VEGF joue un rôle essentiel dans l'angiogénèse. Au niveau physiologique, le VEGF est indispensable au développement du réseau embryonnaire (Carmeliet et al. 1996 ; Ferrara et al. 1996) et est aussi impliqué dans les phénomènes d'angiogénèse survenant à l'âge adulte.

Ce facteur de croissance est également impliqué dans le développement de différentes pathologies telles que l'arthrite, les maladies cardiovasculaires, certaines complications du diabète, la rétinopathie, le psoriasis ou encore le cancer (Gacche et Meshram 2014).

Le VEGF joue un rôle clé dans l'angiogénèse tumorale. Ce facteur de croissance est surexprimé dans de nombreux cancers (Ferrara 2004). Son expression est finement régulée. L'hypoxie a un rôle essentiel dans sa régulation via le facteur de transcription HIF-1 $\alpha$  (Hypoxia Inducible Facteur) (Kerbel 2008 ; Ferrara et Davis-Smyth 1997). De plus, le VEGF peut être séquestré dans la matrice extracellulaire (MEC). Sa libération est régulée par différentes protéines telles que les héparinases, la plasmine ou encore des métalloprotéases matricielles (MMPs). Ce mécanisme de séquestration/libération participe à la régulation de ce facteur de croissance (Lee et al. 2005).

Initialement identifié pour ses propriétés de perméabilité des vaisseaux, le VEGF induit également de nombreux autres effets (Ferrara 2004 ; Ferrara et Davis-Smyth 1997) ; il assure la migration, l'invasion, la prolifération et la survie des cellules endothéliales. Il exerce également un effet sur d'autres types cellulaires dont les monocytes, les cellules progénitrices de la moelle osseuse ainsi que les cellules du système immunitaire.

Le VEGF-B est exprimé dans le tissu adipeux et se présente sous deux isoformes : l'isoforme VEGF-B167 peut s'associer à la matrice extracellulaire (Olofsson et al. 1996) tandis que l'isoforme VEGF-B186 est diffusible et circule librement (Olofsson et al. 1996). Le VEGF-B semble jouer un rôle dans la maintenance des nouveaux vaisseaux sanguins formés lors de conditions pathologiques. Il joue un rôle important dans différents types de neurones et étant donné sa grande expression dans les tissus musculaires striés et le myocarde, il pourrait avoir une fonction dans le métabolisme énergétique (Li et al. 2009).

Le VEGF-C appartient à la famille PDGF/VEGF. C'est un des effecteurs majeurs de régulation de la lymphangiogénèse (Li et al. 2011). Il a été également montré que ce facteur permet d'améliorer les capacités d'invasion des cellules de cancers de l'ovaire in vitro (Ueda et al. 2005). Une forte expression de VEGF-C est parfois retrouvée dans les cancers du sein, de la prostate, du côlon et du poumon et est associée au phénomène de lymphoangiogénèse, à l'apparition de métastases lymphatiques et à une mauvaise survie des patients (Li et al. 2011 ; Nakamura et al. 2005 ; Yang et al. 2006 ; Guo et al. 2009).

Le VEGF-D stimule la croissance vasculaire et la croissance des cellules endothéliales lymphatiques en se fixant sur le VEGFR-2 et le VEGFR-3 (Akahane et al. 2006). Cette protéine joue un rôle majeur dans la lymphangiogénèse.

Le PlGF (Placental like Growth Factor) a été le deuxième facteur de la famille VEGF à être découvert. Il existe 4 isoformes PlGF (PlGF-1, -2, -3 et -4) qui résultent d'épissage alternatif et diffèrent dans leur taille et leur fonction biologique. PlGF-1 et -3 se lient au VEGFR-1 tandis que PlGF-2 se lie également au NRP-1 et NRP-2. Le PlGF induit l'angiogénèse par plusieurs mécanismes : en affectant directement les cellules endothéliales via VEGFR-1, il peut séparer VEGF de VEGFR-1 ce qui permet au VEGF d'activer VEGFR-2, il peut agir comme stimulant en se liant au VEGFR-1 qui à son tour peut augmenter la sensibilité des cellules au VEGF via VEGFR-2 (Ribatti 2008). Généralement, les niveaux plasmatiques et tumoraux du PlGF sont corrélés au stade tumoral, à la vascularisation, à la récurrence, aux métastases et à la survie de nombreux cancers (Matsumoto et al. 2003 ; Chen et al. 2004 ; Parr et al. 2005 ; Wei et al. 2005 ; Ho et al. 2007). Une expression élevée de PlGF est principalement retrouvée dans les cancers gastriques et les cancers du sein (Fisher et al. 2007) tandis qu'une faible expression de ce facteur dans les cancers du côlon et du poumon peut être due à une méthylation aberrante du promoteur (Xu et Jain 2007).

Le VEGF-E est un autre membre de la famille VEGF encodé par des virus et qui se lie spécifiquement au VEGFR-2 (Ogawa et al. 1998) et le VEGF-F a été identifié dans du venin de serpent (Yamazaki et al. 2009).

## **II. Les récepteurs du VEGF**

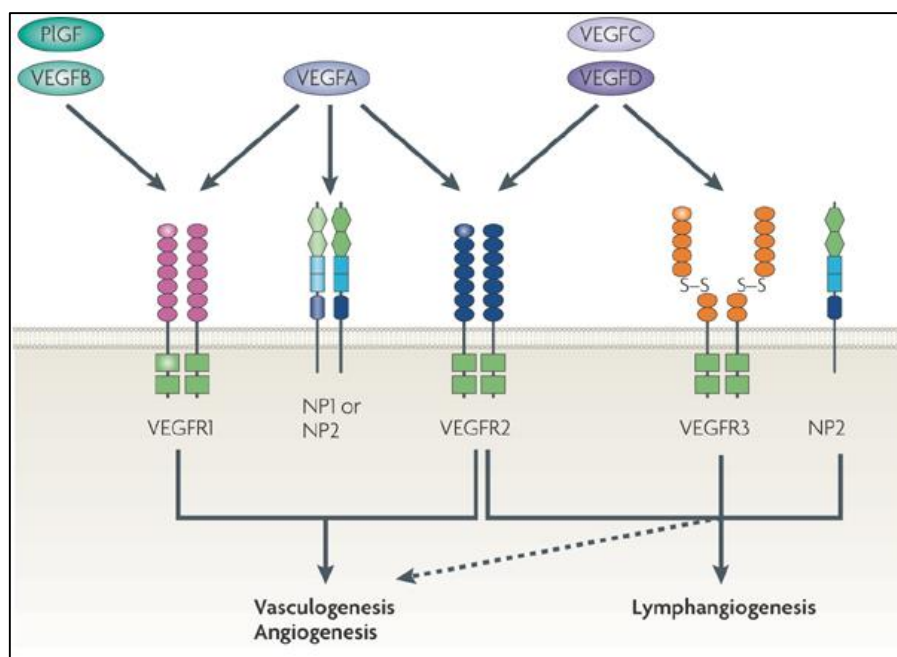
Surexprimé dans de nombreux cancers, le VEGF assure son activité pro-angiogénique en se fixant sur la partie extracellulaire de récepteurs membranaires présents à la surface des cellules endothéliales, et ainsi permet le développement de nouveaux vaisseaux.

Chez l'homme, on dénombre trois récepteurs à activité tyrosine kinase (VEGFR-1, VEGFR-2 et VEGFR-3) ainsi que deux co-récepteurs dépourvus d'activité tyrosine kinase (NRP-1 et NRP-2). Les membres de la famille des VEGFs se lient avec des

affinités différentes sur les trois récepteurs à activité tyrosine kinase et activent des voies de signalisation différentes. Cela conduit à des effets, au niveau cellulaire, différents (Hicklin et Ellis 2005 ; Koch et al. 2011 ; Koch et Claesson-Welsh 2012 ; Shibuya 2014). Toutes les isoformes du VEGF-A se lient à la fois au VEGFR-1 (Flt-1) et au VEGFR-2 (KDR). Le VEGF-B ainsi que le PlGF (PlGF-1 et 2) se lient spécifiquement au VEGFR-1. Des hétérodimères de VEGF-A et PlGF ont également été identifiés, et il a été démontré qu'ils activaient le VEGFR-2. Le VEGF-E interagit spécifiquement avec le VEGFR-2 et les facteurs de croissances VEGF-C et D se lient, quant à eux, aux récepteurs VEGFR-2 et VEGFR-3 (Hicklin et Ellis 2005).

Il a été mis en évidence que les récepteurs VEGFR-1 et VEGFR-2 jouent un rôle primordial dans l'angiogénèse tandis que le VEGFR-3 active des voies de signalisation conduisant à la lymphangiogénèse (Kaipainen et al. 1995).

Contrairement aux VEGFRs, les neuropilines ne possèdent pas de domaine à activité tyrosine kinase et par conséquent ne peuvent, à elles seules, activer des voies de signalisation. Il est suggéré que NRP-1 et NRP-2 agissent comme des co-récepteurs des VEGFRs en augmentant l'affinité des ligands pour ces récepteurs et ont ainsi un rôle dans la régulation de l'angiogénèse (Soker et al. 1998 ; Soker 2011). De plus, ils jouent un rôle dans le recyclage de ces récepteurs (Pang et al. 2014).



**Figure 20 : Les récepteurs au VEGF et leurs ligands (d'après Hicklin et, Ellis 2005)**

Les récepteurs VEGFRs sont des récepteurs transmembranaires présents à la surface des cellules endothéliales. Initialement sous forme de monomères, ces récepteurs sont actifs sous forme de dimères. Le mécanisme d'activation de ces récepteurs est similaire à celui observé pour l'ensemble des récepteurs à activité tyrosine kinase. Les grandes étapes sont donc : fixation du ligand, mécanisme de dimérisation et activation des domaines intracellulaires à activité tyrosine kinase par changement conformationnel puis phosphorylation de résidus tyrosines et internalisation du récepteur.

### **1. VEGFR-1**

Le VEGFR1 est une glycoprotéine de 180-185 kDa.

Le VEGFR-1 se lie au VEGF-A (de Vries et al. 1992) et est le seul récepteur pouvant également lier le VEGF-B (Olofsson et al. 1998) et le PlGF (Park et al. 1994). Il est principalement exprimé par les cellules vasculaires mais, contrairement au VEGFR-2, peut également être exprimé par les monocytes-macrophages, les cellules rénales mésangiales et les cellules de divers types tumoraux. Les souris homozygotes déficientes pour ce récepteur meurent très précocement in utero suite à un défaut d'organisation des structures vasculaires et à une prolifération excessive des hémangioblastes (Fong et al. 1995).

De façon paradoxale, le VEGFR-1 se lie au VEGF avec une affinité dix fois supérieure au VEGFR-2 mais possède de faibles propriétés de transduction du signal suite à une absence de tyrosines activatrices (Terman et al. 1992). Il a ainsi initialement été décrit comme un régulateur négatif de l'activité du VEGF grâce à plusieurs mécanismes : il agit comme un leurre pour le VEGF-A et VEGF-B solubles et est capable de diminuer l'activité du VEGFR-2.

Cependant, d'autres études ont évoqué un rôle activateur du VEGFR-1, notamment à travers des effets sur le recrutement des cellules souches endothéliales progénitrices *via* l'activation de Src et ERK1/2. Les fonctions du VEGFR-1 sont également variables selon son ligand : la liaison du PlGF au VEGFR-1 est capable d'activer par transphosphorylation le VEGFR-2 dans les cellules exprimant les deux types de récepteurs alors que la liaison du VEGF-A entraîne la formation d'hétérodimères.

Il existe une forme soluble du VEGFR-1, résultant d'un épissage alternatif, qui pourrait moduler ou diminuer l'activité du VEGF ou PlGF circulant. Celle-ci a été décrite à l'état physiologique dans le liquide amniotique ainsi que dans plusieurs types tumoraux comme le cancer du sein (Kendall et Thomas 1993).

Il a été montré que le VEGFR-1 était exprimé dans des cellules tumorales et impliqué dans la croissance et la progression des tumeurs surtout dans le CCR. De nombreux travaux témoignent du rôle de ce récepteur dans l'angiogénèse tumorale.

Il est impliqué dans la survie cellulaire. Son expression est activée au cours de l'angiogénèse, ainsi qu'en conditions hypoxiques *via* la protéine HIF-1 $\alpha$  (Gerber et al. 1997).

## **2. Le VEGFR-2**

Le VEGFR-2 est une glycoprotéine de 210-230 kDa.

Il peut lier toutes les isoformes du VEGF, à l'exception du VEGF-B, et joue un rôle central dans la stimulation de l'angiogénèse (Takahashi et al. 2005). Son expression est classiquement limitée aux cellules vasculaires : il est fortement exprimé par les cellules endothéliales matures et les cellules endothéliales progénitrices circulantes. Le rôle prédominant de ce récepteur dans l'angiogénèse est illustré par le fait que les souris déficientes de façon homozygote et hétérozygote pour le VEGFR-2 meurent in utero suite à des défauts du développement vasculaire (Dellinger et al. 2013).

Les effets de la liaison du VEGF-A au VEGFR-2 sont nombreux et incluent notamment l'augmentation de la perméabilité vasculaire, la prolifération et la survie des cellules endothéliales, leur migration et l'invasion (Shibuya et Claesson-Welsh 2006).

Schématiquement, la prolifération des cellules endothéliales passe par l'activation de la voie MAPK, suite à l'activation de la PLC $\gamma$ , alors que la survie et la migration cellulaire impliquent respectivement la voie PI3K et de Fak ou la voie Src (Wu et al. 2000).

Le VEGFR-2 peut également s'hétérodimériser avec le VEGFR-1 et le VEGFR-3 (Simons et al. 2016).

A l'âge adulte son expression diminue mais est réactivée lors de phénomènes physiologiques ponctuels ainsi que dans des pathologies telles que le cancer.

Il a également été montré que le VEGFR-2 est impliqué dans l'angiogénèse pathologique. En effet, une surexpression du VEGFR-2 a été observée au niveau du système vasculaire tumoral de diverses tumeurs malignes (Duff et al. 2006).

### **3. Le VEGFR-3**

Le VEGFR-3 se lie au VEGF-C et VEGF-D. Son expression a longtemps été limitée aux cellules de l'endothélium lymphatique, mais il peut également être exprimé par les cellules des endothéliums vasculaires ainsi que les progéniteurs neuronaux, les ostéoblastes et les macrophages. Le VEGFR-3 joue un rôle important dans le développement cardiaque et vasculaire durant l'embryogénèse et est essentiel à la lymphangiogénèse à l'âge adulte (Kaipainen et al. 1995).

A l'âge adulte, l'expression du VEGFR-3 a été associée aux processus de cicatrisation nécessitant une lymphangiogénèse transitoire et dans le maintien de l'intégrité de l'endothélium vasculaire par le biais de la modulation de la signalisation du VEGFR-2 (Paavonen et al. 2000). Il contribue à la prolifération, la migration et la survie des cellules lymphatiques par plusieurs mécanismes pouvant être ligand-dépendants ou ligand-indépendants (Lohela et al. 2009). Plusieurs modèles ont montré que la surexpression du VEGFR-3 ou de son ligand, VEGF-C, induisait une lymphangiogénèse tumorale et une dissémination ganglionnaire précoce. Chez l'homme, la surexpression du VEGFR-3 et son activation ont été décrites dans plusieurs types tumoraux et associées à la présence de métastases ganglionnaires. Son rôle n'est pas limité à la lymphangiogénèse : son expression a été associée à l'angiogénèse tumorale en association avec VEGF/VEGFR-2 et Notch/Delta-like4. Le rôle du VEGFR-3 dans la néo-angiogénèse tumorale a ainsi été décrit dans le cancer du sein, le mélanome et certaines formes de leucémies (Varney et Singh 2015).

### **4. NRP-1 et NRP-2**

NRP-1 et NRP-2 sont deux co-récepteurs spécifiques de certains isoformes du VEGF circulant dépourvus de domaine intracellulaire à activité tyrosine kinase mais qui augmentent fortement leur affinité de liaison à leurs récepteurs (Soker et al. 1998).

NRP-1 peut former des homodimères ou des hétérodimères avec NRP-2 ou VEGFR-2. Les neuropilines ont initialement été identifiées comme des récepteurs de la



sémaphorine 3A, une petite molécule soluble impliquée dans la modulation du développement des systèmes nerveux et vasculaires (Kolodkin et al. 1997).

Lors du développement, NRP-1 est préférentiellement exprimé au niveau artériel et NRP-2 au niveau veineux et lymphatique.

L'expression forcée de NRP-1 ou son extinction dans des souris transgéniques est létale au stade embryonnaire et s'accompagne d'anomalies neuronales et vasculaires (Taniguchi et al. 1997). En revanche, les souris mutées de façon homozygote pour NRP-2 sont viables mais présentent des capillaires et vaisseaux lymphatiques réduits en nombre et en taille ; ainsi NRP-2 possède principalement un rôle dans la lymphangiogénèse en tant que co-facteur du VEGFR-3.

La liaison du ligand à NRP-1 et NRP-2 est hautement spécifique : NRP-1 peut se lier au VEGF-A, VEGF-B et PlGF alors que NRP-2 lie le VEGF-A, VEGF-C et PlGF. NRP-1 module la signalisation induite par le VEGFR-2 notamment en augmentant la migration et la survie des cellules endothéliales. NRP-1 joue également un rôle clé dans les modifications de perméabilité vasculaire et l'organisation spatiale de la néovascularisation induite par l'activation du VEGFR-2 (Favier et al. 2006).

Une activation du signal pro-angiogénique directe par NRP-1 ou NRP-2, sans l'intermédiaire de l'activation d'un récepteur au VEGF a également été décrite. Cependant, les mécanismes exacts par lesquels NRP-1 module le signal pro-angiogénique induit par le VEGFR-2 restent mal compris.

Il existe également un isoforme soluble de NRP-1 qui agit comme antagoniste naturel en inhibant la liaison du VEGF-A au VEGFR-2 des cellules endothéliales (Gagnon et al. 2000).

### **III. Les autres médiateurs de l'angiogénèse**

#### **1. FGFR**

Les facteurs de croissance des fibroblastes FGF (Fibroblast Growth Factor) forment une famille comportant 23 protéines identifiées à ce jour chez l'homme. Ces facteurs sont généralement sécrétés par des fibroblastes (Ornitz et Itoh 2001). Le rôle le plus important des fibroblastes, cellules du tissu conjonctif, est de maintenir la matrice extracellulaire des tissus conjonctifs et de réparer les lésions dues à un traumatisme.

Ils servent aussi à réguler l'organisation et la différenciation des cellules des tissus environnants.

Seuls le FGF-1 (aFGF) et le FGF-2 (bFGF) ont été bien caractérisés. Le aFGF et le bFGF font partie des protéines angiogéniques les plus puissantes *in vivo*. Le rôle du aFGF dans l'angiogenèse tumorale semble moins important que celui du bFGF. Le bFGF a été la première protéine angiogénique isolée des tissus tumoraux. Il stimule la croissance et la migration des cellules endothéliales, des fibroblastes, des cellules musculaires lisses et des neurones (Folkman 2000). Les isoformes du bFGF induisent la production de protéases, telles l'uPA et les MMP, par des cellules endothéliales en culture, suscitent la formation de tubes dans des gels de collagène, influencent la morphologie des cellules endothéliales par la sécrétion d'intégrines, permettent la communication intercellulaire par la formation de gap junctions et augmentent la production de VEGF et de VEGFR2 (Nakoman et al. 2005). Indépendamment de ses effets angiogéniques directs sur les cellules endothéliales, le bFGF agit aussi en synergie avec le VEGF dans l'induction de l'angiogenèse. Le bFGF induit l'expression de VEGF par des mécanismes à la fois autocrines et paracrines. Le bFGF et le VEGF sont synergiques dans la stimulation de la formation des tubes capillaires. Le récepteur soluble VEGFR-2 bloque complètement l'angiogenèse cornéenne induite par des implants de bFGF (Folkman 2000). Le bFGF est habituellement synthétisé par les cellules tumorales, mais aussi par les macrophages activés recrutés par les cellules tumorales. Les cellules endothéliales dans les tumeurs peuvent aussi produire du bFGF, stimulant ainsi l'angiogenèse de façon autocrine (Seghezzi et al. 1998).

Les FGF ont une forte affinité pour l'héparine et le sulfate d'héparine. Ils s'accumulent donc dans la matrice extracellulaire, d'où ils peuvent être mobilisés par les protéinases ou les héparinases produites par la tumeur ou les cellules endothéliales. Beaucoup de tumeurs humaines expriment le bFGF. Il a aussi été détecté dans les cellules endothéliales des sarcomes de Kaposi et dans les hémangiomes proliférants. Des taux élevés de bFGF ont été détectés dans le sérum et les urines de patients atteints de cancers colorectaux avancés, du sein, de l'ovaire, rénaux, et de sarcomes des tissus mous (Galdemard et al. 1995 ; Turner et Grose 2010).

Les premiers essais cliniques de thérapies anti-angiogéniques ont utilisé l'interféron pour traiter des enfants atteints d'hémangiomes menaçant la vue ou le pronostic vital et qui n'avaient pas répondu aux autres traitements. L'excrétion urinaire

de bFGF s'est révélé un marqueur utile pour suivre l'efficacité de ce traitement (Robenzadeh et al. 1998).

Il existe quatre récepteurs du FGF (FGFR) : tous lient le bFGF et l'aFGF. Leur structure est similaire à celle des VEGFR, avec un domaine extracellulaire contenant trois (et non plus sept) boucles immunoglobulines et un domaine tyrosine kinase interne divisé en deux. Les quatre récepteurs sont codés par quatre gènes différents, mais une multitude d'isoformes du FGFR1 et du FGFR2 ont été décrites (Oyama et al. 1998). Des interactions à la surface des cellules cibles entre des monomères du bFGF et des protéoglycanes contenant des sulfates d'héparine sont probablement requises pour l'activation des récepteurs. Les sulfates d'héparine induisent une oligomérisation du bFGF, conduisant à la dimérisation du récepteur et à son activation (Schlessinger et al. 1995).

## **2. Le PDGFR**

Le PDGF est un mitogène majeur et un chémo-attractant pour les fibroblastes, les cellules musculaires lisses et les cellules gliales (Kohler et Lipton 1974). Le PDGF existe sous la forme d'un homodimère relié par un pont disulfure ou d'un hétérodimère de chaînes A et B. Il existe donc trois isoformes, chacune ayant différentes affinités pour les récepteurs. Deux autres gènes ont été identifiés codant pour les polypeptides PDGF-C et PDGF-D (Li et al. 2000 ; Bergsten et al. 2001). La chaîne B du PDGF a été identifiée comme un proto-oncogène lorsque l'on a découvert qu'elle était l'homologue de v-sis, le gène transformant du virus des sarcomes du singe (Giese et al. 1990).

Le PDGF a été détecté dans plusieurs lignées tumorales, parmi lesquelles des cancers du sein ou du côlon, et des mélanomes (Saeki et al. 1997). Le PDGF pourrait contribuer à l'angiogenèse via la prolifération des cellules endothéliales et la formation de tubes, l'induction du VEGF et d'autres facteurs angiogéniques, ou la stabilisation de la néovascularisation par le recrutement de péricytes et de cellules musculaires lisses. Il stimule le développement et la migration des péricytes. Le PDGF libéré par les cellules endothéliales induirait l'expression du VEGF et serait un facteur de survie des jeunes cellules endothéliales (Reinmuth et al. 2001 ; Affleck et al. 2002). Dans des études expérimentales, le PDGF augmente l'ARNm codant pour le VEGF dans les péricytes, principalement par l'activation de la voie de la phosphatidyl-inositol 3-kinase (PI3K). Ces études suggèrent que les péricytes pourraient protéger les cellules

endothéliales de l'apoptose, en partie par des cytokines qui augmentent l'expression de VEGF (Wang et al. 2010).

Les récepteurs du PDGF (PDGFR) ont une structure similaire à celle des VEGFR et des FGFR : ils possèdent cinq domaines immunoglobulines dans la région extracellulaire et un domaine tyrosine kinase interne divisé en deux. La famille PDGFR RTK comprend le PDGFR  $\alpha$ , le PDGFR  $\beta$ , et trois récepteurs non connus pour être directement impliqués dans l'angiogenèse : CSF-1 R, Kit et Flk 2. Le PDGF, en se liant au PDGFR  $\alpha$ , inhibe les propriétés angiogéniques du bFGF in vitro et in vivo (De Marchis et al. 2002). Le PDGF et ses récepteurs sont coexprimés dans de nombreuses lignées tumorales, comme les sarcomes et les gliomes. La présence du PDGF et de ses récepteurs a été détectée dans des biopsies de tumeurs. Dans les gliomes, le VEGF et le PDGF sont des indicateurs du potentiel angiogénique (Nazarenko et al. 2012). Une forte expression du PDGFR  $\beta$  et du VEGF dans les cellules endothéliales ou les cellules gliales permet une action combinée de ces facteurs en faveur de la néovascularisation.

### **3. Angiopoïétine et Tie-2**

Tie-2 est un RTK dont l'expression est quasiment restreinte aux cellules endothéliales (Fox et al. 2001 ; Folkman 2000). La portion extracellulaire de ce récepteur comprend des domaines immunoglobulines, EGF-like et fibronectine III-like. Le domaine tyrosine kinase interne n'est pas coupé par un insert de séquences comme pour les VEGFR et les FGFR. Des formes solubles de Tie-2 ont récemment été mises en évidence. Les ligands de Tie-2 sont Ang-1 et Ang-2. Le rôle de Tie-2 et de ses ligands dans l'angiogenèse tumorale n'a été reconnu que récemment. Ang-1 est un facteur de croissance spécifique des cellules endothéliales. Cependant, Ang-1 n'a pas directement d'effets mitogéniques et n'entraîne pas de néo-vascularisation dans les expériences d'implants cornéens. Elle agit avec le VEGF pour permettre la croissance des vaisseaux. Elle induit la production, par les cellules endothéliales, de la chaîne B du PDGF, qui recrute les péricytes et les cellules musculaires lisses pour leur incorporation dans la paroi des vaisseaux. Ang-1 agit aussi sur la maturation des vaisseaux en stabilisant le réseau capillaire (Fox et al. 2001 ; Folkman 2000 ; Holash et al. 1999). Dans la peau de souris, la surexpression d'Ang-1 entraîne une augmentation de la vascularisation. La peau est plus rouge et les vaisseaux plus

larges, mais il n'y a pas de signes de perméabilité vasculaire ni d'œdèmes comme on le constate dans les mêmes modèles de surexpression du VEGF ou dans les tumeurs exprimant le VEGF (Folkman 2000). Ang-2 bloque Tie-2 et repousse les péricytes et les cellules musculaires lisses. La production d'Ang-2 est augmentée pendant l'angiogenèse par le VEGF ou l'hypoxie, ce qui empêche les interactions entre Ang-1 et le VEGF, expose les cellules endothéliales au VEGF et permet la croissance de nouveaux vaisseaux sanguins. Les cellules endothéliales sont dépendantes d'une exposition continue au VEGF pour leur survie, puisque le retrait du VEGF avant la stabilisation du vaisseau par une enveloppe de péricytes entraîne une apoptose des cellules endothéliales et une régression du vaisseau (Fox et al. 2001).

Un nouveau ligand de Tie-2 a été mis en évidence : ANGPTL3. Il est capable de lier l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  et de stimuler l'angiogenèse. Il existe des preuves de l'importance de la voie Tie-2 dans les cancers du sein, du cerveau, du foie et du poumon et de ce que son blocage réduit la croissance des tumeurs et les métastases (Fox et al. 2001).

#### **IV. Signalisation et régulation du VEGF**

L'action du VEGF se fait par plusieurs mécanismes ; principalement paracrine et endocrine, et plus rarement, intracrine ou autocrine. Pour les deux premiers mécanismes, les cellules tumorales produisent du VEGF mais ne possèdent, dans la majorité, pas de récepteurs au VEGF, à l'exception du CCR. De façon similaire, les cellules endothéliales ne produisent pas, ou peu, de VEGF mais possèdent de nombreux récepteurs au VEGF à leur surface.

De plus, de nombreux autres types cellulaires sont capables de séquestrer ou sécréter du VEGF, telles les plaquettes, les cellules musculaires et les cellules du stroma tumoral. Ceci explique entre autres, pourquoi les niveaux de VEGF intra-tumoral ou circulant ne sont pas prédictifs de la réponse aux traitements anti-angiogéniques. Un mode d'action autocrine a été évoqué dans plusieurs types tumoraux et dans les cellules souches hématopoïétique où le VEGF aurait notamment un rôle dans la survie cellulaire. Enfin, un mode d'action intracrine a été décrit ; si la majorité des récepteurs au VEGF est exprimé à la membrane cellulaire, il est possible que certains récepteurs localisés à l'intérieur de la cellule favorisent également la survie cellulaire.

La surproduction de VEGF retrouvée dans les tumeurs peut être rattachée à plusieurs mécanismes auxquels participe le facteur HIF.

Dans les conditions physiologiques, l'expression du VEGF est extrêmement contrôlée. L'expression anarchique des facteurs pro-angiogéniques et en particuliers le VEGF entraîne la mise en place d'un réseau vasculaire anarchique et peu fonctionnel. Différents facteurs contrôlent l'expression du VEGF comme l'hypoxie, la déplétion en glucose, la diminution du pH, les cytokines inflammatoires, les facteurs de croissance, les oncogènes, les hormones et certaines chimiokines (Kerbel 2008).

Même si l'induction d'expression la plus importante est observée après stimulation par les facteurs de croissance ou les oncogènes, la condition physiopathologique d'induction de VEGF la plus étudiée est l'hypoxie (Shweiki et al. 1992). Elle régule la transcription, la stabilité et la traduction de l'ARNm du VEGF (Dor et al. 2001). Le VEGF possède dans son promoteur un élément de réponse à l'hypoxie, élément HRE (Hypoxia Response Element) (Forsythe et al. 1996). Cette séquence permet l'activation de la transcription du VEGF en réponse à l'hypoxie par la fixation du facteur de transcription HIF-1. HIF-1 fonctionne sous la forme d'un hétéro-dimère. Il est composé d'une sous unité HIF-1 $\beta$  dont l'expression est constitutive et d'une sous unité HIF-1 $\alpha$  régulatrice dont l'expression est régulée par l'hypoxie (Pugh et Ratcliffe 2003; Semenza 2003). En normoxie, la demi-vie de HIF-1 $\alpha$  est très courte. La protéine VHL (von Hippel-Lindau) possède une activité E3 ubiquitine ligase et ubiquitinye HIF-1 $\alpha$  permettant sa dégradation par le protéasome (Cockman et al. 2000). En hypoxie, la protéine VHL est inactive ce qui entraîne la stabilisation de HIF-1 $\alpha$ . La translocation dans le noyau et l'interaction avec HIF1 $\beta$  entraîne l'activation de la transcription du VEGF en réponse à l'hypoxie. C'est un moyen de contrôler la stabilité de la protéine en fonction de la concentration en oxygène et de réguler l'expression du VEGF en hypoxie.

L'expression du VEGF est également régulée indépendamment de l'hypoxie. Certains facteurs de croissance et certains oncogènes via la voie de signalisation ERK induisent la phosphorylation du facteur de transcription Sp-1 ce qui activent la transcription du gène VEGF (Milanini-Mongiat et al. 2002 ; Milanini et al., 1998).

## V. Thérapies anti-angiogéniques

Les thérapies anti-angiogéniques sont de plus en plus développées et utilisées en clinique. En raison de son rôle primordial dans le développement de l'angiogénèse, la plupart des stratégies ciblent l'axe VEGF / VEGFR.

Le bénéfice clinique des traitements anti-angiogéniques est dû à différents mécanismes. Ces molécules inhibent l'expansion des vaisseaux tumoraux. Elles bloquent la formation de nouvelles ramifications et inhibent l'arrivée au sein de la tumeur des cellules dérivées de la moelle osseuse. Elles permettent également la régression des vaisseaux préexistants. Le traitement inhibe les signaux de survie adressés aux cellules endothéliales. Ainsi, ces cellules deviennent plus sensibles à la chimiothérapie et la radiothérapie. Les anti-angiogéniques augmentent également cette sensibilité en entraînant une normalisation du réseau vasculaire. Sous traitement, les vaisseaux deviennent matures et fonctionnels (Goel et al. 2011). Ces observations expliquent pourquoi un traitement anti-angiogénique associé à une chimiothérapie est plus efficace que la chimiothérapie utilisée seule (Jain 2005).

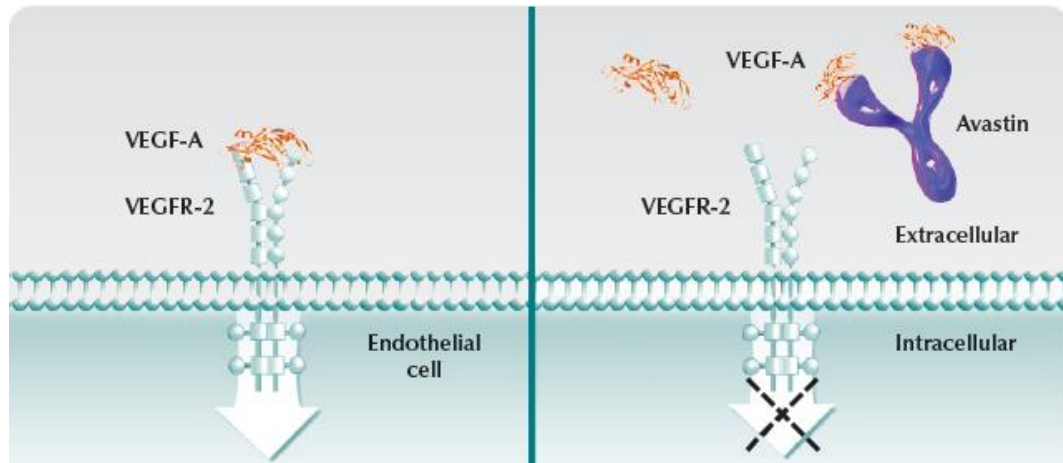
Malheureusement cette normalisation est transitoire. Après cette phase objective une régression excessive de la vascularisation ou un échappement de la tumeur au traitement est souvent observé. Il existe deux types de molécules :

- Les molécules agissant au niveau extracellulaire : anticorps monoclonal ou protéine de fusion recombinante, dirigés spécifiquement contre le VEGF ou ses récepteurs, généralement utilisés en association avec les agents cytotoxiques.
- Les molécules agissant au niveau intracellulaire : petites molécules organiques inhibitrices de l'activité tyrosine kinase des récepteurs aux facteurs de croissances, utilisés en mono-chimiothérapie.

### 1. Bevacizumab

Le premier traitement anti-angiogénique à avoir obtenu l'autorisation de mise sur le marché par la FDA (Food Drug Administration), en 2004, a été le bevacizumab (Avastin®). Il s'agit d'un anticorps monoclonal humanisé de type IgG1 ciblant le VEGF. Il se lie spécifiquement au VEGF-A, inhibant de ce fait la liaison du VEGF à ses récepteurs, Flt-1 (VEGFR-1) et KDR (VEGFR-2), à la surface des cellules

endothéliales. La neutralisation de l'activité biologique du VEGF fait régresser les vaisseaux tumoraux, normalise les vaisseaux tumoraux restants, et inhibe la formation de nouveaux vaisseaux tumoraux, empêchant ainsi la croissance tumorale (Ellis 2006).



**Figure 21 : Mécanisme d'action du Bevacizumab**

Il a été initialement approuvé pour le traitement du cancer colorectal métastatique en association avec la chimiothérapie de référence (association avec FOLFIRI). Avec l'arrivée du bevacizumab, c'est la première fois depuis plus de 20 ans qu'un traitement permet d'augmenter de quelques mois la survie des patients atteints d'un cancer colorectal.

Ainsi, les données cliniques indiquent que l'association bevacizumab + IFL augmente la survie sans progression de 4 mois et la survie globale de 5 mois par rapport au traitement IFL seul (Hurwitz et al., 2004).

Aujourd'hui, le bevacizumab est toujours utilisé dans le traitement du cancer colorectal métastatique en première et seconde ligne.

Il est recommandé soit à la posologie de 5 mg/kg ou 10 mg/kg de poids corporel administré une fois toutes les 2 semaines, soit à la posologie de 7,5 mg/kg ou 15 mg/kg administré une fois toutes les 3 semaines, en perfusion intraveineuse.

Ce composé présente des effets indésirables dont certains sont dû à son mécanisme d'action :

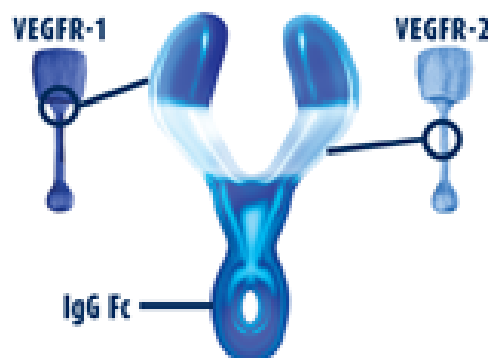
- Les perforations gastro-intestinales sont peu fréquentes mais graves car elles conduisent à des hémorragies importantes
- Les déhiscences des cicatrices qui sont en rapport avec une mauvaise vascularisation



- Les hémorragies
- L'hypertension artérielle. Une étude a montré que l'augmentation de la tension artérielle serait corrélée à l'efficacité du traitement dans le cancer du poumon ce qui traduirait une bonne inhibition de la voie VEGF (Dahlberg et al. 2010)

## 2. Aflibercept

L'aflibercept, (Zaltrap®) est une protéine de fusion soluble composée de fragments du domaine extracellulaire des récepteurs VEGFR-1 et VEGFR-2 associé à un fragment Fc d'IgG1 humaine.



**Figure 22 : Structure de l'Aflibercept**

Il se lie à trois médiateurs de l'angiogenèse, le VEGF-A, le VEGF-B et le PlGF. Il est également connu dans la littérature scientifique sous le nom de VEGF TRAP.

Il agit comme un récepteur leurre soluble qui se lie au VEGF-A, avec une plus haute affinité que ses récepteurs natifs, ainsi qu'aux ligands apparentés PlGF et VEGF-B. En agissant comme piège à ligand, l'aflibercept empêche la liaison des ligands endogènes à leurs récepteurs apparentés et, de ce fait, bloque la signalisation médiée par le récepteur (Holash et al. 2002).

Il bloque l'activation des récepteurs du VEGF et la prolifération des cellules endothéliales, inhibant ainsi la croissance des nouveaux vaisseaux qui alimentent les tumeurs en oxygène et nutriments, et favorisant le ralentissement de la croissance des tumeurs.

Il est utilisé en association à la chimiothérapie FOLFIRI chez les adultes atteints d'un cancer colorectal métastatique résistant ou ayant progressé après un traitement à base d'oxaliplatine.

L'étude VELOUR a montré que dans le traitement de patients atteints d'un cancer colorectal métastatique déjà traité par une chimiothérapie à base d'oxaliplatine, Zaltrap® en association avec la chimiothérapie FOLFIRI améliore de manière statistiquement significative la survie globale, la survie sans progression et le taux global de réponse tumorale par rapport à l'association placebo et FOLFIRI.

Il permet une amélioration de la médiane de survie globale (de 1,4 mois) et de la survie sans progression (de 2,2 mois).

Aucune étude n'a pour le moment évalué son efficacité dans le traitement des cancers colorectaux métastatiques résistants au bevacizumab ni son intérêt dans le traitement de première ligne.

La dose recommandée de ZALTRAP est de 4 mg/kg administrée par perfusion intraveineuse de 1 heure, suivie du schéma posologique de FOLFIRI.

Les principaux effets indésirables retrouvés sont une neutropénie, diarrhée, hypertension artérielle, leucopénie, stomatite, fatigue, protéinurie et asthénie.

### **3. Régorafénib**

Le régorafénib (Styvarga®) est un médicament anti-cancéreux qui inhibe de façon importante de multiples protéines kinases, y compris celles impliquées dans l'angiogenèse tumorale (VEGFR-1, 2, 3, Tie2), l'oncogenèse (KIT, RET, RAF-1, BRAF, BRAFV600E) et le micro-environnement tumoral (PDGFR, FGFR). En particulier, le régorafénib inhibe la protéine KIT mutée, un facteur oncogène majeur dans les tumeurs stromales gastro-intestinales, et bloque ainsi la prolifération des cellules tumorales. Dans les études précliniques, le régorafénib a fait preuve d'une activité anti-tumorale importante sur un large spectre de modèles tumoraux, notamment des modèles de tumeur colorectale et de tumeurs stromales gastro-intestinales, activité due à ses effets anti-angiogéniques et antiprolifératifs. En outre, le régorafénib a présenté des effets anti-métastatiques *in vivo*.

La dose recommandée est de 160mg.

### **4. Ramucirumab**

Le ramucirumab (Cyramza®) est un nouvel agent antinéoplasique approuvé pour le traitement de seconde ligne des patients adultes atteints d'un cancer gastrique avancé ou d'un adénocarcinome de la jonction gastro-œsophagienne.

C'est un anticorps humain dont l'action bloque spécifiquement le VEGFR-2 ce qui inhibe l'activation du récepteur du VEGFR-2 stimulée par le ligand et ses composants de signalisation en aval, dont les protéines kinases activées par les mitogènes p44/p42, neutralisant la prolifération et la migration des cellules endothéliales humaines induites par le ligand.

Il est utilisé en association avec le paclitaxel ou seul à une dose de 8mg/kg.

Le développement du ramucirumab est toujours en cours avec plusieurs études d'association. Une étude de phase III (RAINFALL) a pour objectif de démontrer l'utilité du ramucirumab en première ligne de traitement des adénocarcinomes œso-gastriques localement avancés ou métastatiques. Le ramucirumab est administré dans cette étude à la dose de 8 mg/kg à J1 et J8, associé au cisplatine (80 mg/kg) tous les 21 jours et à la capécitabine (1 000 mg/kg) en deux prises par jour pendant 2 semaines sur 3. Le ramucirumab est également testé dans des phases plus précoces en association à des composés innovants comme d'autres anti-angiogéniques ou des immunothérapies. La tolérance et l'efficacité intéressantes du ramucirumab en association à la chimiothérapie constituent une piste prometteuse pour ces nouvelles études.

## **5. Les marqueurs prédictifs de l'efficacité**

Presque dix ans après la première autorisation de mise sur le marché pour une molécule anti-angiogénique dans le traitement des cancers, aucun marqueur prédictif d'efficacité n'est définitivement validé. Pourtant l'utilisation des marqueurs prédictifs est indispensable pour une meilleure prise en charge des patients. De façon générale, l'amélioration de la survie globale des patients sous traitement anti-angiogénique est limitée. Mais certains patients répondent mieux que d'autres. Il est donc important de mettre en évidence des marqueurs permettant de sélectionner les patients les plus répondeurs. Ces marqueurs optimiseraient la dose et le schéma thérapeutiques de ces molécules. Identifier des marqueurs de résistances au traitement mettrait en évidence de nouvelles cibles thérapeutiques. Enfin, ils permettraient d'identifier les

patients avec un risque important de développer des effets secondaires. D'un point de vue économique, ces marqueurs sont également très importants. Les coûts de ces traitements sont très élevés. Pouvoir sélectionner les patients répondeurs avant traitement diminuerait les dépenses de santé.

De façon générale, un bon marqueur prédictif doit être facilement mesurable avec une technique peu invasive et doit permettre une évaluation rapide. Le mécanisme ciblé par les traitements anti-angiogéniques est très complexe. La diversité des traitements et la variabilité de la réponse au traitement sont donc très importantes. Ainsi, il est facile d'imaginer la difficulté d'identifier un marqueur prédictif universel qui ne serait sans doute pas suffisant.

Pour sélectionner les patients avec une sensibilité plus importante, la clé est l'identification de marqueurs prédictifs de l'efficacité. Bien que certains résultats semblent prometteurs, aucun marqueur n'est utilisé en routine pour sélectionner les patients répondeurs au traitement. Un traitement personnalisé en fonction des prédispositions de chacun est l'objectif à atteindre dans le futur.

Parmi les biomarqueurs prédictifs des thérapies VEGF, il a été proposé que dans le cancer colorectal, les niveaux d'expression de CXCL8 sont corrélés avec la réponse des patients au bevacizumab associé à la chimiothérapie de référence. Le CXCL8 est une cytokine pro-inflammatoire et pro-angiogénique impliquée dans l'angiogenèse tumorale. Des niveaux élevés de cette cytokine avant traitement sont corrélés à une survie sans progression plus faible chez les patients traités (Kopetz et al., 2010). Une autre étude suggère que les niveaux sériques d'Ang-2 constituent un marqueur prédictif du traitement par le bevacizumab. Des niveaux faibles d'Ang-2 avant traitement sont corrélés à un meilleur taux de réponse et à une augmentation de la survie sans progression des patients traités par bevacizumab et chimiothérapie (Goede et al., 2010). Plusieurs études ont mis en évidence qu'une quantité faible de cellules endothéliales circulantes favorise l'action des traitements anti-angiogéniques et augmente la survie sans progression et la survie globale des patients traités (Manzoni et al., 2012 ; Matsusaka et al., 2011). Certains polymorphismes dans des gènes impliqués dans la régulation de l'angiogenèse sont également corrélés à une réponse positive des patients au bevacizumab, notamment dans les gènes codant IL-6, p53, MMP-9, CXCR1 et VEGFR-1 (Hansen et al., 2012). Enfin l'hypertension, un

des effets secondaires les plus importants des traitements anti-angiogéniques, est associée à une augmentation de la survie sans progression des patients traités par le bevacizumab (De Stefano et al., 2011) et peut être considérée comme un marqueur prédictif dans le cancer colorectal métastatique.

---

## Chapitre V. La transition épithélio-mésenchymateuse

---

### I. Définition

Les cellules épithéliales sont à la base de nombreuses fonctions vitales chez les mammifères, en particulier grâce à leurs propriétés de polarisation et de cohésion dynamiques regroupées sous le terme de « plasticité épithéliale ».

Une manifestation originale de cette plasticité est la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT). L'EMT est un processus complexe qui permet à une cellule épithéliale (ou un groupe de cellules) de modifier sa composition et l'organisation de ses protéines pour se détacher de la masse cellulaire à laquelle elle appartient.

Cette cellule (ou ce groupe de cellules) acquiert ainsi une organisation de type fibroblastique propice à la motilité cellulaire. L'EMT est donc un processus dynamique et réversible, au cours duquel les cellules perdent leurs caractéristiques épithéliales et développent des propriétés mésenchymateuses.

Les cellules épithéliales et mésenchymateuses se différencient en effet par des caractéristiques fonctionnelles et phénotypiques. Les cellules épithéliales, qui tapissent les surfaces et cavités du corps, sont étroitement liées par des complexes d'adhérence intercellulaire (jonctions serrées, jonctions adhérentes, desmosomes et jonctions gap) ce qui limite leur mobilité. Elles présentent également une polarité apico-basale, caractérisée par une distribution des structures d'adhérence cellulaire au pôle apical, et la présence d'une membrane basale au pôle opposé de la cellule. A la différence des cellules épithéliales, la plupart des cellules mésenchymateuses interagissent préférentiellement avec la matrice extracellulaire en utilisant des contacts focaux. De ce fait, elles ne forment pas de couches cellulaires organisées, ne présentent pas de polarité apico-basale et possèdent des capacités migratoires importantes.

Il a été proposé de classifier l'EMT en trois sous-types différents selon le contexte biologique dans lequel elle apparaît (Kalluri et Weinberg 2009).

L'EMT de type 1 est décrite dans l'embryogenèse particulièrement lors de la gastrulation et du développement de la crête neurale (Thiery et al. 2009). L'EMT de type 1 concerne également l'invasion trophoblastique (Vicovac et Aplin 1996) et la morphogenèse (morphogenèse mammaire et pulmonaire) (Fata et al. 2004). Ce type

d'EMT génère donc des phénotypes mésenchymateux mais peut également être transitoire. Certaines cellules peuvent en effet subir une transition inverse mésenchymo-épithéliale (MET) afin de générer des épithéliums secondaires (Nieto et al. 2016).

