



Caractérisation moléculaire et fonctionnelle de la signalisation du VEGF dans les cellules cancéreuses colorectales chimio-naïves et résistantes aux médicaments

Sandrine Thouroude

► To cite this version:

Sandrine Thouroude. Caractérisation moléculaire et fonctionnelle de la signalisation du VEGF dans les cellules cancéreuses colorectales chimio-naïves et résistantes aux médicaments. Cancer. Sorbonne Université, 2021. Français. NNT : 2021SORUS003 . tel-03681663

HAL Id: tel-03681663

<https://theses.hal.science/tel-03681663>

Submitted on 30 May 2022

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.

**THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE
PIERRE ET MARIE CURIE**

Ecole doctorale : Physiologie, Physiopathologie et thérapeutique

**CARACTERISATION MOLECULAIRE
ET FONCTIONNELLE DE LA
SIGNALISATION DU VEGF DANS LES
CELLULES CANCEREUSES
COLORECTALES CHIMIO-NAIVES ET
RESISTANTES AUX MEDICAMENTS**

Présentée et soutenue publiquement

par : **Sandrine THOUROUDE**, le

11/02/2021

Devant le jury composé de :

Directeur de thèse : Dr Annette K. LARSEN

Co-directeur de thèse : Dr Grigoris GEROTZIAFAS

Président : Pr Jean-Pierre LOTZ

Rapporteur : Dr Christine GEFFRIAUD-RICOUARD

Rapporteur : Dr Isabelle MUS-VETEAU

Examineur : Dr Marc VASSE

REMERCIEMENTS

Très chers membres du jury,

Tout d'abord, je tiens à m'adresser au **Dr Annette K. Larsen**, ma directrice de thèse sans qui tout ce travail n'aurait pas pu à avoir lieu, c'est pour cela que je la remercie chaleureusement. Elle m'a permis dans un premier temps de pouvoir réaliser mon stage de master 2. Vous m'avez ensuite offert l'opportunité de « continuer l'aventure » en poursuivant mon cursus en thèse sur ce même projet. Pour cela, je ne la remercierais jamais assez de s'être démenée afin de me trouver un financement pour ces quatre années et « COVID-19 » oblige qui s'est prolongé de deux mois cinquième année. Vous m'avez permise d'acquérir un bagage scientifique conséquent par le biais de votre encadrement, des formations animales que vous m'avez permises de faire mais également avec la participation à des congrès internationaux renommés. J'aurais bientôt la chance d'apparaître dans un bon nombre d'articles pour lesquels vous cibler de prestigieux journaux. Ainsi, vous m'avez fait confiance pendant toutes ces années et je vous remercie de vos encouragements et de votre bienveillance tant sur le plan professionnel que personnel. Je me souviendrais de nos longues discussions sur la politique internationale ou française dont je n'étais franchement pas très renseignée.

Je n'oublie pas non plus mon second directeur de thèse, le Dr **Grigoris Gerotziafas**, qui a été essentiel également à la réussite de ses projets. Il s'est aussi démené pour me trouver un financement en collaboration avec Annette. Il m'a également permis de faire grandir mes connaissances sur un domaine qui m'était totalement inconnu : l'hémostase. Domaine qui s'est révélé pour moi être à la fois complexe mais également très intéressant. Il a su être là pour me venir en aide du début jusqu'à la fin. Pour tout cela je vous remercie également. Nos échanges m'ont toujours été bénéfiques tant professionnellement que personnellement. Je me souviendrais de nos échanges sur nos vacances, sur le surf (que votre fille pratique), sur l'équitation (que vous voudriez essayer avec votre famille), sur Provins (la fameuse ville médiévale dans laquelle j'ai grandi). Tant de choses à dire, mais je vais m'arrêter là et vous dire encore une fois un grand merci.

Je remercie le Pr Jean-Pierre Lotz qui me fait l'honneur de présider mon jury de thèse.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude au **Dr Christine Geffriaud-Ricouard** et au **Dr Isabelle Mus-Veteau** pour avoir accepté d'être rapportrices de ma thèse. Nos échanges scientifiques m'ont déjà énormément apporté et je vous remercie déjà pour cela et souhaite qu'ils perdurent ainsi. Merci également pour l'enthousiasme dont vous avez fait preuve en acceptant immédiatement d'évaluer ce travail.

Enfin je remercie le **Dr Marc Vasse** qui me fait l'honneur d'être examinateur de ma thèse.

À mon équipe,

Je remercie tout d'abord le **Dr Michèle Sabbah** qui a toujours été bienveillante envers moi autant dans les moments de rigolades, que les moments un peu moins drôles. C'est un peu la bonne fée du labo, toujours là pour nous conseiller, nous aider quand on a besoin tant scientifiquement que personnellement mais aussi nous remettre en place (toujours gentiment bien sûr) quand il faut (en même temps, il faut parfois 😊). Merci aussi pour toutes tes petites attentions gourmandes le matin en arrivant au labo.

Je remercie également le **Dr Nathalie Ferrand** pour son aide précieuse, son soutien aussi en toutes circonstances. Je me souviendrais de nos longues discussions dans ton bureau ou lors de nos repas partagés, de nos nombreuses « avis de recherche » de produits égarés. Merci pour tout !

Merci également au **Dr Patrick Van Dreden**. Un soutien de tous les jours, de toutes les heures ! Merci pour ton aide tant professionnel que personnel. Merci pour ces moments dans le bureau étudiant à discuter de choses et d'autres, à me partager tes photos de voyages fabuleux, à partager ta passion de la plonger avec moi. Pour tout cela merci encore !