L'EMT de type 2 est associée à la cicatrisation, à la régénération tissulaire et à la fibrose (Kim et al. 2006; Potenta et al. 2008; Zeisberg et al. 2007). Elle est initiée par des signaux moléculaires produits en réaction à une lésion, principalement par des cellules inflammatoires mais aussi des fibroblastes ou des cellules épithéliales elles-mêmes. Le programme de ce type d'EMT commence par un événement de réparation qui génère des cellules fibroblastiques impliquées dans la reconstruction du tissu. Cet EMT est fréquemment associé à une inflammation et cesse dès que cette dernière s'atténue. Néanmoins, lors de la fibrose, l'EMT de type 2 peut se prolonger dans le temps en réponse à une inflammation continue, ce qui peut finalement mener à la destruction de l'organe.

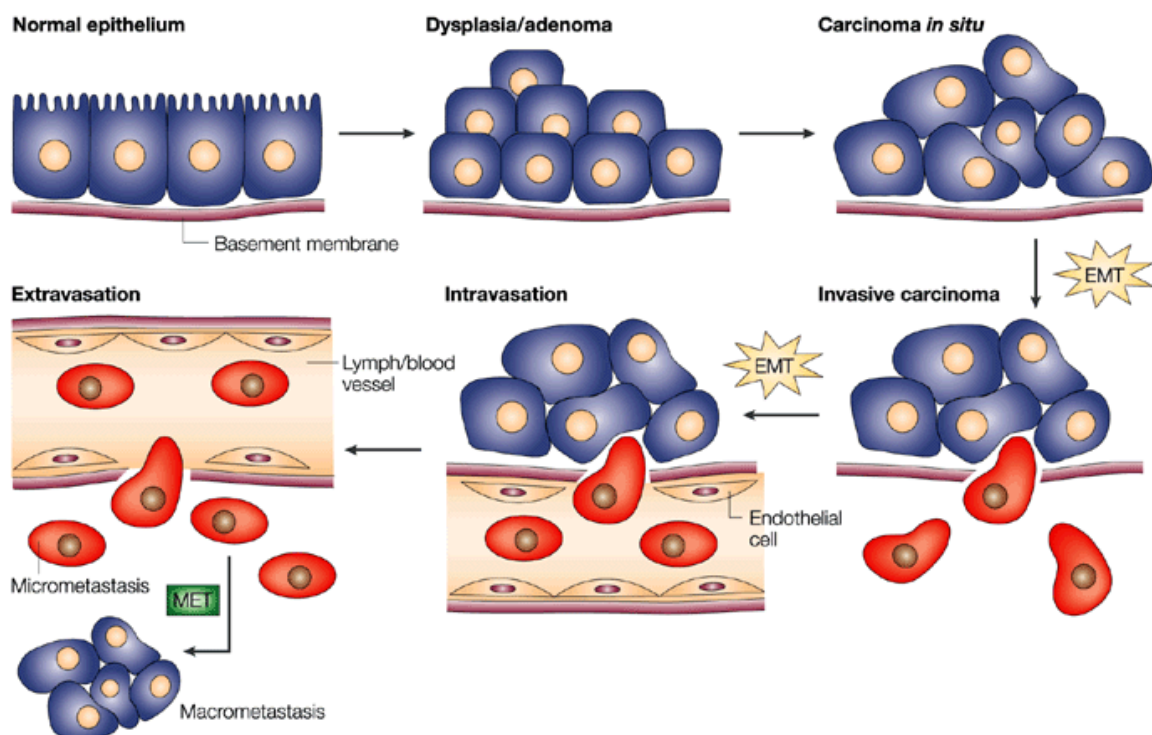
L'EMT de type 3 se présente dans le contexte de la croissance tumorale et de la progression cancéreuse (Kalluri et Weinberg 2009; Thiery 2002), quand les cellules tumorales épithéliales se transforment en un phénotype plus mésenchymateux qui génère des cellules avec des propriétés invasives leur permettant de migrer vers la circulation sanguine et de disséminer par voie systémique vers d'autres organes et ainsi de former des métastases. Ce processus d'EMT semble donc être le mécanisme responsable de l'acquisition de phénotypes malins par les cellules tumorales épithéliales.

Les processus d'EMT peuvent être incomplets et sont réversibles dans de nombreux contextes biologiques, conduisant à l'existence de nombreux phénotypes mésenchymateux.

## **II. EMT et cancers**

Bien que le rôle de l'EMT au cours de la progression tumorale soit resté longtemps un sujet de controverse, la réactivation aberrante de ce processus est maintenant considérée comme l'une des forces motrices de la dissémination métastatique au cours des étapes avancées du développement de carcinomes (Yang et Weinberg 2008). Les facteurs de transcriptions de l'EMT ont en effet en commun la capacité de réprimer, de façon directe ou indirecte, l'expression de l'E-cadhérine, facteur clé des

jonctions adhérentes. En plus de contribuer à la perte des contacts intercellulaires et de la polarité apico-basale, l'EMT est également associée à un gain de marqueurs mésenchymateux, avec l'induction de l'expression de gènes tels que la N-cadhérine, la fibronectine ou la vimentine. L'EMT permet ainsi aux cellules tumorales d'acquérir la mobilité et la plasticité nécessaires pour accomplir certaines étapes critiques du processus métastatique : invasion, intravasation, extravasation et implantation sur un site secondaire. Une fois ce site atteint, l'absence de signaux permissifs provenant du microenvironnement peut conduire au retour des cellules vers un phénotype épithélial (grâce au processus inverse de transition mésenchymo-épithéliale MET), événement nécessaire à la formation de métastases (Tsai et al. 2012).



**Figure 23 : L'EMT dans la progression tumorale (d'après Thiery 2002)**

Expérimentalement, l'exposition de cellules épithéliales humaines à des cytokines telles que le TGF $\beta$  ou l'expression forcée de Twist1, Snail, Slug, Zeb1 ou Zeb2 favorisent la survenue d'une EMT, accompagnée de l'acquisition de propriétés migratoires et invasives, et de l'augmentation de leur potentiel métastatique (Ansieau et al. 2010). Renforçant l'hypothèse du rôle de l'EMT au cours des premières étapes de la dissémination métastatique des tumeurs d'origine épithéliale, des cellules malignes présentant des caractéristiques mésenchymateuses ont pu être mises en



évidence tant dans des modèles expérimentaux murins (Rhim et al. 2012 ; Trimboli et al. 2008) que sur les fronts invasifs de tumeurs humaines coliques (Spaderna et al. 2006). Cette dernière observation a conduit à la théorie selon laquelle le rôle de l'EMT au cours de la progression tumorale se limiterait aux étapes d'invasion et de dissémination métastatique. Cette vision repose sur la conception de l'EMT comme un processus ne donnant naissance qu'à des cellules de phénotype purement mésenchymateux. Les carcinomes étant composés de cellules cancéreuses de phénotype épithélial, il était difficile d'envisager une implication significative du processus de transdifférenciation au cours des phases précoces de la cancérogenèse. Cependant, la compréhension du processus d'EMT associée au développement tumoral comme étant un phénomène dynamique de réponse au stress, capable d'engendrer des cellules douées d'une grande plasticité et présentant des caractéristiques mixtes de cellules épithéliales et mésenchymateuses, a conduit à transformer fondamentalement cette perspective. Des données de plus en plus nombreuses montrent en effet que les inducteurs d'EMT Twist, Zeb et Snail/Slug sont fréquemment exprimés dans les tumeurs humaines, et ce dès le stade localisé (Ansieau et al. 2008 ; Morel et al. 2012). De façon remarquable, ces cellules cancéreuses conservent un phénotype épithélial tel qu'observé dans des carcinomes mammaires in situ.

Une caractéristique remarquable des cellules normales est leur réactivité aux changements environnementaux provenant de stimuli ou d'agressions externes. Au cours de l'évolution des organismes vivants, les cellules ont mis en place des systèmes de défense, appelés "systèmes de sauvegarde", contre les stress métaboliques endogènes et contre les stress occasionnés par des agents physiques et chimiques. Ces systèmes sont essentiels au maintien de la stabilité génétique et à un fonctionnement cellulaire normal (Lowe et al. 2004).

Les principales voies de signalisation impliquées dans le contrôle de la TEM embryonnaire sont fréquemment réactivées au cours de la tumorigenèse, donnant une explication rationnelle à la surexpression fréquente des FT-TEM dans les cancers humains.

La TEM est ainsi initiée en réponse à des conditions de stress des signaux issus du microenvironnement qui font intervenir les voies de signalisation Wnt, Hedgehog et Notch, et des voies empruntées par les cytokines et facteurs de croissance TGF $\beta$  (Transforming Growth Factor- $\beta$ ), EGF, FGF et HGF (Thiery et al. 2006).

La compression mécanique, qui peut être engendrée par une prolifération cellulaire anarchique, induit l'expression de Twist1 par le biais de la voie Wnt, d'une manière similaire à celle observée au cours de la formation du mésoderme lors de la gastrulation. L'hypoxie, par le biais de l'activation des facteurs HIF1/2 $\alpha$ , peut également induire l'expression de Twist1 au cours du développement et de la progression tumorale, ainsi que celle d'autres FT-TEM tels Snail et Slug, pour favoriser la dissémination de cellules dans un environnement moins hostile (Gort et al. 2008). Ces observations soulignent la synergie existant entre ces facteurs de transcription et le microenvironnement tumoral. Plutôt que des inducteurs constitutifs de la TEM, ces protéines apparaissent désormais comme des senseurs capables de promouvoir une TEM dans des conditions environnementales permissives.

Une prolifération cellulaire anormale, induite en réponse à une activation oncogénique aberrante, est à l'origine de dommages à l'ADN dus à des erreurs de réplication et à la production de radicaux libres oxygénés (ROS). L'accumulation de ces altérations provoque l'activation de mécanismes oncosuppresseurs impliquant les voies p16<sup>INK4A</sup>-Rb et p14<sup>ARF</sup>-p53, ce qui conduit à un vieillissement cellulaire prématuré (appelée "sénescence prématurée") ou à une mort cellulaire par apoptose, préservant ainsi l'intégrité du tissu et de l'organisme dans son ensemble. Ces données observées initialement in vitro sont désormais vérifiées in vivo. Ainsi, des marqueurs de dommages à l'ADN et d'apoptose ont été mis en évidence dans les lésions précancéreuses de tumeurs humaines. De même, des marqueurs de sénescence cellulaire ont été observés dans des modèles expérimentaux de tumorigenèse ainsi que dans des lésions prénéoplasiques humaines. L'évolution vers la malignité est associée à une perte de ces marqueurs (Gorgoulis et al. 2005 ; Serrano et al. 1997). Ces observations convergent vers un modèle simplifié selon lequel le développement tumoral repose sur 2 principaux types d'événements au cours des phases précoces du processus : l'activation aberrante de voies de signalisation mitogénique et l'inhibition de mécanismes oncosuppresseurs qui sont normalement activés pour prévenir toute prolifération anormale. Ce modèle apporte une explication rationnelle au fait, que, in vitro, les oncogènes de types Myc ou Ras ne peuvent transformer des cellules qu'en l'absence de la protéine oncosuppressive p53, régulatrice clé des processus d'apoptose et de sénescence. L'activation des FT-TEM de la famille Twist (Twist1 ou Twist2) est suffisante in vitro et in vivo pour abolir la sénescence normalement induite en réponse à une activation anormale des oncoprotéines Ras ou

ErbB2, ou l'apoptose induite en réponse à une surexpression des oncoprotéines de la famille Myc (Ansieau et al. 2008 ; Maestro et al. 1999 ; Tran et al. 2012 ; Valsesia-Wittmann et al. 2004). Twist1 agit au niveau de régulateurs clés de ces voies oncosuppressives, en inhibant l'induction d'expression de p14ARF en réponse aux oncoprotéines Myc, et celle de p21 et p16INK4a en réponse aux oncoprotéines Ras ou ErbB2. Twist1 est aussi capable d'interagir physiquement avec p53, d'interférer avec sa régulation post-traductionnelle et ainsi de favoriser sa dégradation par MDM2 (Piccinin et al. 2012). Cette fonction oncogénique des protéines Twist est renforcée par l'observation d'une amplification du gène *Twist1* dans des carcinomes du poumon présentant une mutation de l'EGFR (Pallier et al. 2012). Elle est également cohérente avec le statut de p53 dans certaines tumeurs humaines : on observe ainsi une corrélation inverse entre la surexpression de Twist1 et les mutations de p53 dans les sarcomes (Piccinin et al. 2012), et une association étroite entre l'expression de Twist1 et l'amplification de l'oncogène N-Myc dans les neuroblastomes, tumeurs pédiatriques caractérisées par la rareté des mutations de p53 (Valsesia-Wittmann et al. 2004). L'inhibition des systèmes de sauvegarde cellulaire semble être une propriété partagée par les différents inducteurs de TEM. Les membres de la famille Zeb sont ainsi capables d'inhiber la sénescence prématurée induite dans les cellules épithéliales oesophagiennes en réponse à l'EGF (Ohashi et al. 2010). En accord avec ces résultats, l'inactivation expérimentale de *Zeb1* entraîne une sénescence prématurée associée à l'induction d'une TEM dans les fibroblastes embryonnaires murins (Liu et al. 2008). De même, l'inhibition de l'expression de Snail1 provoque l'entrée en sénescence des cellules de carcinome prostatique LNCaP (Emadi et al. 2010). Cette capacité d'inhiber la réponse oncosuppressive associée à l'activation aberrante d'une activité mitogénique explique la coopération oncogénique démontrée in vitro et in vivo entre les FT-TEM et les oncogènes de type Ras ou Myc. À titre d'exemple, l'expression forcée de Twist1 et d'une version activée de l'oncogène Ras est suffisante pour transformer des cellules épithéliales mammaires immortalisées humaines et pour conduire au développement de tumeurs mammaires chez la souris (Morel et al. 2012). De même, Twist1 coopère avec Ras in vivo pour accélérer la tumorigenèse pulmonaire en inhibant le programme de sénescence, favorisant ainsi la progression d'un adénome bénin vers un adénocarcinome (Tran et al. 2012). L'inhibition d'expression de *Twist1* dans ce modèle est suffisante pour provoquer l'entrée en sénescence des cellules cancéreuses et une régression tumorale. L'ensemble de ces observations

suggère que la réactivation des FT-TEM favorise parallèlement la progression d'une tumeur bénigne vers un stade malin et la dissémination métastatique. À l'appui de cette hypothèse, la dissémination des cellules pré malignes dans un modèle tumoral mammaire murin a été observée dès le stade d'hyperplasie, stade au cours duquel l'expression du gène *Twist1* est réactivée (Husemann et al. 2008). De même, des cellules cancéreuses présentant un très faible nombre d'anomalies chromosomiques ont été identifiées et caractérisées dans la moelle osseuse de patientes atteintes de cancers du sein, suggérant que certaines cellules peuvent disséminer précocement, avant même la survenue d'une instabilité génétique (Husemann et al. 2008). Enfin, il faut noter que la réactivation des FT-TEM au cours de la progression tumorale semble pouvoir influencer sur 2 autres étapes fondamentales de la progression tumorale : le processus de néo-angiogenèse et l'échappement au système immunitaire. Ainsi, l'expression ectopique des protéines *Twist1* et *Snail/Slug* dans des modèles de carcinome mammaire ou d'adénocarcinome pulmonaire provoque une augmentation de la synthèse de VEGF et favorise la néovascularisation après injection chez l'animal (Mironchik et al. 2005). Par ailleurs, l'expression de *Snail* est associée à l'activation des cytokines immunosuppressives et de cellules T régulatrices, à la résistance aux lymphocytes T régulateurs et aux cellules dendritiques. Au final, les FT-TEM semblent agir comme des senseurs, activés en réponse aux stress mécaniques et métaboliques associés au développement tumoral, qui permettent aux cellules cancéreuses, au travers de l'acquisition de capacités nouvelles de plasticité et d'adaptation, de franchir les principales barrières oncosuppressives intrinsèques et extrinsèques (apoptose et sénescence en réponse à une activation oncogénique ; immunosurveillance) et d'obtenir les ressources et les propriétés nécessaires à leur survie en milieu hostile (néo-angiogenèse, motilité cellulaire).

### **III. Hétérogénéité tumorale**

Le tissu cancéreux constitue un système complexe, composé de populations variées en termes tant génétiques que fonctionnels. Les cellules qui le composent sont capables de s'adapter à leur écosystème grâce à leur diversité et aux interactions qu'elles établissent avec leur microenvironnement. La diversité des populations de cellules cancéreuses au sein d'une tumeur donnée est en partie de nature génétique.

Le développement des approches de séquençage à haut débit a permis de démontrer récemment cette dimension et a mis en exergue les conséquences cliniques de la pression sélective exercée sur les cellules cancéreuses au cours du développement et de l'évolution des pathologies cancéreuses (Chisholm et al. 2015 ; Swanton 2012). Selon le modèle darwinien de la progression tumorale, l'acquisition par les cellules précancéreuses et cancéreuses d'anomalies associées à un avantage de prolifération ou de survie est à l'origine de vagues successives de phases d'expansion clonale (Cahill et al. 1999). Cette source de diversité est favorisée par l'instabilité génétique qui caractérise les cellules cancéreuses. Elle augmente les capacités d'adaptation de la tumeur au cours des différentes étapes de l'évolution de la pathologie, incluant la réponse aux thérapeutiques, et est à l'origine d'une hétérogénéité intratumorale spatiale, les différents clones tumoraux étant distribués au sein de la tumeur primaire et des métastases éventuelles (Escargueil et al. 2016 ; Swanton 2012). Mais, au-delà de l'hétérogénéité provenant de cette pression sélective, les cellules cancéreuses peuvent évoluer de façon dynamique en réponse aux signaux émis par leur micro-environnement. Ainsi, les cytokines pro-inflammatoires ou le TGF $\beta$ , inducteurs puissants de TEM, sont capables de moduler l'écosystème formé par la tumeur. Cette interaction entre les cellules cancéreuses et leur habitat est réciproque, les cellules malignes étant capables de remodeler leur microenvironnement à leur propre avantage (Gatenby et al. 2008 ; Greaves et Maley 2012). Au coeur de ces processus d'évolution et d'adaptation réside le concept de cellules souches cancéreuses (CSC). Selon celui-ci, le développement tumoral repose sur une sous-population tumorale, considérée comme une fraction minoritaire des cellules cancéreuses, possédant des capacités d'auto-renouvellement et présentant l'aptitude d'engendrer une descendance de cellules cancéreuses différenciées dépourvues de propriétés tumorigéniques. Alors que les CSC sont généralement considérées comme provenant de la transformation de cellules souches ou de progéniteurs précoces, notre équipe et celle dirigée par R. Weinberg ont démontré que l'initiation d'un processus de TEM était associée à l'acquisition par les cellules normales et transformées de caractéristiques et de propriétés de CSC (Mani et al. 2008 ; Morel et al. 2008). Cette capacité des FT-TEM à induire une dédifférenciation cellulaire reposerait sur la régulation de l'expression et/ou la coopération avec des facteurs clés de l'homéostasie des cellules souches régulant leur capacité d'autorenouvellement, comme c'est le cas pour Twist1 avec Bmi1 (Yang et al. 2010) ou pour Snail2 avec le facteur Sox9 (Guo et al. 2012).

La surexpression de Twist1 in vivo dans des modèles murins conduit ainsi à la formation de carcinomes mammaires dédifférenciés de type “claudin-low”, un sous-type à cellules mésenchymateuses caractérisé par ses propriétés de type cellules souches (Morel et al. 2012). L’activation des FT-TEM permet donc aux cellules douées d’une activité mitogénique aberrante non seulement d’échapper aux barrières oncosuppressives mais aussi d’acquérir des propriétés d’autorenouvellement, participant ainsi à la transformation maligne et au développement de la tumeur primaire. Cette source de plasticité phénotypique suggère qu’il existe ainsi un équilibre dynamique au sein d’une tumeur, équilibre pouvant évoluer en fonction des signaux émis par le microenvironnement tumoral.

#### **IV. Les facteurs de transcription impliqués**

De nombreux facteurs de transcription peuvent induire l’EMT. La reprogrammation moléculaire durant l’EMT est causée par trois groupes de facteurs de transcription appelés famille Snail, Twist et ZEB (Garg 2013).

La famille Snail comprend Snail1, Snail2 (Slug) et Snail3 (Smuc). Ces facteurs régulent les marqueurs épithéliaux et mésenchymateux (Peinado et al. 2004 ; Bolos et al. 2003). Snail1 induit un signal qui initie le processus d’EMT (Dave et al. 2011 ; Tran et al. 2011).

Ces facteurs inhibent d’autres marqueurs épithéliaux qui agissent sur l’E-cadhérine et se lient au promoteur de l’E-cadhérine pour inhiber sa transcription. Les facteurs Snail activent l’expression de gènes « mesenchymal like » et pro-invasifs qui promouvoit la migration cellulaire (Sanchez-Tillo et al. 2012). Les facteurs Snail sont absents dans les cellules épithéliales normales et Snail1 est très exprimé comparativement à Snail2 et Snail3. La surexpression nucléaire de Snail1 est associée avec la progression tumorale et il peut être retrouvé dans le cytoplasme de plusieurs carcinomes. Le marquage Snail1 est retrouvé dans les cellules « fibroblastes like », les cellules endothéliales au niveau du stroma péri-tumoral et dans les carcinomes colorectaux inflammés (Francí et al. 2009). Snail1 favorise l’apparition de tumeurs mammaires HER2 induites chez la souris et ses caractéristiques « mesenchymateux like » sont retrouvées dans de nombreux carcinomes humains (Moody et al. 2005). Par conséquent, de nombreux cancers du sein sont induits spontanément par Snail1. Un

niveau élevé de Snail1 est un facteur prédictif d'une diminution de la survie sans progression chez les patients atteints de cancers du sein. Ce facteur est considéré comme un facteur pronostic d'une mauvaise évolution et d'une mauvaise survie dans de nombreux cancers (Sanchez-Tillo et al. 2012).

Le facteur Twist induit l'EMT en influençant d'autres facteurs de transcription liés à l'EMT. Twist1 inhibe l'E-cadhérine en induisant Snail1 ou Snail2 et en se liant à son promoteur (Yang et al. 2004 ; Smit et al. 2009 ; Casas et al. 2011). La downrégulation de Twist1 dans des cellules tumorales mammaires réduit les métastases dans des modèles de xénogreffes mais n'influence pas la formation de tumeurs primaires (Terauchi et al. 2007). Twist1 induit la N-cadhérine en guidant sa transcription et les mécanismes post-transcriptionnels (Alexander et al. 2006 ; Yang et al. 2007). Il promeut l'expression de marqueurs mésenchymateux sans provoquer de switch N-cadherine/E-cadhérine dans les cellules de glioblastomes (Mikheeva et al. 2010).

Dans la mobilité cellulaire, l'expression accrue de Twist1 augmente l'expression de gènes du cytosquelette et de la matrice extracellulaire.

Twist1 et Twist2 sont surexprimés au niveau du front invasif des carcinomes de sein et des cellules stromales (Song et al. 2006 ; Yuen et al. 2007 ; Fang et al. 2011). Ces facteurs sont absents au sein de l'épithélium normal mais sont induits dans de nombreux carcinomes humains, comme ceux du tractus digestif, du foie, du sein, de l'endomètre ovarien et de la prostate. Les facteurs Twist sont surexprimés dans le cytoplasme et le noyau des cellules cancéreuses. Ils sont des facteurs pronostiques dans l'augmentation de l'apparition de tumeurs, d'agressivité et de faible taux de survie des patients (Terauchi et al. 2007 ; Song et al. 2006 ; Yang et al. 2009). Les facteurs Snail et Twist jouent des rôles distincts mais collaboratifs envers les facteurs de transcriptions impliqués dans l'EMT.

La famille ZEB est composée de protéines en doigts de zinc, ZEB1 et ZEB2. L'expression des facteurs ZEB conduit à l'EMT en activant les propriétés mésenchymateuses et en réprimant les marqueurs épithéliaux (Sanchez-Tillo et al. 2012). ZEB1 et ZEB2 se lient aux séquences E-box du promoteur de l'E-cadhérine et recrutent différents co-répresseurs appelé SWI/SNF et CtBP pour ZEB1 et NuRD et CtBP pour ZEB2.

Les protéines ZEB se lient et inhibent les promoteurs de marqueurs épithéliaux comme R- et P-cadhérines, jonctions gap (connexines 26 et 31), marqueurs de polarité cellulaires, desmosomes (plakophilin 3, desmoplakin) et les composants des jonctions

serrées (claudin 7, occludin). Les protéines ZEB activent les marqueurs mésenchymateux comme la N-cadhérine et la vimentine (Sanchez-Tillo et al. 2012). ZEB1 inhibe le phénotype épithélial, bien que ce facteur soit retrouvé dans des fibroblastes isolés et des cellules immunes de la matrice interstitielle.

Ce facteur n'est pas exprimé dans l'épithélium et dans les carcinomes bien différenciés qui expriment l'E-cadhérine (Brabletz et al. 2001 ; Spaderna et al. 2006).

ZEB1 est fortement exprimé dans les cellules tumorales invasives dédifférenciées, comme le cancer colorectal, du sein, du foie, de l'endomètre, du poumon, de la prostate et du pancréas. ZEB1 et ZEB2 sont exprimés par les cellules stromales des tissus épithéliaux et organes normaux avec des cellules épithéliales E-cadhérine positive (Oztas et al. 2010).

D'autres facteurs de transcription peuvent aussi induire l'EMT et l'invasivité tumorale. Le facteur « homeobox » goosecoid induit l'EMT en activant les gènes mésenchymateux et en réprimant les marqueurs épithéliaux. TGF- $\beta$  induit goosecoid dans les cellules épithéliales mammaires et goosecoid est surexprimé dans les carcinomes mammaires ductal et l'hyperplasie atypique ductal (Hartwell et al. 2006).



---

## Objectifs des travaux

---

Le cancer du côlon est le troisième cancer le plus fréquent et touche presque autant les femmes que les hommes. C'est également la deuxième cause de décès par cancer en France.

La découverte de l'angiogenèse et le développement des thérapies anti-angiogéniques ont révolutionné la prise en charge thérapeutique de nombreux cancers dont le CCR. Une des cibles de ces médicaments est le facteur VEGF. Deux médicaments ciblant le VEGF sont approuvés dans le traitement du cancer colorectal métastatique : le Bevacizumab (approuvé en première ligne) et l'Aflibercept (approuvé en deuxième ligne). Malgré l'efficacité démontrée de ces traitements, il manque toujours à l'heure actuelle le développement et la validation de marqueurs prédictifs d'efficacité de ces molécules. En effet, certains patients répondent très bien tandis que d'autres y sont réfractaires. Pourtant l'utilisation des marqueurs prédictifs est indispensable pour une meilleure prise en charge des patients.

Ces dernières années, plusieurs études d'expression génique ont permis d'individualiser de nouveaux groupes de pronostic variable, soulignant l'hétérogénéité des CCR. Ces sous-groupes permettent une aide au niveau du pronostic ainsi que pour le choix du traitement pour chaque patient, basé, non seulement sur les mutations et les voies d'activation de ces tumeurs mais aussi sur les caractéristiques phénotypiques et les réponses aux traitements d'autres tumeurs avec des signatures comparables. Ces signatures récentes n'ont pas encore d'application clinique, mais leur utilisation est en cours de validation. Des signatures prédictives de l'efficacité des chimiothérapies et des thérapeutiques ciblées sont également en cours d'analyse.

Le but de ce travail de thèse a été dans un premier temps d'évaluer le phénotype de 5 lignées de CCR en examinant les différents marqueurs épithéliaux et mésenchymateux. Ces différentes lignées ont été classées selon leur phénotype plus ou moins mésenchymateux.

Dans un deuxième temps, ces lignées ont été étudiées *in vivo* dans des modèles de xénogreffes sous cutanées chez la souris. Ces modèles nous ont permis de comparer

l'efficacité du Bevacizumab et de l'Aflibercept sur plusieurs modèles des cancers colorectaux ayant des phénotypes différents. En effet, aucune étude n'a pour le moment démontré la supériorité d'efficacité d'une de ces deux molécules comparativement à l'autre dans le cancer du côlon. De plus, nous voulions étudier l'influence des différents phénotypes sur la réponse à ces deux traitements et chercher des marqueurs prédictifs qui pourraient expliquer les différences de réponse.

L'ensemble des données obtenues est rapporté sous forme d'un article à la suite duquel sont présentés la discussion et les perspectives de cette étude.

## The mesenchymal phenotype and the response to bevacizumab and aflibercept in colorectal cancer

Anaïs Bouygues<sup>1-3</sup>, Lila Louadj<sup>1-3</sup>, Sandrine Thouroude<sup>1-3</sup>, Benoist Chibaudel<sup>1-3,4</sup>, Jean-Paul Thiery<sup>5</sup>, Aimery de Gramont<sup>1-3,4</sup>, Annette K Larsen<sup>1-3,6</sup>

<sup>1</sup>Cancer Biology and Therapeutics, Centre de Recherche Saint-Antoine (CRSA), Paris 75571, France

<sup>2</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U938, Paris 75012, France

<sup>3</sup>Institut Universitaire de Cancérologie (IUC), Université Pierre et Marie Curie (UPMC), Sorbonne Universités, Paris 75005 France

<sup>4</sup>Department of Medical Oncology, Institut Hospitalier Franco-Britannique, 92300 Levallois-Perret, France

<sup>5</sup>Yong Loo Lin School of Medicine, National University of Singapore, Republic of Singapore

<sup>6</sup>Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Paris 75016, Paris

**Running title:** The mesenchymal phenotype and VEGF-inhibitors in CRC

**Keywords:** mesenchymal phenotype, colorectal cancer, VEGF inhibition, aflibercept, bevacizumab, second-line treatment

Correspondence to: Dr Annette K. Larsen, Cancer Biology and Therapeutics, Kourilsky Research Building 1<sup>st</sup> floor, Hôpital Saint-Antoine, 184 rue du Faubourg Saint-Antoine, 75571 PARIS Cedex 12 France. E-mail: [annette.larsen@upmc.fr](mailto:annette.larsen@upmc.fr)

## Abstract

**Purpose.** VEGF is a validated target for treatment of metastatic colorectal cancer (mCRC) with bevacizumab (Avastin®) and aflibercept (VEGF-trap, Zaltrap®) being approved for first and second line treatment, respectively. Recently, different CRC subtypes have been identified including a mesenchymal subgroup with prominent angiogenesis and poor prognosis. We here wish to establish if the mesenchymal phenotype is predictive for the response to VEGF-targeted agents. In addition we wanted to determine if aflibercept was active toward CRC xenografts progressing on bevacizumab.

**Experimental Design.** CRC cell lines were examined for expression of epithelial (E-cadherin, gamma-catenin, cytokeratin 18) and mesenchymal (vimentin, N-cadherin, fibronectin) markers *in vitro* and *in vivo* by qRT-PCR and Western blot analysis and the cellular distribution of E-cadherin and beta-catenin was determined by ICC. Five CRC models were selected ranging from pronounced epithelial (HT-29, DLD-1), intermediate (HCT-116) to mesenchymal (HCT-116/5-FU, LS174T) and the tumor growth inhibitory activity of bevacizumab and aflibercept was established. The microvascular density (MVD) was characterized by quantitative IHC analysis.

**Results.** Two CRC xenograft models were sensitive to both bevacizumab and aflibercept, two models were more sensitive to aflibercept than to bevacizumab, and one model was resistant to both agents. The mesenchymal phenotype was associated with higher microvascular density but not with the response to bevacizumab or aflibercept. Cross-

over experiments showed activity of aflibercept in CRC tumors progressing on bevacizumab.

**Conclusions.** Neither the mesenchymal phenotype nor MVD were predictive for the response to VEGF-targeted agents. Aflibercept showed second-line activity in CRC models progressing on bevacizumab.

## Introduction

Vascular endothelial growth factor A (VEGF-A/VEGF) is a key regulator of tumor angiogenesis. Two VEGF-targeted agents are currently approved for treatment of patients with metastatic colorectal cancer (mCRC), the humanized monoclonal antibody bevacizumab (Avastin®) that is approved in first-line and aflibercept (VEGF-trap, Zaltrap®) a recombinant fusion protein that is approved for second line. Bevacizumab specifically targets VEGF-A while aflibercept also binds and neutralizes VEGF-B and PlGF (Papadopoulos et al., 2012; Ferrara, 2016). VEGF-A is able to bind and activate VEGF receptors 1 and 2 (VEGFR1 and VEGFR2) whereas PlGF and VEGF-B are specific ligands for VEGFR1 (Larsen et al., 2013).

A practical limitation for the use of VEGF-targeted agents is the lack of validated predictive biomarkers. A number of biomarkers for VEGF-inhibition have been proposed including hypertension, tumor imaging, soluble VEGF receptors, circulating cytokines and angiogenic factors or polymorphisms in VEGF-pathway genes. However, these studies are usually based on small patient groups and/or retrospective analyses and so far, none of these biomarkers have been validated prospectively (for review, see Ferrara & Adamis, 2016).

Classification of colorectal cancer based on gene signatures has allowed stratification of CRC into distinct subgroups. An early study reported that the epithelial-mesenchymal transition (EMT) was the dominant program in human colon cancer (Loboda et al., 2011). In EMT, stationary, adherent and polarized epithelial cells acquire features of mobile, individualized mesenchymal cells (Nieto et al., 2016). Importantly, although initially believed to be a binary process, it is now well accepted that cells can be arrested in intermediate (metastable) states allowing them to exhibit both epithelial and mesenchymal features at the same time

(Jordan et al., 2011). Recent studies carried out with cell line panels or patient samples have further stratified CRC into different molecular subgroups (Cancer Genome Atlas Network, 2012; Perez-Villamil et al., 2012; Schlicker et al., 2012; Budinska et al., 2013; Marisa et al., 2013; Sadanandam et al., 2013; De Sousa et al., 2013; Roepman et al., 2014; Guinney et al., 2015). Pooling of patient data from different studies lead to the identification of CMS4 (consensus molecular subtype 4), a poor prognosis subgroup characterized by a mesenchymal phenotype, angiogenesis and activation of VEGF/VEGFR signaling (Guinney et al., 2015).

A major challenge is how these signatures can contribute to therapeutic progress considering that use of the full signature is not feasible for routine clinical use (reviewed by Dienstman et al., 2017). Furthermore, although the signatures appear to have prognostic significance, their predictive value remains to be established. Considering the strong expression of angiogenesis-related features which is characteristic for the mesenchymal subgroup, we would expect this group to display an altered response to angiogenesis inhibitors. In agreement, recent findings suggest that increased tumor microvascular density may serve as positive biomarkers for the response to bevacizumab in ovarian cancer patients (Bais et al., 2017). However, the mesenchymal phenotype is usually, although not always, associated with chemoresistance (Tan et al., 2014) in which case the mesenchymal phenotype could be associated with a negative response to VEGF-targeted therapies. Finally, an early study showed no association between the microvascular density and the response to bevacizumab in CRC patients (Jubb et al., 2006). Therefore, the existence of a possible correlation between the mesenchymal subtype and the response to angiogenesis inhibitors remains an open question.

A second important question concerns the relative activity of bevacizumab and aflibercept in second line treatment. Biomarker studies in CRC patients indicate that bevacizumab treatment is accompanied by increased levels of circulating PlGF which is particularly prominent prior to progression suggesting that the increase of PlGF may somehow be associated with tumor progression (Kopetz et al.; Loupakis et al., 2011). Since aflibercept, but not bevacizumab, targets PlGF, this suggests that aflibercept might be active in patients progressing on bevacizumab due to natural or acquired bevacizumab resistance.

In this study, the expression and localization of validated epithelial and mesenchymal markers were determined for CRC models *in vitro* and *in vivo* and correlated with the sensitivity of the corresponding tumor xenografts to bevacizumab and aflibercept. We identified three different patterns, two tumor models that were sensitive to both bevacizumab and aflibercept, two models that were sensitive to aflibercept, but not to bevacizumab and one model that was resistant to both agents. No correlation with the mesenchymal phenotype or with the tumor microvascular density and the sensitivity to bevacizumab or aflibercept was observed in this study. In contrast, the treatment-associated diminution of the microvasculature was closely linked to the antitumor effect. Cross-over experiments for the models showing differential sensitivity to the two agents, revealed clear tumor growth inhibition with aflibercept after progression with bevacizumab. These findings suggest that, for at least some CRC models, aflibercept is active toward CRC tumors progressing on bevacizumab.



## **Materials and Methods**

### **Drugs**

Bevacizumab (Avastin) and aflibercept (Zaltrap) were provided by Sanofi.

### **Tumor cells**

CRC cells were maintained in cell culture as described previously (Oualet and Larsen, 2014). HT-29 cells were kindly provided by Richard Camalier (National Cancer Institute, Bethesda, MD) while HCT-116 cells were a generous gift from Bert Vogelstein (John Hopkins, Baltimore, MD). The fluorouracil-resistant HCT-116/5-FU subline was developed in the laboratory as described previously (Ayadi et al., 2015). LS174T and DLD-1 CRC cells were a kind gift from Richard Hamelin (Saint-Antoine Research Center, Paris, France). Upon defreezing, cell lines were monitored for mycoplasma contamination and characterized by next generation sequencing of 50 cancer-related genes using the Ion AmpliSeq Cancer Hotspot Panel v2 (ThermoFisher). Cells were replaced after 3 months in culture.

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

Total RNA was extracted from CRC cells (1 million cells per 60 mm petri dish) using the TRIzol® RNA purification reagent. RNA quantity and purity were determined by using a NanoDrop ND-1000. Total RNA (1 µg) from each sample was reverse transcribed and real-time RT-PCR measurements were performed as described previously (Fritah et al., 2008; Guerin et al., 2012; Petitprez et al., 2013) using a Mx3000P apparatus (Agilent) with the corresponding SYBR Green kit. PCR primers were designed with Primer 3 (Agilent) as follows:

E-cadherin, upper, 5'-TGCCCAGAAAATGAAAAAGG-3', lower, 5'-GTGTATGTGGCAATGCGTTC-3'.

Gamma-catenin, upper, 5'-AAGGTGCTATCCGTGTGTCC-3', lower, 5'-GACGTTGACGTCATCCACAC-3'.

Cytokeratin 18, upper, 5'-ACCTTCTCCACCAACTACCG-3', lower, 5'-TGCATGGTCTCCTTCTCGTT-3'.

Vimentin, upper, 5'-GAGAACTTTGCCGTTGAAGC-3', lower, 5'-TCCAGCAGCTTCCTGTAGGT-3'.

N-cadherin, upper, 5'-GACAATGCCCCTCAAGTGTT-3', lower, 5'-CCATTAAGCCGAGTGATGGT-3'.

Fibronectin, upper, 5'-ACCAACCTACGGATGACTCG-3', lower, 5'-GCTCATCATCTGGCCATTTT-3'.

Beta-actin, upper, 5'-GGACTTCGAGCAAGAGATGG-3', lower, 5'-AGCACTGTGTTGGCGTACAG-3'.

Gene expression was normalized to beta-actin. Target cDNA expression was quantified using the comparative Ct method and expressed as the fold change in the samples compared to HCT-116 cells or tumors.

### **Western blot analysis**

Western blot analysis was carried out as described previously (Escargueil et al., 2008) with cells seeded at a density of 2 million cells per Petri (60mm<sup>3</sup>) dish. The primary antibodies were directed against, E-cadherin (BD transduction # 610182), cytokeratin 18 (Santa Cruz # sc-6259), gamma-catenin (Santa Cruz # sc-8415), N-cadherin (BD transduction # 610920), fibronectin (BD transduction # 610077), vimentine (Santa Cruz # sc-32322) and beta-actin (Santa Cruz # sc-47778). The corresponding secondary antibodies were purchased from Cell Signaling (HRP-linked anti-mouse IgG # 7076S; HRP-linked anti-Rabbit IgG #

7074S). Antigens were detected by enhanced chemiluminescence using Western ECL substrate (Biorad # 170-9061). Digital images were collected, and band intensities were measured using ChemiDoc Imaging systems (Biorad).

### **Immunocytochemistry**

Cells (250 000) were seeded on glass coverslips (18 mm), fixed with 4% PFA (ParaFormAldehyde) for 20 minutes and permeabilized with PBS-Triton 0,5% (Sigma) for 20 minutes at room temperature. Samples were saturated in a PBS with 1% bovine serum albumin and 0,2% gelatine followed by incubation with antibodies directed against E-cadherin (BD transduction # 610182) or beta-catenin (Santa Cruz # sc-1496-R). The corresponding Cy3-conjugated secondary antibodies (CY3 Donkey IGG anti-mouse # 715-165-150; CY3 Donkey IGG anti Rabbit # 711-165-152) were purchased from Jackson ImmunoResearch, Bar Harbor, ME). Nuclei were stained with DRAQ-5 (Cell Signaling # 4084S). Confocal microscopy analyses were performed using a laser-scanning confocal microscope (model Leica SP2) at 60x magnification.

### **In vivo studies**

The antitumor effects of aflibercept and bevacizumab (4 mg/kg *i.p.* twice weekly) were evaluated in athymic mice (female NMRI-Foxn1n, 6 weeks old) from Taconic (Skensved, Danmark) bearing HT-29, DLD-1, HCT-116, HCT-116/5-FU or LS174T xenografts. PBS was used as vehicle control. Two to five million cells were injected into the right flank and the treatments were started when the tumors were palpable. Animals were weighed daily and the tumor size was determined three times per week (Mesange et al., 2014). Tumor volumes (mm<sup>3</sup>) were calculated according to formula:  $[(\text{length} \times \text{width}^2)/2]$ . Boxplot analysis was carried out using the

graphpad prism 6.04 software (Graphpad, La Jolla, CA). Treated over Control (T/C) values were calculated as follows: average tumor volume of treated animals/average tumor volume of control animals x 100. Animals were treated according to institutional guidelines and the protocol was approved by the local ethics committee for animal experimentation.

## **Immunohistochemistry**

Biomarker analysis was carried out with tumors collected after 4 weeks of treatment and processed for immunohistochemistry (IHC) analysis. The following antibodies were used: anti-CD31/PECAM-1 (Abcam ab28364)) to determine the vascular density, anti-phospho-VEGFR1 (Millipore 07-758) that recognizes phospho-Tyr 1213, anti-phospho-VEGFR2 (Cell Signaling # 2478) that recognizes phospho-Tyr 1273 and anti-VEGFR1 (Santa Cruz Sc-9029,). The relevant Cy3-conjugated secondary antibodies were obtained from Jackson ImmunoResearch (Montlucon, France). Tumors were counterstained by 4',6-diamidino-2-phenylindole to reveal the nuclei of individual cells.

All images were captured by a fluorescence microscope and the fluorescence intensities were determined by the MetaMorph software (Universal Imaging Corporation, New York). For quantitative analysis, the data represents the average fluorescence intensity of treated tumors compared to the treatment intensity of control tumors and are the average of 6 fields/tumor for at least 3 different tumors. Blood vessel density is expressed as the CD31-positive area, in % of total, and represents the averages of at least 6 fields/tumor for at least 3 different tumors.

## **Statistical analysis**

ANOVA was performed to determine the significance of observed differences between groups using the tool pack from Excel (Microsoft).

Post hoc comparisons was made using Student's paired *t*-test using GraphPad Prism (GraphPad Software). Differences between two groups are presented as the mean  $\pm$  SD. All tests were two-sided and *p* values  $<0.05$  were considered statistically significant.

## Results

### Differential expression of epithelial/mesenchymal markers in CRC cells.

The expression of epithelial (E-cadherin, gamma-catenin/plakoglobin, cytokeratin 18) and mesenchymal (vimentin, N-cadherin, fibronectin) markers was determined by relative quantitative RT-PCR (Figure 1 open columns). The results indicate important differences in the expression of the epithelial markers E-cadherin, gamma-catenin and cytokeratin 18 with strong expression in two cell lines (HT-29 and DLD-1), intermediate expression in one cell line (HCT-116) and low expression in two cell lines (HCT-116/5-FU and LS174T). In contrast, vimentin was only expressed by one cell line (HCT-116/5-FU) whereas no detectable expression was detected for N-cadherin or fibronectin in any of the cellular models (data not shown). Western blot analysis confirmed these findings with strong expression of E-cadherin and gamma-catenin in three cell lines (HT-29, DLD-1 and HCT-116) and cytokeratin 18 in two cell lines (HT-29 and DLD-1) compared to the other models (Figure 2, upper lanes). Vimentin was only expressed by HCT-116/5-FU cells whereas fibronectin and N-cadherin was expressed in none of the five cell lines (Figure 2, upper lanes and Supplementary figure S1).

The mesenchymal phenotype is typically accompanied by altered cellular distribution of E-cadherin and beta-catenin. The results (Figure 3) show that E-cadherin is predominantly membrane-associated in HT-29,

DLD-1 and HCT-116 cells, which is particularly pronounced for the HT-29 model. In comparison, HCT-116/5-FU cells display a faint membrane-associated signal whereas LS174T display a punctate intracellular signal, likely corresponding to proteolyzed E-cadherin (David &, Rajasekaran 2012). A similar distribution was observed for beta-catenin. Importantly, a subfraction of LS174T cells displayed nuclear beta-catenin, typically associated with an invasive mesenchymal phenotype (Brabletz et al., 2001). Therefore, the selected CRC cell lines displayed various degrees of epithelial/mesenchymal features ranging from pronounced epithelial (HT-29, DLD-1), moderate epithelial (HCT-116) to mesenchymal (HCT-116/5-FU and LS174T). Interestingly, the mesenchymal phenotype was predominantly associated with loss of epithelial features, rather than with expression of mesenchymal markers.

**CRC xenografts show different patterns of sensitivity to aflibercept and bevacizumab.** The tumor growth inhibitory activity was determined after 4 weeks continuous exposure to aflibercept or bevacizumab. Three different patterns of response were observed (Figure 4). Two models (DLD-1 and HCT-116/5-FU) were sensitive to both agents. Specifically, the tumor growth inhibition was 77% and 87% for bevacizumab and aflibercept, respectively, for DLD-1 tumors and 63% and 79%, respectively, for HCT-116/5-FU tumors. Two models (HT-29 and HCT-116) showed sensitivity to aflibercept, but were more resistant to bevacizumab, corresponding to 29% and 65% tumor growth inhibition for bevacizumab and aflibercept, respectively, for HT-29 tumors and 49% and 76% tumor growth inhibition, respectively, for HCT-116 tumors. Finally, one model (LS174T) showed limited sensitivity to both drugs with 29% and 35% tumor growth inhibition to bevacizumab and aflibercept, respectively. These data are summarized in Figure 4 (bottom panel).

**The mesenchymal phenotype and the response to VEGF-targeted agents.** A comparison of the tumor phenotype and the response to bevacizumab or aflibercept reveals no obvious correlation between tumor growth inhibition and the epithelial/mesenchymal phenotype (Figure 4, bottom panel). For bevacizumab, the most resistant tumors have either a pronounced epithelial (HT-29) or a pronounced mesenchymal (LS174T) phenotype. Similarly, for the sensitive tumors, one (DLD-1) is epithelial whereas the other (HCT-116/5-FU) is mesenchymal. Although the findings are less pronounced for aflibercept, it is notable that one of the mesenchymal models (HCT-116/5-FU) is sensitive to aflibercept, whereas the other mesenchymal model (LS174T) is resistant. Taken together, the mesenchymal phenotype alone was not associated with the response to VEGF-targeted agents, neither positively or negatively.

**The mesenchymal phenotype and microvascular density.** It has been reported, that the mesenchymal phenotype is accompanied with increased microvascular density (Guinney et al 2015). These findings are coherent with our data, since the microvascular density ranged from 2.9 to 4.5, as expressed as % of the total tumor area, for the epithelial tumors while the two mesenchymal models had a microvascular density between 5.0 and 5.8 (Table 1).

The influence of the two VEGF-targeted agents on tumor growth inhibition was closely reflected in their influence on the microvascular density, as measured by CD31/PECAM-1. The treatment resulted in up to 91% reduction of the microvascular density in sensitive tumors whereas the microvasculature was only reduced 12-15 % for tumors resistant to bevacizumab and aflibercept (compare Figure 4 bottom and Table 1).

In contrast, there was no obvious correlation between the epithelial/mesenchymal phenotype and the influence of the two agents on

the microvascular density. Specifically, bevacizumab had modest effect on the microvascular density in both the epithelial HT-29 and the mesenchymal LS174T xenografts. In contrast, bevacizumab treatment showed strong inhibition on the microvasculature in both the epithelial DLD-1 tumors and the mesenchymal HCT-116/5-FU tumors (Table 1). Although the results for aflibercept were less striking, it is notable that aflibercept showed variable activity toward the two mesenchymal models LS174T and HCT-116/5-FU.

**Aflibercept show activity in second line after bevacizumab.**

Aflibercept showed superior activity compared to bevacizumab in two tumor models, HT-29 and HCT-116. To determine, if this would also be the case if aflibercept was administered in second line, one arm was treated with bevacizumab with a cross-over to aflibercept on day 15.

The results show, that even after 14 days prior exposure to bevacizumab, subsequent exposure to aflibercept have a noticeable effect toward HCT-116 tumors (Figure 5, upper panel). Specifically, at the end of the treatment, there was highly significant difference between the bevacizumab group (bevacizumab for 28 days) compared to the bevacizumab to aflibercept group (14 days bevacizumab followed by 14 days aflibercept). In contrast, no significant differences were observed between the aflibercept group (aflibercept for 28 days) and the bevacizumab to aflibercept group (14 days bevacizumab followed by 14 days aflibercept).



## **Discussion**

Characterization of established CRC cell lines with respect to epithelial and mesenchymal markers resulted in identification of five models displayed various degrees of epithelial/mesenchymal features ranging from pronounced epithelial (HT-29, DLD-1), moderate epithelial (HCT-116) to mesenchymal (HCT-116/5-FU and LS174T). Comparison of the expression pattern in CRC cells and the corresponding tumor xenografts revealed a similar expression of the different markers suggesting a relatively minor influence of the stromal component of the tumor xenografts. Interestingly, the mesenchymal profile was predominantly associated with loss of epithelial features, rather than with expression of typical mesenchymal markers. Previous work has defined an “EMT score” dividing 15 different tumor types into an “epithelial-like” or “mesenchymal-like” phenotype based on transcriptional profiling of patient samples (Tan et al., 2014). Interestingly, colon cancer came out as the most epithelial tumor type with only a modest mesenchymal subfraction. These finding could, at least in part, explain why the existence of a mesenchymal phenotype in CRC is often challenged by medical pathologists.

Treatment of the 5 xenograft models with bevacizumab or aflibercept revealed 3 different patterns. Two tumor models (DLD-1 and HCT-116/5-FU) were sensitive to both bevacizumab and aflibercept, two models (HT-29 and HCT-116) were sensitive to aflibercept, but not to bevacizumab and one model (LS174T) was resistant to both agents. There was no obvious relation between the response to the two VEGF-targeted agents and the mesenchymal phenotype which was particularly striking for bevacizumab since the two bevacizumab-sensitive xenografts included one epithelial (DLD-1) and one mesenchymal (HCT-116/5-FU) model

while the two bevacizumab-resistant tumors also included one epithelial (HT-29) and one mesenchymal (LS174T) model.

The mesenchymal phenotype has been associated with increased angiogenesis and microvascular density. This is concordant with our results, since the 3 epithelial tumor models showed lower microvascular density than the mesenchymal tumors. In contrast, there was no correlation between the MVD and the response to neither bevacizumab nor aflibercept. These data contrast with recent findings for ovarian cancer where the basal levels of MVD were predictive for the response to bevacizumab (Bais et al., 2017). However, our findings are in agreement with early data for CRC patients where the basal levels of MVD showed no correlation with the response to bevacizumab. It is not clear why the results from the two studies differ although it is possible that the influence of MVD on the response to VEGF inhibition is tumor-type dependent.

In contrast to the basal levels, there was a clear correlation between the attenuation of MVD and tumor growth inhibitory in all models. This is coherent with the prevailing view of angiogenesis being principally driven by the VEGF-A/VEGFR2 axis. However, it should be noted that both VEGFR1 and PlGF are able to modulate VEGFR2 signaling. It has been reported that activation of VEGFR1 by PlGF results in intermolecular transphosphorylation of VEGFR2, thereby amplifying VEGF-driven angiogenesis through VEGFR2 (Autiero et al., 2003). Furthermore, the two ligands, VEGF-A and PlGF are able to form heterodimers which promote the formation of VEGFR1/VEGFR2 heterodimers (Autiero et al., 2003; Cudmore et al., 2012). Interestingly, although the VEGFR1/VEGFR2 heterodimers activate endothelial cell migration and tube formation they do appear to promote endothelial cell migration, pointing to fundamental functional differences between VEGFR1/VEGFR2 heterodimers and VEGFR2 dimers. These findings

suggest that PlGF, although being specific binding to VEGFR1 is also able to modulate VEGFR2 signaling.

VEGF signaling also plays an important role for the tumor cells. Most, if not all CRC cells and tumors express functional VEGFR1 (Fan et al., 2005; Poindessous et al., 2011) and the vast majority of VEGF in the tumor environment is secreted by the tumor cells thereby promoting both endocrine and paracrine VEGF-signaling (Mésange et al., 2014; Chiron et al., 2014). VEGFR1 staining generally increased with tumor progression and strong VEGFR1 staining has been associated with shorter survival for CRC patients after surgery (Bates et al., 2003; Fan et al., 2005; Okita et al., 2009). VEGFR1 signaling seems to be particularly important for the survival of CRC cell undergoing EMT to compensate for the loss of homotypic survival signaling when the cells become more individualized (Bates et al., 2003). This might explain why the influence of bevacizumab and aflibercept toward the highly mesenchymal LS174T cells were more prominent (29-38% growth inhibition) compared to the modest attenuation of the MVD (12-15% decrease).

We then asked if aflibercept would have activity in tumor models progressing on bevacizumab. For this experiment we selected the HT-29 and HCT-116 models that show differential sensitivity to bevacizumab and aflibercept. The results (Figure 6 and ongoing experiments) clearly indicate that aflibercept shows activity in both models when administered after bevacizumab in agreement with previous studies in patient-derived xenograft models (Chiron et al., 2014)

Taken together, no correlation was observed between the mesenchymal phenotype or the tumor microvascular density and the sensitivity to VEGF-target agents. In contrast, the treatment-associated diminution of the microvasculature was closely linked to the antitumor

effect. Cross-over experiments revealed clear tumor growth inhibition with aflibercept after progression with bevacizumab. These findings suggest that aflibercept is active toward CRC tumors progressing on bevacizumab.

## References

Autiero M, Waltenberger J, Communi D, Kranz A, Moons L, Lambrechts D, Kroll J, Plaisance S, De Mol M, Bono F, Kliche S, Fellbrich G, Ballmer-Hofer K, Maglione D, Mayr-Beyrle U, Dewerchin M, Dombrowski S, Stanimirovic D, Van Hummelen P, Dehio C, Hicklin DJ, Persico G, Herbert JM, Communi D, Shibuya M, Collen D, Conway EM, Carmeliet P. Role of PlGF in the intra- and intermolecular cross talk between the VEGF receptors Flt1 and Flk1. *Nat Med*. 2003 Jul;9(7):936-43.

Ayadi M, Bouygues A, Ouaret D, Ferrand N, Chouaib S, Thiery JP, Muchardt C, Sabbah M, Larsen AK. Chronic chemotherapeutic stress promotes evolution of stemness and WNT/beta-catenin signaling in colorectal cancer cells: implications for clinical use of WNT-signaling inhibitors. *Oncotarget*. 2015 Jul 30;6(21):18518-33.

Bais C, Mueller B, Brady MF, Mannel RS, Burger RA, Wei W, Marien KM, Kockx MM, Husain A, Birrer MJ; NRG Oncology/Gynecologic Oncology Group. Tumor Microvessel Density as a Potential Predictive Marker for Bevacizumab Benefit: GOG-0218 Biomarker Analyses. *J Natl Cancer Inst*. 2017 Nov 1;109(11).

Bates RC, Goldsmith JD, Bachelder RE, Brown C, Shibuya M, Oettgen P, Mercurio AM. Flt-1-dependent survival characterizes the epithelial-mesenchymal transition of colonic organoids. *Curr Biol*. 2003 Sep 30;13(19):1721-7.

Brabletz T, Jung A, Reu S, Porzner M, Hlubek F, Kunz-Schughart LA, Knuechel R, Kirchner T. Variable beta-catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001 Aug 28;98(18):10356-61.

Budinska E, Popovici V, Tejpar S, D'Ario G, Lapique N, Sikora KO, Di Narzo AF, Yan P, Hodgson JG, Weinrich S, Bosman F, Roth A, Delorenzi M. Gene expression patterns unveil a new level of molecular heterogeneity in colorectal cancer. *J Pathol*. 2013 Sep;231(1):63-76.

Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* **487**, 330–337 (2012).

Chiron M, Bagley RG, Pollard J, Mankoo PK, Henry C, Vincent L, Geslin C, Baltes N, Bergstrom DA. Differential antitumor activity of aflibercept and bevacizumab in patient-

derived xenograft models of colorectal cancer. *Mol Cancer Ther.* 2014 Jun;13(6):1636-44.

Cudmore MJ, Hewett PW, Ahmad S, Wang KQ, Cai M, Al-Ani B, Fujisawa T, Ma B, Sissaoui S, Ramma W, Miller MR, Newby DE, Gu Y, Barleon B, Weich H, Ahmed A. The role of heterodimerization between VEGFR-1 and VEGFR-2 in the regulation of endothelial cell homeostasis. *Nat Commun.* 2012 Jul 24;3:972.

David JM, Rajasekaran AK. Dishonorable discharge: the oncogenic roles of cleaved E-cadherin fragments. *Cancer Res.* 2012 Jun 15;72(12):2917-23.

De Sousa E Melo F, Wang X, Jansen M, Fessler E, Trinh A, de Rooij LP, de Jong JH, de Boer OJ, van Leersum R, Bijlsma MF, Rodermond H, van der Heijden M, van Noesel CJ, Tuynman JB, Dekker E, Markowitz F, Medema JP, Vermeulen L. Poor-prognosis colon cancer is defined by a molecularly distinct subtype and develops from serrated precursor lesions. *Nat Med.* 2013 May;19(5):614-8.

Dienstmann R, Vermeulen L, Guinney J, Kopetz S, Tejpar S, Tabernero J. Consensus molecular subtypes and the evolution of precision medicine in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer.* 2017 Mar 23;17(4):268.

Escargueil AE, Poindessous V, Soares DG, Sarasin A, Cook PR, Larsen AK. Influence of irofulven, a transcription-coupled repair-specific antitumor agent, on RNA polymerase activity, stability and dynamics in living mammalian cells. *J Cell Sci.* 2008 Apr 15;121(Pt 8):1275-83.

Ferrara N, Adamis AP. Ten years of anti-vascular endothelial growth factor therapy. *Nat Rev Drug Discov.* 2016 Jun;15(6):385-403.

Ferrara N. Commentary on "Humanization of an Anti-VEGF Monoclonal Antibody for the Therapy of Solid Tumors and Other Disorders". *Cancer Res.* 2016 Sep 1;76(17):4913-5.

Fan F, Wey JS, McCarty MF, Belcheva A, Liu W, Bauer TW, Somcio RJ, Wu Y, Hooper A, Hicklin DJ, Ellis LM. Expression and function of vascular endothelial growth factor receptor-1 on human colorectal cancer cells. *Oncogene.* 2005 Apr 14;24(16):2647-53.

Fritah A, Saucier C, De Wever O, Bracke M, Bièche I, Lidereau R, Gespach C, Drouot S, Redeuilh G, Sabbah M. Role of WISP-2/CCN5 in the maintenance of a differentiated and noninvasive phenotype in human breast cancer cells. *Mol Cell Biol.* 2008 Feb;28(3):1114-23.

Guérin E, Raffelsberger W, Pencreach E, Maier A, Neuville A, Schneider A, Bachellier P, Rohr S, Petitprez A, Poch O, Moras D, Oudet P, Larsen AK, Gaub MP, Guenot D. In vivo topoisomerase I inhibition attenuates the expression of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  target genes and decreases tumor angiogenesis. *MolMed.* 2012 Feb 10;18:83-94.

Guinney J, Dienstmann R, Wang X, de Reyniès A, Schlicker A, Soneson C, Marisa L, Roepman P, Nyamundanda G, Angelino P, Bot BM, Morris JS, Simon IM, Gerster S, Fessler E, De Sousa E Melo F, Missiaglia E, Ramay H, Barras D, Homicsko K, Maru D, Manyam GC, Broom B, Boige V, Perez-Villamil B, Laderas T, Salazar R, Gray JW, Hanahan D, Tabernero J, Bernards R, Friend SH, Laurent-Puig P, Medema JP, Sadanandam A, Wessels L, Delorenzi M, Kopetz S, Vermeulen L, Tejpar S. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med*. 2015 Nov;21(11):1350-6.

Jordan NV, Johnson GL, Abell AN. Tracking the intermediate stages of epithelial-mesenchymal transition in epithelial stem cells and cancer. *Cell Cycle*. 2011 Sep 1;10(17):2865-73.

Jubb AM, Hurwitz HI, Bai W, Holmgren EB, Tobin P, Guerrero AS, Kabbinavar F, Holden SN, Novotny WF, Frantz GD, Hillan KJ, Koeppen H. Impact of vascular endothelial growth factor-A expression, thrombospondin-2 expression, and microvessel density on the treatment effect of bevacizumab in metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2006 Jan 10;24(2):217-27.

Kopetz S, Hoff PM, Morris JS, Wolff RA, Eng C, Glover KY, Adinin R, Overman MJ, Valero V, Wen S, Lieu C, Yan S, Tran HT, Ellis LM, Abbruzzese JL, Heymach JV. Phase II trial of infusional fluorouracil, irinotecan, and bevacizumab for metastatic colorectal cancer: efficacy and circulating angiogenic biomarkers associated with therapeutic resistance. *J Clin Oncol*. 2010 Jan 20;28(3):453-9.

Larsen AK, de Gramont A, Poindessous V, Bouygues A, Ayadi M, Mésange P. Functions and clinical implications of autocrine VEGF signaling in colorectal cancer. *Current Colorectal Cancer Reports* 9: 270-277, 2013.

Loboda A, Nebozhyn MV, Watters JW, Buser CA, Shaw PM, Huang PS, Van't Veer L, Tollenaar RA, Jackson DB, Agrawal D, Dai H, Yeatman TJ. EMT is the dominant program in human colon cancer. *BMC Med Genomics*. 2011 Jan 20;4:9.

Loupakis F, Cremolini C, Fioravanti A, Orlandi P, Salvatore L, Masi G, Di Desidero T, Canu B, Schirripa M, Frumento P, Di Paolo A, Danesi R, Falcone A, Bocci G. Pharmacodynamic and pharmacogenetic angiogenesis-related markers of first-line FOLFOXIRI plus bevacizumab schedule in metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2011 Apr 12;104(8):1262-9.

Marisa L, de Reyniès A, Duval A, Selves J, Gaub MP, Vescovo L, Etienne-Grimaldi MC, Schiappa R, Guenot D, Ayadi M, Kirzin S, Chazal M, Fléjou JF, Benchimol D, Berger A, Lagarde A, Pencreach E, Piard F, Elias D, Parc Y, Olschwang S, Milano G, Laurent-Puig P, Boige V. Gene expression classification of colon cancer into molecular subtypes: characterization, validation, and prognostic value. *PLoS Med*. 2013;10(5):e1001453.

Mésange P, Poindessous V, Sabbah M, Escargueil AE, de Gramont A, Larsen AK. Intrinsic bevacizumab resistance is associated with prolonged activation of autocrine VEGF signaling and hypoxia tolerance in colorectal cancer cells and can be overcome by nintedanib, a small molecule angiokinase inhibitor. *Oncotarget*. 2014 Jul 15;5(13):4709-21.

Nieto MA, Huang RY, Jackson RA, Thiery JP. EMT: 2016. *Cell*. 2016 Jun 30;166(1):21-45.

Okita NT, Yamada Y, Takahari D, Hirashima Y, Matsubara J, Kato K, Hamaguchi T, Shirao K, Shimada Y, Taniguchi H, Shimoda T. Vascular endothelial growth factor receptor expression as a prognostic marker for survival in colorectal cancer. *Jpn J Clin Oncol*. 2009 Sep;39(9):595-600.

Ouaret D, Larsen AK. Protein kinase C  $\beta$  inhibition by enzastaurin leads to mitotic missegregation and preferential cytotoxicity toward colorectal cancer cells with chromosomal instability (CIN). *Cell Cycle*. 2014;13(17):2697-706.

Papadopoulos N, Martin J, Ruan Q, Rafique A, Rosconi MP, Shi E, Pyles EA, Yancopoulos GD, Stahl N, Wiegand SJ. Binding and neutralization of vascular endothelial growth factor (VEGF) and related ligands by VEGF Trap, ranibizumab and bevacizumab. *Angiogenesis*. 2012 Jun;15(2):171-85.

Perez-Villamil B, Romera-Lopez A, Hernandez-Prieto S, Lopez-Campos G, Calles A, Lopez-Asenjo JA, Sanz-Ortega J, Fernandez-Perez C, Sastre J, Alfonso R, Caldes T, Martin-Sanchez F, Diaz-Rubio E. Colon cancer molecular subtypes identified by expression profiling and associated to stroma, mucinous type and different clinical behavior. *BMC Cancer*. 2012 Jun 19;12:260.

Petitprez A, Poindessous V, Ouaret D, Regairaz M, Bastian G, Guérin E, Escargueil AE, Larsen AK. Acquired irinotecan resistance is accompanied by stable modifications of cell cycle dynamics independent of MSI status. *Int J Oncol*. 2013 May;42(5):1644-53.

Poindessous V, Ouaret D, El Ouadrani K, Battistella A, Mégaloophonos VF, Kamsu-Kom N, Petitprez A, Escargueil AE, Boudou P, Dumont S, Cervera P, Fléjou JF, André T, Tournigand C, Chibaudel B, de Gramont A, Larsen AK. EGFR- and VEGF(R)-targeted small molecules show synergistic activity in colorectal cancer models refractory to combinations of monoclonal antibodies. *Clin Cancer Res*. 2011 Oct 15;17(20):6522-30.

Roepman P, Schlicker A, Tabernero J, Majewski I, Tian S, Moreno V, Snel MH, Chresta CM, Rosenberg R, Nitsche U, Macarulla T, Capella G, Salazar R, Orphanides G, Wessels LF, Bernards R, Simon IM. Colorectal cancer intrinsic subtypes predict chemotherapy benefit, deficient mismatch repair and epithelial-to-mesenchymal transition. *Int J Cancer*. 2014 Feb 1;134(3):552-62. PMID: 23852808

Sadanandam A, Lyssiotis CA, Homicsko K, Collisson EA, Gibb WJ, Wullschlegel S, Ostos LC, Lannon WA, Grotzinger C, Del Rio M, Lhermitte B, Olshen AB, Wiedenmann B, Cantley LC, Gray JW, Hanahan D. A colorectal cancer classification system that associates cellular phenotype and responses to therapy. *Nat Med*. 2013 May;19(5):619-25.

Schlicker A, Tabernero J, Majewski I, Tian S, Moreno V, Snel MH, Chresta CM, Rosenberg R, Nitsche U, Macarulla T, Capella G, Salazar R, Orphanides G, Wessels LF, Bernards R, Simon IM. Colorectal cancer intrinsic subtypes predict chemotherapy benefit, deficient mismatch repair and epithelial-to-mesenchymal transition. *Int J Cancer*. 2014 Feb 1;134(3):552-62.

Tan TZ, Miow QH, Miki Y, Noda T, Mori S, Huang RY, Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transition spectrum quantification and its efficacy in deciphering survival and drug responses of cancer patients. *EMBO Mol Med*. 2014 Oct;6(10):1279-93.



## Figure and table legends

Table 1. Microvascular density of CRC xenografts after 28 days treatment with vehicle, bevacizumab or aflibercept. Tumor blood vessels were identified by CD31/PECAM-1 labeling and the signal quantified by image analysis. The numbers indicate the CD31-positive area, as % of the total surface, and represent the average of at least 6 fields/tumor for at least 3 different tumors. E, epithelial phenotype. M, mesenchymal phenotype. Green, orange and red colors indicate strong, intermediate or weak inhibition of the microvascular density, respectively.

**Figure 1.** Expression of epithelial and mesenchymal markers. RNA was extracted from HT-29, DLD-1, HCT-116, HCT-116/5-FU and LS174T cells (open columns) and tumors (hatched columns) and analyzed by qRT-PCR using primers that specifically detect E-cadherin, gamma-catenin, cytokeratin 18 or vimentin. Columns correspond to the relative mRNA expression of the indicated mRNA normalized to beta-actin. All values are indicated relative to the expression of HCT-116 cells or tumors as indicated by the dotted line.

**Figure 2.** Expression of epithelial and mesenchymal markers. Western blot analysis of extracts from HT-29, DLD-1, HCT-116, HCT-116/5-FU and LS174T cells or tumors using antibodies that specifically detect E-cadherin, gamma-catenin, cytokeratin 18 or vimentin. Actin was used as loading control. The numbers indicate the expression of the indicated protein in comparison to the expression in HCT-116 cells or tumors.

Figure 3. Cellular localization of E-cadherin and beta-catenin. Confocal fluorescence microscopy of HT-29, DLD-1, HCT-116, HCT-116/5-FU and

LS174T cells using antibodies that specifically detect E-cadherin or beta-catenin (in red). Nuclei were stained by DRAQ-5 (blue). The overlay outlines the localization of E-cadherin or beta-catenin on the cytoplasmic membrane, intracellular vesicles or in the nuclei.

**Figure 4. Influence of bevacizumab or aflibercept on tumor growth for the indicated xenograft models.** Nude mice with HT-29, DLD-1, HCT-116, HCT-116/5-FU or LS174T human CRC xenografts were dosed with vehicle, bevacizumab or aflibercept at 4 mg/kg i.p. every 3 days. Each treatment group corresponded to at least seven animals. Left, average growth of the indicated tumor xenografts in mice treated with vehicle (hatched squares), aflibercept (dark grey circles) or bevacizumab (white circles) for 28 days. Right, box and whisker plot of the volumes of indicated tumor xenografts after 4 weeks treatment with aflibercept or bevacizumab. Lines, medians; boxes, 25th to 75th percentile interquartile ranges; whiskers, the highest and lowest values for a given treatment. The statistical analysis of experimental data was performed using a Student's paired *t*-test comparing the treatment group with the vehicle control. Bars, SD; \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ . The findings are summarized in the lower panel with the average tumor growth inhibition by 28 days indicated as % of the vehicle control. E, epithelial phenotype. M, mesenchymal phenotype. Green, orange and red colors indicate strong, intermediate or weak tumor growth inhibition, respectively.

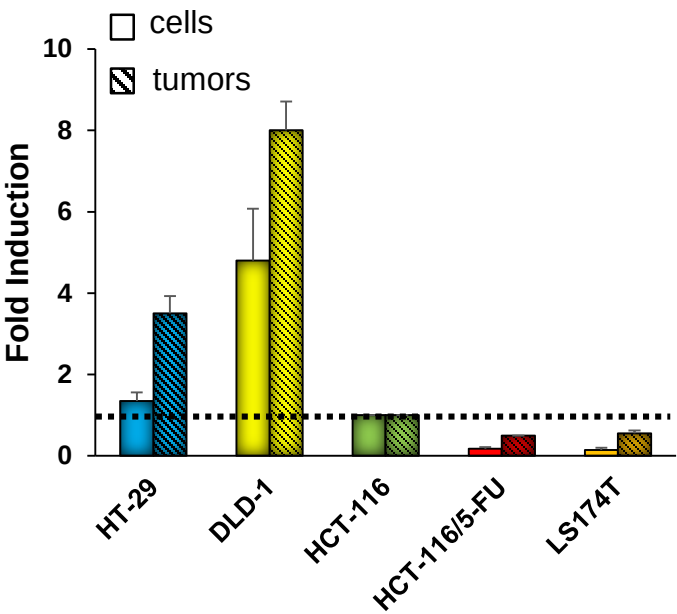
**Figure 5. Influence of bevacizumab aflibercept or bevacizumab followed by aflibercept on tumor growth for the indicated xenograft models.** Nude mice with HT-29 or HCT-116 human CRC xenografts were dosed with vehicle (green circles), bevacizumab (yellow circles) or aflibercept (red circles) at 4 mg/kg i.p. every 3 days. Alternatively, animals

were treated with bevacizumab for 14 days followed by 14 days treatment with aflibercept (orange circles). The time of the cross-over is indicated by a black arrow. Each treatment group corresponded to at least seven animals. Right, box and whisker plot of the volumes of indicated tumor xenografts after 4 weeks treatment with aflibercept, bevacizumab or bevacizumab followed by aflibercept. Lines, medians; boxes, 25th to 75th percentile interquartile ranges; whiskers, the highest and lowest values for a given treatment. The statistical analysis of experimental data was performed using a Student's paired *t*-test comparing the treatment group with the vehicle control. Bars, SD. \*\*  $p < 0,01$ . \*\*\*  $p < 0,001$ . NS, non significant.

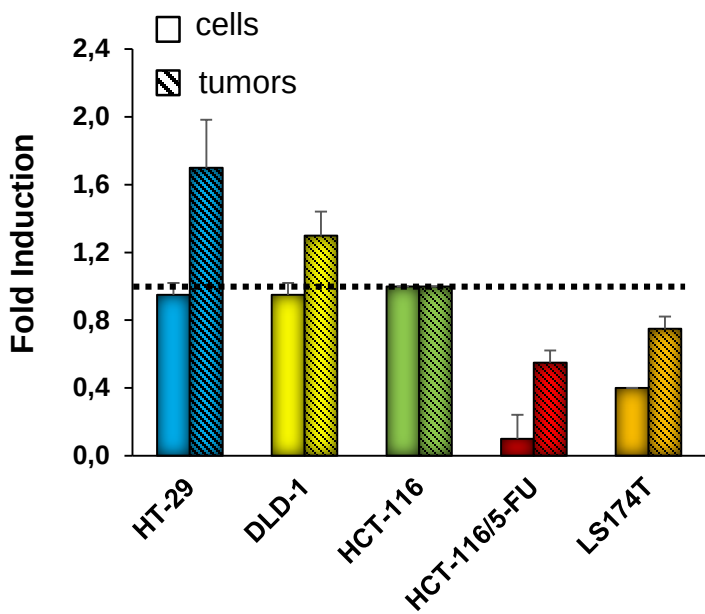
**Supplementary figure S1.** Expression of mesenchymal markers. Western blot analysis of extracts from HT-29, DLD-1, HCT-116, HCT-116/5-FU and LS174T cells or tumors using antibodies that specifically detect fibronectin or N-cadherin. Actin was used as loading control. T+ indicate the positive control for N-cadherin or fibronectin, respectively.

Figure 1

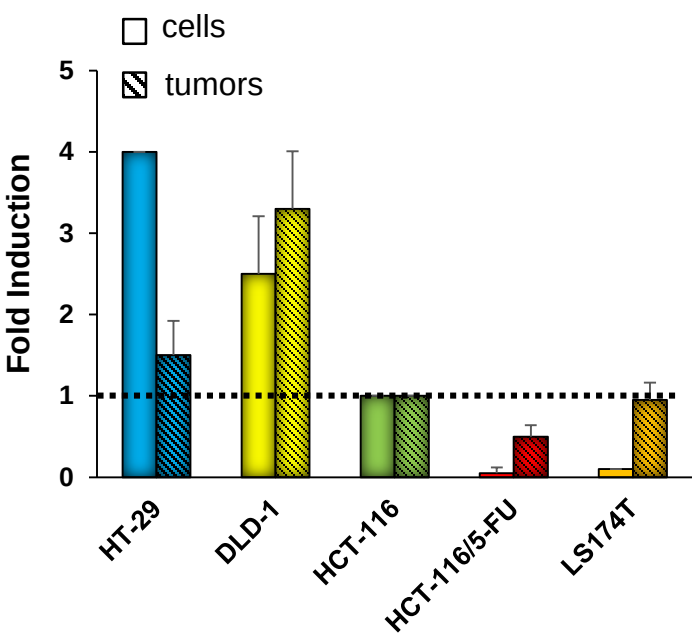
E-cadherin



γ-catenin



Cytokeratin 18



Vimentin

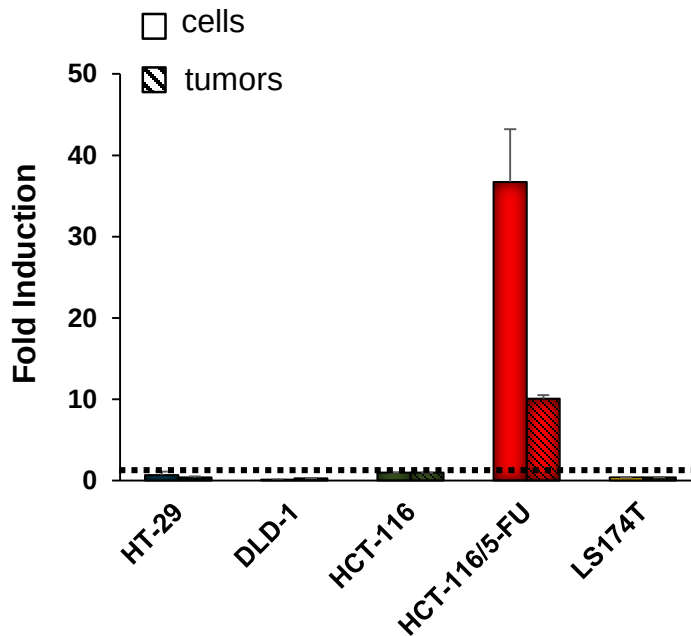
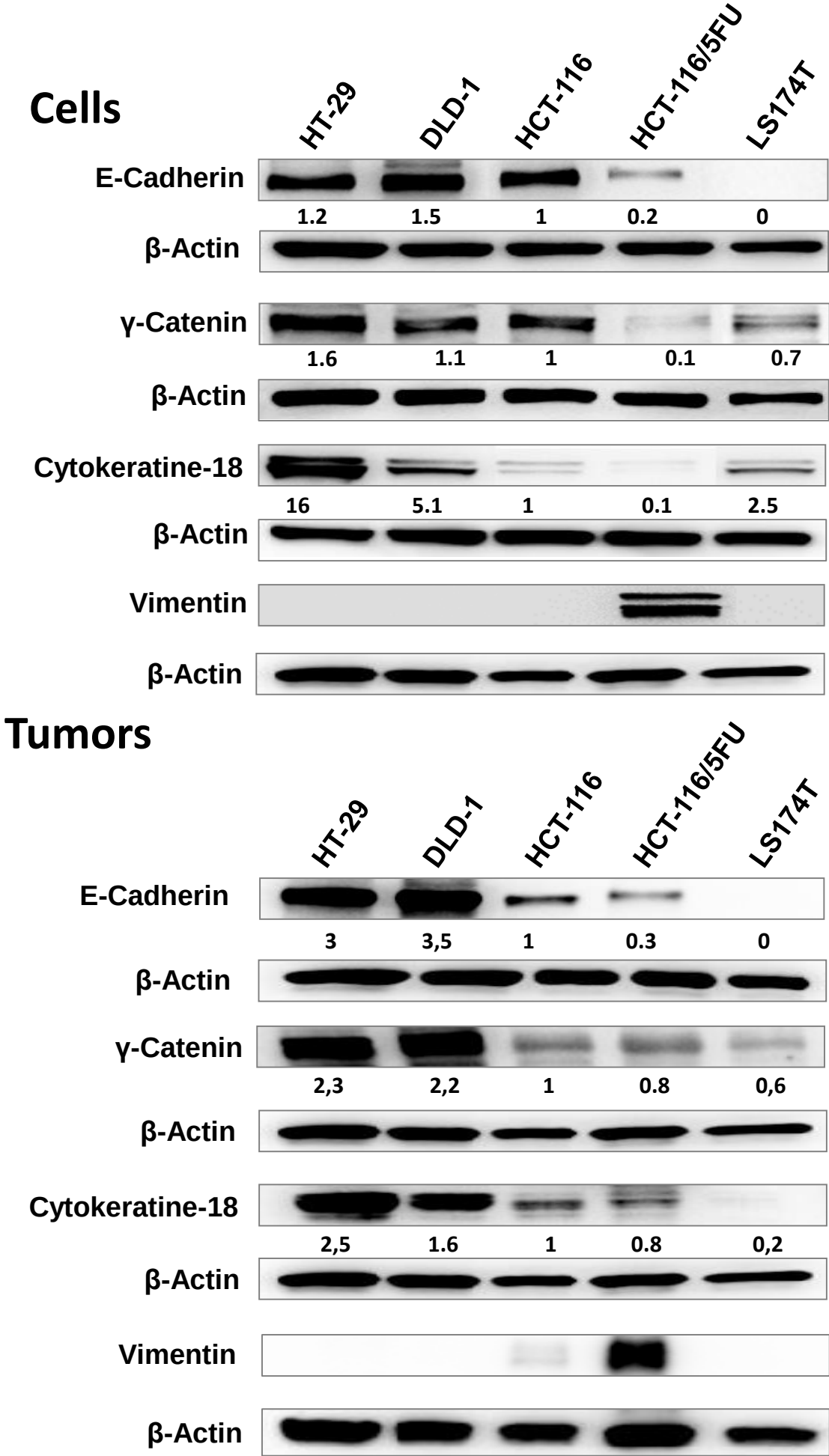
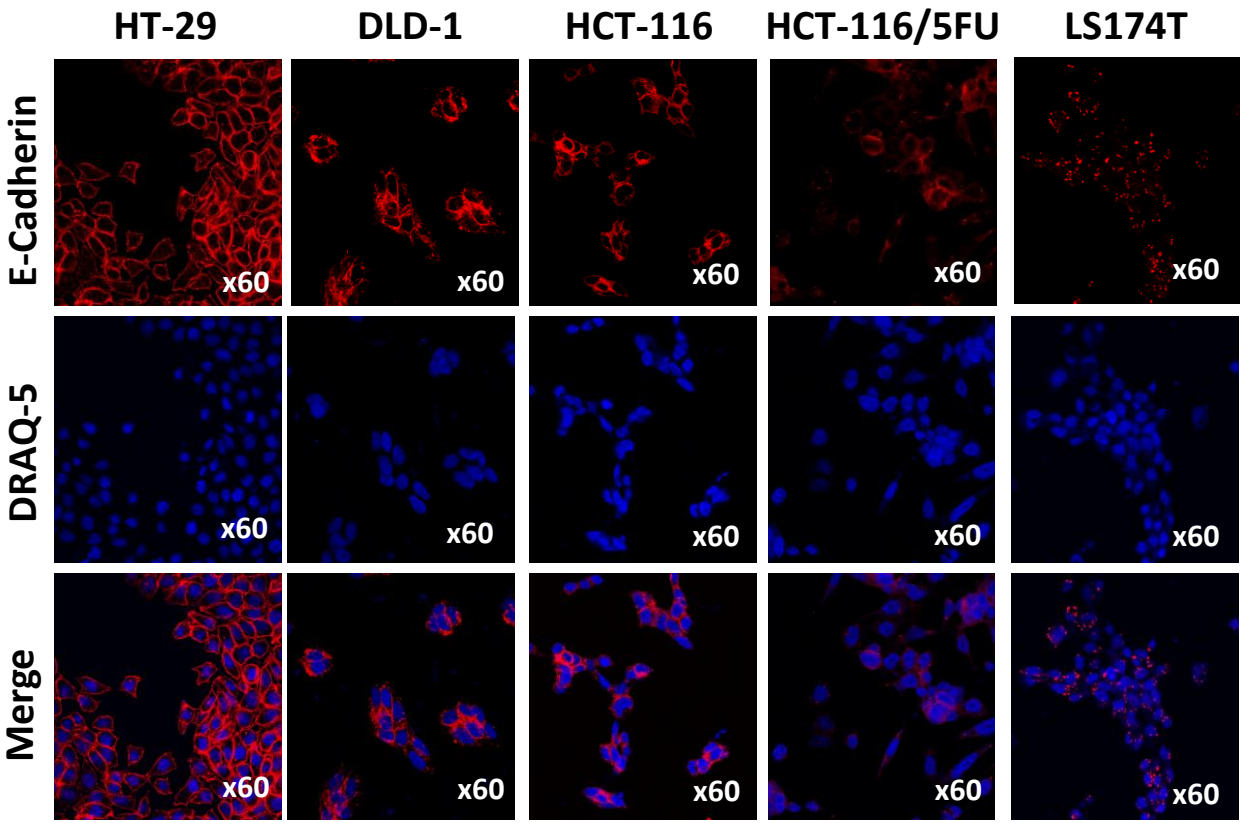


Figure 2



E-cadherin

Figure 3



$\beta$ -catenin

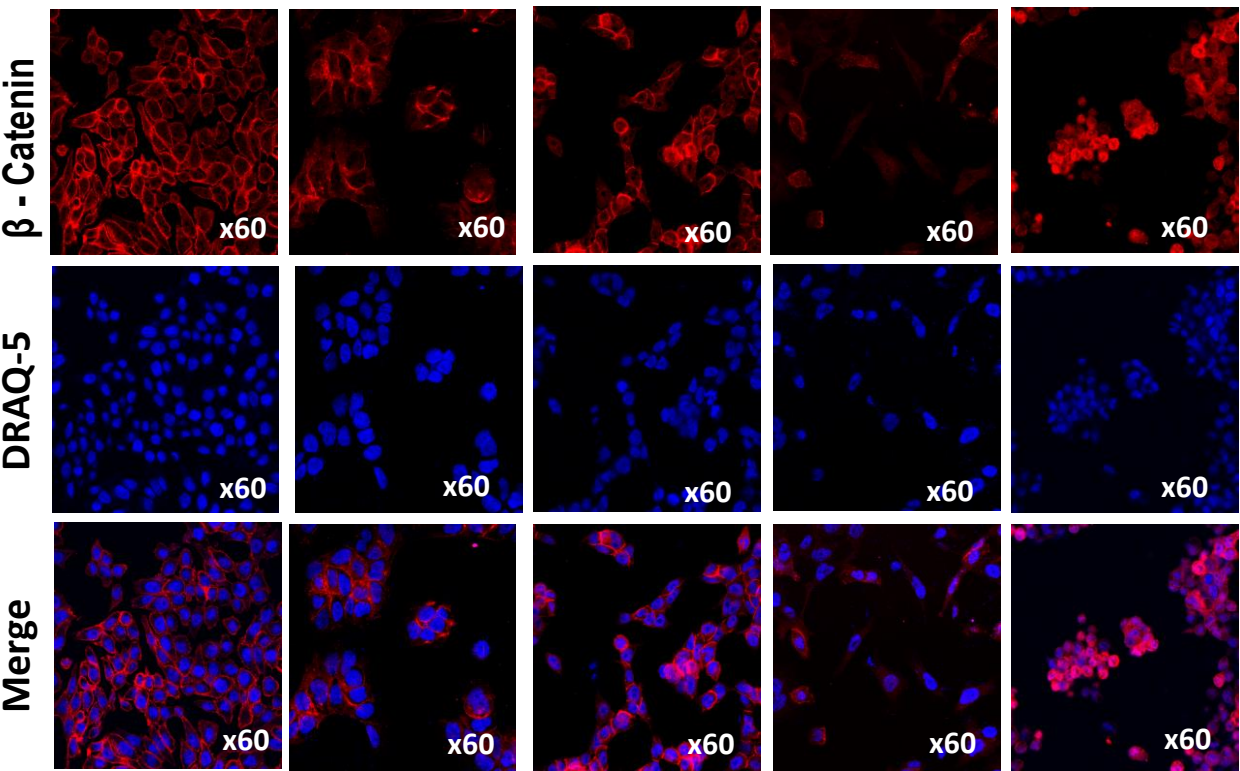
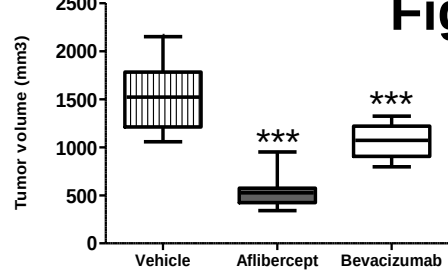
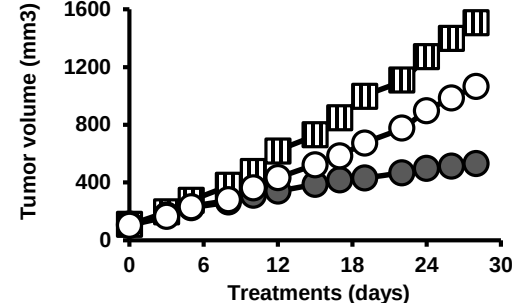
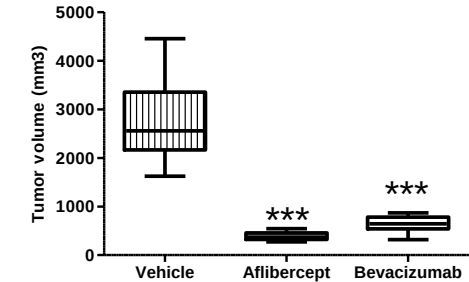
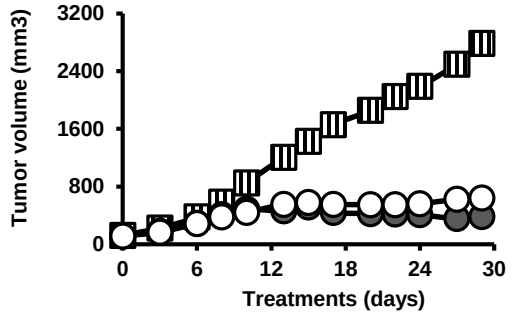


Figure 4

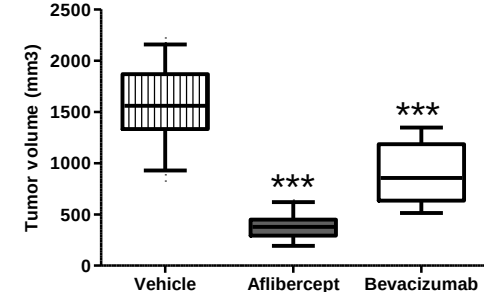
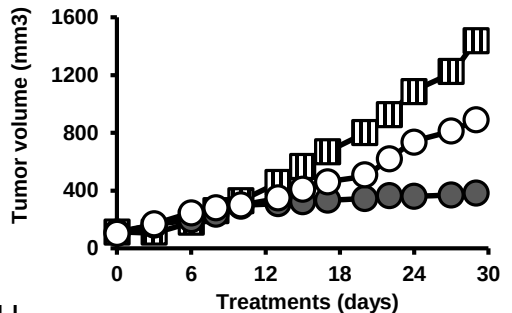
HT-29



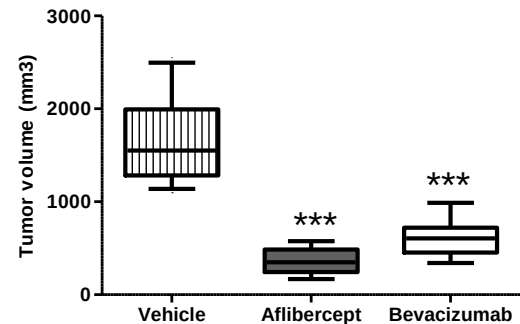
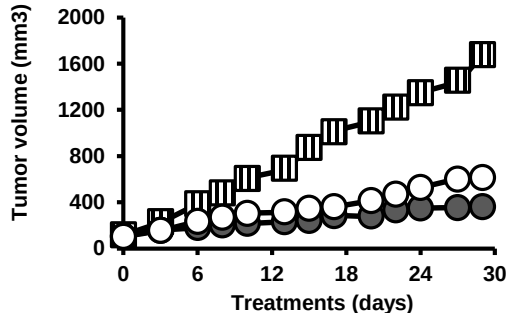
DLD-1



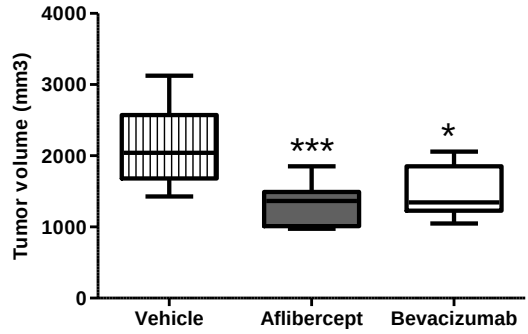
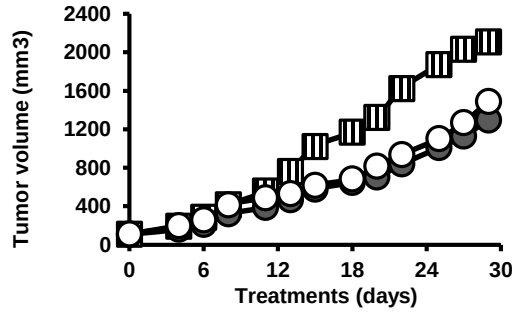
HCT-116



HCT-116/5-FU



LS174T



| Tumor growth inhibition (% of control) |           |             |             |
|----------------------------------------|-----------|-------------|-------------|
|                                        | Phenotype | Bevacizumab | Aflibercept |
| HT-29                                  | E         | 29          | 65          |
| DLD-1                                  | E         | 77          | 87          |
| HCT-116                                | E         | 49          | 76          |
| HCT-116/5-FU                           | M         | 63          | 79          |
| LS174T                                 | M         | 29          | 38          |

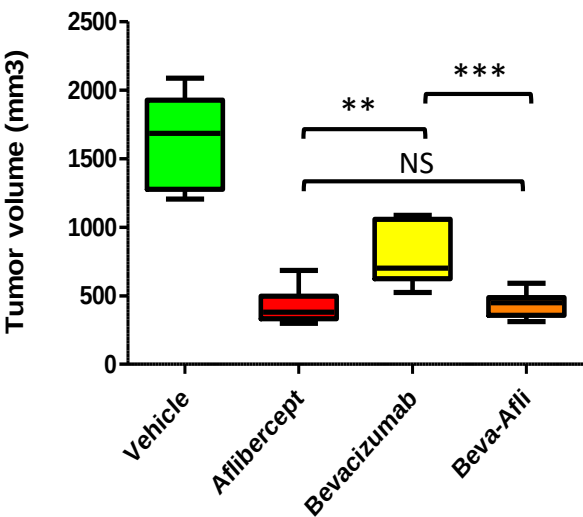
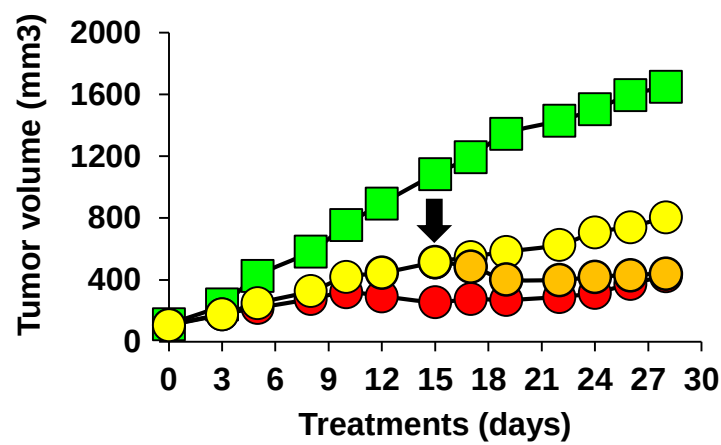
Microvascular density

|              |           | Basal CD31      | CD31<br>Bevacizumab | CD31<br>Aflibercept |
|--------------|-----------|-----------------|---------------------|---------------------|
|              | Phenotype | % of total area | % inhibition        | % inhibition        |
| HT-29        | E         | 2.9             | 13                  | 86                  |
| DLD-1        | E         | 4.5             | 75                  | 91                  |
| HCT-116      | E         | 3.5             | 51                  | 80                  |
| HCT-116/5-FU | M         | 5.8             | 70                  | 89                  |
| LS174T       | M         | 5.0             | 12                  | 15                  |



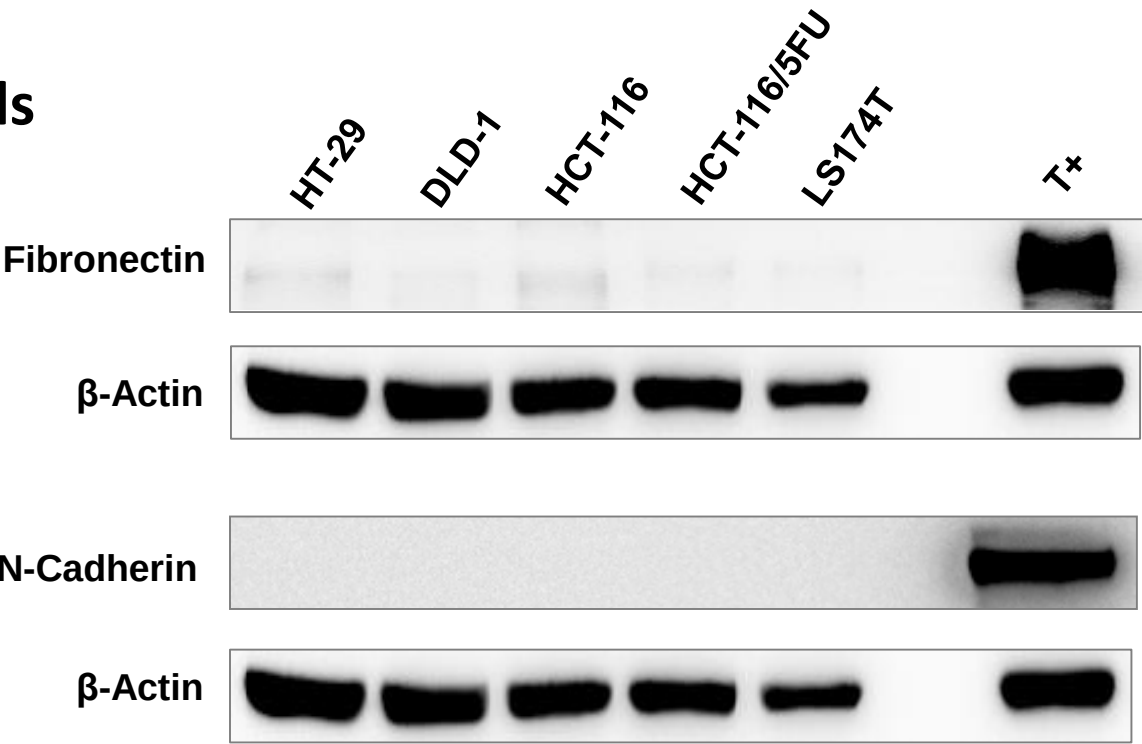
Figure 5

HCT-116 cross-over

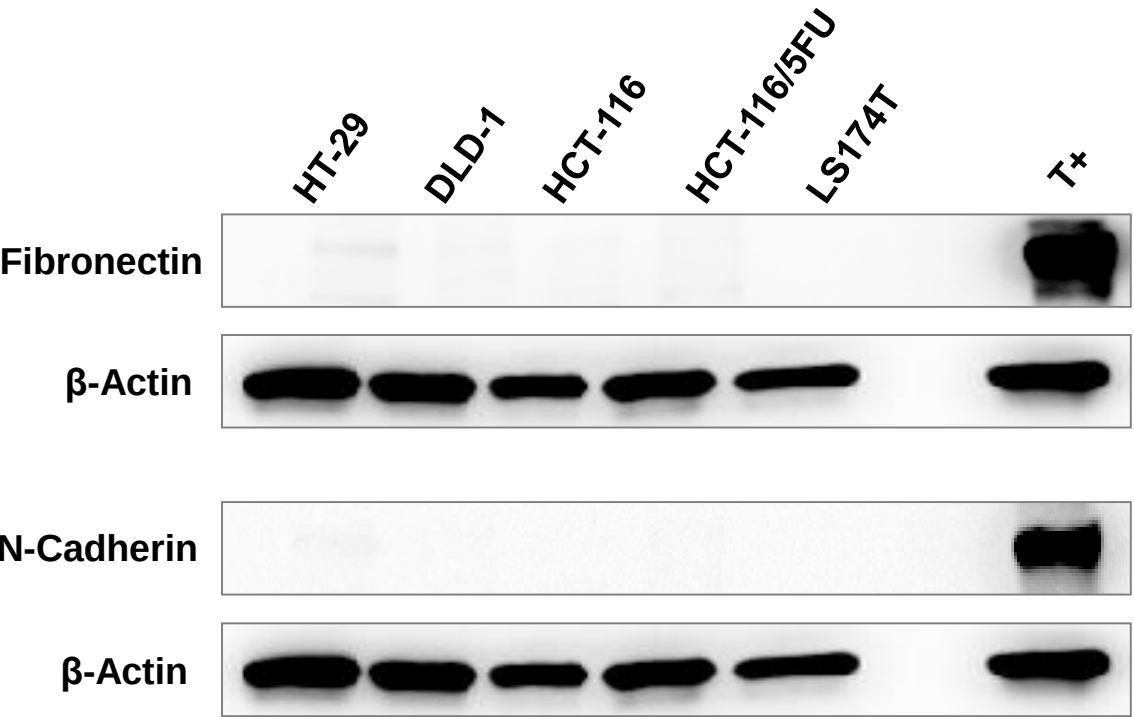


HT-29 cross-over

Cells



Tumors



---

## *Discussion et perspectives*

---

Après la découverte de la chimiothérapie, de nouvelles molécules sont arrivées sur le marché donnant naissance à l'utilisation de thérapies ciblées dans le CCR. Les deux médicaments anti-angiogéniques Bevacizumab et Aflibercept ont permis d'augmenter la survie des patients dans le cancer du côlon métastatique. Quel que soit le choix thérapeutique, il n'est pour le moment pas encore possible de prédire les phénomènes de résistances ou de réponse positive ou négative à ces différents traitements. En effet, il n'existe aucun marqueur prédictif ayant été validé pour les agents ciblant la voie du VEGF ; ceci peut constituer une limite à l'utilisation de ces médicaments. Un certain nombre de biomarqueurs ont été proposés comme l'hypertension, l'imagerie de la tumeur, les récepteurs solubles du VEGF, les cytokines circulantes et les facteurs angiogéniques ou encore le polymorphisme des gènes de la voie VEGF. Cependant, ces études sont basées sur un nombre limité de patients ou sont des études rétrospectives et pour le moment, aucuns biomarqueurs n'a été validés (Ferrara et Adamis 2016).

De nombreuses classifications des CCR ont été proposées afin d'identifier des sous-groupes de patients. Une étude a identifié l'EMT comme le programme dominant dans le CCR (Loboda et al. 2011). Plus récemment, de nombreuses études sur des lignées cellulaires ou des échantillons de patients ont permis d'identifier plusieurs sous-groupes moléculaires (Cancer genome atlas network 2012) dont le groupe CMS4 caractérisé par un mauvais pronostic, un phénotype mésenchymateux, un phénomène d'angiogénèse et une activation de la voie VEGF/VEGFR (Guinney et al. 2015). Compte tenu l'activation de la voie VEGF, nous nous attendons à ce que ce groupe ait une réponse différente aux inhibiteurs angiogéniques.

La caractérisation de différentes lignées cellulaires de CCR selon des marqueurs épithéliaux et mésenchymateux nous a permis d'identifier 5 modèles allant de lignées ayant un phénotype épithélial prononcé (HT-29 et DLD-1), modéré (HCT-116) ou ayant un phénotype mésenchymateux (HCT-116/5-FU et LS174T). La comparaison des niveaux d'expression de ces marqueurs a révélé une similitude d'expression dans les

lignées cellulaires et dans les xénogreffes correspondantes ce qui suggèrent que le stroma a une influence minime sur les xénogreffes. De façon intéressante, le profil mésenchymateux est fortement associé à une perte des caractéristiques épithéliales plutôt qu'à une expression des marqueurs mésenchymateux typiques.

Une précédente étude a défini une « score EMT » classifiant 15 différents types de tumeurs selon un phénotype type « épithélial » ou type « mésenchymateux » en se basant sur la transcription de gènes d'échantillons de patients (Tan et al. 2014).

De façon intéressante, le cancer du côlon apparaît comme une tumeur plutôt épithéliale avec une faible fraction mésenchymale. Ces résultats peuvent, en partie, expliquer pourquoi l'existence d'un phénotype mésenchymateux dans le CCR est souvent un défi pour les médecins pathologistes.

Le traitement des 5 modèles de xénogreffes avec du bevacizumab ou de l'aflibercept a montré 3 différentes réponses. Deux modèles de tumeurs (DLD-1 et HCT-116) sont sensibles aussi bien au bevacizumab et à l'aflibercept, deux modèles (HT-29 et HCT-116) sont sensibles à l'aflibercept mais pas au bevacizumab et un modèle (LS174T) est résistant aux deux médicaments. Ces résultats révèlent qu'il n'existe pas de corrélation évidente entre la réponse à ces deux médicaments anti-VEGF et le phénotype mésenchymateux ce qui est particulièrement remarquable pour le bevacizumab car les deux modèles sensibles et résistantes à cette molécule sont de phénotype différent ; l'une est épithéliale et l'autre mésenchymateuse.

Le phénotype mésenchymateux a été associé à une augmentation de l'angiogénèse et de la densité vasculaire. Ceci est concordant avec nos résultats puisque les 3 modèles de tumeurs de type épithélial ont montré une faible densité vasculaire comparativement aux tumeurs mésenchymateuses. Cependant, il n'y a pas de corrélation entre la densité vasculaire et la réponse au bevacizumab ou à l'aflibercept. Ces résultats diffèrent des données obtenues dans le cancer de l'ovaire qui a démontré que les niveaux de base de densité vasculaire de la tumeur étaient corrélés à une réponse au bevacizumab (Bais et al. 2017).

Toutefois, nos données sont en accord avec les résultats précoces chez des patients atteints de CCR qui n'a pas montré de corrélation entre le niveau de

vascularisation de la tumeur et la réponse au bevacizumab. Les différences de résultats entre les deux études ne sont pas claires mais il se pourrait que l'influence de la densité vasculaire sur la réponse aux inhibiteurs du VEGF soit dépendant du type de tumeur.

Contrairement aux niveaux de base de vascularisation des tumeurs, il existe un lien entre la diminution de la densité vasculaire et l'inhibition de la croissance tumorale dans tous nos modèles. Ceci est cohérent avec le fait que l'angiogénèse est principalement dirigé par l'axe VEGF-A/VEGFR-2. Cependant, il est à noter que le VEGFR-1 et le PlGF sont capable de modulation la signalisation VEGFR-2. Il a été décrit que l'activation du VEGFR-1 par le PlGF entraînait la trans-phosphorylation de VEGFR-2, ce qui permet une amplification de l'angiogénèse médié par VEGF à travers VEGFR-2 (Autiero et al. 2003). De plus, les deux ligands VEGF-A et PlGF sont capable de former des hétérodimères qui vont promouvoir la formation d'hétérodimères VEGFR-1/VEGFR-2 (Autiero et al. 2003 ; Cudmore et al. 2012).

La signalisation VEGF joue également un rôle important pour les cellules tumorales. Quasiment toutes les cellules et tumeurs CCR expriment des récepteurs VEGFR-1 fonctionnels (Fan et al. 2005 ; Poindessous et al. 2011) et la majorité du VEGF dans l'environnement tumoral est sécrété par les cellules tumorales permettant ainsi la signalisation VEGF endocrine et paracrine (Mésange et al. 2014 ; Chiron et al. 2014). Le marquage VEGFR-1 est généralement augmenté avec la progression tumorale et une forte expression de VEGFR-1 a été associé à une courte survie chez les patients atteints de CCR après (Bates et al. 2003 ; Fan et al. 2005 ; Okita et al. 2009). La signalisation VEGFR-1 semble être particulièrement importante pour la survie des cellules tumorales subissant un processus d'EMT pour compenser la perte de la signalisation de survie quand les cellules deviennent plus individualiser (Bates et al. 2003). Ceci pourrait expliquer pourquoi l'influence du bevacizumab et de l'aflibercept sur la lignée très mésenchymateuse LS174T est plus visible (29-38% d'inhibition de croissance) comparativement à une modeste atténuation de la densité vasculaire (12-15% de diminution).

Nous nous sommes ensuite demandé si l'aflibercept pouvait avoir une activité dans des modèles de tumeurs qui progressent sous traitement par le bevacizumab.

Pour cette expérience, nous avons sélectionné deux modèles (HT-29 et HCT-116) qui ont des sensibilités différentes au bevacizumab et à l'aflibercept. Les résultats (figure 6 et résultats en cours) montrent clairement que l'aflibercept possède une très bonne activité dans les deux modèles quand il est administré après le bevacizumab en accord avec les études précédentes sur les modèles de xénogreffes dérivées de patients (Chiron et al. 2014).

L'ensemble de ces résultats montre qu'il n'y a pas de corrélation entre le phénotype mésenchymateux ou la densité vasculaire de la tumeur et la sensibilité aux agents anti-VEGF. Néanmoins, la diminution des vaisseaux au sein de la tumeur après traitement est étroitement liée à l'effet anti-tumoral. Les expériences de d'échange de traitement montrent une activité de l'aflibercept après traitement par le bevacizumab, que ce soit sur une lignée sensible au bevacizumab ou une lignée résistante. Ceci suggère que l'aflibercept pourrait être actif sur des patients résistants ou progressant sous traitement par le bevacizumab.

---

## *Bibliographie*

---

Affleck DG, Bull DA, Bailey SH, Albanil A, Connors R, Stringham JC, Karwande SV. **PDGF(BB) increases myocardial production of VEGF: shift in VEGF mRNA splice variants after direct injection of bFGF, PDGF(BB), and PDGF(AB).** J Surg Res. 2002 Oct;107(2):203-9.

Akahane M, Akahane T, Matheny SL, Shah A, Okajima E, Thorgeirsson UP. **Vascular endothelial growth factor-D is a survival factor for human breast carcinoma cells.** Int J Cancer. 2006 Feb 15;118(4):841-9.

Alexander NR, Tran NL, Rekapally H, Summers CE, Glackin C, Heimark RL. **N-cadherin gene expression in prostate carcinoma is modulated by integrin-dependent nuclear translocation of Twist1.** Cancer Res. 2006 Apr 1;66(7):3365-9.

Ansieau S, Morel AP, Hinkal G, Bastid J, Puisieux A. **TWISTing an embryonic transcription factor into an oncoprotein.** Oncogene 2010;29(22):3173-84.

Ansieau S, Bastid J, Doreau A et al. **Induction of EMT by twist proteins as a collateral effect of tumor-promoting inactivation of premature senescence.** Cancer Cell 2008;14(1):79-89.

Aoki K, Taketo MM. **Adenomatous polyposis coli (APC): a multi-functional tumor suppressor gene.** J Cell Sci. 2007 Oct 1;120(Pt 19):3327-35.

Arnold D, Lueza B, Douillard JY, Peeters M, Lenz HJ, Venook A, Heinemann V, Van Cutsem E, Pignon JP, Tabernero J, Cervantes A, Ciardiello F. **Prognostic and predictive value of primary tumour side in patients with RAS wild-type metastatic colorectal cancer treated with chemotherapy and EGFR directed antibodies in six randomized trials.** Ann Oncol. 2017 Aug 1;28(8):1713-1729.

Autiero M, Waltenberger J, Communi D, Kranz A, Moons L, Lambrechts D, Kroll J, Plaisance S, De Mol M, Bono F, Kliche S, Fellbrich G, Ballmer-Hofer K, Maglione D, Mayr-Beyrle U, Dewerchin M, Dombrowski S, Stanimirovic D, Van Hummelen P, Dehio C, Hicklin DJ, Persico G, Herbert JM, Communi D, Shibuya M, Collen D, Conway EM, Carmeliet P. **Role of PlGF in the intra- and intermolecular cross talk between the VEGF receptors Flt1 and Flk1.** Nat Med. 2003 Jul;9(7):936-43.

Baeriswyl V, Christofori G. **The angiogenic switch in carcinogenesis.** Semin Cancer Biol. 2009 Oct;19(5):329-37.

Baker S.J., Preisinger A.C., Jessup J.M., Paraskeva C., Markowitz S., Willson J.K., Hamilton S., Vogelstein B. **p53 gene mutations occur in combination with 17p allelic deletions as late events in colorectal tumorigenesis.** Cancer Res. 1990;50:7717–7722.

Baker S, Fearon E, Nigro J, et al. **Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas.** Science. 1989;244:217–221

Bais C, Mueller B, Brady MF, Mannel RS, Burger RA, Wei W, Marien KM, Kockx MM, Husain A, Birrer MJ; NRG Oncology/Gynecologic Oncology Group. **Tumor Microvessel Density as a Potential Predictive Marker for Bevacizumab Benefit: GOG-0218 Biomarker Analyses.** J Natl Cancer Inst. 2017 Nov 1;109(11).

Baish JW, Jain RK. **Fractals and cancer.** Cancer Res. 2000 Jul 15;60(14):3683-8.

Barrows GH, Burton RM, Jarrett DD, Russell GG, Alford MD, Songster CL. **Immunochemical detection of human blood in feces.** Am J Clin Pathol. 1978 Mar;69(3):342-6.

Bates RC, Goldsmith JD, Bachelder RE, Brown C, Shibuya M, Oettgen P, Mercurio AM. **Flt-1-dependent survival characterizes the epithelial-mesenchymal transition of colonic organoids.** Curr Biol. 2003 Sep 30;13(19):1721-7.

Becouarn Y., Ychou M., Ducreux M. et coll. **Phase II trial of oxaliplatin as first-line chemotherapy in metastatic colorectal cancer patients.** J Clin Oncol 1998 ; 16 (8) : 2739-44.

Behrens J, von Kries JP, Kühl M, Bruhn L, Wedlich D, Grosschedl R, Birchmeier W. **Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1.** Nature. 1996 Aug 15;382(6592):638-42.

Bergers G, Benjamin LE. **Tumorigenesis and the angiogenic switch.** Nat Rev Cancer. 2003 Jun;3(6):401-10.

Bergsten E, Uutela M, Li X, Pietras K, Ostman A, Heldin CH, Alitalo K, Eriksson U. **PDGF-D is a specific, protease-activated ligand for the PDGF beta-receptor.** Nat Cell Biol. 2001 May;3(5):512-6.

Bernstein CN, Blanchard JF, Kliewer E, Wajda A. **Cancer risk in patients with inflammatory bowel disease: a population-based study.** Cancer. 2001 Feb 15;91(4):854-62.



Black WC, Welch HG. **Advances in diagnostic imaging and overestimations of disease prevalence and the benefits of therapy.** N Engl J Med. 1993 Apr 29;328(17):1237-43.

Bleiberg H., de Gramont A. et coll. **Oxaliplatin plus 5-fluorouracil : clinical experience in patients with advanced colorectal cancer.** Semin Oncol 1998 ; 25 (suppl. 5) : 32-9.

Bodmer WF, Bailey CJ, Bodmer J, Bussey HJ, Ellis A, Gorman P, Lucibello FC, Murday VA, Rider SH, Scambler P, et al. **Localization of the gene for familial adenomatous polyposis on chromosome 5.** Nature. 1987 Aug 13-19;328(6131):614-6.

Boisen MK, Johansen JS, Dehlendorff C, Larsen JS, Osterlind K, Hansen J, Nielsen SE, Pfeiffer P, Tarpgaard LS, Holländer NH, Keldsen N, Hansen TF, Jensen BB, Jensen BV. **Primary tumor location and bevacizumab effectiveness in patients with metastatic colorectal cancer.** Ann Oncol. 2013 Oct;24(10):2554-9.

Bolós V, Peinado H, Pérez-Moreno MA, Fraga MF, Esteller M, Cano A. **The transcription factor Slug represses E-cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transitions: a comparison with Snail and E47 repressors.** J Cell Sci. 2003 Feb 1;116(Pt 3):499-511.

Brabletz T, Jung A, Reu S, Porzner M, Hlubek F, Kunz-Schughart LA, Knuechel R, Kirchner T. **Variable beta-catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment.** Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Aug 28;98(18):10356-61.

Cahill DP, Kinzler KW, Vogelstein B, Lengauer C. **Genetic instability and Darwinian selection in tumours.** Trends Cell Biol 1999;9(12):M57-M60.

Cancer Genome Atlas Network. **Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer.** Nature. 2012 Jul 18;487(7407):330-7.

Cao DD, Xu HL, Xu XM, Ge W. **The impact of primary tumor location on efficacy of cetuximab in metastatic colorectal cancer patients with different Kras status: a systematic review and meta-analysis.** Oncotarget. 2017 Jul 5;8(32):53631-53641.

Carmeliet P, Jain RK. **Angiogenesis in cancer and other diseases.** Nature. 2000 Sep 14;407(6801):249-57.

Carmeliet P. **Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis.** Nat Med. 2000 Apr;6(4):389-95.

Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, Fahrig M, Vandenhoek A, Harpal K, Eberhardt C, Declercq C, Pawling J, Moons L, Collen D, Risau W, Nagy A. **Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele.** Nature. 1996 Apr 4;380(6573):435-9.

Carmeliet P. **Developmental biology. Controlling the cellular brakes.** Nature. 1999 Oct 14;401(6754):657-8.

Casas E, Kim J, Bendesky A, Ohno-Machado L, Wolfe CJ, Yang J. **Snail2 is an essential mediator of Twist1-induced epithelial mesenchymal transition and metastasis.** Cancer Res. 2011 Jan 1;71(1):245-54.

Chen CN, Hsieh FJ, Cheng YM, Cheng WF, Su YN, Chang KJ, Lee PH. **The significance of placenta growth factor in angiogenesis and clinical outcome of human gastric cancer.** Cancer Lett. 2004 Sep 15;213(1):73-82.

Chiron M, Bagley RG, Pollard J, Mankoo PK, Henry C, Vincent L, Geslin C, Baltes N, Bergstrom DA. **Differential antitumor activity of aflibercept and bevacizumab in patient-derived xenograft models of colorectal cancer.** Mol Cancer Ther. 2014 Jun;13(6):1636-44.

Chisholm RH, Lorenzi T, Lorz A, Larsen AK, de Almeida LN, Escargueil A, Clairambault J. **Emergence of drug tolerance in cancer cell populations: an evolutionary outcome of selection, nongenetic instability, and stress-induced adaptation.** Cancer Res. 2015 Mar 15;75(6):930-9.

Cockman ME, Masson N, Mole DR, Jaakkola P, Chang GW, Clifford SC, Maher ER, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Maxwell PH. **Hypoxia inducible factor-alpha binding and ubiquitylation by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein.** J Biol Chem. 2000 Aug 18;275(33):25733-41.

Crosnier C, Stamatakis D, Lewis J. **Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control.** Nat Rev Genet. 2006 May;7(5):349-59.

Cudmore MJ, Hewett PW, Ahmad S, Wang KQ, Cai M, Al-Ani B, Fujisawa T, Ma B, Sissaoui S, Ramma W, Miller MR, Newby DE, Gu Y, Barleon B, Weich H, Ahmed A. **The role of heterodimerization between VEGFR-1 and VEGFR-2 in the regulation of endothelial cell homeostasis.** Nat Commun. 2012 Jul 24;3:972.

Dahlberg SE, Sandler AB, Brahmer JR, Schiller JH, Johnson DH. **Clinical course of advanced non-small-cell lung cancer patients experiencing hypertension during treatment with bevacizumab in combination with carboplatin and paclitaxel on ECOG 4599.** J Clin Oncol. 2010 Feb 20;28(6):949-54.

Dave N, Guaita-Esteruelas S, Gutarra S, Frias À, Beltran M, Peiró S, de Herreros AG. **Functional cooperation between Snail1 and twist in the regulation of ZEB1 expression during epithelial to mesenchymal transition.** J Biol Chem. 2011 Apr 8;286(14):12024-32.

Dellinger MT, Meadows SM, Wynne K, Cleaver O, Brekken RA. **Vascular endothelial growth factor receptor-2 promotes the development of the lymphatic vasculature.** PLoS One. 2013 Sep 2;8(9):e74686.

Diasio RB, Harris BE. **Clinical pharmacology of 5-fluorouracil.** Clin Pharmacokinet 1989;16:215-37.

Diaz-Rubio E., Sastre J., Zaniboni A. et coll. **Oxaliplatin as single agent in previously untreated colorectal carcinoma patients : a phase II multicentric study.** Ann Oncol 1998 ; 9 (1) : 105-8

Dor Y, Porat R, Keshet E. **Vascular endothelial growth factor and vascular adjustments to perturbations in oxygen homeostasis.** Am J Physiol Cell Physiol. 2001 Jun;280(6):C1367-74.

Douillard JY; V-303 Study Group. **Irinotecan and high-dose fluorouracil/leucovorin for metastatic colorectal cancer.** Oncology (Williston Park). 2000 Dec;14(12 Suppl 14):51-5.

Douillard JY, Cunningham D, Roth AD, Navarro M, James RD, Karasek P, et al. **Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer : a multicentre randomised trial.** Lancet 2000;355:1041-7.

Duff SE, Jeziorska M, Rosa DD, Kumar S, Haboubi N, Sherlock D, O'Dwyer ST, Jayson GC. **Vascular endothelial growth factors and receptors in colorectal cancer: implications for anti-angiogenic therapy.** Eur J Cancer. 2006 Jan;42(1):112-7.

Duschinsky R, Plevén E, Heidelberg C. **The synthesis of 5-fluoro-pyrimidines.** J Am Chem Soc 1957;79:4559-60.

Duval A, Hamelin R. **Mutations at coding repeat sequences in mismatch repair-deficient human cancers: toward a new concept of target genes for instability.** Cancer Res. 2002;62:2447–2454.

Eastman A. **Reevaluation of the interactions of cis-diamminedichloro (ethylene) platinum(II) with DNA.** Biochemistry 1986 ; 24 : 707-13.

Ehrmann RL, Knoth M. **Choriocarcinoma. Transfilter stimulation of vasoproliferation in the hamster cheek pouch. Studied by light and electron microscopy.** J Natl Cancer Inst. 1968 Dec;41(6):1329-41.

Ellis LM. **Mechanisms of action of bevacizumab as a component of therapy for metastatic colorectal cancer.** Semin Oncol. 2006 Oct;33(5 Suppl 10):S1-7.

Emadi BM, Soheili ZS, Schmitz I, Sameie S, Schulz WA. **Snail regulates cell survival and inhibits cellular senescence in human metastatic prostate cancer cell lines.** Cell Biol Toxicol 2010;26(6):553-67.

Escargueil AE, Prado S, Dezaire A, Clairambault J, Larsen AK, Soares DG. **Genotype- or Phenotype-Targeting Anticancer Therapies? Lessons from Tumor Evolutionary Biology.** Curr Pharm Des. 2016;22(44):6625-6644.

Faivre S., Woynarowski J.M. **Oxaliplatin effects on DNA integrity and apoptosis induction in human tumor cells.** Proc Am Ass Cancer Res 1998 ; 39 : 158

Fan F, Wey JS, McCarty MF, Belcheva A, Liu W, Bauer TW, Somcio RJ, Wu Y, Hooper A, Hicklin DJ, Ellis LM. **Expression and function of vascular endothelial growth factor receptor-1 on human colorectal cancer cells.** Oncogene. 2005 Apr 14;24(16):2647-53.

Fang X, Cai Y, Liu J, Wang Z, Wu Q, Zhang Z, Yang CJ, Yuan L, Ouyang G. **Twist2 contributes to breast cancer progression by promoting an epithelial-mesenchymal transition and cancer stem-like cell self-renewal.** Oncogene. 2011 Nov 24;30(47):4707-20.

Fata JE, Werb Z, Bissell MJ. **Regulation of mammary gland branching morphogenesis by the extracellular matrix and its remodeling enzymes.** Breast Cancer Res. 2004;6(1):1-11. Epub 2003 Aug 19.

Favier B, Alam A, Barron P, Bonnin J, Laboudie P, Fons P, Mandron M, Herault JP, Neufeld G, Savi P, Herbert JM, Bono F. **Neuropilin-2 interacts with VEGFR-2 and VEGFR-3 and promotes human endothelial cell survival and migration.** Blood. 2006 Aug 15;108(4):1243-50. Epub 2006 Apr 18.

Fearnhead NS, Britton MP, Bodmer WF. **The ABC of APC.** Hum Mol Genet. 2001;10:721-733

Fearon ER. **Molecular genetics of colorectal cancer.** Annu Rev Pathol. 2011;6:479-507.

Fearon E, Vogelstein B. **A genetic model for colorectal tumorigenesis.** Cell. 1990;61:759–767

Ferrara N, Adamis AP. **Ten years of anti-vascular endothelial growth factor therapy.** Nat Rev Drug Discov. 2016 Jun;15(6):385-403.

Ferrara N. **Vascular endothelial growth factor as a target for anticancer therapy.** Oncologist. 2004;9 Suppl 1:2-10.

Ferrara N, Davis-Smyth T. **The biology of vascular endothelial growth factor.** Endocr Rev. 1997 Feb;18(1):4-25.

Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea KS, Powell-Braxton L, Hillan KJ, Moore MW. **Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene.** Nature. 1996 Apr 4;380(6573):439-42.

Fischel JL, Formento P, Ciccolini J, Rostagno P, Etienne MC, Catalin J, Milano G. **Impact of the oxaliplatin-5 fluorouracil-folinic acid combination on respective intracellular determinants of drug activity.** Br J Cancer. 2002 Apr 8;86(7):1162-8.

Fischer C, Jonckx B, Mazzone M, Zacchigna S, Loges S, Pattarini L, Chorianopoulos E, Liesenborghs L, Koch M, De Mol M, Autiero M, Wyns S, Plaisance S, Moons L, van Rooijen N, Giacca M, Stassen JM, Dewerchin M, Collen D, Carmeliet P. **Anti-PIGF inhibits growth of VEGF(R)-inhibitor-resistant tumors without affecting healthy vessels.** Cell. 2007 Nov 2;131(3):463-75.

Folkman J. **Tumor angiogenesis: therapeutic implications.** N Engl J Med. 1971 Nov 18;285(21):1182-6.

Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M, Breitman ML. **Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium.** Nature. 1995 Jul 6;376(6535):66-70.

Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, Agani F, Leung SW, Koos RD, Semenza GL. **Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1.** Mol Cell Biol. 1996 Sep;16(9):4604-13.

Fox SB, Gasparini G, Harris AL. **Angiogenesis: pathological, prognostic, and growth-factor pathways and their link to trial design and anticancer drugs.** Lancet Oncol. 2001 May;2(5):278-89.

Francí C, Gallén M, Alameda F, Baró T, Iglesias M, Virtanen I, García de Herreros A. **Snail1 protein in the stroma as a new putative prognosis marker for colon tumours.** PLoS One. 2009;4(5):e5595.

Gacche RN, Meshram RJ. **Angiogenic factors as potential drug target: efficacy and limitations of anti-angiogenic therapy.** Biochim Biophys Acta. 2014 Aug;1846(1):161-79.

Gagnon ML, Bielenberg DR, Gechtman Z, Miao HQ, Takashima S, Soker S, Klagsbrun M. **Identification of a natural soluble neuropilin-1 that binds vascular endothelial growth factor: In vivo expression and antitumor activity.** Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Mar 14;97(6):2573-8.

Galdemard C, Brison O, Lavielle C. **The proto-oncogene FGF-3 is constitutively expressed in tumorigenic, but not in non-tumorigenic, clones of a human colon carcinoma cell line.** Oncogene. 1995 Jun 15;10(12):2331-42.

Garg, M., **Epithelial-mesenchymal transition - activating transcription factors – multifunctional regulators in cancer.** World J Stem Cells, 2013. 5(4): p. 188–95.

Gatalica Z, Vranic S, Xiu J, Swensen J, Reddy S. **High microsatellite instability (MSI-H) colorectal carcinoma: a brief review of predictive biomarkers in the era of personalized medicine.** Fam Cancer. 2016 Jul;15(3):405-12.

Gatenby RA, Gillies RJ. **A microenvironmental model of carcinogenesis.** Nat Rev Cancer 2008;8(1):56-61.

Gerber HP, Condorelli F, Park J, Ferrara N. **Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes. Flt-1, but not Flk-1/KDR, is up-regulated by hypoxia.** J Biol Chem. 1997 Sep 19;272(38):23659-67.

Giantonio BJ, Catalano PJ, Meropol NJ, O'Dwyer PJ, Mitchell EP, Alberts SR, et al. **Bevacizumab in combination with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin (FOLFOX4) for previously treated metastatic colorectal cancer: Results from the Eastern Cooperative Oncology Group Study E3200.** J Clin Oncol. 2007;25:1539–44.

Giese N, LaRochelle WJ, May-Siroff M, Robbins KC, Aaronson SA. **A small v-sis/platelet-derived growth factor (PDGF) B-protein domain in which subtle conformational changes abrogate PDGF receptor interaction and transforming activity.** Mol Cell Biol. 1990 Oct;10(10):5496-501.

Gill S, Thomas RR, Goldberg RM. **Review article: colorectal cancer chemotherapy.** Aliment Pharmacol Ther. 2003 Oct 1;18(7):683-92.

Goede V, Coutelle O, Neuneier J, Reinacher-Schick A, Schnell R, Koslowsky TC, Weihrauch MR, Cremer B, Kashkar H, Odenthal M, Augustin HG, Schmiegel W, Hallek M, Hacker UT. **Identification of serum angiopoietin-2 as a biomarker for clinical**

**outcome of colorectal cancer patients treated with bevacizumab-containing therapy.** Br J Cancer. 2010 Oct 26;103(9):1407-14.

Goel S, Duda DG, Xu L, Munn LL, Boucher Y, Fukumura D, Jain RK. **Normalization of the vasculature for treatment of cancer and other diseases.** Physiol Rev. 2011 Jul;91(3):1071-121.

Goldmann E. **The Growth of Malignant Disease in Man and the Lower Animals, with special reference to the Vascular System.** Proc R Soc Med. 1908;1(Surg Sect):1-13.

Goldstein J, Tran B, Ensor J, Gibbs P, Wong HL, Wong SF, Vilar E, Tie J, Broaddus R, Kopetz S, Desai J, Overman MJ. **Multicenter retrospective analysis of metastatic colorectal cancer (CRC) with high-level microsatellite instability (MSI-H).** Ann Oncol. 2014 May;25(5):1032-8.

Goldstein NI, Prewett M, Zuklys K, Rockwell P, Mendelsohn J. **Biological efficacy of a chimeric antibody to the epidermal growth factor receptor in a human tumor xenograft model.** Clin Cancer Res. 1995 Nov;1(11):1311-8.

Gordon KJ, Blobel GC. **Role of transforming growth factor-beta superfamily signaling pathways in human disease.** Biochim Biophys Acta. 2008;1782(4):197–228.

Gorgoulis VG, Vassiliou LV, Karakaidos P et al. **Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions.** Nature 2005;434(7035):907-13.

Gort EH, van HG, Verlaan I et al. **The TWIST1 oncogene is a direct target of hypoxia-inducible factor-2alpha.** Oncogene 2008;27(11):1501-10.

de Gramont A, Figuer A, Seymour M, Homerin M, Hmissi A, Cassidy J, Boni C, et al. **Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer.** J Clin Oncol 2000;18:2938-47.

Greaves M, Maley CC. **Clonal evolution in cancer.** Nature 2012;481(7381):306-13.

Greenblatt M, Shubi P. **Tumor angiogenesis: transfilter diffusion studies in the hamster by the transparent chamber technique.** J Natl Cancer Inst. 1968 Jul;41(1):111-24.

Gregorieff A, Clevers H. **Wnt signaling in the intestinal epithelium: from endoderm to cancer.** Genes Dev. 2005 Apr 15;19(8):877-90

Guastadisegni C, Colafranceschi M, Ottini L, Dogliotti E. **Microsatellite instability as a marker of prognosis and response to therapy: A meta-analysis of colorectal cancer survival data.** Eur J Cancer. 2010;46:2788–2798.

Guinney J, Dienstmann R, Wang X, de Reyniès A, Schlicker A, Soneson C, Marisa L, Roepman P, Nyamundanda G, Angelino P, Bot BM, Morris JS, Simon IM, Gerster S, Fessler E, De Sousa E Melo F, Missiaglia E, Ramay H, Barras D, Homicsko K, Maru D, Manyam GC, Broom B, Boige V, Perez-Villamil B, Laderas T, Salazar R, Gray JW, Hanahan D, Tabernero J, Bernards R, Friend SH, Laurent-Puig P, Medema JP, Sadanandam A, Wessels L, Delorenzi M, Kopetz S, Vermeulen L, Tejpar S. **The consensus molecular subtypes of colorectal cancer.** Nat Med. 2015 Nov;21(11):1350-6.

Gullino PM. **Angiogenesis and oncogenesis.** J Natl Cancer Inst. 1978 Sep;61(3):639-43.

Guo W, Keckesova Z, Donaher JL et al. **Slug and Sox9 cooperatively determine the mammary stem cell state.** Cell 2012;148(5):1015-28.

Guo X, Chen Y, Xu Z, Xu Z, Qian Y, Yu X. **Prognostic significance of VEGF-C expression in correlation with COX-2, lymphatic microvessel density, and clinicopathologic characteristics in human non-small cell lung cancer.** Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai). 2009 Mar;41(3):217-22.

Gustafsson T, Puntschart A, Kaijser L, Jansson E, Sundberg CJ. **Exercise-induced expression of angiogenesis-related transcription and growth factors in human skeletal muscle.** Am J Physiol. 1999 Feb;276(2 Pt 2):H679-85.

Hanahan D, Folkman J. **Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis.** Cell. 1996 Aug 9;86(3):353-64.

Hansen TF, Christensen Rd, Andersen RF, Garm Spindler KL, Johnsson A, Jakobsen A. **The predictive value of single nucleotide polymorphisms in the VEGF system to the efficacy of first-line treatment with bevacizumab plus chemotherapy in patients with metastatic colorectal cancer: results from the Nordic ACT trial.** Int J Colorectal Dis. 2012 Jun;27(6):715-20.

Hartwell KA, Muir B, Reinhardt F, Carpenter AE, Sgroi DC, Weinberg RA. **The Spemann organizer gene, Goosecoid, promotes tumor metastasis.** Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Dec 12;103(50):18969-74. Epub 2006 Dec 1.

He WZ, Liao FX, Jiang C, Kong PF, Yin CX, Yang Q, Qiu HJ, Zhang B, Xi LP. **Primary Tumor Location as a Predictive Factor for First-line Bevacizumab Effectiveness in Metastatic Colorectal Cancer Patients.** J Cancer 2017; 8(3):388-394.



Hecht JR, Mitchell E, Chidiac T, Scroggin C, Hagenstad C, Spigel D, Marshall J, Cohn A, McCollum D, Stella P, Deeter R, Shahin S, Amado RG. **A randomized phase IIIB trial of chemotherapy, bevacizumab, and panitumumab compared with chemotherapy and bevacizumab alone for metastatic colorectal cancer.** J Clin Oncol. 2009 Feb 10;27(5):672-80.

Helmlinger G, Yuan F, Dellian M, Jain RK. **Interstitial pH and pO<sub>2</sub> gradients in solid tumors in vivo: high-resolution measurements reveal a lack of correlation.** Nat Med. 1997 Feb;3(2):177-82.

Hicklin DJ, Ellis LM. **Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis.** J Clin Oncol. 2005 Feb 10;23(5):1011-27

Ho MC, Chen CN, Lee H, Hsieh FJ, Shun CT, Chang CL, Lai YT, Lee PH. **Placenta growth factor not vascular endothelial growth factor A or C can predict the early recurrence after radical resection of hepatocellular carcinoma.** Cancer Lett. 2007 Jun 8;250(2):237-49

Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, et al. **Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma.** N Engl J Med. 2010;363:211–223

Holash J, Davis S, Papadopoulos N, Croll SD, Ho L, Russell M, Boland P, Leidich R, Hylton D, Burova E, Ioffe E, Huang T, Radziejewski C, Bailey K, Fandl JP, Daly T, Wiegand SJ, Yancopoulos GD, Rudge JS. **VEGF-Trap: a VEGF blocker with potent antitumor effects.** Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Aug 20;99(17):11393-8. Epub 2002 Aug 12.

Holash J, Wiegand SJ, Yancopoulos GD. **New model of tumor angiogenesis: dynamic balance between vessel regression and growth mediated by angiopoietins and VEGF.** Oncogene. 1999 Sep 20;18(38):5356-62.

Holbro T, Hynes NE. **ErbB receptors: directing key signaling networks throughout life.** Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2004;44:195-217.

Holch JW, Ricard I, Stintzing S, Modest DP, Heinemann V. **The relevance of primary tumour location in patients with metastatic colorectal cancer: A meta-analysis of first-line clinical trials.** Eur J Cancer. 2017 Jan;70:87-98.

Hooker CM, Gallicchio L, Genkinger JM, Comstock GW, Alberg AJ. **A prospective cohort study of rectal cancer risk in relation to active cigarette smoking and passive smoke exposure.** Ann Epidemiol. 2008;18:28–35.

Horiguchi K, Sakamoto K, Koinuma D, Semba K, Inoue A, Inoue S, Fujii H, Yamaguchi A, Miyazawa K, Miyazono K, Saitoh M. **TGF- $\beta$  drives epithelial-mesenchymal transition through  $\delta$ EF1-mediated downregulation of ESRP.** *Oncogene*. 2012 Jun 28;31(26):3190-201.

Huang F, Chen YG. **Regulation of TGF- $\beta$  receptor activity.** *Cell Biosci*. 2012 Mar 15;2:9.

Hubert P. **Growth factors of the EGF family and their receptors.** *Bull Cancer*. 2007;94(7 Suppl):F137-45.

Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, Berlin J, Baron A, Griffing S, Holmgren E, Ferrara N, Fyfe G, Rogers B, Ross R, Kabbinavar F. **Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer.** *N Engl J Med*. 2004 Jun 3;350(23):2335-42.

Husemann Y, Geigl JB, Schubert F et al. **Systemic spread is an early step in breast cancer.** *Cancer Cell* 2008;13(1):58-68.

Issa JP. **CpG island methylator phenotype in cancer.** *Nat Rev Cancer*. 2004;4:988–993.

Jain RK. **Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy.** *Science*. 2005 Jan 7;307(5706):58-62.

Jain RK. **Antiangiogenic therapy for cancer: current and emerging concepts.** *Oncology (Williston Park)*. 2005 Apr;19(4 Suppl 3):7-16.

Jasperson KW, Tuohy TM, Neklason DW, Burt RW. **Hereditary and familial colon cancer.** *Gastroenterology*. 2010 Jun;138(6):2044-58.

Jones PA, Baylin SB. **The fundamental role of epigenetic events in cancer.** *Nat Rev Genet*. 2002 Jun;3(6):415-28.

Kaipainen A, Korhonen J, Mustonen T, van Hinsbergh VW, Fang GH, Dumont D, Breitman M, Alitalo K. **Expression of the fms-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development.** *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Apr 11;92(8):3566-70.

Kalluri R, Weinberg RA. **The basics of epithelial-mesenchymal transition.** *J Clin Invest*. 2009 Jun;119(6):1420-8.

Kamiyama H, Takano S, Tsuboi K, Matsumura A. **Anti-angiogenic effects of SN38 (active metabolite of irinotecan): inhibition of hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF-1alpha)/vascular endothelial growth factor (VEGF) expression of glioma and growth of endothelial cells.** J Cancer Res Clin Oncol. 2005 Apr;131(4):205-13.

Kendall RL, Thomas KA. **Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor.** Proc Natl Acad Sci U S A. 1993 Nov 15;90(22):10705-9.

Kerbel RS. **Tumor angiogenesis.** N Engl J Med. 2008 May 8;358(19):2039-49.

Kerbel RS. **Tumor angiogenesis: past, present and the near future.** Carcinogenesis. 2000 Mar;21(3):505-15.

Kim KK, Kugler MC, Wolters PJ, Robillard L, Galvez MG, Brumwell AN, Sheppard D, Chapman HA. **Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops in vivo during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix.** Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Aug 29;103(35):13180-5. Epub 2006 Aug 21.

Kinzler KW, Vogelstein B. **Lessons from hereditary colorectal cancer.** Cell. 1996;87:159–17

Kinzler KW, Vogelstein B. **Life (and death) in a malignant tumour.** Nature. 1996 Jan 4;379(6560):19-20.

Kline CL, El-Deiry WS. **Personalizing colon cancer therapeutics: targeting old and new mechanisms of action.** Pharmaceuticals (Basel). 2013 Aug 21;6(8):988-1038.

Koch S, Claesson-Welsh L. **Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors.** Cold Spring Harb Perspect Med. 2012 Jul;2(7):a006502.

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

Kolodkin AL, Levengood DV, Rowe EG, Tai YT, Giger RJ, Ginty DD. **Neuropilin is a semaphorin III receptor.** Cell. 1997 Aug 22;90(4):753-62.

Kondo Y, Issa JP. **Epigenetic changes in colorectal cancer.** Cancer Metastasis Rev. 2004 Jan-Jun;23(1-2):29-39

Kopetz S, Hoff PM, Morris JS, Wolff RA, Eng C, Glover KY, Adinin R, Overman MJ, Valero V, Wen S, Lieu C, Yan S, Tran HT, Ellis LM, Abbruzzese JL, Heymach JV. **Phase II trial of infusional fluorouracil, irinotecan, and bevacizumab for metastatic colorectal cancer: efficacy and circulating angiogenic biomarkers associated with therapeutic resistance.** J Clin Oncol. 2010 Jan 20;28(3):453-9.

Lane DP. **Cancer. p53, guardian of the genome.** Nature. 1992;358:15-6

Larsen AK, Ouaret D, El Ouadrani K, Petitprez A. **Targeting EGFR and VEGF(R) pathway cross-talk in tumor survival and angiogenesis.** Pharmacol Ther. 2011 Jul;131(1):80-90.

Lee S, Jilani SM, Nikolova GV, Carpizo D, Iruela-Arispe ML. **Processing of VEGF-A by matrix metalloproteinases regulates bioavailability and vascular patterning in tumors.** J Cell Biol. 2005 May 23;169(4):681-91.

Lengauer C, Kinzler K, Vogelstein B. **Genetic instabilities in human cancers.** Nature. 1998;396:643–649

Leslie A, Carey F, Pratt N, et al. **The colorectal adenoma-carcinoma sequence.** Br J Surg. 2002;89:845–860

Lévi F, Giacchetti S, Adam R, Zidani R, Metzger G, Misset JL. **Chronomodulation of chemotherapy against metastatic colorectal cancer. International Organization for Cancer Chronotherapy.** Eur J Cancer 1995;31A:1264-70.

Levine AJ, Oren M. **The first 30 years of p53: growing ever more complex.** Nat Rev Cancer. 2009;9:749–758

Li X, Pontén A, Aase K, Karlsson L, Abramsson A, Uutela M, Bäckström G, Hellström M, Boström H, Li H, Soriano P, Betsholtz C, Heldin CH, Alitalo K, Ostman A, Eriksson U. **PDGF-C is a new protease-activated ligand for the PDGF alpha-receptor.** Nat Cell Biol. 2000 May;2(5):302-9.

Li X, Liu B, Xiao J, Yuan Y, Ma J, Zhang Y. **Roles of VEGF-C and Smad4 in the lymphangiogenesis, lymphatic metastasis, and prognosis in colon cancer.** J Gastrointest Surg. 2011 Nov;15(11):2001-10.

Li X, Lee C, Tang Z, Zhang F, Arjunan P, Li Y, Hou X, Kumar A, Dong L. **VEGF-B: a survival, or an angiogenic factor?** Cell Adh Migr. 2009 Oct-Dec;3(4):322-7.

Lièvre A, Bachet JB, Le Corre D, Boige V, Landi B, Emile JF, Côté JF, Tomasic G, Penna C, Ducreux M, Rougier P, Penault-Llorca F, Laurent-Puig P. **KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer.** Cancer Res. 2006 Apr 15;66(8):3992-5.

Liu HB, Wu Y, Lv TF, Yao YW, Xiao YY, Yuan DM, Song Y. **Skin rash could predict the response to EGFR tyrosine kinase inhibitor and the prognosis for patients with non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis.** PLoS One. 2013;8(1):e55128.

Liu Y, El-Naggar S, Darling DS, Higashi Y, Dean DC. **Zeb1 links epithelial-mesenchymal transition and cellular senescence.** Development 2008;135(3):579-88.

Loboda A, Nebozhyn MV, Watters JW, Buser CA, Shaw PM, Huang PS, Van't Veer L, Tollenaar RA, Jackson DB, Agrawal D, Dai H, Yeatman TJ. **EMT is the dominant program in human colon cancer.** BMC Med Genomics. 2011 Jan 20;4:9.

Lohela M, Bry M, Tammela T, Alitalo K. **VEGFs and receptors involved in angiogenesis versus lymphangiogenesis.** Curr Opin Cell Biol. 2009 Apr;21(2):154-65.

Lokich JJ, Ahlgren JD, Gullo JJ, Philips JA, Fryer JG. **A prospective randomized comparison of continuous infusion fluorouracil with a conventional bolus schedule in metastatic colorectal carcinoma: a Mid-Atlantic Oncology Program Study.** J Clin Oncol. 1989; 7:425-432

Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. **5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies.** Nat Rev Cancer. 2003 May;3(5):330-8.

Loupakis F, Yang D, Yau L, Feng S, Cremolini C, Zhang W, Maus MK, Antoniotti C, Langer C, Scherer SJ, Müller T, Hurwitz HI, Saltz L, Falcone A, Lenz HJ. **Primary tumor location as a prognostic factor in metastatic colorectal cancer.** J Natl Cancer Inst. 2015 Feb 24;107(3).

Lowe SW, Cepero E, Evan G. **Intrinsic tumour suppression.** Nature 2004;432(7015):307-15.

Lu Y, Segelman J, Nordgren A, Lindström L, Frisell J, Martling A. **Increased risk of colorectal cancer in patients diagnosed with breast cancer in women.** Cancer Epidemiol. 2016 Apr;41:57-62.

Lynch HT, Smyrk T. **Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome). An updated review.** Cancer. 1996 Sep 15;78(6):1149-67.

Maestro R, Dei Tos AP, Hamamori Y, Krasnokutsky S, Sartorelli V, Kedes L, Doglioni C, Beach DH, Hannon GJ. **Twist is a potential oncogene that inhibits apoptosis.** Genes Dev. 1999 Sep 1;13(17):2207-17.

Mandel JS, Church TR, Bond JH, Ederer F, Geisser MS, Mongin SJ, Snover DC, Schuman LM. **The effect of fecal occult-blood screening on the incidence of colorectal cancer.** N Engl J Med. 2000 Nov 30;343(22):1603-7.

Mani SA, Guo W, Liao MJ et al. **The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells.** Cell 2008;133(4):704-15.

Manzoni M, Mariucci S, Delfanti S, Rovati B, Ronzoni M, Loupakis F, Brugnattelli S, Tinelli C, Villa E, Falcone A, Danova M. **Circulating endothelial cells and their apoptotic fraction are mutually independent predictive biomarkers in Bevacizumab-based treatment for advanced colorectal cancer.** J Cancer Res Clin Oncol. 2012 Jul;138(7):1187-96.

De Marchis F, Ribatti D, Giampietri C, Lentini A, Faraone D, Scoccianti M, Capogrossi MC, Facchiano A. **Platelet-derived growth factor inhibits basic fibroblast growth factor angiogenic properties in vitro and in vivo through its alpha receptor.** Blood. 2002 Mar 15;99(6):2045-53.

Markowitz S, Wang J, Myeroff L, Parsons R, Sun L, Lutterbaugh J, Fan RS, Zborowska E, Kinzler KW, Vogelstein B, et al. **Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability.** Science. 1995 Jun 2;268(5215):1336-8.

Massague J. **TGFbeta in Cancer.** Cell. 2008;134(2):215–230.

Matsumoto K, Suzuki K, Koike H, Okamura K, Tsuchiya K, Uchida T, Takezawa Y, Kobayashi M, Yamanaka H. **Prognostic significance of plasma placental growth factor levels in renal cell cancer: an association with clinical characteristics and vascular endothelial growth factor levels.** Anticancer Res. 2003 Nov-Dec;23(6D):4953-8.

Matsusaka S, Suenaga M, Mishima Y, Takagi K, Terui Y, Mizunuma N, Hatake K. **Circulating endothelial cells predict for response to bevacizumab-based chemotherapy in metastatic colorectal cancer.** Cancer Chemother Pharmacol. 2011 Sep;68(3):763-8.

Matuo R, Sousa FG, Escargueil AE, Soares DG, Grivicich I, Saffi J, Larsen AK, Henriques JA. **DNA repair pathways involved in repair of lesions induced by 5-fluorouracil and its active metabolite FdUMP.** Biochem Pharmacol. 2010 Jan 15;79(2):147-53.

Matuo R, Sousa FG, Escargueil AE, Grivicich I, Garcia-Santos D, Chies JA, Saffi J, Larsen AK, Henriques JA. **5-Fluorouracil and its active metabolite FdUMP cause DNA damage in human SW620 colon adenocarcinoma cell line.** J Appl Toxicol. 2009 May;29(4):308-16.

Mésange P, Poindessous V, Sabbah M, Escargueil AE, de Gramont A, Larsen AK. **Intrinsic bevacizumab resistance is associated with prolonged activation of autocrine VEGF signaling and hypoxia tolerance in colorectal cancer cells and can be overcome by nintedanib, a small molecule angiokinase inhibitor.** Oncotarget. 2014 Jul 15;5(13):4709-21.

Mikheeva SA, Mikheev AM, Petit A, Beyer R, Oxford RG, Khorasani L, Maxwell JP, Glackin CA, Wakimoto H, González-Herrero I, Sánchez-García I, Silber JR, Horner PJ, Rostomily RC. **TWIST1 promotes invasion through mesenchymal change in human glioblastoma.** Mol Cancer. 2010 Jul 20;9:194.

Milanini-Mongiat J, Pouysségur J, Pagès G. **Identification of two Sp1 phosphorylation sites for p42/p44 mitogen-activated protein kinases: their implication in vascular endothelial growth factor gene transcription.** J Biol Chem. 2002 Jun 7;277(23):20631-9. Epub 2002 Mar 19.

Milanini J, Viñals F, Pouysségur J, Pagès G. **p42/p44 MAP kinase module plays a key role in the transcriptional regulation of the vascular endothelial growth factor gene in fibroblasts.** J Biol Chem. 1998 Jul 17;273(29):18165-72.

Mironchik Y, Winnard PT, Jr., Vesuna F et al. **Twist overexpression induces in vivo angiogenesis and correlates with chromosomal instability in breast cancer.** Cancer Res 2005;65(23):10801-9.

Moody SE, Perez D, Pan TC, Sarkisian CJ, Portocarrero CP, Sterner CJ, Notorfrancesco KL, Cardiff RD, Chodosh LA. **The transcriptional repressor Snail promotes mammary tumor recurrence.** Cancer Cell. 2005 Sep;8(3):197-209.

Morel AP, Hinkal GW, Thomas C et al. **EMT inducers catalyze malignant transformation of mammary epithelial cells and drive tumorigenesis towards claudin-low tumors in transgenic mice.** PLoS Genet 2012;8(5):e1002723.

Morel AP, Lievre M, Thomas C, Hinkal G, Ansieau S, Puisieux A. **Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition.** PLoS One 2008;3(8):e2888.

Nakamura Y, Yasuoka H, Tsujimoto M, Imabun S, Nakahara M, Nakao K, Nakamura M, Mori I, Kakudo K. **Lymph vessel density correlates with nodal status, VEGF-C expression, and prognosis in breast cancer.** Breast Cancer Res Treat. 2005 May;91(2):125-32.

Nakoman C, Resmi H, Ay O, Acikel U, Atabey N, Güner G. **Effects of basic fibroblast factor (bFGF) on MMP-2, TIMP-2, and type-I collagen levels in human lung carcinoma fibroblasts.** Biochimie. 2005 Mar-Apr;87(3-4):343-51.

Nazarenko I, Hede SM, He X, Hedrén A, Thompson J, Lindström MS, Nistér M. **PDGF and PDGF receptors in glioma.** Ups J Med Sci. 2012 May;117(2):99-112.

Nieto MA, Huang RY, Jackson RA, Thiery JP. **EMT: 2016.** Cell. 2016 Jun 30;166(1):21-45.

Ogawa S, Oku A, Sawano A, Yamaguchi S, Yazaki Y, Shibuya M. **A novel type of vascular endothelial growth factor, VEGF-E (NZ-7 VEGF), preferentially utilizes KDR/Flk-1 receptor and carries a potent mitotic activity without heparin-binding domain.** J Biol Chem. 1998 Nov 20;273(47):31273-82.

Ohashi S, Natsuizaka M, Wong GS et al. **Epidermal growth factor receptor and mutant p53 expand an esophageal cellular subpopulation capable of epithelial-to-mesenchymal transition through ZEB transcription factors.** Cancer Res 2010;70(10):4174-84.

Okita NT, Yamada Y, Takahari D, Hirashima Y, Matsubara J, Kato K, Hamaguchi T, Shirao K, Shimada Y, Taniguchi H, Shimoda T. **Vascular endothelial growth factor receptor expression as a prognostic marker for survival in colorectal cancer.** Jpn J Clin Oncol. 2009 Sep;39(9):595-600.

Olofsson B, Korpelainen E, Pepper MS, Mandriota SJ, Aase K, Kumar V, Gunji Y, Jeltsch MM, Shibuya M, Alitalo K, Eriksson U. **Vascular endothelial growth factor B (VEGF-B) binds to VEGF receptor-1 and regulates plasminogen activator activity in endothelial cells.** Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Sep 29;95(20):11709-14.

Olofsson B, Pajusola K, Kaipainen A, von Euler G, Joukov V, Saksela O, Orpana A, Pettersson RF, Alitalo K, Eriksson U. **Vascular endothelial growth factor B, a novel growth factor for endothelial cells.** Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Mar 19;93(6):2576-81.

Olofsson B, Pajusola K, von Euler G, Chilov D, Alitalo K, Eriksson U. **Genomic organization of the mouse and human genes for vascular endothelial growth factor B (VEGF-B) and characterization of a second splice isoform.** J Biol Chem, 1996. 271(32): p. 19310-7



Ornitz DM, Itoh N. **Fibroblast growth factors.** Genome Biol. 2001;2(3):REVIEWS3005. Epub 2001 Mar 9.

Otani N, Minami S, Yamoto M, Shikone T, Otani H, Nishiyama R, Otani T, Nakano R. **The vascular endothelial growth factor/fms-like tyrosine kinase system in human ovary during the menstrual cycle and early pregnancy.** J Clin Endocrinol Metab. 1999 Oct;84(10):3845-51.

Otori K, Konishi M, Sugiyama K, Hasebe T, Shimoda T, Kikuchi-Yanoshita R, Mukai K, Fukushima S, Miyaki M, Esumi H. **Infrequent somatic mutation of the adenomatous polyposis coli gene in aberrant crypt foci of human colon tissue.** Cancer. 1998 Sep 1;83(5):896-900.

Oyama T, Ran S, Ishida T, Nadaf S, Kerr L, Carbone DP, Gabrilovich DI. **Vascular endothelial growth factor affects dendritic cell maturation through the inhibition of nuclear factor-kappa B activation in hemopoietic progenitor cells.** J Immunol. 1998 Feb 1;160(3):1224-32.

Oztas E, Avci ME, Ozcan A, Sayan AE, Tulchinsky E, Yagci T. **Novel monoclonal antibodies detect Smad-interacting protein 1 (SIP1) in the cytoplasm of human cells from multiple tumor tissue arrays.** Exp Mol Pathol. 2010 Oct;89(2):182-9.

Paavonen K, Puolakkainen P, Jussila L, Jahkola T, Alitalo K. **Vascular endothelial growth factor receptor-3 in lymphangiogenesis in wound healing.** Am J Pathol. 2000 May;156(5):1499-504.

Pallier K, Cessot A, Cote JF et al. **TWIST1 a new determinant of epithelial to mesenchymal transition in EGFR mutated lung adenocarcinoma.** PLoS One 2012;7(1):e29954.

Pang HB, Braun GB, Friman T, Aza-Blanc P, Ruidiaz ME, Sugahara KN, Teesalu T, Ruoslahti E. **An endocytosis pathway initiated through neuropilin-1 and regulated by nutrient availability.** Nat Commun. 2014 Oct 3;5:4904.

Paris C, Thaon I, Hérin F, Clin B, Lacourt A, Luc A, Coureau G, Brochard P, Chamming's S, Gislard A, Galan P, Hercberg S, Wild P, Pairon JC, Andujar P. **Occupational Asbestos Exposure and Incidence of Colon and Rectal Cancers in French Men: The Asbestos-Related Diseases Cohort (ARDCo-Nut).** Environ Health Perspect. 2017 Mar;125(3):409-415.

Park JE, Chen HH, Winer J, Houck KA, Ferrara N. **Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR.** J Biol Chem. 1994 Oct 14;269(41):25646-54.

Parr C, Watkins G, Boulton M, Cai J, Jiang WG. **Placenta growth factor is over-expressed and has prognostic value in human breast cancer.** Eur J Cancer. 2005 Dec;41(18):2819-27.

Peeters M, Price T. **Biologic therapies in the metastatic colorectal cancer treatment continuum--applying current evidence to clinical practice.** Cancer Treat Rev. 2012;38:397–406.

Peinado H, Marin F, Cubillo E, Stark HJ, Fusenig N, Nieto MA, Cano A. **Snail and E47 repressors of E-cadherin induce distinct invasive and angiogenic properties in vivo.** J Cell Sci. 2004 Jun 1;117(Pt 13):2827-39.

Petitprez A, Larsen AK. **Irinotecan resistance is accompanied by upregulation of EGFR and Src signaling in human cancer models.** Curr Pharm Des. 2013;19(5):958-64.

Piccinin S, Tonin E, Sessa S et al. **A “twist box” code of p53 inactivation: twist box: p53 interaction promotes p53 degradation.** Cancer Cell 2012;22(3):404-15.

Pinedo HM, Peters GF. **Fluorouracil : biochemistry and pharmacology.** J Clin Oncol 1988;6:1653-64.

Poindessous V, Ouaret D, El Ouadrani K, Battistella A, Mégaloophonos VF, Kamsu-Kom N, Petitprez A, Escargueil AE, Boudou P, Dumont S, Cervera P, Fléjou JF, André T, Tournigand C, Chibaudel B, de Gramont A, Larsen AK. **EGFR- and VEGF(R)-targeted small molecules show synergistic activity in colorectal cancer models refractory to combinations of monoclonal antibodies.** Clin Cancer Res. 2011 Oct 15;17(20):6522-30.

Poon MA, O'Connell MJ, Moertel CG, Wieand HS, Cullinan SA, Everson LK, Krook JE, Mailliard JA, Laurie JA, Tschetter LK, et al. **Biochemical modulation of fluorouracil: evidence of significant improvement of survival and quality of life in patients with advanced colorectal carcinoma.** J Clin Oncol 1989;7:1407-1418.

Potentia S, Zeisberg E, Kalluri R. **The role of endothelial-to-mesenchymal transition in cancer progression.** Br J Cancer. 2008 Nov 4;99(9):1375-9.

Powell SM, Petersen GM, Krush AJ, Booker S, Jen J, Giardiello FM, Hamilton SR, Vogelstein B, Kinzler KW.. **Molecular diagnosis of familial adenomatous polyposis.** N Engl J Med 1993; 329 (27): 1982–1987.

Pugh CW, Ratcliffe PJ. **Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system.** Nat Med. 2003 Jun;9(6):677-84.

Moon RT, Kohn AD, De Ferrari GV, Kaykas A. **WNT and  $\beta$ -catenin signalling: diseases and therapies.** Nat Rev Genet. 2004 Sep;5(9):691-701.

Raymond E., Buquet-Fagot C., Djelloul C.J. et coll. **Antitumoral activity of oxaliplatin in combination with 5-fluorouracil and the thymidilate synthase inhibitor AG337 in human colon, breast, and ovarian cancers.** Anti-Cancer Drugs 1997 ; 8 : 876-85

Reinmuth N, Liu W, Jung YD, Ahmad SA, Shaheen RM, Fan F, Bucana CD, McMahon G, Gallick GE, Ellis LM. **Induction of VEGF in perivascular cells defines a potential paracrine mechanism for endothelial cell survival.** FASEB J. 2001 May;15(7):1239-41.

Rhim AD, Mirek ET, Aiello NM et al. **EMT and dissemination precede pancreatic tumor formation.** Cell 2012;148(1- 2):349-61.

Ribatti D. **Endogenous inhibitors of angiogenesis: a historical review.** Leuk Res. 2009 May;33(5):638-44.

Ribatti D. **The discovery of the placental growth factor and its role in angiogenesis: a historical review.** Angiogenesis. 2008;11(3):215-21.

Robenzadeh A, Don PC, Weinberg JM. **Treatment of tufted angioma with interferon alfa: role of bFGF.** Pediatr Dermatol. 1998 Nov-Dec;15(6):482.

Rougier P, Ducreux M. **Optimiser la chimiothérapie dans les cancers digestifs. L'exemple des cancers colorectaux métastasés.** Hepato-gastro 1997;4:91-101.

Saeki T, Tanada M, Takashima S, Saeki H, Takiyama W, Nishimoto N, Moriwaki S. **Correlation between expression of platelet-derived endothelial cell growth factor (thymidine phosphorylase) and microvessel density in early-stage human colon carcinomas.** Jpn J Clin Oncol. 1997 Aug;27(4):227-30.

Saltz LB, Lenz HJ, Kindler HL, Hochster HS, Wadler S, Hoff PM, Kemeny NE, Hollywood EM, Gonen M, Quinones M, Morse M, Chen HX. **Randomized phase II trial of cetuximab, bevacizumab, and irinotecan compared with cetuximab and bevacizumab alone in irinotecan-refractory colorectal cancer: the BOND-2 study.** J Clin Oncol. 2007 Oct 10;25(29):4557-61.

Samad AK, Taylor RS, Marshall T, Chapman MA. **A meta-analysis of the association of physical activity with reduced risk of colorectal cancer.** Colorectal Dis. 2005;7:204–213

Samowitz WS, Powers MD, Spirio LN, Nollet F, van Roy F, Slattery ML. **Beta-catenin mutations are more frequent in small colorectal adenomas than in larger adenomas and invasive carcinomas.** Cancer Res. 1999 Apr 1;59(7):1442-4.

Sánchez-Tilló E, Liu Y, de Barrios O, Siles L, Fanlo L, Cuatrecasas M, Darling DS, Dean DC, Castells A, Postigo A. **EMT-activating transcription factors in cancer: beyond EMT and tumor invasiveness.** Cell Mol Life Sci. 2012 Oct;69(20):3429-56.

Santini D, Loupakis F, Vincenzi B, Floriani I, Stasi I, Canestrari E, Rulli E, Maltese PE, Andreoni F, Masi G, Graziano F, Baldi GG, Salvatore L, Russo A, Perrone G, Tommasino MR, Magnani M, Falcone A, Tonini G, Ruzzo A. **High concordance of KRAS status between primary colorectal tumors and related metastatic sites: implications for clinical practice.** Oncologist. 2008 Dec;13(12):1270-5.

Schlessinger J, Lax I, Lemmon M. **Regulation of growth factor activation by proteoglycans: what is the role of the low affinity receptors?** Cell. 1995 Nov 3;83(3):357-60.

Seghezzi G, Patel S, Ren CJ, Gualandris A, Pintucci G, Robbins ES, Shapiro RL, Galloway AC, Rifkin DB, Mignatti P. **Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) induces vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in the endothelial cells of forming capillaries: an autocrine mechanism contributing to angiogenesis.** J Cell Biol. 1998 Jun 29;141(7):1659-73.

Seitz JF, Rougier P. **Résultats de la chimiothérapie dans les cancers digestifs.** Bull Cancer 1994;81:260-76

Semenza GL. **Targeting HIF-1 for cancer therapy.** Nat Rev Cancer. 2003 Oct;3(10):721-32.

Seo Y, Ishii Y, Ochiai H, Fukuda K, Akimoto S, Hayashida T, Okabayashi K, Tsuruta M, Hasegawa H, Kitagawa Y. **Cetuximab-mediated ADCC activity is correlated with the cell surface expression level of EGFR but not with the KRAS/BRAF mutational status in colorectal cancer.** Oncol Rep. 2014 May;31(5):2115-22.

Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW. **Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a.** Cell 1997;88(5):593-602.

Shaukat A, Dostal A, Menk J, Church TR. **BMI Is a Risk Factor for Colorectal Cancer Mortality.** Dig Dis Sci. 2017 Jul 21. doi: 10.1007/s10620-017-4682-z

Shibuya M. **VEGF-VEGFR Signals in Health and Disease.** Biomol Ther (Seoul). 2014 Jan;22(1):1-9.

Shibuya M, Claesson-Welsh L. **Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis.** Exp Cell Res. 2006 Mar 10;312(5):549-60. Epub 2005 Dec 5.

Shimizu Y, Ikeda S, Fujimori M, Kodama S, Nakahara M, Okajima M, Asahara T. **Frequent alterations in the Wnt signaling pathway in colorectal cancer with microsatellite instability.** Genes Chromosomes Cancer. 2002 Jan;33(1):73-81.

Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. **Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis.** Nature. 1992 Oct 29;359(6398):843-5.

Simons M, Gordon E, Claesson-Welsh L. **Mechanisms and regulation of endothelial VEGF receptor signalling.** Nat Rev Mol Cell Biol. 2016 Oct;17(10):611-25.

Singh AB, Harris RC. **Autocrine, paracrine and juxtacrine signaling by EGFR ligands.** Cell Signal. 2005 Oct;17(10):1183-93.

Smit MA, Geiger TR, Song JY, Gitelman I, Peeper DS. **A Twist-Snail axis critical for TrkB-induced epithelial-mesenchymal transition-like transformation, anoikis resistance, and metastasis.** Mol Cell Biol. 2009 Jul;29(13):3722-37.

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

Soker S. **Neuropilin in the midst of cell migration and retraction.** Int J Biochem Cell Biol. 2001 Apr;33(4):433-7.

Soker S, Takashima S, Miao HQ, Neufeld G, Klagsbrun M. **Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor.** Cell. 1998 Mar 20;92(6):735-45.

Song LB, Liao WT, Mai HQ, Zhang HZ, Zhang L, Li MZ, Hou JH, Fu LW, Huang WL, Zeng YX, Zeng MS. **The clinical significance of twist expression in nasopharyngeal carcinoma.** Cancer Lett. 2006 Oct 28;242(2):258-65. Epub 2006 Jan 18.

Spaderna S, Schmalhofer O, Hlubek F, Berx G, Eger A, Merkel S, Jung A, Kirchner T, Brabletz T. **A transient, EMT-linked loss of basement membranes indicates metastasis and poor survival in colorectal cancer.** Gastroenterology. 2006 Sep;131(3):830-40.

Spano JP, Fagard R, Soria JC, Rixe O, Khayat D, Milano G. **Epidermal growth factor receptor signaling in colorectal cancer: preclinical data and therapeutic perspectives.** Ann Oncol. 2005 Feb;16(2):189-94.

Sporn MB, Roberts AB, Wakefield LM, Assoian RK. **Transforming growth factor-beta: biological function and chemical structure.** Science. 1986 Aug 1;233(4763):532-4.

De Stefano A, Carlomagno C, Pepe S, Bianco R, De Placido S. **Bevacizumab-related arterial hypertension as a predictive marker in metastatic colorectal cancer patients.** Cancer Chemother Pharmacol. 2011 Nov;68(5):1207-13.

Steinke V, Engel C, Büttner R, Schackert HK, Schmiegel WH, Propping P. **Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC)/Lynch syndrome.** Dtsch Arztebl Int. 2013 Jan;110(3):32-8.

Sunada H, Magun BE, Mendelsohn J, MacLeod CL. **Monoclonal antibody against epidermal growth factor receptor is internalized without stimulating receptor phosphorylation.** Proc Natl Acad Sci U S A. 1986 Jun;83(11):3825-9.

Swanton C. **Intratumor heterogeneity: evolution through space and time.** Cancer Res 2012;72(19):4875-82.

Swift MR, Weinstein BM. **Arterial-venous specification during development.** Circ Res. 2009 Mar 13;104(5):576-88

Takahashi H, Shibuya M. **The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions.** Clin Sci (Lond). 2005 Sep;109(3):227-41.

Tan TZ, Miow QH, Miki Y, Noda T, Mori S, Huang RY, Thiery JP. **Epithelial-mesenchymal transition spectrum quantification and its efficacy in deciphering survival and drug responses of cancer patients.** EMBO Mol Med. 2014 Oct;6(10):1279-93.

Taniguchi M, Yuasa S, Fujisawa H, Naruse I, Saga S, Mishina M, Yagi T. **Disruption of semaphorin III/D gene causes severe abnormality in peripheral nerve projection.** Neuron. 1997 Sep;19(3):519-30.

Terauchi M, Kajiyama H, Yamashita M, Kato M, Tsukamoto H, Umezu T, Hosono S, Yamamoto E, Shibata K, Ino K, Nawa A, Nagasaka T, Kikkawa F. **Possible involvement of TWIST in enhanced peritoneal metastasis of epithelial ovarian carcinoma.** Clin Exp Metastasis. 2007;24(5):329-39. Epub 2007 May 9.

Terman BI, Dougher-Vermazen M, Carrion ME, Dimitrov D, Armellino DC, Gospodarowicz D, Böhlen P. **Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor.** Biochem Biophys Res Commun. 1992 Sep 30;187(3):1579-86.

Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. **Microsatellite instability in cancer of the proximal colon.** Science. 1993;260:816–819.

Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. **Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease.** Cell. 2009 Nov 25;139(5):871-90

Thiery JP, Sleeman JP. **Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions.** Nat Rev Mol Cell Biol 2006;7(2):131-42.

Thiery JP. **Epithelial-mesenchymal transitions in tumor progression.** Nat Rev Cancer. 2002 Jun;2(6):442-54.

Tol J, Koopman M, Rodenburg CJ, Cats A, Creemers GJ, Schrama JG, Erdkamp FL, Vos AH, Mol L, Antonini NF, Punt CJ. **A randomised phase III study on capecitabine, oxaliplatin and bevacizumab with or without cetuximab in first-line advanced colorectal cancer, the CAIRO2 study of the Dutch Colorectal Cancer Group (DCCG). An interim analysis of toxicity.** Ann Oncol. 2008 Apr;19(4):734-8.

Tonnesen MG, Feng X, Clark RA. **Angiogenesis in wound healing.** J Invest Dermatol Symp Proc. 2000 Dec;5(1):40-6.

Tournigand C, Chibaudel B, Samson B, Scheithauer W, Vernerey D, Mésange P, Lledo G, Viret F, Ramée JF, Toubiana-Mathieu N, Dauba J, Dupuis O, Rinaldi Y, Mabro M, Aucoin N, Latreille J, Bonnetain F, Louvet C, Larsen AK, André T, de Gramont A. **Bevacizumab with or without erlotinib as maintenance therapy in patients with metastatic colorectal cancer (GERCOR DREAM; OPTIMOX3): a randomised, open-label, phase 3 trial.** Lancet Oncol. 2015 Nov;16(15):1493-505.

Tran PT, Shroff EH, Burns TF et al. **Twist1 suppresses senescence programs and thereby accelerates and maintains mutant Kras-induced lung tumorigenesis.** PLoS Genet 2012;8(5):e1002650.

Tran DD, Corsa CA, Biswas H, Aft RL, Longmore GD. **Temporal and spatial cooperation of Snail1 and Twist1 during epithelial-mesenchymal transition predicts for human breast cancer recurrence.** Mol Cancer Res. 2011 Dec;9(12):1644-57.

Treps L, Gavard J. **Tumor angiogenesis: when the Tree of Life turns bad.** Med Sci (Paris). 2015 Nov;31(11):989-95.

Trimboli AJ, Fukino K, de Bruin A et al. **Direct evidence for epithelial-mesenchymal transitions in breast cancer.** Cancer Res 2008;68(3):937-45.

Tsai JH, Donaher JL, Murphy DA, Chau S, Yang J. **Spatiotemporal regulation of epithelial-mesenchymal transition is essential for squamous cell carcinoma metastasis.** Cancer Cell 2012;22(6):725-36.

Turner N, Grose R. **Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer.** Nat Rev Cancer. 2010 Feb;10(2):116-29.

Ueda M, Hung YC, Terai Y, Kanda K, Kanemura M, Futakuchi H, Yamaguchi H, Akise D, Yasuda M, Ueki M. **Vascular endothelial growth factor-C expression and invasive phenotype in ovarian carcinomas.** Clin Cancer Res. 2005 May 1;11(9):3225-32.

Vaish M, Mittal B. **DNA mismatch repair, microsatellite instability and cancer.** Indian J Exp Biol. 2002 Sep;40(9):989-94.

Valsesia-Wittmann S, Magdeleine M, Dupasquier S et al. **Oncogenic cooperation between H-Twist and N-Myc overrides failsafe programs in cancer cells.** Cancer Cell 2004;6(6):625-30.

Varney ML, Singh RK. **VEGF-C-VEGFR3/Flt4 axis regulates mammary tumor growth and metastasis in an autocrine manner.** Am J Cancer Res. 2015 Jan 15;5(2):616-28.

Vicovac L, Aplin JD. **Epithelial-mesenchymal transition during trophoblast differentiation.** Acta Anat (Basel). 1996;156(3):202-16.

Voena C, Chiarle R. **Advances in cancer immunology and cancer immunotherapy.** Discov Med. 2016 Feb;21(114):125-33.

de Vries C, Escobedo JA, Ueno H, Houck K, Ferrara N, Williams LT. **The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor.** Science. 1992 Feb 21;255(5047):989-91.

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

Wang Z, Ahmad A, Li Y, Kong D, Azmi AS, Banerjee S, Sarkar FH. **Emerging roles of PDGF-D signaling pathway in tumor development and progression.** Biochim Biophys Acta. 2010 Aug;1806(1):122-30.



Wei SC, Tsao PN, Yu SC, Shun CT, Tsai-Wu JJ, Wu CH, Su YN, Hsieh FJ, Wong JM. **Placenta growth factor expression is correlated with survival of patients with colorectal cancer.** Gut. 2005 May;54(5):666-72.

Woynarowski J.M., Chapman W.G., Napier C., Raymond E. **Oxaliplatin effects on naked and intracellular DNA.** Proc Am Ass Cancer Res 1997 ; 38 : 311.

Wu LW, Mayo LD, Dunbar JD, Kessler KM, Ozes ON, Warren RS, Donner DB. **VRAP is an adaptor protein that binds KDR, a receptor for vascular endothelial cell growth factor.** J Biol Chem. 2000 Mar 3;275(9):6059-62.

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

Xu XL, Yu J, Zhang HY, Sun MH, Gu J, Du X, Shi DR, Wang P, Yang ZH, Zhu JD. **Methylation profile of the promoter CpG islands of 31 genes that may contribute to colorectal carcinogenesis.** World J Gastroenterol. 2004 Dec 1;10(23):3441-54.

Yamazaki Y, Matsunaga Y, Tokunaga Y, Obayashi S, Saito M, Morita T. **Snake venom Vascular Endothelial Growth Factors (VEGF-Fs) exclusively vary their structures and functions among species.** J Biol Chem. 2009 Apr 10;284(15):9885-91.

Yang J, Weinberg RA. **Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis.** Dev Cell 2008;14(6):818-29.

Yang J, Wu HF, Qian LX, Zhang W, Hua LX, Yu ML, Wang Z, Xu ZQ, Sui YG, Wang XR. **Increased expressions of vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF-C and VEGF receptor-3 in prostate cancer tissue are associated with tumor progression.** Asian J Androl. 2006 Mar;8(2):169-75.

Yang J, Mani SA, Donaher JL, Ramaswamy S, Itzykson RA, Come C, Savagner P, Gitelman I, Richardson A, Weinberg RA. **Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis.** Cell. 2004 Jun 25;117(7):927-39.

Yang MH, Hsu DS, Wang HW et al. **Bmi1 is essential in Twist1-induced epithelial-mesenchymal transition.** Nat Cell Biol 2010;12(10):982-92.

Yang MH, Chen CL, Chau GY, Chiou SH, Su CW, Chou TY, Peng WL, Wu JC. **Comprehensive analysis of the independent effect of twist and snail in promoting metastasis of hepatocellular carcinoma.** Hepatology. 2009 Nov;50(5):1464-74.

Yang Z, Zhang X, Gang H, Li X, Li Z, Wang T, Han J, Luo T, Wen F, Wu X. **Up-regulation of gastric cancer cell invasion by Twist is accompanied by N-cadherin and fibronectin expression.** Biochem Biophys Res Commun. 2007 Jul 6;358(3):925-30. Epub 2007 May 15.

Yuen HF, Chan YP, Wong ML, Kwok WK, Chan KK, Lee PY, Srivastava G, Law SY, Wong YC, Wang X, Chan KW. **Upregulation of Twist in oesophageal squamous cell carcinoma is associated with neoplastic transformation and distant metastasis.** J Clin Pathol. 2007 May;60(5):510-4. Epub 2006 Jul 5.

Zeisberg EM, Tarnavski O, Zeisberg M, Dorfman AL, McMullen JR, Gustafsson E, Chandraker A, Yuan X, Pu WT, Roberts AB, Neilson EG, Sayegh MH, Izumo S, Kalluri R. **Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis.** Nat Med. 2007 Aug;13(8):952-61. Epub 2007 Jul 29.

---

## ***Annexe 1***

---

### **Combinations of Bevacizumab and Erlotinib show activity in colorectal cancer independent of *RAS* status**

Paul Mésange, **Anaïs Bouygues**, Nathalie Ferrand, Michèle Sabbah, Alexandre E. Escargueil, Ariel Savina, Benoist Chibaudel, Christophe Tournigand, Thierry André, Aimery de Gramont and Annette K. Larsen

## **Combinations of Bevacizumab and Erlotinib show activity in colorectal cancer independent of *RAS* status**

Paul Mésange<sup>1,2,3</sup>, Anaïs Bouygues<sup>1,2,3</sup>, Nathalie Ferrand<sup>1,2,3</sup>, Michèle Sabbah<sup>1,2,3,4</sup>, Alexandre E. Escargueil<sup>1,2,3</sup>, Ariel Savina<sup>5</sup>, Benoist Chibaudel<sup>1,2,6</sup>, Christophe Tournigand<sup>7,8</sup>, Thierry André<sup>1,2,3,9</sup>, Aimery de Gramont<sup>1,2,6</sup> and Annette K. Larsen<sup>1,2,3,4</sup>

<sup>1</sup>Cancer Biology and Therapeutics, Centre de Recherche Saint-Antoine (CRSA), Paris 75571, France

<sup>2</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U938, Paris 75012, France

<sup>3</sup>Institut Universitaire de Cancérologie (IUC), Université Pierre et Marie Curie (UPMC), Sorbonne Universités, Paris 75005 France

<sup>4</sup>Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Paris 75016, Paris

<sup>5</sup>Roche Scientific Partnerships, Boulogne-Billancourt 92650, France

<sup>6</sup>Department of Medical Oncology, Institut Hospitalier Franco-Britannique, 92300 Levallois-Perret, France

<sup>7</sup>Department of Medical Oncology, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Henri Mondor, 94000 Créteil, France

<sup>8</sup>Université Paris Est, Créteil, France

<sup>9</sup>Department of Medical Oncology, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Saint-Antoine, Paris 75571, France

**Running title:** combined VEGF/EGFR inhibition

**Keywords:** Colorectal cancer, combined VEGF/EGFR inhibition, *RAS* mutation, bevacizumab-resistance

Correspondence to: Dr Annette K. Larsen, Cancer Biology and Therapeutics, Kourilsky Research Building 1<sup>st</sup> floor, Hôpital Saint-Antoine, 184 rue du Faubourg Saint-Antoine, 75571 PARIS Cedex 12 France. E-mail: [annette.larsen@upmc.fr](mailto:annette.larsen@upmc.fr)

## Translational significance

The epidermal growth factor receptor (EGFR) and the vascular endothelial growth factor (VEGF) pathways are validated targets for treatment of patients with metastatic colorectal cancer (mCRC). However, combinations of monoclonal antibodies targeting both pathways show disappointing results. We here show that combinations of bevacizumab and erlotinib, a small molecule EGFR inhibitor, show activity in CRC models independent of *RAS* status and bevacizumab resistance. Bevacizumab exposure was accompanied by intracellular accumulation of active, phosphorylated EGFR in both tumor cells and tumor-associated endothelial cells and could be attenuated by erlotinib. We further demonstrate differential activity of cetuximab and erlotinib on EGFR-mediated functions in CRC cells as a function of *RAS* status revealing fundamental differences between mAbs and TKIs targeting the same pathway. These findings may be applicable for other tumor types as well.

**Purpose:** There is extensive cross-talk between VEGF- and EGFR-pathway signaling in colorectal cancer (CRC). However, combinations of VEGF- and EGFR-targeted monoclonal antibodies (mAbs) show disappointing activity, in particular for patients with mutant *RAS*. Previous results show that tyrosine kinase inhibitors (TKIs) can be active in CRC models resistant to mAbs. This promoted us to examine whether the activity of bevacizumab can be increased by combination with erlotinib.

**Experimental design:** The antitumor activity of bevacizumab, erlotinib and their combination was determined in CRC models with different *RAS* status and bevacizumab sensitivity. EGFR/VEGF pathway activation was characterized by immunohistochemistry, Western blot and ELISA assays. The influence of cetuximab and erlotinib on EGF-mediated migration and the EGFR-EGF ligand feed-back loop was established in CRC cell lines with different *RAS* status.

**Results:** The addition of erlotinib increased bevacizumab activity in all models independent of *RAS* status. Bevacizumab exposure was accompanied by marked EGFR activation in tumor cells as well as in tumor-associated endothelial cells (TECs) and resulted in strong accumulation of intracellular EGFR, which could be attenuated by erlotinib. In cellular models, erlotinib was able to attenuate EGF-mediated functions in all cell lines independent of *RAS* status while cetuximab only showed activity in *RAS* wt cells.

**Conclusions:** The results presented here provide the molecular framework to interpret the findings of the GERCOR DREAM phase III clinical trial of the bevacizumab-erlotinib combination. Differential activity of mAbs and TKIs targeting the same signaling pathway is likely applicable for other tumor types.

## Introduction

The epidermal growth factor receptor (EGFR) and the vascular endothelial growth factor (VEGF) pathways are validated targets for treatment of patients with metastatic colorectal cancer (mCRC). There is extensive cross-talk between these two signaling pathways (1) and combinations of VEGF(R) and EGFR-directed compounds have consistently shown at least additive activity in preclinical models (2). However, the results of clinical trials were disappointing since the addition of EGFR-targeted monoclonal antibodies (mAbs) to bevacizumab plus chemotherapy was no better, in terms of overall survival, than bevacizumab plus chemotherapy alone, even for patients with wild-type *RAS* tumors, and was detrimental, in terms of progression-free survival, for most patients with *KRAS* mutant tumors (3,4).

To determine if these disappointing results were pathway- or agent-related, we compared the antitumor activity of two mAbs with two small molecule tyrosine kinase inhibitors (TKIs) in the same CRC xenograft models (5). The results showed that the combination of the two antibodies was no more active than either agent alone while the combination of the TKIs showed synergistic antitumor activity. Unexpectedly, the TKI combination was also active in CRC models with mutant *RAS* status (5) indicating that mutant *RAS* may not be a limiting factor for EGFR-directed TKIs like it is for the mAbs (6-8). These findings provided the rational for the current study which shows that erlotinib enhances the *in vivo* activity of bevacizumab independent of *RAS* status. We further demonstrate a differential activity of cetuximab and erlotinib on EGFR-mediated functions in CRC cells revealing fundamental differences between mAbs and TKIs targeting the same pathway.

## **Materials and Methods**

### **Drugs**

Bevacizumab (Avastin) was provided by Roche, cetuximab was from Merck while erlotinib (Tarceva) was purchased from LC Laboratories (Woburn, MA).

### **Tumor cells**

CRC cells were maintained in cell culture as described previously (9). SW48, LS174T and DLD-1 CRC cells were a kind gift from Richard Hamelin (Saint-Antoine Research Center, Paris, France) while SW480 and LIM1215 cells were purchased from American Type Culture Collection (Rockville, MD). HT-29, CoLo205 and SW620 cells were kindly provided by Richard Camalier (National Cancer Institute, Bethesda, MD) while HCT-116 cells were a generous gift from Bert Vogelstein (John Hopkins, Baltimore, MD). Upon defreezing, cell lines were monitored for mycoplasma contamination and characterized by next generation sequencing of 50 cancer-related genes using the Ion AmpliSeq Cancer Hotspot Panel v2 (ThermoFisher). Cells were replaced after 3 month in culture.

### **In vivo studies**

The antitumor effects of bevacizumab, erlotinib and their combination were evaluated in athymic mice (female NMRI-Foxn1n, 6 weeks old) from Taconic (Skensved, Danmark) bearing SW48, HT-29 or SW620 xenografts. Two to five million cells were injected into the right flank, and the treatments were started when the tumors were palpable. Animals were weighed daily and the tumor size was determined three times per week (10). Tumor volumes ( $\text{mm}^3$ ) were calculated according to formula:  $[(\text{length} \times \text{width}^2)/2]$ . Boxplot analysis was carried out using the



graphpad prism 6.04 software (Graphpad, La Jolla, CA). Treated/Control (T/C) values were calculated as follows: average tumor volume of treated animals/average tumor volume of control animals x 100. Animals were treated according to institutional guidelines and the protocol was approved by the local ethics committee for animal experimentation.

## **Antibodies**

The following antibodies were used for immunohistochemistry (IHC) analysis: anti-CD31 (# 550274, BD Bioscience, le Pont de Claix, France) to determine the vascular density, anti-VEGF-A (sc-152, Santa Cruz Biotechnology, CliniSciences, Nanterre, France), anti-phospho-VEGFR1 (07-758, Millipore, Darmstadt, Germany) that recognizes phospho-Tyr 1213, anti-phospho-VEGFR2 (# 2478, Cell Signaling, Ozyme, Montigny-le-bretonneux, France) that recognizes phospho-Tyr 1273, anti-phospho-EGFR (sc-12351, Santa Cruz Biotechnology) that recognizes phospho-Tyr 1173, anti-EGFR (sc-03, Santa Cruz Biotechnology), and anti-amphiregulin (AF262, R&D System Minneapolis, MN). The relevant Cy3-conjugated secondary antibodies were obtained from Jackson ImmunoResearch (Montlucon, France).

The following antibodies were used for Western blot analysis: anti-phospho-EGFR antibody (#3777, Cell signaling) that recognizes Tyr1068 EGFR, anti-EGFR antibody (sc-03, Santa Cruz Biotechnology) and anti-actin-HRP antibody (sc-1615, Santa Cruz Biotechnology) followed by incubation with the appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (Cell Signaling).

## **Immunohistochemistry**

Biomarker analysis was carried out with tumors collected after 4 weeks of treatment and processed for immunohistochemistry (IHC)

analysis. All images were captured by a fluorescence microscope and the fluorescence intensities were determined by the MetaMorph software (Universal Imaging Corporation, New York) for quantitative image analysis. When indicated, tumors were counterstained by 4',6-diamidino-2-phenylindole to reveal the nuclei of individual cells. For the quantitative analysis of the signal intensity, the data represents the average fluorescence intensity of treated tumors compared to the treatment intensity of control tumors and is the average of 6 fields/tumor for at least 3 different tumors. Blood vessel density is expressed as the CD31-positive area, in % of total, and represents the averages of at least 6 fields/tumor for at least 3 different tumors.

For the determination of pEGFR expression by the TECs, double labeling was carried out for pEGFR and CD31 and the degree of co-localization was determined by semi-quantitative analysis as illustrated in Figure 4. Only blood vessels where the entire rim could be assessed were included in the analysis with at least 12 blood vessels per treatment.

### **ELISA assay and Western blot of xenograft samples**

Tumor tissues were collected from untreated, frozen tumors (three tumors per treatment) and protein extracts were prepared in RIPA buffer according to the manufacturer's instructions. VEGF levels were determined by Quantikine ELISA (# DVE00 and MMV00, R&D System) for human, tumor-derived VEGF and for murine, stroma-derived VEGF, respectively. Amphiregulin levels were determined by Quantikine ELISA (R&D System # DAR00, human AREG). VEGFR1 and VEGFR2 levels were determined by DuoSet ELISA (DY321B and DY1766, R&D System). The values represent the average of 3 independent experiments, each done in duplicate.

For Western blot, equal amounts of proteins (100 µg/lane) were loaded into SDS-PAGE gels, transferred onto nitrocellulose membranes and blotted with antibodies directed against phosphorylated and total EGFR. Protein expression was quantified by densitometric analysis of the immunoblots using Image Lab software (Biorad) after normalization with  $\beta$ -actin.

### **ELISA assays of conditioned media.**

Cells were seeded and allowed to attach for 24 hrs followed by 72 hrs incubation in 5% FCS in the absence or presence of cetuximab (1 µg/mL) or erlotinib (3 µM) as described (11). Conditioned media was collected and concentrated using Amicon ultracentrifugal filter units. The levels of secreted TGF- $\alpha$  and amphiregulin were determined by Quantikine ELISA (R&D System # DTGA00 for TGF- $\alpha$  and # DAR00 for amphiregulin) according to the manufacturer's instructions. The values represent the average of 3 independent experiments, each done in duplicate.

### **Tumor cell migration**

Cell migration was assessed by the trans-well assay (Boyden chamber, Dutscher, Issy-les-moulineaux, France) according to the manufacturer's instructions. Briefly, 50 000 to 100 000 cells in serum-free media with or without erlotinib or cetuximab were plated in the upper chamber on membranes with a pore size of 8 µm while the lower chamber contained culture media with EGF (20 ng/ml) as chemoattractant. After 6 hr, remaining cells were removed from the top-side of the inserts whereas migrating cells on the bottom of the inserts were stained with Diff-Quik (ThermoFischer Scientific, Waltham, MA) and all migrating cells were counted. Results are expressed as means  $\pm$

standard error of the means (SEM) and represent triplicate samples from at least two independent experiments.

## **Statistical analysis**

ANOVA was performed to determine the significance of observed differences between groups using the tool pack from Excel (Microsoft). Post hoc comparisons was made using Student's paired *t*-test using GraphPad Prism (GraphPad Software). Differences between two groups are presented as the mean  $\pm$  SEM or mean  $\pm$  SD as noted in the figure legends. All tests were two-sided and *p* values  $<0.05$  were considered statistically significant.

## **Results**

### **Erlotinib increases the antitumor activity of bevacizumab**

Three different CRC xenograft models were used including SW48 (*RAS* wt, bevacizumab sensitive), HT-29 (*RAS* wt, bevacizumab resistant) and SW620 (*RAS* mutant and bevacizumab sensitive) (10). The antitumor activities of bevacizumab (1 mg/kg) and erlotinib were comparable for SW48 and SW620 xenografts with T/C values (average tumor volume of treated animals/average tumor volume of control animals  $\times$  100) of 55 and 54 for bevacizumab and 65 and 74 for erlotinib, respectively (Figure 1). Combined treatment with bevacizumab and erlotinib increased the antitumor activity to T/C values of 33 and 39, respectively, which is significantly different from bevacizumab alone ( $p < 0.01$ ). To confirm the activity of the bevacizumab + erlotinib combination toward the *RAS* mutant SW620 tumors, the experiment was repeated with a standard dose of bevacizumab (5 mg/kg). Under these conditions, the T/C value was 27 for bevacizumab alone and 16 for the combination ( $p < 0.001$ ) (Supplementary figure S1, upper panels).

Bevacizumab exposure (5 mg/kg) was accompanied by modest tumor growth inhibition for HT-29 xenografts (T/C of 68) whereas erlotinib treatment was associated with unexpected strong antitumor activity (T/C of 36). The combination of the two drugs gave a T/C value of 26, which is significantly ( $p < 0.001$ ) more than what was observed for bevacizumab alone (Figure 1), whereas the difference between erlotinib and erlotinib + bevacizumab did not reach significance ( $p = 0.07$ ).

### **Influence of BRAF status**

The potent activity of erlotinib toward HT-29 xenografts was unexpected since HT-29 tumors shows limited sensitivity to the EGFR-targeted antibody cetuximab (5). HT-29 cells express the *BRAF* V600E mutation (<http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>). To explore if the expression of mutant *BRAF* was associated with erlotinib sensitivity, we selected a different *BRAF* V600E mutant cell line, CoLo205. However, the response of CoLo205 tumors to bevacizumab, erlotinib, and their combination (T/C values of 53, 64 and 32, respectively) was comparable with SW48 and SW620 rather than with HT-29 (Supplementary figure S1, lower panels). Therefore, *BRAF* status as such cannot explain the unexpected erlotinib sensitivity of HT-29 xenografts.

### **Angiogenic signaling**

Bevacizumab has preferential activity for human VEGF. To estimate the relative contribution of human tumor-derived and murine stromal-derived VEGF within the tumor microenvironment, tissue extracts were prepared from untreated SW48, HT-29 and SW620 tumors and the concentration of murine and human VEGF was determined by species-specific ELISA analysis (data not shown). The results show that human

VEGF represents more than 95% of the total VEGF in the tumor environment in agreement with previous findings (10, 12).

The microvascular density of SW48, HT-29 and SW620 xenografts was compared by immunohistochemistry with a CD31-directed antibody followed by quantitative image analysis. The results (Figure 2, upper panel left) indicate that bevacizumab reduced the microvascular density by ~ 65% in the bevacizumab-sensitive SW48 and SW620 xenografts compared to only ~ 30% in the bevacizumab-resistant HT-29 xenografts. In comparison, erlotinib treatment was accompanied by ~ 50% reduction of the vascular density in all 3 xenograft models. Interestingly, the addition of erlotinib to bevacizumab strongly diminished the microvascular density of HT-29 xenografts (from 30% to 64% of the vehicle control) suggesting that EGFR-signaling contributes to the bevacizumab resistance of this tumor model. The combination of bevacizumab + erlotinib was also significantly more effective than bevacizumab alone for the SW48 and SW620 tumor models, although the effect was less pronounced than for HT-29.

Bevacizumab exposure was accompanied by ~ 40% increased expression of tissue-associated VEGF that diminished significantly ( $p < 0.01$ ) when erlotinib was added to bevacizumab (Figure 2, upper panel right). Most CRC cells and tumors express functional VEGFR1/Flt-1 that promotes cellular survival under environmental stress (13). Bevacizumab exposure was accompanied by increased levels of active phospho-VEGFR1 for all xenograft models which was attenuated ( $p < 0.001$ ) by the addition of erlotinib (Figure 2, middle right panel and lower panels). This was most marked for the HT-29 xenografts where the levels of phospho-VEGFR1 were 171% in the presence of bevacizumab alone and 71% in the presence of bevacizumab + erlotinib, compared to untreated vehicle controls. The differences in VEGFR1 phosphorylation

were not linked to altered protein levels, as determined by ELISA of total VEGFR1 in tumor extracts (Supplemental figure S2). In bevacizumab-treated tumors, the active, autophosphorylated form of pVEGFR1 was mostly localized inside the cells as indicated by a prominent cytoplasmic signal (Figure 2, lower panels, indicated with a white arrow).

In addition to VEGFR1, CRC xenografts may express low levels of VEGFR2/Flk-1. Bevacizumab exposure was accompanied by up to 2-fold increase in the levels of phospho-VEGFR2 that was significantly attenuated in the presence of erlotinib, with the exception of the SW620 model, where the modest decrease did not reach significance (Figure 2, middle panel right). It is noticeable that the levels of VEGFR1 and VEGFR2 protein are very different, with about 20-fold less VEGFR2, compared with VEGFR1, in SW48 and SW620 tumors and almost 80-fold less VEGFR2, compared to VEGFR1, in HT-29 xenografts (Supplemental figure S2). These differences may explain the current controversy concerning the expression of VEGFR2 by CRC cells (13). Taken together, our findings show that bevacizumab activates autocrine VEGF-signaling in all three xenograft models which can be attenuated in by erlotinib.

### **EGFR signaling**

Next, the levels of total and phosphorylated EGFR were determined (Figure 3, upper panels). The results show that erlotinib exposure was accompanied by decreased levels of the active, autophosphorylated form of EGFR which was most pronounced for SW48 (66% inhibition, compared to the vehicle control) followed by SW620 (50% inhibition) and HT-29 xenografts (35% inhibition). Unexpectedly, bevacizumab treatment was accompanied by strong EGFR activation ranging from ~ 140% for the bevacizumab-sensitive SW48 and SW620 xenografts to

more than 200% for the bevacizumab-resistant HT-29 xenografts. The addition of erlotinib to bevacizumab was accompanied by a highly significant ( $p < 0.001$ ) decrease in phospho-EGFR levels in all models shown by quantitative immunohistochemistry as well as by Western blot analysis (Figure 3 upper and middle panels). In comparison, bevacizumab had no detectable influence on total EGFR levels whereas erlotinib exposure, alone or in combination, was accompanied by a modest increase of total EGFR that never reached significance (Figure 3 upper and middle panels).

As observed for pVEGFR1, bevacizumab treatment was accompanied by a prominent cytoplasmic signal of pEGFR (Figure 3, lower panels, indicated with a white arrow).

### **EGFR signaling in endothelial cells**

Tumor-associated endothelial cells (TECs) frequently express functional EGFR (14,15). To characterize the expression of active EGFR on the TECs, a semi-quantitative approach was developed as illustrated (Figure 4, upper panel, left). Tumors were double-labeled for phospho-EGFR and CD31 and the degree of colocalization was determined as detailed in the figure legend. The results show that bevacizumab treatment was accompanied by a strong increase in TEC-associated phospho-EGFR while phospho-EGFR was attenuated following treatment with erlotinib. Importantly, the addition of erlotinib to bevacizumab was associated with a highly significant ( $p < 0.001$ ) decrease in TEC-associated phospho-EGFR, compared to bevacizumab alone, for all three xenograft models.

The EGFR ligands amphiregulin (AREG) and transforming growth factor- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ) are known to form positive feed-back loops with activated EGFR (16-18). Amphiregulin is of particular interest, since it is



expressed at high levels in CRC and has potential predictive value for the response to EGFR-targeted agents (19,20). Tumor extracts were prepared and the ligand expression was determined by ELISA analysis. A modest increase in amphiregulin expression was observed in the bevacizumab-treated tumors while erlotinib treatment resulted in a ~ 50% decrease. Importantly, amphiregulin expression was significantly decreased in all bevacizumab + erlotinib groups, compared to bevacizumab alone. For TGF- $\alpha$ , the levels were too close to the detection limit to give reproducible results.

It has been reported that amphiregulin promotes endothelial tube formation *in vitro* suggesting a direct role for amphiregulin in tumor angiogenesis (21). To determine if tumor-derived amphiregulin co-localize with the TECs, tumors were double-labeled for human amphiregulin and CD31. Unexpectedly, the results (Figure 4, lower panel) show prominent co-localization of amphiregulin and the TECs (indicated in yellow) compared to the more faint red labeling of amphiregulin in the tumor cells, coherent with a close *in vivo* association between the TECs and tumor-derived amphiregulin.

### **EGFR-signaling in *RAS* mutant cells**

EGFR activation is accompanied by a positive feed-back loop with some of its ligands including TGF- $\alpha$  and amphiregulin (16-18). Intriguingly, a recent study reports that EGFR-directed antibodies are unable to downregulate amphiregulin and TGF- $\alpha$  in *RAS* mutant CRC cells, which could, at least in part, explain the lack of activity of the mAbs toward such cells (11). The activity of erlotinib and cetuximab toward different *RAS* mutant CRC cell lines was compared (Figure 5). The results show that cetuximab exposure increased TGF- $\alpha$  expression up to 4-fold in all cellular models, but had no significant

influence on amphiregulin. In clear contrast, erlotinib decreased both TGF- $\alpha$  and amphiregulin secretion, with highly significant ( $p < 0.001$ ) differences between cetuximab and erlotinib in all cases (Figure 5 upper panels).

EGFR activation promotes tumor cell migration. Four CRC cell lines with good migratory capacity were selected including LIM1215 (*RAS* wt), HCT-116, LS174T and SW480 (all *RAS* mutant). EGF strongly stimulated the migration of all cell lines which could be attenuated by erlotinib (Figure 5, middle and lower panels). In clear contrast, cetuximab was only able to attenuate migration of the *RAS* wt LIM1215 cells, without any detectable influence on the migration of the *RAS* mutant cells. Importantly, the viability at the end of the incubation period was comparable for all groups (Supplemental figure S3).

## Discussion

We here report that erlotinib increases the activity of bevacizumab in CRC models independent of *RAS* status and bevacizumab resistance. We further document differential activity of cetuximab and erlotinib on EGFR-mediated functions in CRC cells as a function of *RAS* status revealing fundamental differences between mAbs and TKIs targeting the same pathway. These findings inspired the DREAM Phase III clinical trial and provide the mechanistic framework to interpret the clinical findings. Specifically, the DREAM study reported that administration of bevacizumab plus erlotinib as maintenance therapy to patients with mCRC resulted in a three months increase in overall survival compared to bevacizumab alone, independent of *RAS* status (23).

Besides *RAS* status, there is increasing interest in the impact of primary tumor location. Current evidence suggest that metastatic colorectal cancer (mCRC) arising from different sides of the colon (left

versus right) have different clinical outcomes, which may, at least in part, be a reflection of the different embryonic origin of the normal tissue forming the left and right sides of the colon. In mCRC, patients with right-sided tumors have generally worse prognosis than those with left-sided tumors (24,25). Furthermore, retrospective analysis of pooled clinical trials suggests that EGFR-targeted antibodies may be more active toward left-sided *RAS* wt tumors compared with right-sided *RAS* wt tumors ((25-27). Interestingly, it has been reported that VEGF-targeting may also differ between right- and left-sided tumors. In particular, bevacizumab may only provide a survival advantage for left-sided and rectal tumors (28, 29), suggesting that right- and left-sided tumors may respond differently to both EGFR-and VEGF-targeted anticancer agents. However, a large prospective trial is still needed to confirm these data.

Unfortunately, little is known about the origin of the vast majority of CRC cell lines including the ones used here. However, based on putative site-specific markers, it has been suggested that HT-29 is likely derived from a right-sided tumor while SW620 is likely derived from a left-sided tumor (30). Although the origin of these cell lines can never be determined with full certainty, it is tempting to speculate that erlotinib, alone or in combination with bevacizumab, may prove particularly interesting for treatment of patients with right-sided mCRC, a patient subgroup in need of novel, active agents.

Usually, EGFR inhibition is believed to principally influence tumor cells while VEGF-targeting is acting on endothelial cells. The results presented here provide evidence for a more complex model. Pruning of the tumor-associated microvasculature is accompanied by tumor cell hypoxia, activation of tumor-associated VEGF signaling as well as EGFR activation. In addition, vascular pruning interfered with tumor cell receptor recycling as evidenced by a prominent cytoplasmic signal for

both pVEGFR1 and pEGFR in agreement with an influence of the oxygen-sensing pathway on endocytosis (31). Interestingly, bevacizumab exposure was also accompanied by EGFR signaling activation and accumulation of tumor-derived amphiregulin in the TECs. Taken together, these results suggest that both tumor cells and TECs are targeted by EGFR blockage.

The finding that an EGFR-targeted TKI may have different activity compared to EGFR-targeted antibodies *in vitro* as *in vivo*, is initially surprising. However, it should be noted that the mAbs and the TKIs owe their activity to different mechanisms. Binding of the mAbs to EGFR is followed by endocytosis and lysosomal degradation, thereby decreasing receptor density on the cell surface (32). In the case of the TKIs, it is the catalytic activity of EGFR that is inhibited without an immediate effect on EGFR protein levels. Importantly, the activity of the TKIs is not restricted to surface-associated EGFR but includes additional pools of EGFR, like the active EGFR contained in endosomes following receptor internalization. Furthermore, recent results suggest that the interaction between EGFR and Ras proteins ceases within minutes after EGFR activation, with EGFR accumulating in the endosomes while Ras remain associated with the plasma membrane, thereby providing a physical separation between the two molecules and rapid signal downregulation (33).

Traditionally, EGFR signaling has been associated with canonical cellular signaling pathways like Ras/MAPK, PI3K/Akt, Phospholipase C/PKC, STAT and Src pathways as depicted in Figure 6. However, several novel EGFR signaling pathways have been described recently including the binding of EGFR to and phosphorylation of the tyrosine kinase Lyn, which then phosphorylate MCM7, a licensing factor critical for DNA synthesis (34), beclin1 (BCN-1), a crucial mediator of autophagy

(35) and argonaute 2 (AGO2) a modulator of microRNA processing (36). Importantly, the phosphorylation of AGO2 and Beclin1 is mediated by catalytically active EGFR present on intracellular vesicles after internalization, but before lysosomal degradation (35,36), thereby representing a subfraction of EGFR that can only be inhibited by EGFR-directed small molecules, but not by EGFR-directed mAbs.

In conclusion, our study provides strong evidence that mAbs and TKIs target different elements of the EGFR signaling pathway, both as single agents and in combination with VEGF-targeted therapies. These findings provide a rationale for novel therapeutic strategies for patient subgroups that are unlikely to benefit from EGFR-targeted antibodies. We further suggest that differential activity of mAbs and TKIs targeting the same signaling pathway is likely applicable for other tumor types.

## **Funding**

This work was financed in part by research funding to A.K.L. from Roche. Paul Mésange and Anaïs Bouygues are generously supported by a Mouna Nasrallah fellowship.

## **Notes**

The sponsors had no role in the study design, data collection and analysis, interpretation of the results, the preparation of the manuscript, or the decision to submit the manuscript for publication.

AKL has research funding from Roche, Sanofi-Aventis, Ipsen and Boehringer Ingelheim. AdG has an unpaid consultancy role for Roche and Sanofi-Aventis. BC has honoraria from Roche, Bayer, Lilly and Sanofi-Aventis. AS is employed by Roche. TA has a consultancy role for Roche. CT has a consultancy role for Roche, Merck, Amgen, Bayer and

Boehringer Ingelheim. PM, AB, NF, MS and AEE have no conflict of interest to declare.

AKL and AdG developed the concept. AKL, AdG, MS, AEE, AS, CT and TA provided suggestions and technical advice. AKL supervised the study. PM, AB and NF performed the experiments. PM, AB, NF and AKL did the data analysis. PM and AB did the statistical analysis. AKL wrote the manuscript. AdG, PM, AB, NF, MS, AEE, BC, TA, CT and AS reviewed the manuscript. All authors approved the final version of the manuscript.

## **Acknowledgements**

We thank Mériam Ayadi, Olivier Bernadini, Karima El Ouadrani, Virginie Megalophonos, Delphine Muller, Amélie Petitprez and Virginie Poindessous for help with the animal experiments. We appreciate the contribution of Tatiana Ledent from the animal facilities at Saint-Antoine Research Center and Sylvie Dumont and Fatiha Merabtene from the pathology platform at Hôpital Saint-Antoine.

## References

1. Larsen AK, Ouaret D, El Ouadrani K, Petitprez A. Targeting EGFR and VEGF(R) pathway cross-talk in tumor survival and angiogenesis. *Pharmacol Ther* 2011;131:80-90.
2. Tabernero J. The role of VEGF and EGFR inhibition: implications for combining anti-VEGF and anti-EGFR agents. *Mol Cancer Res* 2007;5:203-20.
3. Tol J, Koopman M, Cats A, Rodenburg CJ, Creemers GJ, Schrama JG, et al. Chemotherapy, bevacizumab, and cetuximab in metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2009;360:563-72.
4. Hecht JR, Mitchell E, Chidiac T, Scroggin C, Hagenstad C, Spiegel D, et al. A randomized phase IIIB trial of chemotherapy, bevacizumab, and panitumumab compared with chemotherapy and bevacizumab alone for metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2009;27:672-80.
5. Poindessous V, Ouaret D, El Ouadrani K, Battistella A, Mégaloophonos VF, Kamsu-Kom N, et al. EGFR- and VEGF(R)-targeted small molecules show synergistic activity in colorectal cancer models refractory to combinations of monoclonal antibodies. *Clin Cancer Res* 2011;17:6522-30.
6. Lièvre A, Bachet JB, Boige V, Cayre A, Le Corre D, Buc E, et al. KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab. *J Clin Oncol* 2008;26:374-9.

7. Douillard JY, Oliner KS, Siena S, Tabernero J, Burkes R, Barugel M, et al. Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *N Engl J Med* 2013;369:1023-34.
8. Atreya CE, Corcoran RB, Kopetz S. Expanded RAS: refining the patient population. *J Clin Oncol* 2015;33:682-5.
9. Ouaret D, Larsen AK. Protein kinase C  $\beta$  inhibition by enzastaurin leads to mitotic missegregation and preferential cytotoxicity toward colorectal cancer cells with chromosomal instability (CIN). *Cell Cycle* 2014;13:2697-706.
10. Mésange P, Poindessous V, Sabbah M, Escargueil AE, de Gramont A, Larsen AK. Intrinsic bevacizumab resistance is associated with prolonged activation of autocrine VEGF signaling and hypoxia tolerance in colorectal cancer cells and can be overcome by nintedanib, a small molecule angiokinase inhibitor. *Oncotarget* 2014;5:4709-21.
11. Hobor S, Van Emburgh BO, Crowley E, Misale S, Di Nicolantonio F, Bardelli A. TGF $\alpha$  and amphiregulin paracrine network promotes resistance to EGFR blockade in colorectal cancer cells. *Clin Cancer Res* 2014;20:6429-38.
12. Chiron M, Bagley RG, Pollard J, Mankoo PK, Henry C, Vincent L, et al. Differential antitumor activity of aflibercept and bevacizumab in patient-derived xenograft models of colorectal cancer. *Mol Cancer Ther* 2014;13:1636-44.



13. Larsen AK, de Gramont A, Bouygues A, Ayadi M, Measange P. Functions and clinical implications of autocrine VEGF signaling in colorectal cancer. *Curr Colorectal Cancer Rep* 2013;9:270-27.
14. Yokoi K, Thaker PH, Yazici S, Rebhun RR, Nam DH, He J, et al. Dual inhibition of epidermal growth factor receptor and vascular endothelial growth factor receptor phosphorylation by AEE788 reduces growth and metastasis of human colon carcinoma in an orthotopic nude mouse model. *Cancer Res* 2005;65:3716-25.
15. Amin DN, Hida K, Bielenberg DR, Klagsbrun M. Tumor endothelial cells express epidermal growth factor receptor (EGFR) but not ErbB3 and are responsive to EGF and to EGFR kinase inhibitors. *Cancer Res* 2006;66:2173-80.
16. Coffey RJ Jr, Derynck R, Wilcox JN, Bringman TS, Goustin AS, Moses HL, et al. Production and auto-induction of transforming growth factor-alpha in human keratinocytes. *Nature* 1987;328:817-20.
17. Gunaratnam L, Morley M, Franovic A, de Paulsen N, Mekhail K, Parolin DA, et al. Hypoxia inducible factor activates the transforming growth factor-alpha/epidermal growth factor receptor growth stimulatory pathway in VHL(-/-) renal cell carcinoma cells. *J Biol Chem* 2003;278:44966-74.
18. Panupinthu N, Yu S, Zhang D, Zhang F, Gagea M, Lu Y, et al. Self-reinforcing loop of amphiregulin and Y-box binding protein-1

contributes to poor outcomes in ovarian cancer. *Oncogene* 2014;33:2846-56.

19. Khambata-Ford S, Garrett CR, Meropol NJ, Basik M, Harbison CT, Wu S, et al. Expression of epiregulin and amphiregulin and K-ras mutation status predict disease control in metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab. *J Clin Oncol* 2007;25:3230-7.
20. Salazar R, Capellà G, Tabernero J. Paracrine network: another step in the complexity of resistance to EGFR blockade? *Clin Cancer Res* 2014;20:6227-9.
21. Bordoli MR, Stiehl DP, Borsig L, Kristiansen G, Hausladen S, Schraml P, et al. Prolyl-4-hydroxylase PHD2- and hypoxia-inducible factor 2-dependent regulation of amphiregulin contributes to breast tumorigenesis. *Oncogene* 2011;30:548-60.
22. Nilsson MB, Zage PE, Zeng L, Xu L, Cascone T, Wu HK, et al. Multiple receptor tyrosine kinases regulate HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  in normoxia and hypoxia in neuroblastoma: implications for antiangiogenic mechanisms of multikinase inhibitors. *Oncogene* 2010; 29:2938-49.
23. Tournigand C, Chibaudel B, Samson B, Scheithauer W, Vernerey D, Mésange P, et al. Bevacizumab with or without erlotinib as maintenance therapy in patients with metastatic colorectal cancer (GERCOR DREAM; OPTIMOX3): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2015;16:1493-1505.

24. Loupakis F, Yang D, Yau L, Feng S, Cremolini C, Zhang W, et al. Primary tumor location as a prognostic factor in metastatic colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2015; 24;107(3).
25. Arnold D, Lueza B, Douillard JY, Peeters M, Lenz HJ, Venook A, et al.. Prognostic and predictive value of primary tumour side in patients with RAS wild-type metastatic colorectal cancer treated with chemotherapy and EGFR directed antibodies in six randomised trials. *Ann Oncol* 2017;28:1713-29.
26. Holch JW, Ricard I, Stintzing S, Modest DP, Heinemann V. The relevance of primary tumour location in patients with metastatic colorectal cancer: A meta-analysis of first-line clinical trials. *Eur J Cancer.* 2017;70:87-98.
27. Cao DD, Xu HL, Xu XM, Ge W. The impact of primary tumor location on efficacy of cetuximab in metastatic colorectal cancer patients with different Kras status: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget* 2017;8:53631-41.
28. Boisen MK, Johansen JS, Dehlendorff C, Larsen JS, Osterlind K, Hansen J, et al.. Primary tumor location and bevacizumab effectiveness in patients with metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol* 2013; 24:2554-9.
29. He WZ, Liao FX, Jiang C, Kong PF, Yin CX, Yang Q, et al. Primary Tumor Location as a Predictive Factor for First-line Bevacizumab

- Effectiveness in Metastatic Colorectal Cancer Patients. *J Cancer* 2017;8:388-94.
30. Bauer KM, Hummon AB, Buechler S. Right-side and left-side colon cancer follow different pathways to relapse. *Mol Carcinog* 2012;51:411-21.
  31. Wang Y, Roche O, Yan MS, Finak G, Evans AJ, Metcalf JL, et al. Regulation of endocytosis via the oxygen-sensing pathway. *Nat Med* 2009;15:319-24.
  32. Spangler JB, Neil JR, Abramovitch S, Yarden Y, White FM, Lauffenburger DA, et al. Combination antibody treatment down-regulates epidermal growth factor receptor by inhibiting endosomal recycling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107:13252-7.
  33. Pinilla-Macua I, Watkins SC, Sorkin A. Endocytosis separates EGF receptors from endogenous fluorescently labeled HRas and diminishes receptor signaling to MAP kinases in endosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2016;113:2122-7.
  34. Huang TH, Huo L, Wang YN, Xia W, Wei Y, Chang SS, et al. Epidermal growth factor receptor potentiates MCM7-mediated DNA replication through tyrosine phosphorylation of Lyn kinase in human cancers. *Cancer Cell* 2013;23:796-810.
  35. Wei Y, Zou Z, Becker N, Anderson M, Sumpter R, Xiao G, et al. EGFR-mediated Beclin 1 phosphorylation in autophagy suppression,

tumor progression, and tumor chemoresistance. Cell 2013;154:1269-84.

36. Shen J, Xia W, Khotskaya YB, Huo L, Nakanishi K, Lim SO, et al. EGFR modulates microRNA maturation in response to hypoxia through phosphorylation of AGO2. Nature 2013;497:383-7.

### Figure and Table legends

**Figure 1.** Influence of bevacizumab, erlotinib and their combination on tumor growth of CRC xenografts. *Left*, nude mice with SW48, HT-29 or SW620 CRC xenografts were dosed with vehicle (striped squares), bevacizumab (1 mg/kg *i.p.* every 3 days for SW48 and SW620 or 5 mg/kg *i.p.* every 3 days for HT-29) (black circles), erlotinib (75 mg/kg *p.o.* once daily) (white circles) or bevacizumab and erlotinib together (light grey circles). The curves represent the average tumor growth of at least 7 animals per group. *Right*, box and whisker plots of tumor volumes in mice with SW48, HT-29 or SW620 CRC xenografts after 4 weeks treatment with vehicle, bevacizumab (beva), erlotinib (erlo) or their combination (beva + erlo). Lines, medians; boxes, 25<sup>th</sup> to 75<sup>th</sup> percentile interquartile ranges; whiskers, the highest and lowest value for a given treatment. The brackets indicate the difference between the bevacizumab groups and the corresponding bevacizumab + erlotinib group P values were calculated using Student's paired *t*-test. \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .

**Figure 2.** Influence of bevacizumab, erlotinib and their combination on tumor angiogenesis. Animals with SW48 (grey columns), HT-29

(hatched columns) or SW620 (black columns) human CRC xenografts were treated with bevacizumab (beva), erlotinib (erlo) or their combination (beva + erlo) for 4 weeks as described in the legend to Figure 1, followed by immunohistochemistry and quantitative image analysis. The photos illustrate the typical staining patterns for tumors derived from animals treated with bevacizumab (B) or with bevacizumab + erlotinib (B+E). For the microvascular density, CD31-positive endothelial blood vessels are outlined in white while the bar diagram indicate the CD31-positive area, as % of total, and represent the averages of at least 6 fields/tumor for at least 3 different tumors. For the quantitative analysis of VEGF, phospho-VEGFR1 and phospho-VEGFR2, the data represent the average fluorescence intensities of treated tumors compared to the treatment intensity of control tumors and are the averages of 6 fields/tumor for at least 3 different tumors. Bars indicate the mean  $\pm$  SEM. The brackets indicate the difference between the bevacizumab groups and the corresponding bevacizumab + erlotinib groups. P values were calculated using Student's paired *t*-test. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ . Bottom panels, cellular distribution of phospho-VEGFR1 (pVEGFR1) after treatment with bevacizumab, erlotinib and their combination in HT-29 tumors after 4 weeks treatment as described in the legend to Figure 1. The presence of phospho-VEGFR1 was determined by immunohistochemistry and is indicated in red, whereas the nuclei appear in blue. The white arrow indicates the prominent intracellular accumulation of phosphorylated VEGFR1.

**Figure 3.** Influence of bevacizumab, erlotinib and their combination on EGFR. Animals with SW48 (grey columns), HT-29 (hatched columns) or SW620 (black columns) human CRC xenografts were treated with bevacizumab (beva), erlotinib (erlo) or their combination (beva + erlo) for

4 weeks as described in the legend to Figure 1. Top panels, the expression of phospho-EGFR and total EGFR was determined by immunohistochemistry followed by quantitative image analysis. The photos illustrate the typical staining patterns for tumors derived from animals treated with bevacizumab (B) or with bevacizumab + erlotinib (B+E). The bars indicate the mean  $\pm$  SEM and represent the average fluorescence intensities of treated tumors compared to the treatment intensity of control tumors and are the averages of 6 fields/tumor for at least 3 different tumors. The brackets indicate the difference between the bevacizumab groups and the corresponding bevacizumab + erlotinib groups. P-values were calculated using Student's paired *t*-test. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ . Middle panel, Western blot analysis of pEGFR and EGFR expression in the tumors described above. The columns indicate the pEGFR signal (% of control) after normalization with beta-actin that was used as loading control. Data represent typical results from 3 different experiments. Bottom panels, cellular distribution of phosphorylated EGFR (pEGFR) after treatment with bevacizumab, erlotinib and their combination in HT-29 tumors after 4 weeks treatment as described in the legend to Figure 1. The presence of phospho-EGFR was determined by immunohistochemistry and is indicated in red, whereas the nuclei appear in blue. The white arrow indicates the prominent intracellular accumulation of phosphorylated EGFR.

**Figure 4.** EGFR-signaling in tumor-associated endothelial cells (TECs).

Top, to identify phosphorylated EGFR on the tumor-associated endothelial cells, double labeling was carried out for phospho-EGFR and CD31 and the degree of colocalization was determined by semi-quantitative analysis as illustrated (top, left). Only blood vessels where

the entire rim could be assessed were included in the analysis, with at least 12 blood vessels per group. For each blood vessel, no colocalization was characterized by a uniform green color (indicated with an open white arrow) and given a value of 0, some colocalization was characterized by a mixture of yellow and green cells and given a value of 1 and strong colocalization (indicated by a bold white arrow) was characterized by predominance of yellow cells and given a value of 2 thereby giving an estimate of the average levels of co-localization for each group. The results of the semi-quantitative analysis are indicated in the top (right). P values were calculated using Student's paired *t*-test. The brackets indicate the difference between the bevacizumab groups and the corresponding bevacizumab + erlotinib groups. P-values were calculated using Student's paired *t*-test.  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ . Bottom, to identify human, tumor-derived amphiregulin on the tumor-associated endothelial cells, double labeling was carried out for CD31 (in green) and human amphiregulin (AREG in red) to visualize the degree of colocalization (Merge, in yellow). The brackets indicate the difference between the bevacizumab groups and the corresponding bevacizumab + erlotinib groups. P-values were calculated using Student's paired *t*-test. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .

**Figure 5.** Influence of erlotinib and cetuximab on EGFR signaling in CRC cells. Upper panels, secretion of TGF- $\alpha$  (left) or amphiregulin (right) in HCT-116, DLD-1, SW620 and SW480 cells after 72 hrs incubation in the absence (hatched columns) or presence of erlotinib (3  $\mu$ M, grey columns) or cetuximab (1  $\mu$ g/mL, black columns). The values represent the averages of 3 independent experiments, each done in duplicate. The brackets indicate the differences between erlotinib and cetuximab-treated cells. Middle and lower panels, migration of LIM1215,

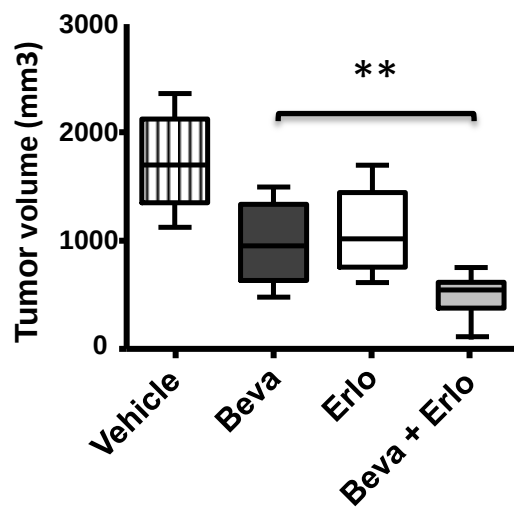
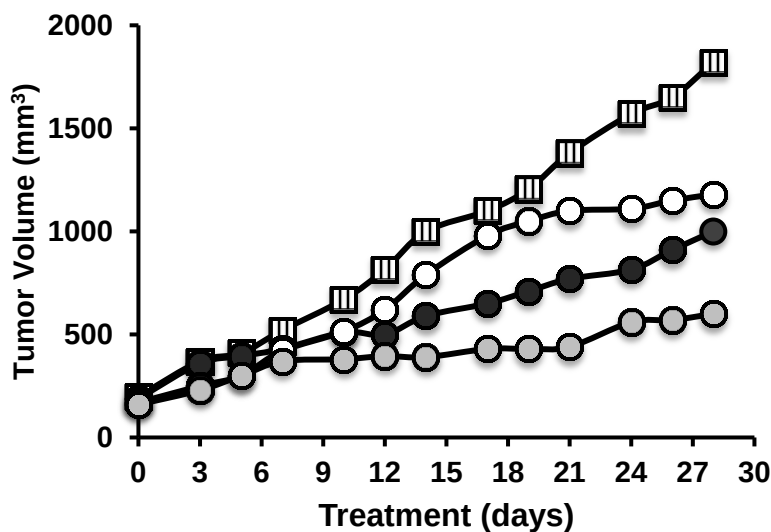


HCT-116, LS174T and SW480 cells as determined by the trans-well assay (Boyden chamber) in the absence (white columns) or presence of EGF in the lower chamber and in the absence (hatched columns) or presence of erlotinib (grey columns) or cetuximab (black columns) in the upper chamber. The values represent the averages of 3 independent experiments, each done in duplicate. The brackets indicate the difference between the positive EGF control and the erlotinib or cetuximab-treated cells. P values were calculated using Student's paired *t*-test. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .

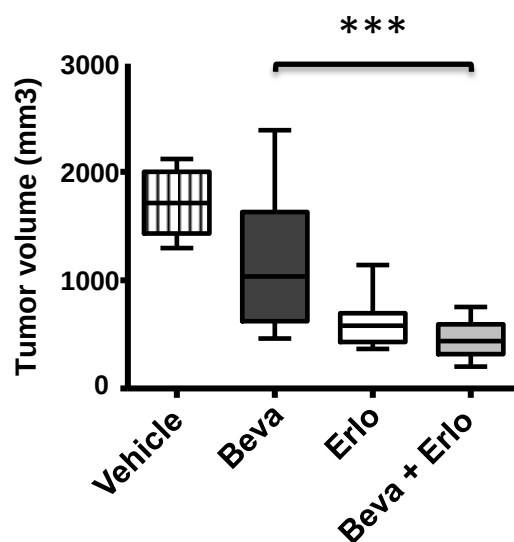
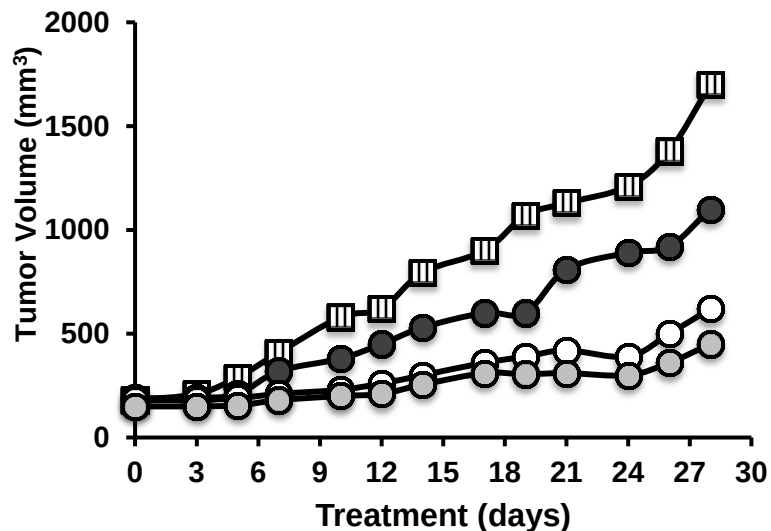
**Figure 6. Outline of classical and novel EGFR signaling pathways.** EGFR mediates a wide variety of cellular functions including both classical mechanisms and newly identified pathways that plays a role in the regulation of DNA synthesis (Lyn/MCM7), autophagy (BCN-1) and miRNA processing (AGO2). The phosphorylation of AGO2 and Beclin1 is mediated by catalytically active EGFR present on intracellular vesicles after internalization, but before lysosomal degradation (35,36).

**Figure 1**

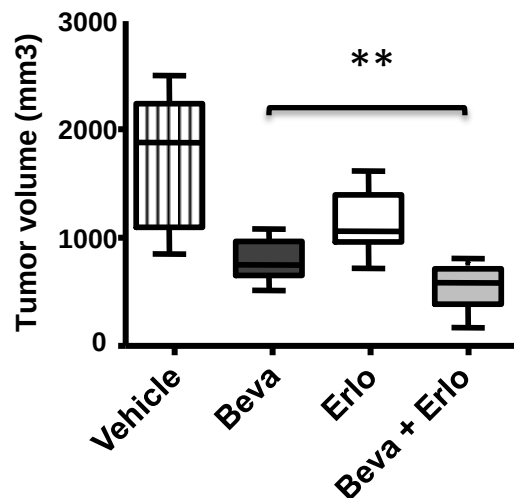
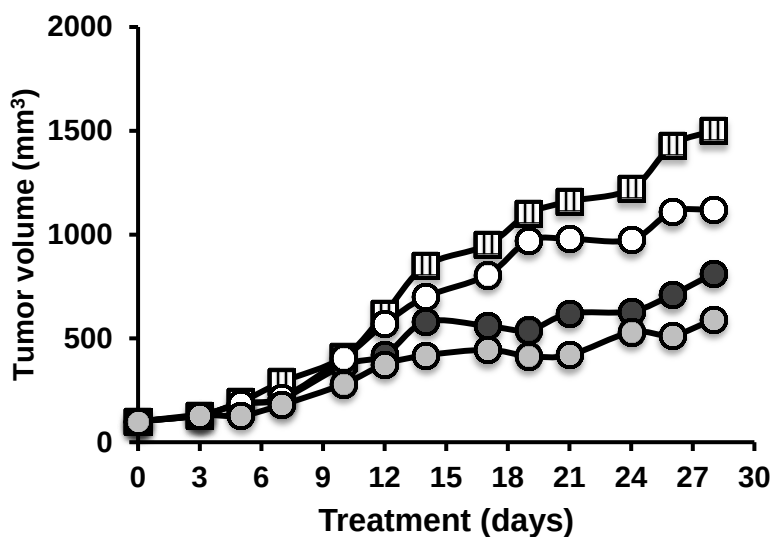
**SW48**

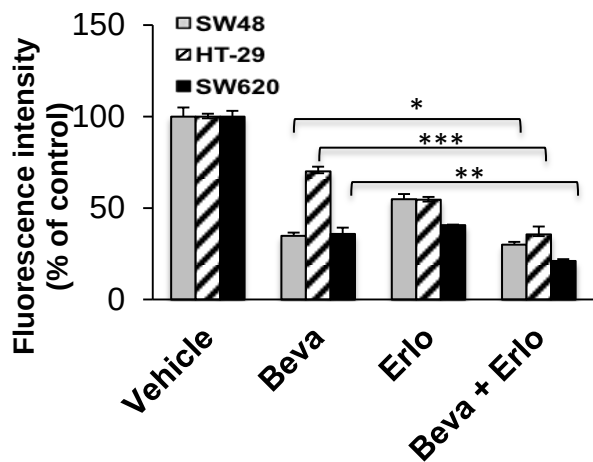
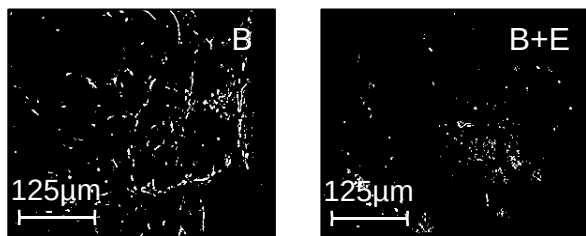
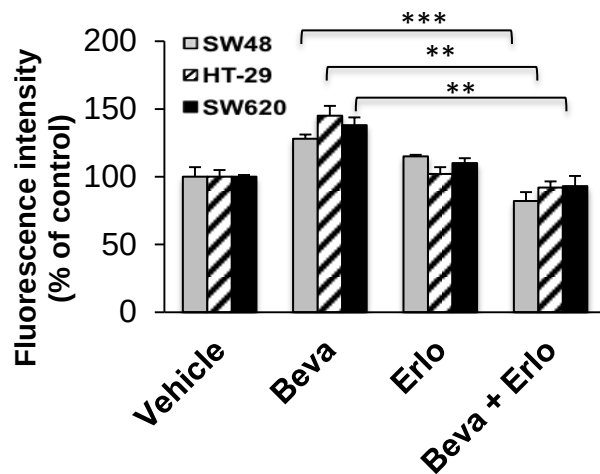
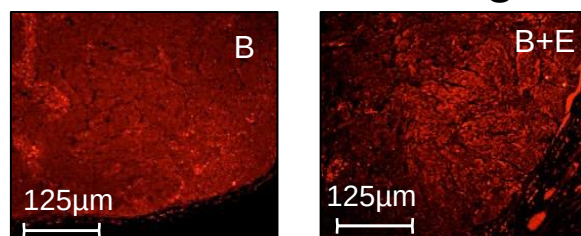
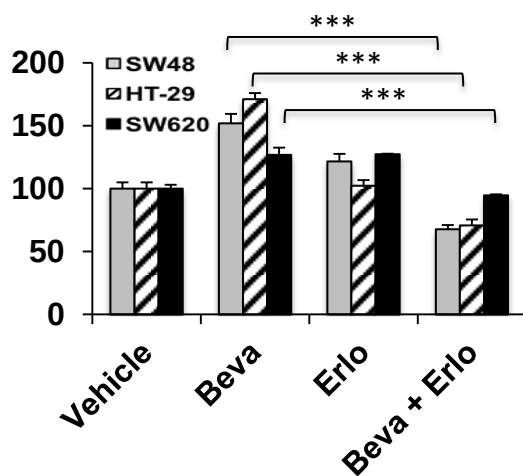
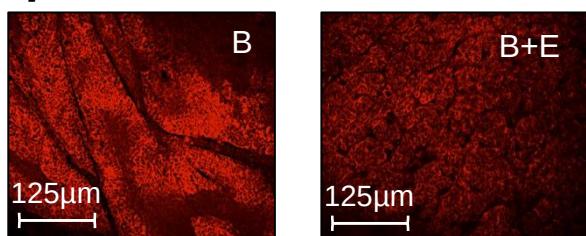
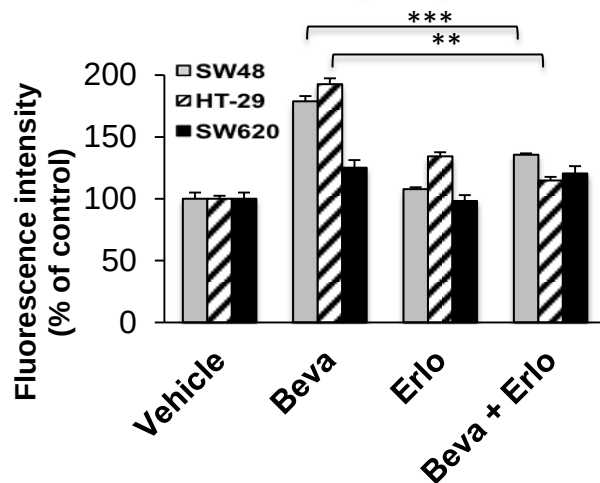
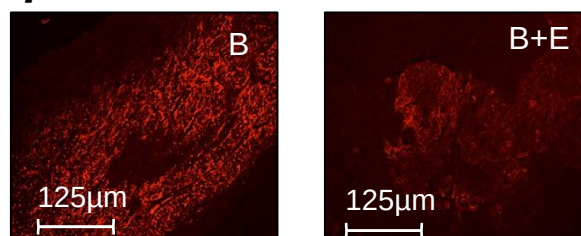
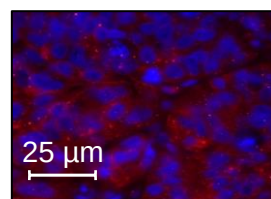
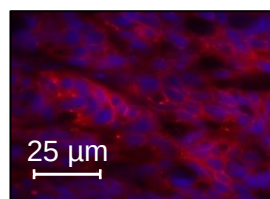
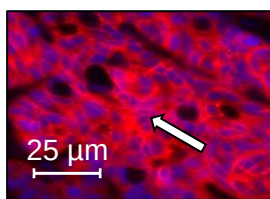
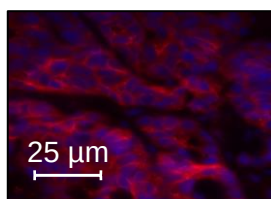


**HT-29**



**SW620**



**CD31****VEGF****Figure 2****pVEGFR-1****pVEGFR-2****Vehicle****Beva****Erlo****Beva + Erlo****pVEGFR-1**

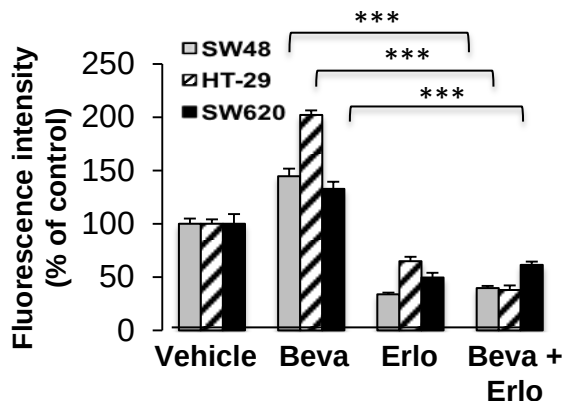
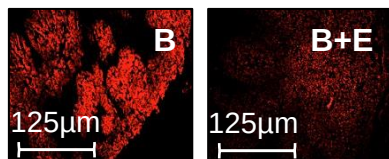
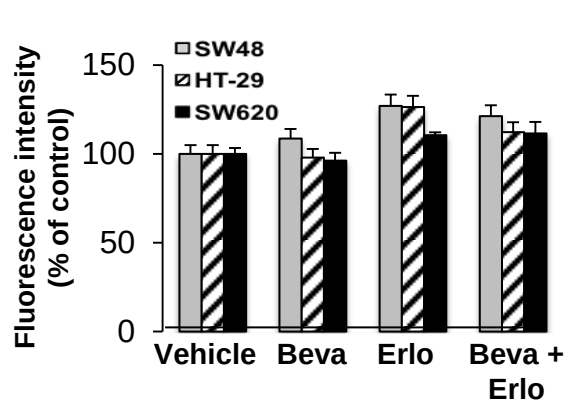
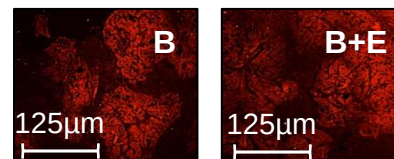
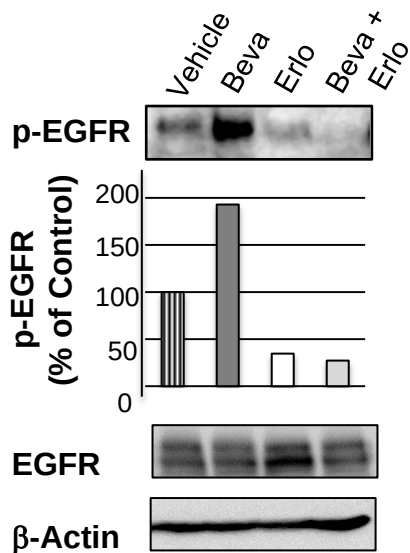
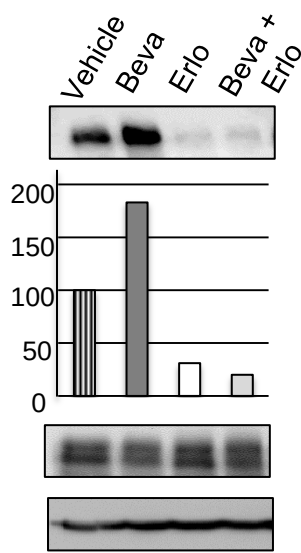
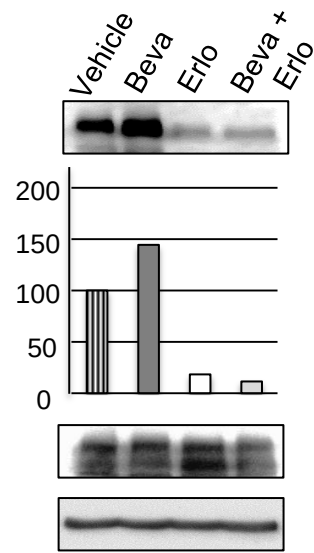
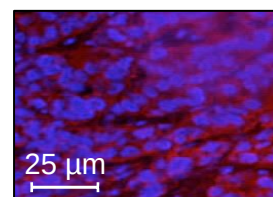
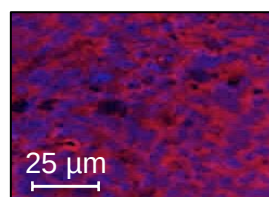
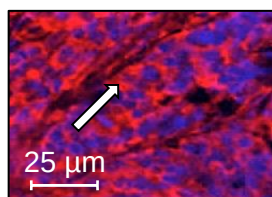
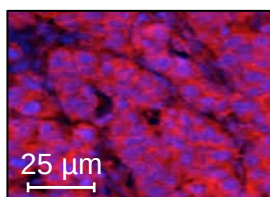
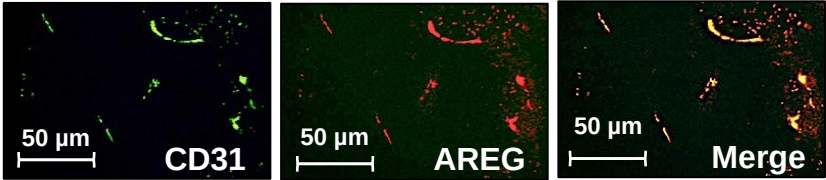
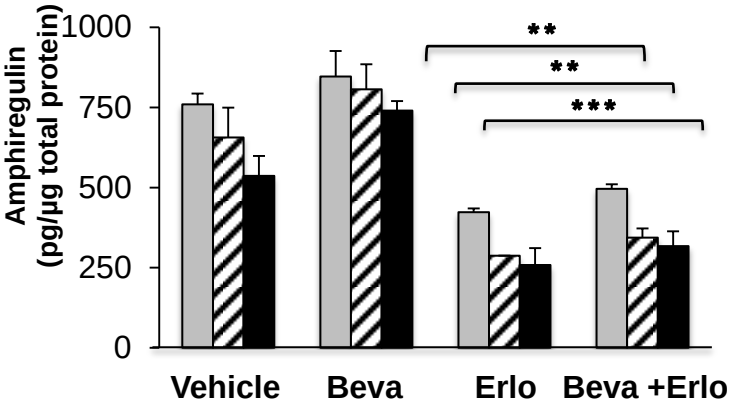
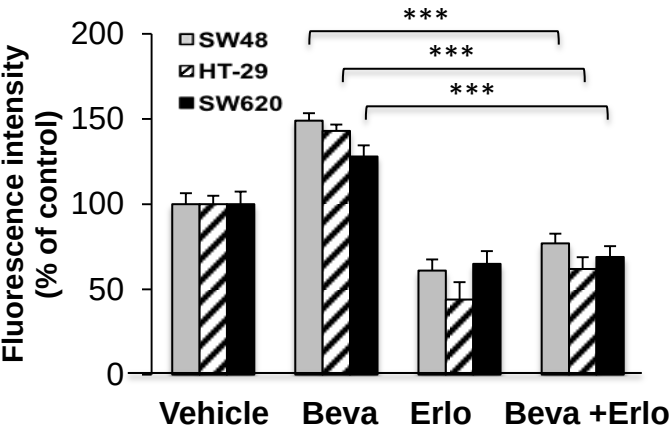
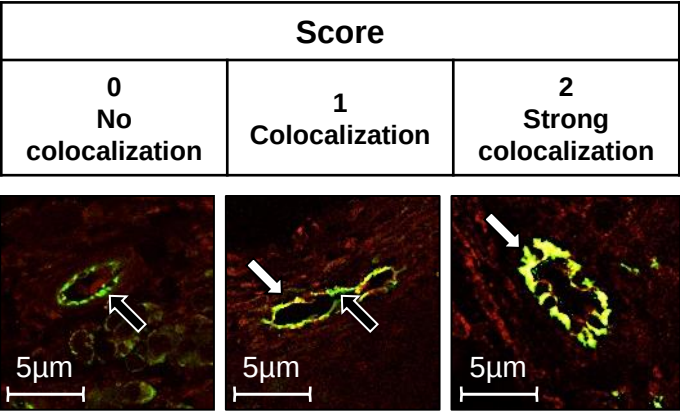
**pEGFR****EGFR****SW48****HT-29****SW620****Vehicle****Beva****Erlo****Beva + Erlo****pEGFR**

Figure 4



# Figure 5

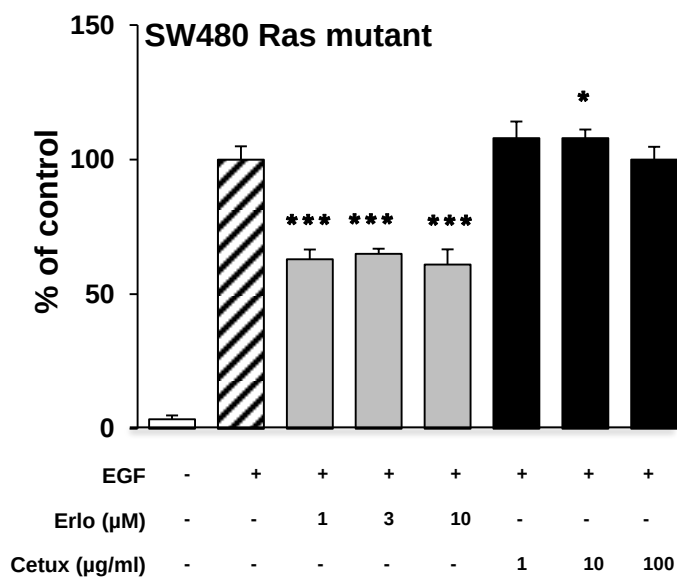
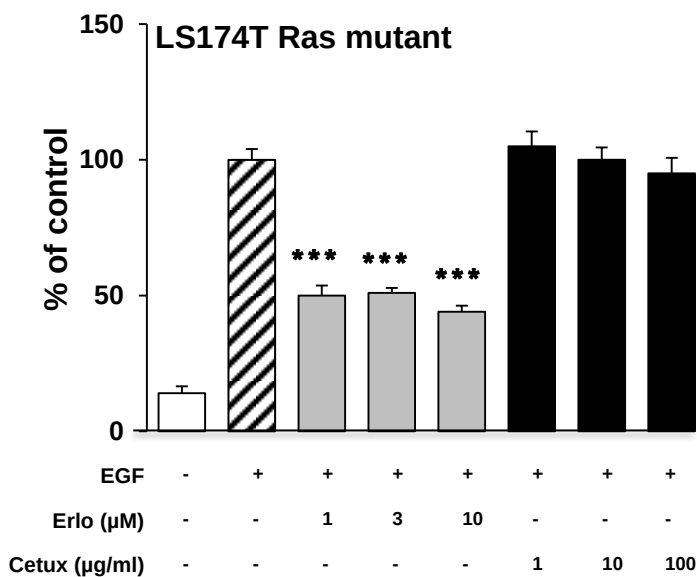
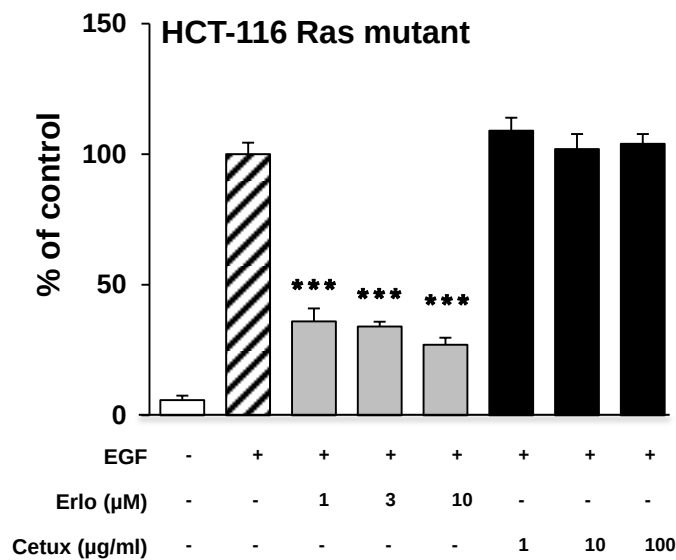
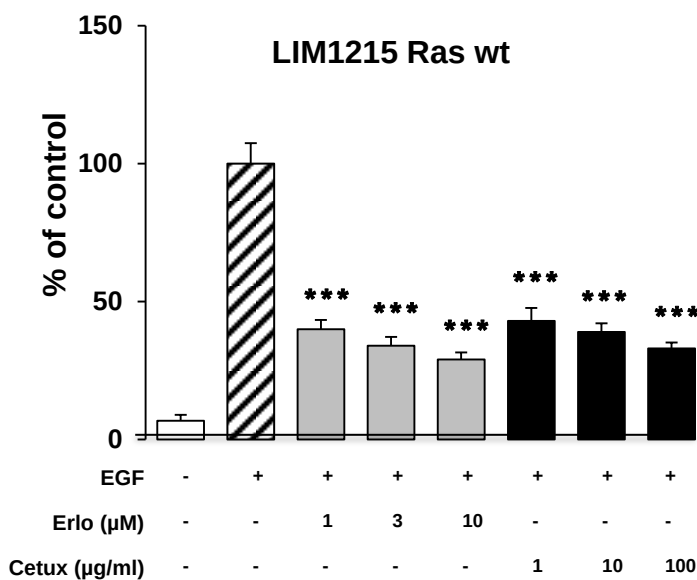
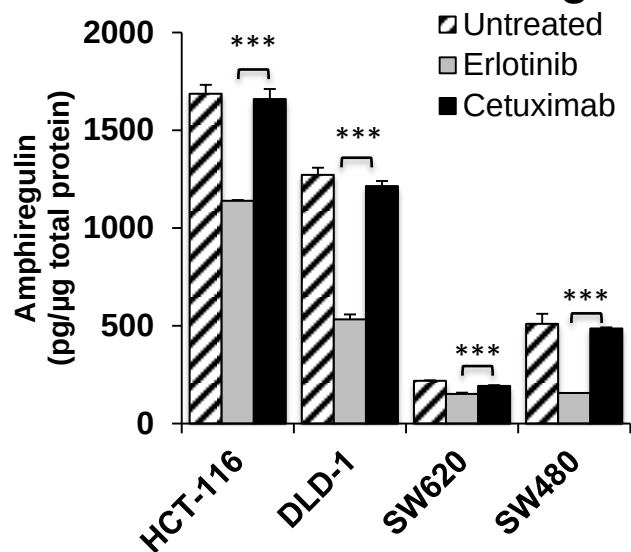
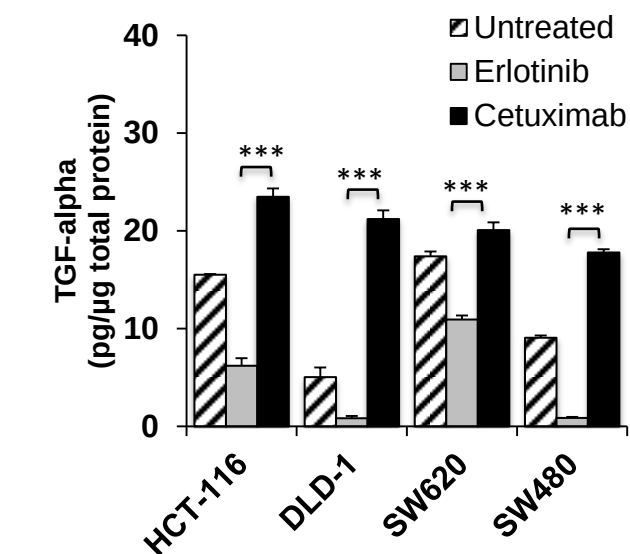
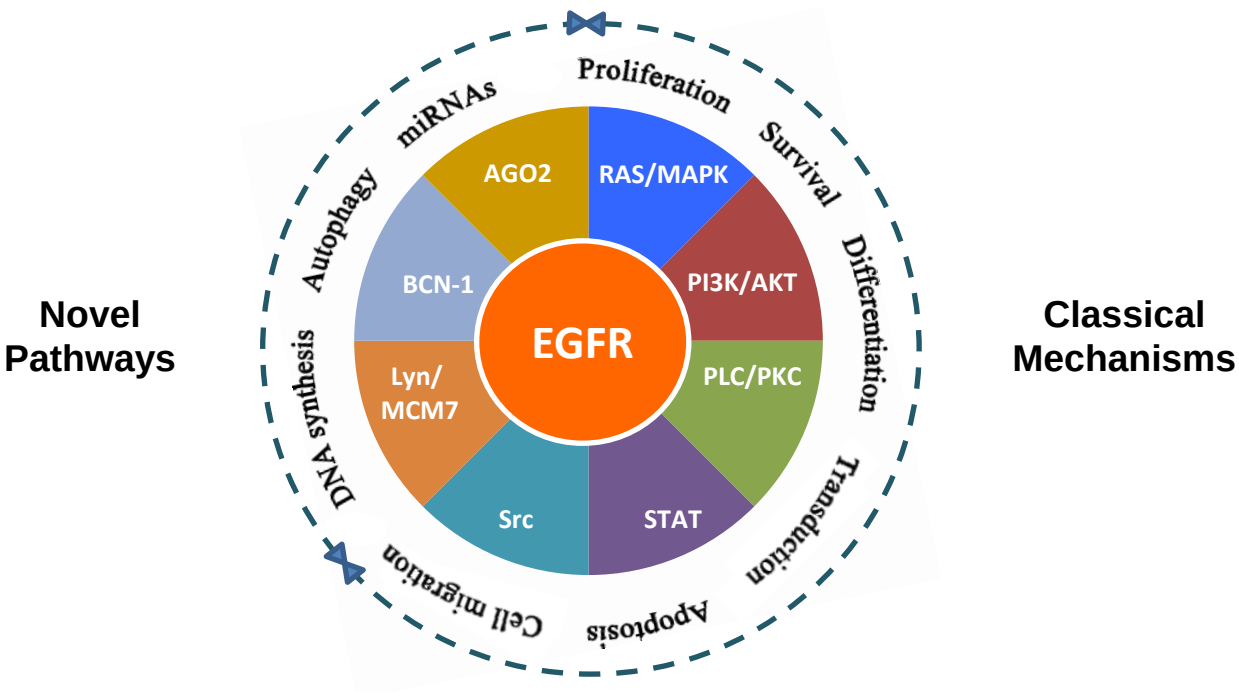


Figure 6



---

## *Annexe 2*

---

### **Chronic chemotherapeutic stress promotes evolution of stemness and WNT/beta-catenin signaling in colorectal cancer cells: implications for clinical use of WNT-signaling inhibitors**

Meriam Ayadi, **Anaïs Bouygues**, Djamila Ouaret, Nathalie Ferrand, Salem Chouaib, Jean-Paul Thiery, Christian Muchardt, Michèle Sabbah, Annette K Larsen



# Chronic chemotherapeutic stress promotes evolution of stemness and WNT/beta-catenin signaling in colorectal cancer cells: implications for clinical use of WNT-signaling inhibitors

Meriam Ayadi<sup>1,2,3</sup>, Anaïs Bouygues<sup>1,2,3</sup>, Djamila Ouaret<sup>1,2,3</sup>, Nathalie Ferrand<sup>1,2,3</sup>, Salem Chouaib<sup>4</sup>, Jean-Paul Thiery<sup>5</sup>, Christian Muchardt<sup>6</sup>, Michèle Sabbah<sup>1,2,3</sup>, Annette K Larsen<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Cancer Biology and Therapeutics, Centre de Recherche Saint-Antoine, Paris, France

<sup>2</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U938, Paris, France

<sup>3</sup>Institut Universitaire de Cancérologie, Pierre et Marie Curie (UPMC) Sorbonne Universités, Paris, France

<sup>4</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U753, Gustave-Roussy, Villejuif, France

<sup>5</sup>Institute of Molecular and Cell Biology, A\*STAR (Agency for Science, Technology and Research), Singapore, Singapore. Department of Biochemistry, School of Medicine, National University of Singapore, Singapore. Cancer Science Institute, National University of Singapore, Singapore

<sup>6</sup>Laboratory of Epigenetic Regulation, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) URA2578, Institut Pasteur, Paris, France

## Correspondence to:

Annette K. Larsen, e-mail: annette.larsen@upmc.fr

**Keywords:** colorectal cancer, chemotherapeutic stress, "stemness", WNT/beta-catenin signaling, WNT inhibitors

**Received:** January 05, 2015

**Accepted:** April 29, 2015

**Published:** May 11, 2015

## ABSTRACT

**Most solid tumors contain a subfraction of cells with stem/progenitor cell features. Stem cells are naturally chemoresistant suggesting that chronic chemotherapeutic stress may select for cells with increased "stemness". We carried out a comprehensive molecular and functional analysis of six independently selected colorectal cancer (CRC) cell lines with acquired resistance to three different chemotherapeutic agents derived from two distinct parental cell lines. Chronic drug exposure resulted in complex alterations of stem cell markers that could be classified into three categories: 1) one cell line, HT-29/5-FU, showed increased "stemness" and WNT-signaling, 2) three cell lines showed decreased expression of stem cell markers, decreased aldehyde dehydrogenase activity, attenuated WNT-signaling and lost the capacity to form colonospheres and 3) two cell lines displayed prominent expression of ABC transporters with a heterogeneous response for stem cell markers. While WNT-signaling could be attenuated in the HT-29/5-FU cells by the WNT-signaling inhibitors ICG-001 and PKF-118, this was not accompanied by any selective growth inhibitory effect suggesting that the cytotoxic activity of these compounds is not directly linked to WNT-signaling inhibition. We conclude that classical WNT-signaling inhibitors have toxic off-target activities that need to be addressed for clinical development.**

## INTRODUCTION

Increasing experimental and clinical evidence indicates that tumors evolve over time which is driven by clonal heterogeneity, selection, non-genetic instability and adaptation to environmental stress like exposure to therapeutic agents [1–7]. Most studies of acquired drug-resistance have focused on classical mechanisms directly linked to the drug-target interaction like membrane

transporters, drug distribution or DNA repair mechanisms, sometimes classified as "non-oncogenic" resistance [8–12]. However, recent findings suggest that chronic chemotherapeutic stress may promote more general and often unexpected biological changes in cancer cells. For example, analysis of biopsies from non-small cell lung cancer (NSCLC) patients with acquired resistance to small molecule epidermal growth factor receptor (EGFR) inhibitors displayed *MET* gene amplifications, epithelial to

mesenchymal transition (EMT) as well as a transformation from NSCLC into small cell lung cancer [13]. Exposure of colorectal cancer (CRC) cells to oxaliplatin was associated with up-regulation of VEGF ligands and receptors [14] while chronic exposure to irinotecan was accompanied by activation of EGFR- and SRC-signaling in CRC models [15].

Most, if not all, solid tumors contain a subpopulation that displays molecular and functional similarities to stem cells. Stem cells are naturally chemoresistant due to high expression of certain ATP-binding cassette transporters, proficient DNA repair, a slow cell cycle and activation of various signaling pathways including WNT [16]. Therefore, one potential mechanism of acquired resistance to chemotherapeutic stress would be selection of cells with increased “stemness”.

The WNT-signaling pathway plays an important role in the colon. Starting at the base of the crypt unit, WNT-signaling is highest in the stem cell compartment and decreases as the cell moves upwards through the proliferative areas and into the differentiative compartment [17]. The central role of WNT signaling is further emphasized by a recent molecular study of human colon and rectal cancers indicating that at least 90% of patient tumors display a deregulated WNT-signaling pathway [2]. These findings support a role for WNT/beta-catenin-signaling inhibitors as potential novel agents for treatment of CRC. Assuming that acquired chemoresistance is accompanied by increased “stemness” and upregulation of WNT-signaling, such inhibitors might show preferential activity toward tumors with acquired drug resistance.

To establish the influence of chronic chemotherapeutic stress on “stemness”, we carried out a comprehensive molecular and functional analysis of six independently selected CRC cell lines with acquired resistance to three chemotherapeutic agents with different mechanisms of action (5-fluorouracil, oxaliplatin and irinotecan) derived from two parental cell lines with distinct molecular profiles, HT-29 (chromosome unstable, CIN) and HCT-116 (microsatellite unstable, MSI).

We here report that chronic chemotherapeutic stress drives the evolution of “stemness” in CRC cells in a complex manner which is relevant for the elaboration of future therapeutic strategies. In addition, our results reveal that classical WNT-signaling inhibitors have toxic off-target activities that need to be addressed for their clinical development.

## RESULTS

### Chronic chemotherapeutic stress is accompanied by altered CD44 splicing

CD44 is a broadly distributed multifunctional glycoprotein adhesion molecule that is widely used as a stem cell marker [18]. Through alternative splicing, cells can produce a large family of CD44 protein isoforms which

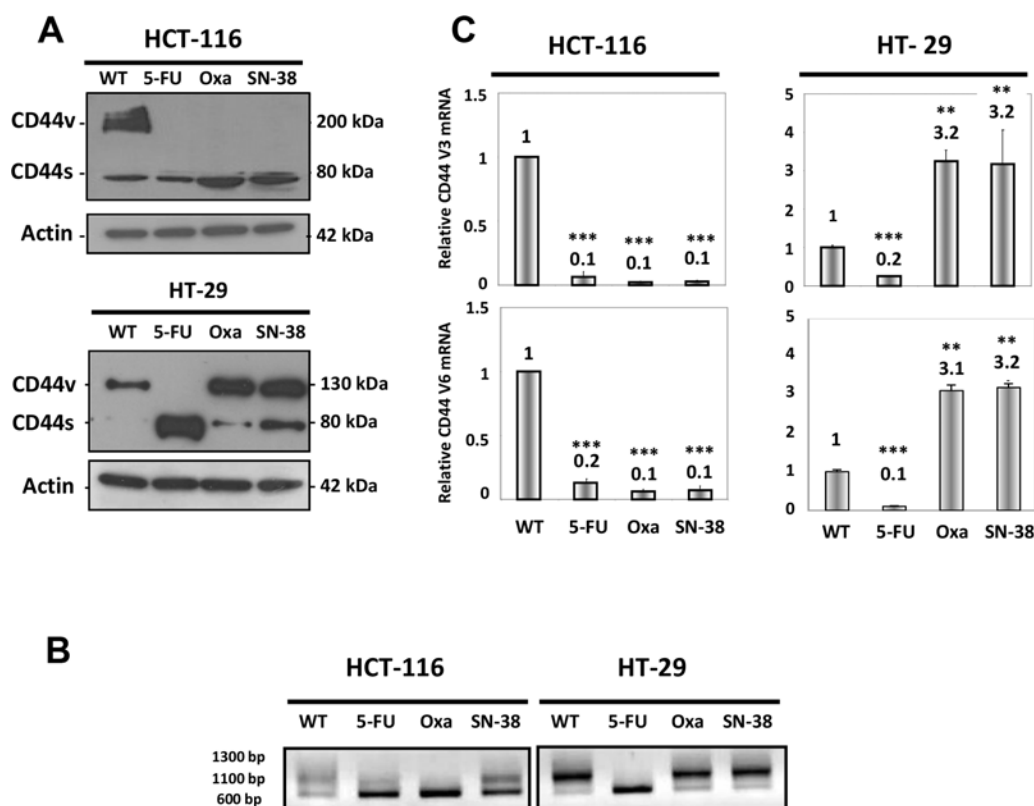
are involved in a variety of biological processes. Normal epithelial cells in the colon express the standard form of CD44 (CD44s) whereas adenomas, carcinomas and CRC metastasis may also express CD44 variants (CD44v) containing additional exons that are coding for insertions in the membrane-proximal extracellular region [19].

Western blot analysis revealed that the parental HCT-116 cells predominantly expressed CD44v isoforms in contrast to the three drug-resistant HCT-116 variants that almost exclusively expressed CD44s (Figure 1A upper panel). Parental HT-29 cells expressed exclusively CD44v isoforms while the oxaliplatin- and SN38-resistant variants showed increased expression of CD44v as well as expression of CD44s. In comparison, HT-29/5-FU cells expressed exclusively CD44s (Figure 1A lower panel). To confirm that the altered size distribution was linked to alternative splicing, rather than to potential differences in glycosylation [20], CD44 mRNA was characterized further by qRT-PCR followed by agarose gel electrophoresis (Figure 1B). The results confirm the differences in size between CD44 transcripts.

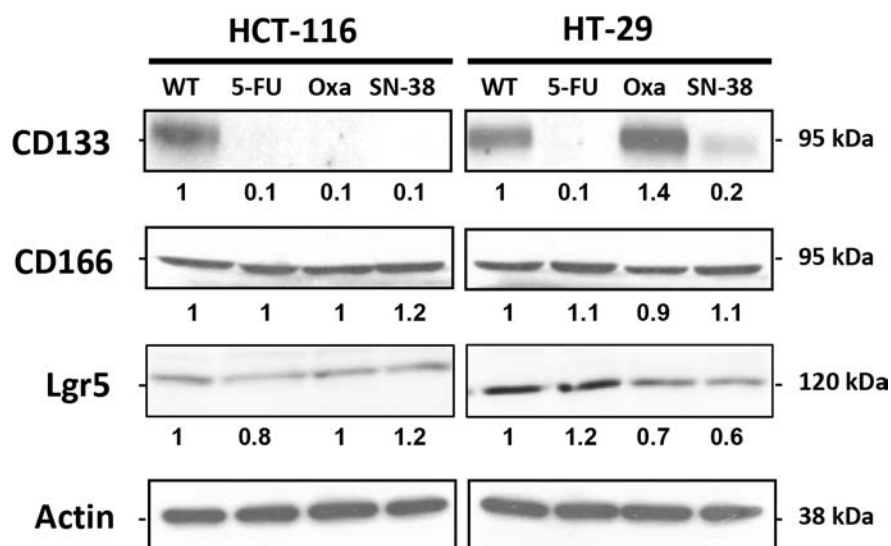
We then focused on CD44 variants containing exons 3 (CD44v3) and 6 (CD44v6). The CD44v3 isoform undergoes heparin sulphate modification and is able to interact with various growth factors including heparin-binding epidermal growth factor and basic fibroblast growth factor [21, 22], whereas the CD44v6 isoform has been shown to act as a co-receptor for the receptor tyrosine kinase c-MET [23]. In agreement with the Western blot analysis, quantitative RT-PCR analysis of CD44 mRNA using isoform-specific primers for v3 and v6 showed decreased expression of CD44v3 and CD44v6 in the three drug-resistant HCT-116 cells as well as for the HT-29/5-FU cells (Figure 1C). In contrast, increased expression (about 3-fold) was observed for both CD44v3 and CD44v6 in the HT-29/Oxa and HT-29/ SN38 cells.

### Differential influence of chronic chemotherapeutic stress on the expression of CD133, CD166 and Lgr5

CD133 is a widely used stem cell marker [24] whereas CD166 and Lgr5 are expressed on the surface of epithelial cells within the colon stem cell niche [25, 26]. Western blot analysis show that CD133 protein was strongly expressed by the parental HCT-116 and HT-29 cells as well as by the HT-29/Oxa cells (Figure 2) while CD133 expression was weak in the HT-29/SN-38 cells and marginal in drug-resistant HCT-116 variants and HT-29/5-FU cells. In clear contrast, Western blot analysis revealed no alteration in the expression of CD166 among the eight cell lines (Figure 2). Lgr5 expression was comparable for HT-29/5-FU cells and slightly downregulated for HT-29/Oxa and HT-29/SN38 cells, compared to the parental cells, whereas Lgr5 expression was marginal for all four HCT-116 cell lines. Therefore, chronic drug exposure had divergent influence on the expression of the three stem cell



**Figure 1: CD44 expression in parental and drug-resistant CRC cells** **A.** Western blot analysis of CD44 expression in parental and drug-resistant HCT-116 (upper panel) or HT-29 cells (lower panel) using an antibody that detects all CD44 isoforms. CD44s, standard form of CD44; CD44v, variant forms of CD44. Actin was used as loading control. **B.** RNA was extracted from parental and drug-resistant cells and analyzed by qRT-PCR using primers that detect all isoforms of CD44 followed by agarose gel electrophoresis. **C.** RNA was extracted from parental and drug-resistant cells and analyzed by qRT-PCR using primers that specifically detect the CD44v3 or CD44v6 isoforms. Data were derived from three independent experiments. Columns correspond to the relative mRNA expression of the indicated mRNA normalized to GAPDH. Bars, SD. \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  as determined by Student's  $t$ -test.



**Figure 2: Expression of CD133, CD166 and Lgr5 in parental and drug-resistant HCT-116 and HT-29 cells as determined by Western blot analysis.** Actin was used as loading control. Relative protein levels were calculated by densitometry and are listed below the bands.

markers indicating that their expression is not coordinated in CRC cell lines.

### Chronic chemotherapeutic stress is accompanied by altered aldehyde dehydrogenase (ALDH) activity

ALDH is considered as a biomarker for the stem cell/progenitor cell phenotype [27, 28]. Comparison of the ALDH enzymatic activity by the ALDEFLUOR assay in the parental and resistant cell lines revealed a clear decrease in ALDH activity for all three HCT-116 drug-resistant variants that was particularly pronounced for the HCT-116/Oxa cells. The ALDH activity was also decreased for the HT-29/Oxa and HT-29/SN-38 cells, in contrast to the HT-29/5-FU cells where the ALDH activity was increased (Figure 3). Therefore, most of the drug-resistant CRC cells showed decreased ALDH activity whereas ALDH was upregulated in the HT-29/5-FU cells.

### Chronic chemotherapeutic stress may be accompanied by loss of colonosphere capacity

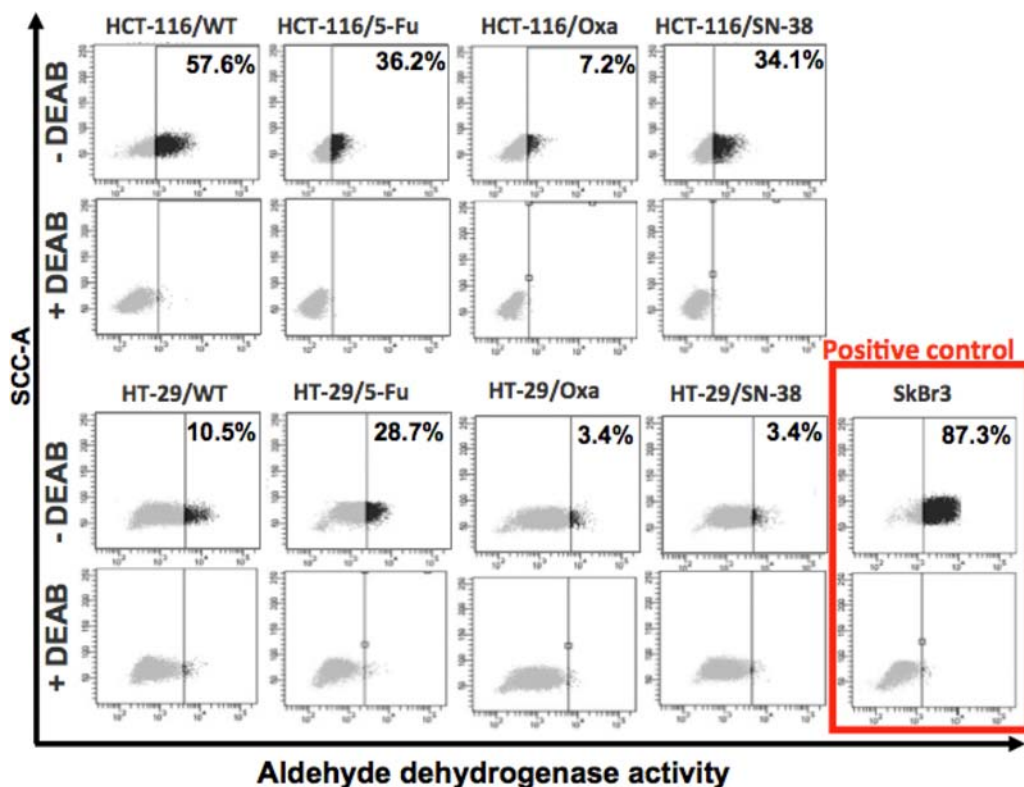
Colon stem cells as well as some colon cancer cells are able to form colonospheres in serum-free media supplemented with growth factors, when plated in limited numbers under anchorage-independent conditions [29].

Both HCT-116 and HT-29 parental cells were able to form uniform and regular colonospheres under these conditions (Figure 4).

Unexpectedly, the capacity to form colonospheres was lost for all three drug-resistant HCT-116 variants. In comparison, HT-29/Oxa and HT-29/SN-38 cells had retained the capacity to form colonospheres with a morphology comparable to the parental cells whereas the 5-FU resistant HT-29 cells formed loose irregular aggregates with structural similarity to the spheroids previously described for MDA MB-231 [30] and MCF7-sh-WISP2 cells [31].

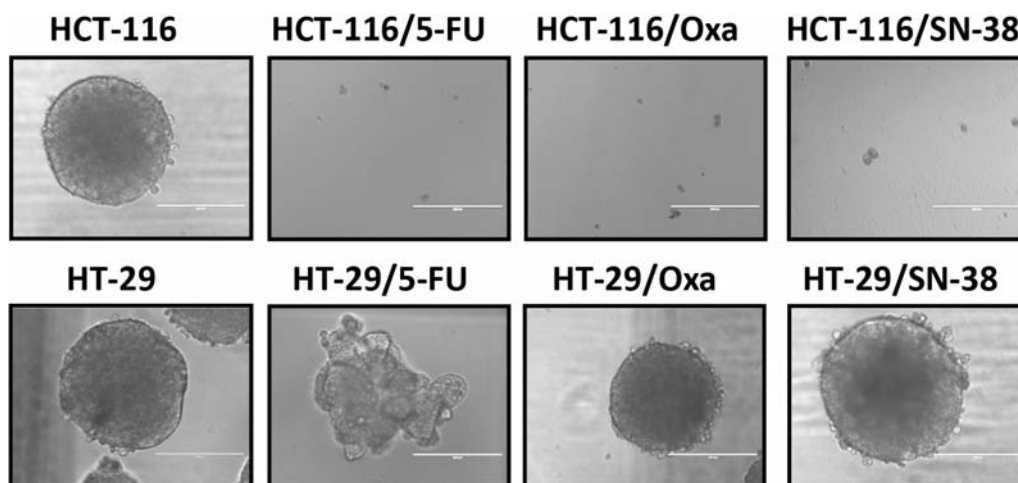
### Chronic chemotherapeutic stress has different influence on the capacity to efflux Hoechst 33342 dye

A characteristic shared by many adult stem cells as well as some chemo-naïve tumor cells is the ability to efflux Hoechst due to elevated expression of ABC transporters on the cell surface [32, 33]. The ability to extrude Hoechst 33342 dye was determined by flow cytometry analysis (Figure 5A) where the efflux capacity is considered as the difference in the proportion of cells present in the side population (SP, outlined in the lower left corner) in the absence and presence of the non-specific ABC transporter inhibitor verapamil. The results indicate



**Figure 3: Flow cytometry analysis of aldehyde dehydrogenase (ALDH) activity.** Parental and drug-resistant HCT-116 and HT-29 cells were treated with ALDEFLUOR in the absence or presence of the ALDH inhibitor DEAB in order to establish the baseline fluorescence of the cells thereby defining the ALDEFLUOR positive region. The numbers indicate the fraction of cells present in the ALDH positive region.



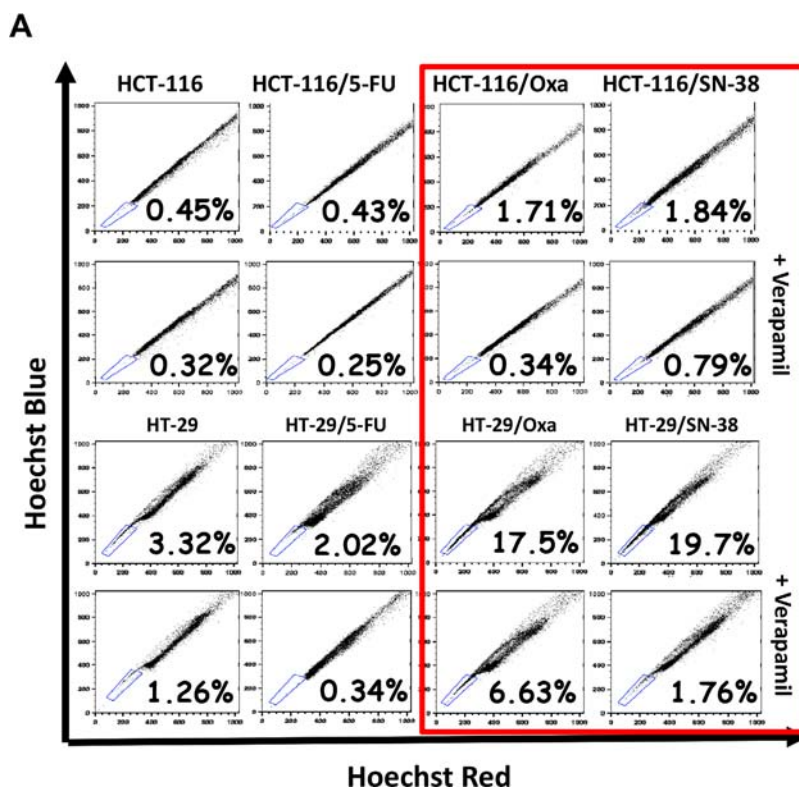


**Figure 4: Colonosphere formation.** Parental and drug-resistant HCT-116 and HT-29 cells were plated in serum-free non-adherent culture conditions. The images are representative of colonospheres formation after 14 days in culture.

modest modifications of the side population for the two 5-FU-resistant cell lines, compared to the corresponding parental cells. In contrast, the side population was increased for oxaliplatin- and SN38-resistant cells as outlined in red, which is particularly marked for the two HT-29 variants.

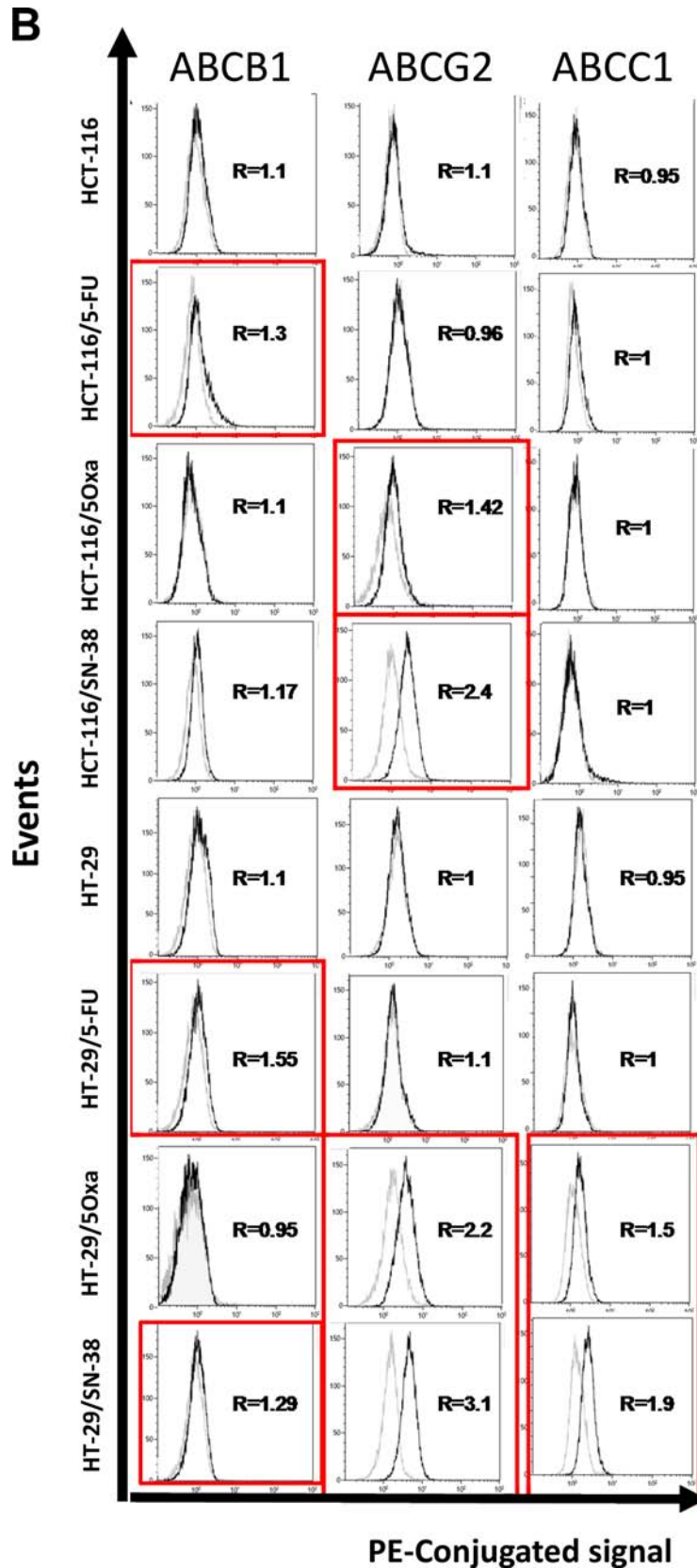
We then determined the relative expression of three drug transporters expressed by SP cells:

ABCB1 (PGP, MDR1), ABCG2 (MRX, BCRP) and ABCC1 (MRP1) [34] by flow cytometry analysis. The results show that the expression of ABCB1, ABCG2, ABCC1 alone or in combination was increased for the oxaliplatin- and SN-38-resistant variants, whereas the two 5-FU-resistant cell lines show increased expression of ABCB1 (Figure 5B).



**Figure 5: A. Accumulation of Hoechst 33342 as determined by flow cytometry analysis.** Parental and drug-resistant HCT-116 and HT-29 cells were exposed to Hoechst 33342 in the absence or presence of verapamil, a non-specific inhibitor of ABC membrane transporters, and Hoechst blue and Hoechst red fluorescence were measured by flow cytometry. The numbers indicate the fraction of the side population (outlined in the lower left corner) and are representative of three independent experiments.

(Continued)



**Figure 5 (Continued): B.** Expression of ABCB1 (PGP, MDR1), ABCG2 (MXR, BCRP) and ABCC1 (MRP1) as determined by flow cytometry analysis. Parental and drug-resistant HCT-116 and HT-29 cells were incubated with phycoerythrin-conjugated antibodies (solid black lines) or the corresponding isotype antibody (thin black lines) to determine the baseline fluorescence. R corresponds to the ratio of the mean intensities and is representative of two independent experiments.

## The expression of stem cell markers and chemoresistance is not causally linked

To explore the link between chemoresistance and the expression of stem cell markers, the six resistant variants were maintained in drug-free media for a prolonged period of time. After more than 6 months (> 50 passages) we observed no detectable differences in the expression of stem cell markers for any of the resistant cell lines (data not shown) whereas the levels of drug resistance decreased markedly during this interval (Table 1). This was particularly striking for the HT-29/5-FU cells where the resistance ratio decreased from 12 to 2. Therefore, although the chemotherapeutic stress was driving the evolution of both the drug resistance and the altered expression of molecular and functional stem cell markers, the two phenotypes do not appear to be causally linked.

## Chronic chemotherapeutic stress modulates WNT-beta-catenin signaling

WNT pathway activation was determined after transfection with TOP-Flash and FOP-Flash plasmid constructs and is expressed in arbitrary units as the ratio of the TOP/FOP luciferase activity. First, we evaluated WNT-signaling for the two parental cell lines in comparison with two reference cell lines, DLD1 and SW480 that show strong intrinsic WNT-signaling activity [35, 36]. The results (Figure 6A) indicate modest WNT-signaling activity for both HT-29 and HCT-116 parental cell lines compared to DLD1 and SW480 cells. Next, WNT-signaling was compared between parental and drug-resistant variants. The results (Figure 6B) reveal that the WNT-signaling activity was decreased for the three HCT-116 variants which was particularly marked for the SN-38-resistant cells. WNT-signaling activity was also downregulated in HT-29/Oxa and HT-29/SN-38 cells, compared to the parental cells. In marked contrast,

WNT-signaling activity was upregulated 12-fold in the HT-29/5-FU cells.

Activation of the canonical WNT pathway is generally associated with nuclear accumulation of active, dephosphorylated  $\beta$ -catenin that has escaped proteasome degradation. In agreement with the findings shown in Figures 6A and 6B, Western blot analysis revealed a 6-fold increase in the expression of the active, unphosphorylated form of beta-catenin in HT-29/5-FU cells whereas the expression was either decreased or unchanged for the other drug-resistant variants (Figure 6C).

The localization of beta-catenin in parental and 5-FU resistant HT-29 cells was characterized by fluorescence microscopy (Figure 6D). The results indicate that beta-catenin (indicated in red) is predominantly membrane-associated in the parental HT-29 cells but displays a cytoplasmic/nuclear staining in the HT-29/5-FU cells. Nuclear accumulation of beta-catenin allows complex formation with the transcription factor T cell factor/Lymphoid enhancer factor (TCF/LEF) thereby leading to transcriptional activation of target genes like Cyclin D1 [37] and Axin 2 [38]. In agreement, the levels of Cyclin D1 and Axin 2 mRNA, as determined by qRT-PCR, were increased in the HT-29/5-FU cells but not in the other drug-resistant variants (Figure 6E). Unexpectedly, a modest, but reproducible increase in mRNA levels for cyclin D1 and Axin 2 was observed for the oxaliplatin-resistant HCT-116 cells while the 5-FU and SN-38 resistant HCT-116 cells were comparable with the parental HCT-116 cells.

## The WNT-signaling inhibitors ICG-001 and PKF 118 downregulate WNT-activity without any selective cytotoxic effects

To establish if the strong WNT activity in HT-29/5-FU cells was accompanied by increased sensitivity to WNT inhibition, we selected two WNT-signaling

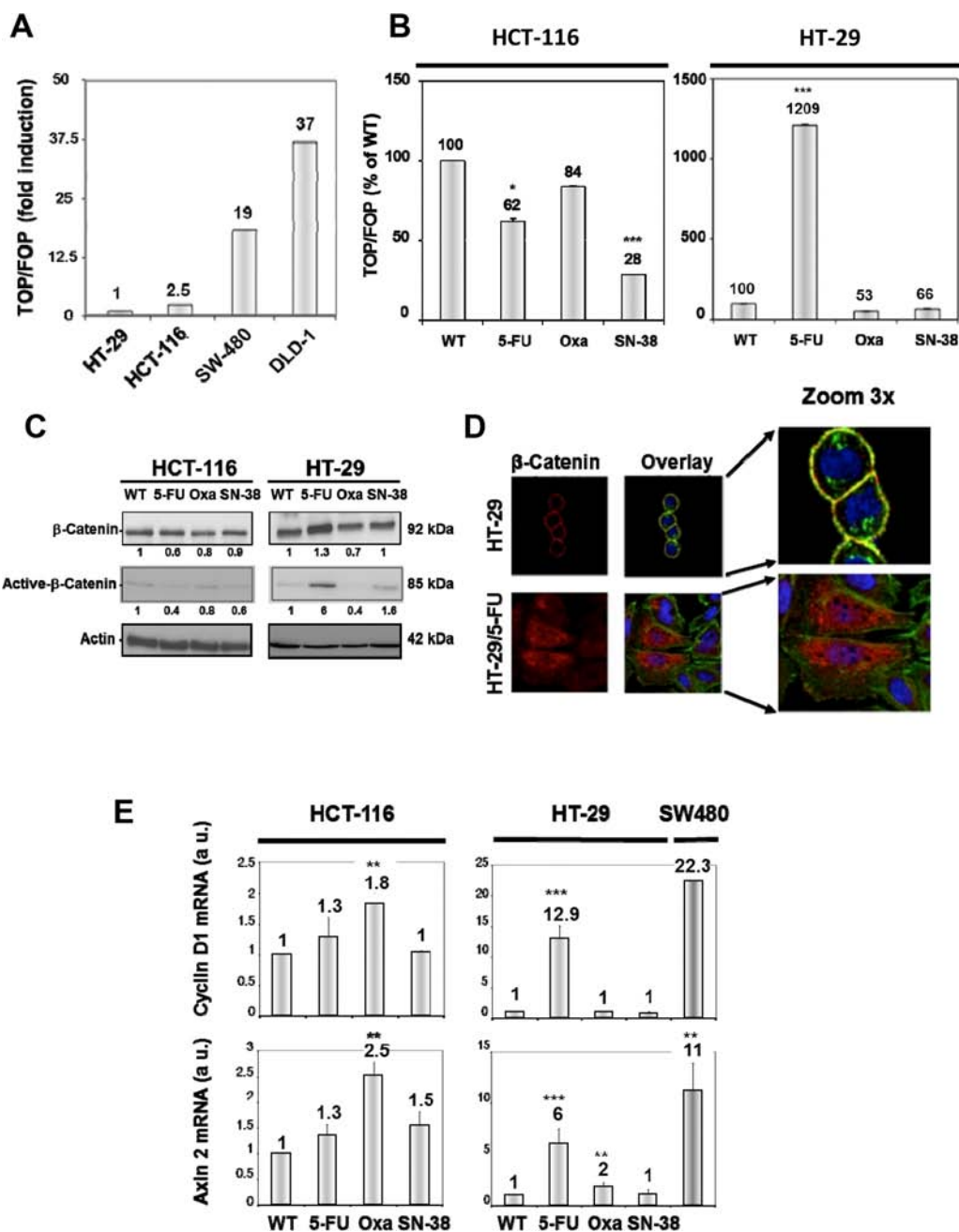
**Table 1: Characteristics of parental and drug resistant cell lines used in this study**

|                | Cells resistant to | Resistance level <sup>a</sup> | Resistance level <sup>b</sup> |
|----------------|--------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| HCT-116        | Parental cells     | 1                             | 1                             |
| HCT-116/5-FU   | 5-fluorouracil     | 12                            | 7                             |
| HCT-116/Oxa    | Oxaliplatin        | 15                            | 6                             |
| HCT-116 /SN-38 | SN-38 (irinotecan) | 10                            | 6                             |
| HT-29          | Parental cells     | 1                             | 1                             |
| HT-29/5-FU     | 5-fluorouracil     | 12                            | 2                             |
| HT-29/Oxa      | Oxaliplatin        | 10                            | 4                             |
| HT-29/SN-38    | SN-38 (irinotecan) | 5                             | 3                             |

The resistance level corresponds to the  $IC_{50}$  value for the resistant cells/ $IC_{50}$  value for the corresponding parental cells

<sup>a</sup>Resistance levels observed when cells are under continuous drug exposure

<sup>b</sup>Resistance levels observed when the resistant cells were maintained in drug-free media for 6 months



**Figure 6: A. Comparison of WNT-signaling in HT-29 and HCT-116 cells in comparison with DLD-1 and SW480 cells.** WNT pathway activation was determined after transfection with Top-Flash and Fop-Flash plasmid constructs and is expressed in comparison with the TOP/FOP luciferase activity in HT-29 cells. **B.** WNT-signaling in parental and resistant HCT-116 (left) and HT-29 cells (right) expressed as % of control. Bars, SD. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  as determined by Student's *t*-test. **C.** Expression of total and unphosphorylated beta-catenin in parental and drug-resistant variants as determined by Western blot analysis. Actin was used as loading control. Relative protein levels were calculated by densitometry and are listed below the bands. **D.** Fluorescence microscopy of beta-catenin localization in HT-29 and HT-29/5-FU cells as determined by immunostaining with a beta-catenin-directed antibody (red). Nuclei were stained by DAPI (blue) while actin was revealed by phalloidin (green). The overlay outlines the localization of beta-catenin on the cytoplasmic membrane (yellow) in the parental, but not in the 5-FU resistant cells. **E.** Expression of Cyclin D and Axin 2 mRNA as determined by qRT-PCR. Data were derived from three independent experiments. Columns, relative mRNA expression of the indicated mRNA normalized to GAPDH. Bars, SD. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  as determined by Student's *t*-test.



inhibitors with different mechanism of action. ICG-001 is a selective low molecular-weight inhibitor, which antagonize  $\beta$ -catenin/TCF-mediated transcription by specifically binding to CBP (cyclic AMP response element-binding protein), thereby disrupting the interaction between CBP and  $\beta$ -catenin [39]. PKF 118-310 binds selectively to beta-catenin, thereby disrupting its interaction with TCF-4 [40]. The growth inhibitory effects of ICG-001 and PKF 118 were determined by the MTT viability assay after 120 hours continuous drug exposure [41] and is expressed as  $IC_{50}$  values (drug concentration inhibiting cell growth by 50% compared to untreated controls). The  $IC_{50}$  values were around 3  $\mu$ M for ICG-001 and 0.3  $\mu$ M for PKF 118 (Figure 7) in agreement with previous findings [39, 40]. However, there was no selective cytotoxicity toward either HT-29 or HT-29/5-FU cells. Similar experiments with DLD-1 and SW480 cells that are both chemo-naïve and show high intrinsic WNT-signaling (Figure 6) resulted in similar  $IC_{50}$  values for both ICG-001 and PKF 118 (Figure 7), and this although the 4 cell lines tested differ almost 40-fold with respect to Wnt/beta catenin activity (Figure 6A).

To confirm these unexpected findings, the cytotoxic activities of ICG-001 and PKF 118 toward HT-29, HT-29/5-FU, SW480 and DLD-1 cells were determined by the highly sensitive colony formation assay. The results (SI Figure 1) show that the cytotoxic activity of PKF 118 was comparable between the 4 cell lines. For ICG-001, there was up to 3-fold differences in the cytotoxic activity ( $IC_{50}$  values) between the most sensitive and the most resistant cell line, but without any obvious correlation between  $IC_{50}$  value and the WNT/beta-catenin activity.

To establish if the increased WNT/beta-catenin activity in the HT-29/5-FU cells was causally related to 5-FU resistance, we determined the influence of 5-FU on colony formation in the absence or presence of PKF 118 or ICG-001. The results (SI Figure 2) show no influence of PKF 118 or ICG-001 on the cytotoxic activity of 5-FU in neither HT-29 nor HT-29/5-FU cells.

We then characterized the influence of ICG-001 and PKF 118 on WNT-signaling in DLD-1, SW480 and

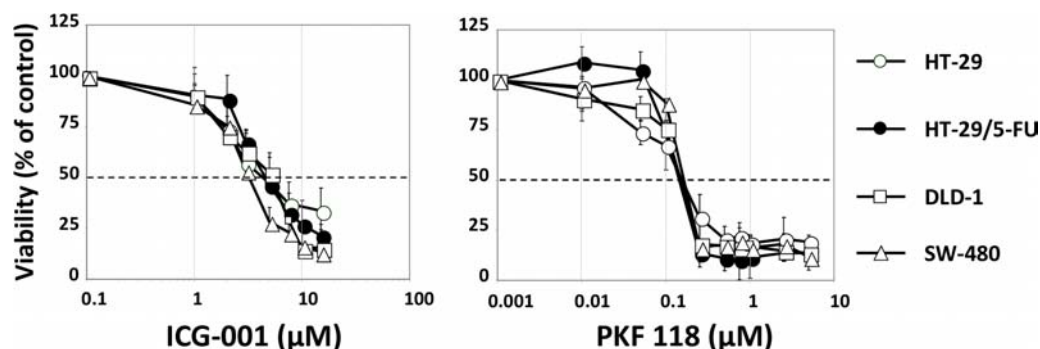
HT-29/5-FU cells after transfection with TOP-Flash or FOP-Flash plasmid constructs. The results show that 24 hours exposure to ICG-001 and PKF 118 is associated with a clear decrease in WNT-signaling (Figure 8).

Taken together, these results show that although the two WNT signaling inhibitors do indeed inhibit WNT-signaling within a relevant dose range, this is not accompanied by any selective cytotoxic effects toward cells with high levels of WNT signaling.

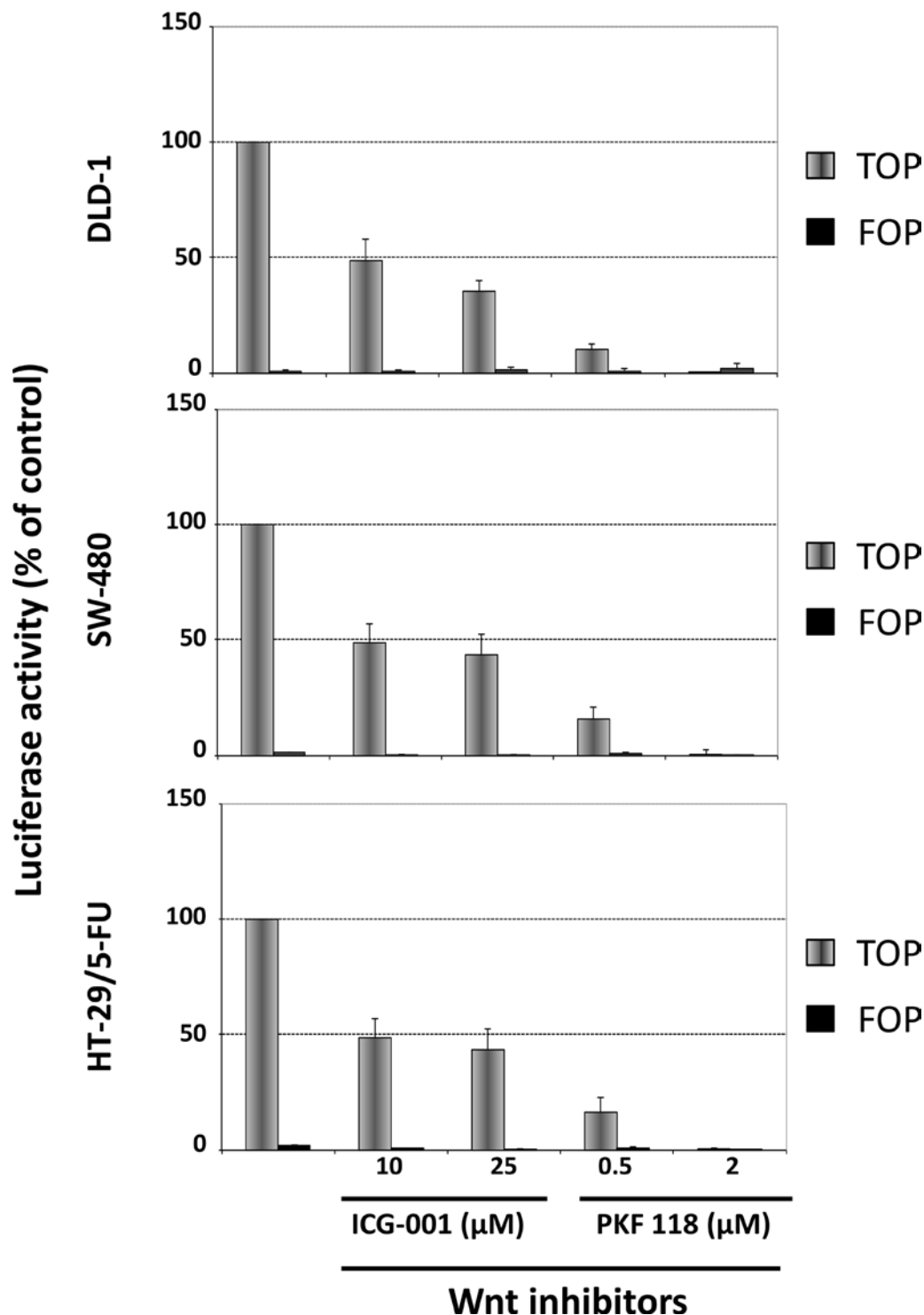
## DISCUSSION

Most solid tumors contain a subfraction of cells with molecular and functional characteristics of stem/progenitor cells that show intrinsic chemoresistance [16, 42, 43]. This suggests that chronic chemotherapeutic stress may provide a selective advantage to cells with a high degree of “stemness”. To explore the link between chronic chemotherapeutic stress and “stemness”, we carried out a comprehensive molecular and functional analysis of six independently selected CRC cell lines with acquired resistance to three chemotherapeutic agents with different mechanisms of action (5-fluorouracil, oxaliplatin and irinotecan) derived from two parental cell lines with distinct molecular profiles, HT-29 (chromosome instable, CIN) and HCT-116 (microsatellite instable, MSI). Since the expression of stem-cell markers may not be regulated in a coordinated fashion, we used a battery of four widely used stem-cell/progenitor markers (CD44, CD133, CD166 and Lgr5) and three functional tests (aldehyde dehydrogenase activity, colonosphere formation and exclusion of Hoechst dye).

Our results show that although chronic chemotherapeutic stress may indeed be accompanied by the appearance of cells with increased stemness, the outcome is more complex than originally proposed. One cell line, HT-29/5-FU showed a clear increase in aldehyde dehydrogenase activity, increased expression of the ABC transporter ABCB1 and formed loose cellular aggregates in serum-free media under low attachment, in contrast to the parental HT-29 cells that formed regular



**Figure 7: Viability of HT-29, HT-29/5-FU, DLD1 and SW480 cells after 120 hours continued exposure to ICG-001 (left) or PKF 118 (right) followed by MTT determination.** Bars indicate SD and are shown when they exceed symbol size. The data represents at least three independent experiments each done in duplicate.



**Figure 8: Influence of ICG-001 and PKF 118 on WNT-signaling in DLD-1 cells (top), SW-480 cells (middle) or HT-29/5-FU cells (bottom) as determined by the luciferase activity after transfection with Top-Flash or Fop-Flash plasmid constructs. Bars, SD. The data represents two independent experiments each done in duplicate.**

spheroids under the same conditions. Therefore, chronic chemotherapeutic stress was accompanied by increased “stemness” in these cells.

In contrast, all three drug-resistant HCT-116 variants had lost CD133 expression, displayed decreased aldehyde dehydrogenase activity and had lost the capacity to form spheroids, suggesting that these cells had either

differentiated further or, alternatively, had undergone trans-differentiation, most likely via EMT (epithelial-mesenchymal transition). The latter possibility is supported by a switch in CD44 isoform expression from a mixture of CD44v and CD44s isoforms in the parental cells to CD44s in all three HCT-116 variants, since the expression of CD44s has been causally linked to the

EMT phenotype in different tumor types including the colon [44–47]. Interestingly, the HT-29/5-FU cells have undergone a similar CD44 switch, as shown by strong expression of the CD44s isoform. In addition, these cells display an altered morphology, consistent with a mesenchymal phenotype, as illustrated in Figure 6D.

Besides CD44 isoform switching, the three HCT-116 variants and HT-29/5-FU cells have lost the expression of CD133. Although CD133 is widely used as an universal stem-cell marker, recent results suggest that this might not be applicable for the colon where CD133 is ubiquitously expressed on differentiated colonic epithelium in both adult mice and in humans [48]. Interestingly, the same study reported that CD133<sup>+</sup> CRC cells form less aggressive tumors, which is supported by recent clinical studies where strong CD133 expression, as determined by immunohistochemistry, is associated with longer progression-free survival in patients with metastatic CRC [49, 50]. Assuming that these four resistant cells lines have indeed undergone EMT, this would mean that EMT can be associated (HT-29/5-FU) or not (HCT-116/5-FU, HCT-116/Oxa, HCT-116/SN-38) with “stemness”, in agreement with recent models [51, 52].

Finally, two drug-selected cell lines, HT-29/Oxa and HT-29/SN-38 show a heterogeneous response with respect to stem cell markers in combination with the presence of a prominent side population linked to increased expression of ABCB1, ABCG2 and ABCC1. Therefore, it appears that prolonged chemotherapeutic stress was principally associated with upregulation of ABC drug transporters in these two cell lines.

Interruption of chronic drug exposure was accompanied by diminished drug resistance in agreement with the clinical experience, where drug-free intervals are typically associated with restoration of drug-sensitivity. In contrast, the altered expression of stem cell markers appears more permanent. This observation is coherent with the dynamic nature of tumor cells that evolves under chemotherapeutic stress and provides interesting therapeutic perspectives for second-line treatment. For example, we recently reported that acquired irinotecan resistance was associated with upregulation of EGFR- and SRC-signaling pathways that can be targeted with selective anticancer agents [15].

The WNT/beta-catenin signaling pathway is altered in more than 90% of patients with CRC [2] as well as in patients with breast cancer [53, 54] and hepatocellular carcinoma [55] making it a particularly attractive therapeutic target. However, the pathway presents several features that suggest that it may also be a difficult target. For example, WNT-signaling appears to play a much broader role not only in crypt epithelial cells but also in differentiated epithelial and mesenchymal cells of the small intestine and colon than was previously anticipated [56]. This is supported by recent findings reporting that epithelial WNTs are dispensable and that stromal

production of WNTs can fully support normal murine intestinal homeostasis [57]. A comprehensive analysis of human tumor samples from patients with colon or rectal cancer revealed that multiple lesions affecting the WNT signaling pathway may co-exist in the same tumor suggestive of a complex signaling network [2]. Finally, it was shown that the canonical WNT suppressor Axin 2 promotes colon carcinoma oncogenic activity rather than functioning as a tumor suppressor as expected [58].

Our results show that WNT-signaling activity is upregulated in the HT-29/5-FU cells as shown by a luciferase reporter assay, the expression and localization of beta-catenin as well as by transcriptional upregulation of Cyclin D1 and Axin 2, two prominent transcriptional targets of canonical WNT-signaling. Although WNT-signaling could be attenuated in the HT-29/5-FU cells by the WNT-signaling inhibitors ICG-001 and PKF 118, this was not accompanied by any selective growth inhibitory effects suggesting that the cytotoxic activity of these compounds is not directly linked to WNT-signaling inhibition. This unexpected finding was subsequently confirmed in two chemo-naïve CRC cell lines with strong WNT-signaling. It is possible that the cytotoxic effects of WNT inhibition may be context-dependent and rely of the strength of additional signaling pathways like MAP kinase signaling [59] or VEGFR1 signaling [60]. However, although the 24 hours drug exposure used for the reporter assay and the 120 hours drug exposure used for the MTT viability assay are not directly comparable, it is noticeable that the drug concentrations needed for WNT-signaling inhibition and for the cytotoxic effects are within the same dose range. This suggests that both inhibitors influence additional targets (off-targets) within the same dose range as WNT-signaling inhibition that can induce cell death independent of the WNT pathway. Future development of WNT-signaling inhibitors will depend on identification of these off-targets in order to obtain WNT inhibitors with increased selectivity.

Taken together, we here show that chronic chemotherapeutic stress drives the evolution of “stemness” in a heterogeneous, context-dependent manner in CRC cells which may provide clues for future therapeutic strategies for second-line treatment. Furthermore, our findings reveal that the cytotoxic activities of WNT-signaling inhibitors do not depend on WNT-signaling as such but rather on off-targets that remain to be identified for further development of this category of molecules.

## MATERIALS AND METHODS

### Cell culture

DLD-1 cells were kindly provided by Richard Hamelin (Paris, France) while SW-480 colon carcinoma cells were purchased from American Type Culture Collection (Rockville, MD). HT-29 cells were provided

by Thécia Lesuffleur (Paris, France) and HCT-116 cells were a kind gift from Bert Vogelstein (Baltimore, MD).

The cells were maintained in, McCoy's A (HCT-116), DMEM (HT-29, SW480) or RPMI (DLD-1) supplemented with 5% fetal calf serum and 1% penicillin/streptomycin (PAA).

HT-29 or HCT-116 cells were exposed to increasing doses of 5-fluorouracil (Teva-Pharma), oxaliplatin (Eloxatin, Sanofi-Synthelabo) or SN-38 (the active metabolite of irinotecan, Abatara-technology) in the culture media as described in detail elsewhere [9, 10, 15]. The properties of parental and drug-resistant cells are detailed in Table 1.

## Reagents and antibodies

PFK118-310 was purchased from Sigma-Aldrich while ICG-001 was obtained from Selleck Chemicals. Alexa fluor 488 phalloidine and 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) were purchased from Sigma. The antibodies used for Western blot analysis and immunocytochemistry were: rabbit anti-CD44 (Abcam # 51037), rabbit anti-CD133 (Cell Signaling # 3663), mouse anti-CD166 (Abcam # 175422), rabbit anti-Lgr5 (Sigma-Aldrich # HPA012530), goat anti-actin (Santa Cruz # sc-1615), rabbit anti-beta-catenin (Cell Signaling # 8480), mouse antibodies specific for the active form of beta-catenin, dephosphorylated on Ser 37 and Thr 41 (Millipore, clone 8E7, # 05-665). Anti-rabbit IgG horseradish peroxidase-linked antibodies and anti-mouse IgG horseradish peroxidase-linked antibodies were from Cell Signaling whereas Cy3-conjugated anti-mouse secondary antibodies were obtained from Jackson ImmunoResearch Labs.

The following antibodies were used for flow cytometry analysis: phycoerythrine-conjugated mouse anti-human ABCB1 (BD Biosciences # 557003), phycoerythrine-conjugated mouse anti-human ABCG2 (BD Biosciences # 561180), mouse anti-human ABCC1 (BD Biosciences # 557594) and anti-mouse phycoerythrine-conjugated secondary antibodies (BD Biosciences # 555574).

## Viability assay

The growth inhibitory effects were determined by the MTT (3-(4, 5-dimethyl-thiazol-2yl)-2, 5-diphenyl-tetrazolium bromide) viability test as previously described [41] with minor modifications. Cells (7,000 cells per well for HCT-116, 10,000 per well for HT-29, SW480 and DLD-1) were seeded in 24-well plates in culture media containing 5% FCS, incubated in drug-free media for 24 hours followed by drug exposure for 120 hours. Cellular viability was determined by exposing cells to the MTT tetrazolium salt for 4 hours at 37°C and the formation of formazan was measured at 590 nm by a microplate reader. The IC<sub>50</sub> value is defined as the drug concentration causing

50% reduction of viable cells compared to the untreated control cells. All values are averages of at least 3 independent experiments each done in duplicate.

## Western blot analysis

Western blot analysis was carried out as described previously [61, 62] with minor modifications. Cells were harvested at 70% confluence and cellular lysates were prepared in RIPA buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris pH 7.4, 0.1% SDS, 1% NP-40, 2 mM EDTA, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 mM PMSF, 1 mM Na-F) supplemented with protease inhibitors (Roche) according to the manufacturer's instruction. Proteins were resolved on SDS-PAGE gels (8–12% acrylamide) in a denaturing buffer followed by transfer to nitrocellulose membranes. Membranes were incubated with anti-CD44, anti-CD133, anti-CD166, anti-Lgr5, anti-beta-catenin, anti-active beta-catenin or anti-actin antibodies followed by incubation with the appropriate secondary horseradish peroxidase-conjugated antibodies. Protein expression was revealed with enhanced chemiluminescence reagents (ECL Amersham).

## qRT-PCR

Total RNA was extracted from parental and drug-resistant HCT-116 and HT-29 cells with MRC Tri-reagent, according to the manufacturer's instructions. RNA quantity and purity was determined by using a NanoDrop ND-1000 and total RNA from each sample was reverse transcribed using Revertaid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific) followed by amplification of the DNA product with a SYBR Green kit (Promega). PCR primers were designed with the logiciel primer3 and gene expression was normalized to GAPDH as previously described [31].

The threshold was set above the non-template control background and within the linear phase of target gene amplification to calculate the number of cycles at which the transcript was detected. Gene expression values were calculated based on the comparative delta CT method [63] and normalized to the housekeeping gene GAPDH.

## Aldehyde dehydrogenase assay

The ALDFLUOR assay was performed according to the manufacturer's recommendations (StemCell Technologies). Briefly, cells were harvested with accutase (PAA), counted and rinsed with PBS buffer. Cells were re-suspended in the ALDFLUOR assay buffer and incubated with the ALDFLUOR substrate for 45 min at 37°C to allow substrate conversion. Then, half of the sample were transferred to tubes containing the specific ALDH inhibitor, diethylaminobenzaldehyde (DEAB). After centrifugation, cells were suspended in the ALDFLUOR assay buffer and the ALDH activity analysis was



determined by flow cytometry at 493 nm using a FACS LSR II (BD Biosciences).

### Colonspheres formation assay

For colonsphere formation, cells (100 cells) were incubated in serum-free media composed of DMEM and F12 (1:1) in 96-well ultra-low-attachment plates (Corning). The media was supplemented with B27 (Life Technologies), 20 ng/ml EGF (Sigma-Aldrich), 10 ng/ml fibroblast growth factor (Sigma), and 100 Units/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin (PAA). The resulting colonspheres were examined using an Olympus microscope (10x) after 14 days and representative images collected from at least five microscopic fields.

### Side population (SP) assay

The side population was determined as previously described [64] with minor modifications. Cells were collected by accutase, pelleted and resuspended in culture media with 2% FCS, 10 mM Hepes pH7.4 and 100 Units/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin followed by labelling with Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich) for 90 min 37°C, in the absence or presence of verapamil (Sigma-Aldrich). Then, cells were centrifuged and re-suspended in Hank's balanced saline solution (Life Technologies) containing 2% FCS and 10 mM Hepes. Cells were maintained in darkness at 4°C until flow cytometry analysis. The SP was determined by analysis of 10<sup>6</sup> cells using a FACS LSR II (BD Biosciences) after counterstaining with propidium iodide to identify dead cells.

### Flow cytometry analysis

Cells were grown to 70% confluence, detached with accutase, washed in PBS and fixed in PBS-PFA 1% for 10 minutes. Then, cells were labeled with phycoerythrine-conjugated mouse anti-human ABCB1, phycoerythrine-conjugated mouse anti-human ABCG2 or mouse anti-human ABCC1 followed by phycoerythrine-conjugated secondary antibodies.

### Immunocytochemistry

Cells were grown on coverslips for 24 hours. After washing with PBS, cells were fixed with 4% (v/v) paraformaldehyde in PBS for 20 minutes, washed twice with PBS-0.1% Tween 20 and permeabilized with 0.5% Triton x100 for 15 minutes at room temperature. Then, cells were washed and blocked for 30 minutes in 0.5% bovine serum albumin in PBS and incubated with anti-beta-catenin antibodies. The coverslips were washed with PBS-0.5% Tween 20 and incubated with Cy3-conjugated secondary. Cells were washed, counterstained with

DAPI, mounted with Vectashield (Vector Laboratories) and observed by microscopy. Fluorescent images were captured using an inverted microscope (Olympus CKX41) with a digital compact camera (Olympus camera C4000) and a 60x objective.

### WNT pathway reporter assay

For the luciferase reporter gene assays, cells were seeded in 12-well plates at 150,000 cells/well and incubated in drug-free media for 24 hours. Cells were then transfected with TOP-Flash (plasmids containing 3 TCF binding sites) and/or their negative counterpart FOP-Flash (plasmids containing mutant, inactive TCF binding sites) both from Upstate Technologies using the Fugene HD reagent (Promega). After 24 hours, cells were treated, or not, with various concentrations of ICG-001 or PKF118-320. The next day, the luciferase activity was determined using the luciferase assay system (Promega). RSV β-galactosidase vector was used for co-transfection in order to normalize the luciferase activity against β-galactosidase activity. All assays were performed in triplicate.

### Statistical analysis

The statistical analysis of experimental data was performed using a Student's paired *t*-test, and the results are presented as mean + SD. Symbols: \**p* < 0.05; \*\**p* < 0.01; \*\*\**p* < 0.001.

### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Guillaume Dorothee and Anne-Marie Faussat for help with flow cytometry.

### REFERENCES

1. Thirlwell C, Will OC, Domingo E, Graham TA, McDonald SA, Oukrif D, Jeffrey R, Gorman M, Rodriguez-Justo M, Chin-Aleong J, Clark SK, Novelli MR, Jankowski JA, et al. Clonality assessment and clonal ordering of individual neoplastic crypts shows polyclonality of colorectal adenomas. *Gastroenterology*. 2010; 138:1441–1454.
2. Cancer Genome Atlas Network . Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature*. 2012; 487:330–337.
3. Xu X, Hou Y, Yin X, Bao L, Tang A, Song L, Li F, Tsang S, Wu K, Wu H, He W, Zeng L, Xing M, et al. Single-cell exome sequencing reveals single-nucleotide mutation characteristics of a kidney tumor. *Cell*. 2012; 148:886–895.
4. Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Larkin J, Endesfelder D, Gronroos E, Martinez P, Matthews N, Stewart A, Tarpey P, Varela I, Phillimore B, Begum S, et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution

- revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med*. 2012; 366:883–892.
5. Longo DL. Tumor heterogeneity and personalized medicine. *N Engl J Med*. 2012; 366:956–957.
  6. Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA Jr, Kinzler KW. Cancer genome landscapes. *Science*. 2013; 339:1546–1558.
  7. Chisholm RH, Lorenzi T, Lorz A, Larsen AK, Almeida L, Escargueil AE, Clairambault J. Emergence of drug tolerance in cancer cell populations: an evolutionary outcome of selection non-genetic instability and stress-induced adaptation. *Cancer Res*. 2015; 75:930–939.
  8. Larsen AK, Escargueil AE, Skladanowski A. Resistance mechanisms associated with altered intracellular distribution of anticancer agents. *Pharmacol Ther*. 2000; 85:217–229.
  9. Rocca CJ, Poindessous V, Soares DG, Ouadrani KE, Sarasin A, Guérin E, de Gramont A, Henriques JA, Escargueil AE, Larsen AK. The NER proteins XPC and CSB, but not ERCC1, regulate the sensitivity to the novel DNA binder S23906: implications for recognition and repair of antitumor alkylators. *Biochem Pharmacol*. 2010; 80:335–343.
  10. Petitprez A, Poindessous V, Ouaret D, Regairaz M, Bastian G, Guérin E, Escargueil AE, Larsen AK. Acquired irinotecan resistance is accompanied by stable modifications of cell cycle dynamics independent of MSI status. *Int J Oncol*. 2013; 42:1644–1653.
  11. Blagosklonny MV. Why therapeutic response may not prolong the life of a cancer patient: selection for oncogenic resistance. *Cell Cycle*. 2005; 4:1693–1698.
  12. Blagosklonny MV. Oncogenic resistance to growth-limiting conditions. *Nat Rev Cancer*. 2002; 3:221–225.
  13. Sequist LV, Waltman BA, Dias-Santagata D, Digumarthy S, Turke AB, Fidias P, Bergethon K, Shaw AT, Gettinger S, Cosper AK, Akhavanfard S, Heist RS, Temel J, et al. Genotypic and histological evolution of lung cancers acquiring resistance to EGFR inhibitors. *Sci Transl Med*. 2011; 3:75ra26.
  14. Fan F, Gray MJ, Dallas NA, Yang AD, Van Buren G 2nd, Camp ER, Ellis LM. Effect of chemotherapeutic stress on induction of vascular endothelial growth factor family members and receptors in human colorectal cancer cells. *Mol Cancer Ther*. 2008; 7:3064–3070.
  15. Petitprez A, Larsen AK. Irinotecan resistance is accompanied by upregulation of EGFR and Src signaling in human cancer models. *Curr Pharm Des*. 2013; 19:958–964.
  16. Maugeri-Saccà M, Vigneri P, De Maria R. Cancer stem cells and chemosensitivity. *Clin Cancer Res*. 2011; 17:4942–4947.
  17. Bertrand FE, Angus CW, Partis WJ, Sigounas G. Developmental pathways in colon cancer: crosstalk between WNT, BMP, Hedgehog and Notch. *Cell Cycle*. 2012; 11:4344–4351.
  18. Ponta H, Sherman L, Herrlich PA. CD44: from adhesion molecules to signaling regulators. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003; 4:33–45.
  19. Bánky B, Rásó-Barnett L, Barbai T, Tímár J, Becságh P, Rásó E. Characteristics of CD44 alternative splice pattern in the course of human colorectal adenocarcinoma progression. *Mol Cancer*. 2012; 11:83.
  20. Stamenkovic I, Amiot M, Pesando JM, Seed B. A lymphocyte molecule implicated in lymph node homing is a member of the cartilage link protein family. *Cell*. 1989; 56:1057–1062.
  21. Bennett KL, Jackson DG, Simon JC, Tanczos E, Peach R, Modrell B, Stamenkovic I, Plowman G, Aruffo A. CD44 isoforms containing exon V3 are responsible for the presentation of heparin-binding growth factor. *J Cell Biol*. 1995; 128:687–698.
  22. Spix JK, Chay EY, Block ER, Klarlund JK. Hepatocyte growth factor induces epithelial cell motility through transactivation of the epidermal growth factor receptor. *Exp Cell Res*. 2007; 313:3319–3325.
  23. Orian-Rousseau V, Chen L, Sleeman JP, Herrlich P, Ponta H. CD44 is required for two consecutive steps in HGF/c-Met signaling. *Genes Dev*. 2002; 16:3074–3086.
  24. Keysar SB, Jimeno A. More than markers: biological significance of cancer stem cell-defining molecules. *Mol Cancer Ther*. 2010; 9:2450–2457.
  25. Levin TG, Powell AE, Davies PS, Silk AD, Dismuke AD, Anderson EC, Swain JR, Wong MH. Characterization of the intestinal cancer stem cell marker CD166 in the human and mouse gastrointestinal tract. *Gastroenterology*. 2010; 139:2072–2082. e5.
  26. Yui S, Nakamura T, Sato T, Nemoto Y, Mizutani T, Zheng X, Ichinose S, Nagaishi T, Okamoto R, Tsuchiya K, Clevers H, Watanabe M. Functional engraftment of colon epithelium expanded *in vitro* from a single adult Lgr5<sup>+</sup> stem cell. *Nat Med*. 2012; 18:618–623.
  27. Storms RW, Trujillo AP, Springer JB, Shah L, Colvin OM, Ludeman SM, Smith C. Isolation of primitive human hematopoietic progenitors on the basis of aldehyde dehydrogenase activity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; 96:9118–9123.
  28. Marcatò P, Dean CA, Giacomantonio CA, Lee PW. Aldehyde dehydrogenase: its role as a cancer stem cell marker comes down to the specific isoform. *Cell Cycle*. 2011; 10:1378–1384.
  29. Collura A, Marisa L, Trojan D, Buhard O, Lagrange A, Saget A, Bombled M, Méchighel P, Ayadi M, Muleris M, de Reynies A, Svrcek M, Fléjou JF, et al. Extensive characterization of sphere models established from colorectal cancer cell lines. *Cell Mol Life Sci*. 2013; 70:729–742.

30. Ivascu A, Kubbies M. Diversity of cell-mediated adhesions in breast cancer spheroids. *Int J Oncol.* 2007; 31:1403–1413.
31. Ferrand N, Gnanapragasam A, Dorothee G, Redeuilh G, Larsen AK, Sabbah M. Loss of WISP2/CCN5 in estrogen-dependent MCF7 human breast cancer cells promotes a stem-like cell phenotype. *PLoS One.* 2014; 9:e87878.
32. Kim M, Turnquist H, Jackson J, Sgagias M, Yan Y, Gong M, Dean M, Sharp JG, Cowan K. The multidrug resistance transporter ABCG2 (breast cancer resistance protein 1) effluxes Hoechst 33342 and is overexpressed in hematopoietic stem cells. *Clin Cancer Res.* 2002; 8:22–28.
33. Hirschmann-Jax C, Foster AE, Wulf GG, Nuchtern JG, Jax TW, Gobel U, Goodell MA, Brenner MK. A distinct “side population” of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004; 101:14228–14233.
34. Golebiewska A, Brons NH, Bjerkvig R, Niclou SP. Critical appraisal of the side population assay in stem cell and cancer stem cell research. *Cell Stem Cell.* 2011; 8:136–147.
35. Kuphal F, Behrens J. E-cadherin modulates Wnt-dependent transcription in colorectal cancer cells but does not alter Wnt-independent gene expression in fibroblasts. *Exp Cell Res.* 2006; 312:457–467.
36. Fischer V, Brown-Grant DA, Li FQ. Chibby suppresses growth of human SW480 colon adenocarcinoma cells through inhibition of  $\beta$ -catenin signaling. *J Mol Signal.* 2012; 7:6.
37. Shtutman M, Zhurinsky J, Simcha I, Albanese C, D’Amico M, Pestell R, Ben-Ze’ev A. The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999; 96:5522–5527.
38. Jho EH, Zhang T, Domon C, Joo CK, Freund JN, Costantini F. Wnt/beta-catenin/Tcf signaling induces the transcription of Axin2, a negative regulator of the signaling pathway. *Mol Cell Biol.* 2002; 22:1172–1183.
39. Emami KH, Nguyen C, Ma H, Kim DH, Jeong KW, Eguchi M, Moon RT, Teo JL, Kim HY, Moon SH, Ha JR, Kahn M. A small molecule inhibitor of beta-catenin/CREB-binding protein transcription. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004; 101:12682–12687.
40. Lepourcelet M, Chen YN, France DS, Wang H, Crews P, Petersen F, Bruseo C, Wood AW, Shivdasani RA. Small-molecule antagonists of the oncogenic Tcf/beta-catenin protein complex. *Cancer Cell.* 2004; 5:91–102.
41. Ouaret D, Larsen AK. Protein kinase C beta inhibition by enzastaurin leads to mitotic missegregation and preferential cytotoxicity toward colorectal cancer cells with chromosomal instability (CIN). *Cell Cycle.* 2014; 13:2697–2706.
42. Calcagno AM, Salcido CD, Gillet JP, Wu CP, Fostel JM, Mumau MD, Gottesman MM, Varticovski L, Ambudkar SV. Prolonged drug selection of breast cancer cells and enrichment of cancer stem cell characteristics. *J Natl Cancer Inst.* 2010; 102:1637–1652.
43. Moitra K, Lou H, Dean M. Multidrug efflux pumps and cancer stem cells: insights into multidrug resistance and therapeutic development. *Clin Pharmacol Ther.* 2011; 89:491–502.
44. Brown RL, Reinke LM, Damerow MS, Perez D, Chodosh LA, Yang J, Cheng C. CD44 splice isoform switching in human and mouse epithelium is essential for epithelial-mesenchymal transition and breast cancer progression. *J Clin Invest.* 2011; 121:1064–1074.
45. Mima K, Okabe H, Ishimoto T, Hayashi H, Nakagawa S, Kuroki H, Watanabe M, Beppu T, Tamada M, Nagano O, Saya H, Baba H. CD44s regulates the TGF- $\beta$ -mediated mesenchymal phenotype and is associated with poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* 2012; 72:3414–3423.
46. Cho SH, Park YS, Kim HJ, Kim CH, Lim SW, Huh JW, Lee JH, Kim HR. CD44 enhances the epithelial-mesenchymal transition in association with colon cancer invasion. *Int J Oncol.* 2012; 41:211–218.
47. Mashita N, Yamada S, Nakayama G, Tanaka C, Iwata N, Kanda M, Kobayashi D, Fujii T, Sugimoto H, Koike M, Nomoto S, Fujiwara M, Kodera Y. Epithelial to mesenchymal transition might be induced via CD44 isoform switching in colorectal cancer. *J Surg Oncol.* 2014; 110:745–751.
48. Shmelkov SV, Butler JM, Hooper AT, Hormigo A, Kushner J, Milde T, St Clair R, Baljevic M, White I, Jin DK, Chadburn A, Murphy AJ, Valenzuela DM, et al. CD133 expression is not restricted to stem cells, and both CD133+ and CD133- metastatic colon cancer cells initiate tumors. *J Clin Invest.* 2008; 118:2111–2120.
49. Yamamoto S, Tanaka K, Takeda K, Akiyama H, Ichikawa Y, Nagashima Y, Endo I. Patients with CD133-negative colorectal liver metastasis have a poor prognosis after hepatectomy. *Ann Surg Oncol.* 2014; 21:1853–1861.
50. Pitule P, Cedikova M, Daum O, Vojtisek J, Vycital O, Hosek P, Treska V, Hes O, Kralickova M, Liska V. Immunohistochemical detection of cancer stem cell related markers CD44 and CD133 in metastatic colorectal cancer patients. *Biomed Res Int.* 2014; 2014:432139.
51. Jordan NV, Johnson GL, Abell AN. Tracking the intermediate stages of epithelial-mesenchymal transition in epithelial stem cells and cancer. *Cell Cycle.* 2011; 10:2865–2873.
52. Lim J, Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions: insights from development. *Development.* 2012; 139:3471–3486.
53. Ayyanan A, Civenni G, Ciarloni L, Morel C, Mueller N, Lefort K, Mandinova A, Raffoul W, Fiche M, Dotto GP, Briskin C. Increased Wnt signaling triggers oncogenic conversion of human breast epithelial cells by a Notch-dependent mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006; 103:3799–3804.
54. Bafico A, Liu G, Goldin L, Harris V, Aaronson SA. An autocrine mechanism for constitutive Wnt pathway activation in human cancer cells. *Cancer Cell.* 2004; 6:497–506.

55. de La Coste A, Romagnolo B, Billuart P, Renard CA, Buendia MA, Soubrane O, Fabre M, Chelly J, Beldjord C, Kahn A, Perret C. Somatic mutations of the beta-catenin gene are frequent in mouse and human hepatocellular carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998; 95:8847–8851.
56. Gregorieff A, Pinto D, Begthel H, Destrée O, Kielman M, Clevers H. Expression pattern of Wnt signaling components in the adult intestine. *Gastroenterology*. 2005; 129:626–638.
57. Kabiri Z, Greicius G, Madan B, Biechele S, Zhong Z, Zaribafzadeh H, *et al*. Stroma provides an intestinal stem cell niche in the absence of epithelial Wnts. *Development*. 2014; 141:2206–2215.
58. Wu ZQ, Brabletz T, Fearon E, Willis AL, Hu CY, Li XY, Weiss SJ. Canonical Wnt suppressor, Axin2, promotes colon carcinoma oncogenic activity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012; 109:11312–11317.
59. Horst D, Chen J, Morikawa T, Ogino S, Kirchner T, Shivdasani RA. Differential WNT activity in colorectal cancer confers limited tumorigenic potential and is regulated by MAPK signaling. *Cancer Res*. 2012; 72:1547–1556.
60. Naik S, Dothager RS, Marasa J, Lewis CL, Piwnicka-Worms D. Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 Is Synthetic Lethal to Aberrant {beta}-Catenin Activation in Colon Cancer. *Clin Cancer Res*. 2009; 15:7529–7537.
61. Escargueil AE, Poindessous V, Soares DG, Sarasin A, Cook PR, Larsen AK. Influence of irrofulven, a transcription-coupled repair-specific antitumor agent, on RNA polymerase activity, stability and dynamics in living mammalian cells. *J Cell Sci*. 2008; 121:1275–1283.
62. Mésange P, Poindessous V, Sabbah M, Escargueil AE, de Gramont A, Larsen AK. Intrinsic bevacizumab resistance is associated with prolonged activation of autocrine VEGF signaling and hypoxia tolerance in colorectal cancer cells and can be overcome by nintedanib, a small molecule angiokinase inhibitor. *Oncotarget*. 2014; 5:4709–4721.
63. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001; 29:e45.
64. Goodell MA, Brose K, Paradis G, Conner AS, Mulligan RC. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating *in vivo*. *J Exp Med*. 1996; 183:1797–1806.



---

## **Annexe 3**

---

### **Functions and Clinical Implications of Autocrine VEGF Signaling in Colorectal Cancer**

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

# Functions and Clinical Implications of Autocrine VEGF Signaling in Colorectal Cancer

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

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

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

different factors associated with a therapeutic response to VEGF blockage and summarize future challenges.

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

## Introduction

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

---

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

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

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

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

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

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

## VEGF Signaling

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

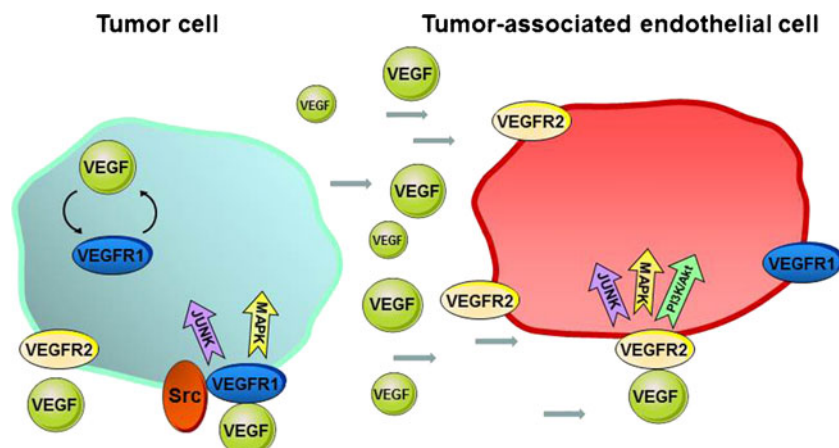
The VEGF ligands bind to three receptor tyrosine kinases, VEGFR1 (Flt-1), VEGFR2 (Flk-1/KDR), and VEGFR3, and to the neuropilins, membrane-associated co-receptors without tyrosine kinase activity [4, 5]. VEGF-B and PlGF bind

exclusively to VEGFR1 whereas VEGF-A can bind to both VEGFR1 and VEGFR2. VEGF-C and VEGF-D bind to VEGFR3 and are involved in lymph angiogenesis [6].

## Expression of VEGF Ligands and Receptors in CRC Cells and Tumors

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

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



**Fig. 1** VEGF signaling in colorectal cancer cells. CRC cells are a major source of VEGF that is secreted into the tumor environment. In the classical paracrine signaling pathway, tumor-derived VEGF associates with VEGF receptors on neighboring endothelial cells thereby inducing signaling pathways that promote endothelial cell survival, proliferation, and migration. These pathways include the Erk1/2 MAP kinase, JNK/SAPK, and PI3K-Akt pathways. In addition, the CRC cells express

functional VEGF receptors giving rise to autocrine VEGF signaling. Activation of tumor-associated VEGFR1 is accompanied by activation of Erk1/2 MAP kinase, JNK/SAPK, and the Src family of non-receptor tyrosine kinases. Autocrine VEGF signaling in CRC cells promotes migration, invasion, survival, and anchorage-independent growth. In addition to the surface-associated receptors there is evidence of internal (intracrine) VEGF signaling in CRC cells (reviewed in Ref. [29])

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

### Expression and Function of Placental Growth Factor

PlGF is recognized by aflibercept and is the target for a wide range of therapeutic antibodies under clinical development. However, the published data regarding the function, regulation, and expression of PlGF are often conflicting. One explanation might be that the four PlGF splice forms (PlGF1–4) in humans may not be expressed in the same tissues or have similar biological activity. Other data are more difficult to explain. For example, it has been reported that expression of PlGF in CRC cell lines and tumor tissues is low because of hypermethylation of the PlGF promoter which is accompanied by transcriptional downregulation [17]. However, q-PCR and immunohistochemical analysis

of 94 primary CRC tumors indicates that expression of the two PlGF isoforms, PlGF-1 and PlGF-2, is increased compared with background tissues [18]. In agreement, immunohistochemical analysis of PlGF expression in tissues from another 83 CRC patients revealed a significant correlation between PlGF expression and lymph node metastasis, tumor stage, and patient survival [19]. In patients with rectal cancer, plasma levels of PlGF and free VEGF were increased after bevacizumab treatment whereas exposure to classical cytotoxic agents had no effect [20]. In xenograft models, treatment with sFLT01, a fusion protein that neutralizes VEGF and PlGF caused a marked increase in circulating PlGF which principally represented a host response [21]. These results indicate that treatment with angiogenesis inhibitors affects expression and secretion of PlGF and VEGF by tumor and/or host cells. Currently, however, there are no conclusive data showing a clear correlation between circulating levels of VEGF ligands and tumor response to antiangiogenic therapy.

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

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

### Autocrine VEGF Signaling

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

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

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

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

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

#### HIF Signaling

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



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

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

### p53

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

### Wnt/beta-catenin

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

### EGFR Signaling

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

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

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

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

### Angiogenesis Inhibition and CRC Cell Survival

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

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

### Conclusions

Current evidence suggests that autocrine VEGF signaling is important in the survival, migration, invasion, and chemoresistance of colorectal cancer cells. Immunohistochemical analysis of patient tumors reveals that VEGF ligands and receptors are

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

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

### Compliance with Ethics Guidelines

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

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

Virginie Poindessous declares that she has no conflict of interest.

Anaïs Bouygues declares that she has no conflict of interest.

Mérim Ayadi declares that she has no conflict of interest.

Paul Mésange declares that he has no conflict of interest.

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

### References

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

- Of importance
- Of major importance

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

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



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