Un grand merci à Romain Morichon, pour ce temps passé à établir mon protocole de vasculogénèse, à chercher la meilleure façon d'avoir des photos magnifiques. De m'avoir créé une macro pour me permettre d'analyser mes images rapidement. Et aussi à toutes ces discussions dans l'ombre de ta pièce de microscopie et aussi dans le froid souvent =).

Merci également au **Dr Jérôme Denis**, pour tout son soutien.

Je tiens à remercier aussi tous les doctorants encore présents et passés du laboratoire :

La toute première c'est bien évidemment toi, ma petite **Lila**, mon tac-tac, mon lilaloum, tu as et tu resteras je pense mon acolyte pour toujours. On a commencé ensemble et on finit ensemble c'est plutôt une sacrée belle histoire tant professionnellement que surtout amicalement ! Tu as toujours été là pour moi ! Je ne sais quel souvenir m'aura le plus marqué, tellement il y en a eu. Nos chansons à tue-tête dans le fameux bureau 17, nos voyages en congrès où bien évidemment inséparables qu'on est, on prenait toujours une seule chambre pour 2, nos fous rires, nos diverses aventures plus loufoques les unes que les autres. Bref, merci à toi mon tac tac car sans toi ces 5 années n'auraient pas été pareilles.

Mauricette, le plus ancien de tous mais qui est toujours là au final. Merci pour tous ces moments de fous rires dont je tairais leur origine. Pour tous ces moments de très haute gastronomie 😊. Je pense que tu te souviendras à jamais de toutes les chansons plus pourries les unes que les autres que l'on a chanté dans tes oreilles avec Lila. A notre sortie « Escape Game » où on a littéralement explosé l'équipe adverse (n'est-ce pas Justine, Elodie et Ambrounette).

Anaïs, ma petite licorne, merci d'avoir été là pour me soutenir aussi. Je me souviens encore de ces longues journées passées à l'animalerie pour nos petites souris, mais toujours dans la bonne humeur, à rigoler, à chanter, à mourir de faim aussi. Merci pour ces restaurants partagés, pour les moments avec la petite victoire aussi.

Ambrounette, Mon petit Sumo, bon j'épargnerais ici l'origine de ce surnom. Mais merci pour ce sourire constant que tu as eu. C'est aussi avec toi que j'ai commencé mon expérience scientifique dans la recherche, tu as su être une très bonne pédagogue pour m'apprendre les premières bases de la recherche afin de me laisser ensuite décoller avec mes propres petites ailes. Je me souviens encore, alors rappelons-le que tu es partie il y a un moment maintenant, de tes « j'ai faim » à 11h00. Je me souviens aussi de notre petite séance de gym suédoise, de notre soirée Halloween. Bref pleins de bons moments toujours dans ma mémoire.

Mehdichette, ou devrais-je dire Ozghür, ralala nos surnoms 😊, merci à toi aussi pour ta bonne humeur de tous les jours ou presque (mais même quand tu râlais c'était drôle), pour ces échanges musicaux de très bons goûts, pour tes allers retours en trottinette dans le couloir en faisant le bruit d'une sirène, tes danses venues d'un autre monde, ton talent d'imitateur fou. Bref, tu as su égayer ces années de thèse.

Je n'oublie pas non plus, **Clémentoche** (ma petite mandarine clémentine), **Katyana** (ma petite lenteur des îles), **Elodie** (Mon acolyte des soirées arrosées mais juste un peu 😊), **Justine** (ma Youstine Chivotte, la plus perchée de tous mais mon dieu mais c'est pour ça qu'on l'adore), **Marjo, Adrien, Marc antoine** (ou MAB pour les intimes) et j'en oublie peut-être mais vous avez tous marqués un moment de cette folle aventure.

À ma famille et mes amis,

À ma maman, qui n'y est pas pour rien dans le chemin qui m'a mené ici et qui est et restera à jamais la bonne étoile qui veille sur moi de là-haut.

À mon papou, le plus fabuleux de tous, je n'ai pas de mots à dire sauf ceux-là je t'aime !

À mon chéri, d'être là depuis maintenant 9 ans et de me soutenir dans mon parcours professionnel comme il le fait ! De me faire rire quand j'en ai besoin. De parler pendant des heures de moto parce qu'il adore ça, à contrario de m'écouter parler et reparler de ma passion qui prend beaucoup de place et qu'il accepte tout de même. Merci pour tout mon amour !

À mes copines de tous les temps, Aurore et Audrey d'être des amies fidèles depuis la primaire et le collège, et de rester toujours présentes les unes pour les autres malgré la distance qui nous sépare et nos emplois du temps de ministre.

À mes copines d'écuries, ma charli charlotte pour avoir été d'abord une coach hors-pair puis maintenant une amie sans faille, soutien de tous les jours dans toutes les circonstances. Ma chrichri d'am, d'être ce que tu es, ta générosité sans faille, ton soutien à tout moment, d'être mon acolyte à cheval avec nos séances sportives du dimanche. Mon brithouche, toujours là pour me faire rire, pour me soutenir, pour passer d'excellentes aventures pour aller voir doudou ou pour passer des soirées pré-concours à parler de tout et de rien, merci mon brithouche d'être là. A mon Milou, ma

Popo, ma petite Rino, M pour tous ces moments de rigolades partagés et pour leur présence en toutes circonstances.

SOMMAIRE

LISTE DES ABBREVIATIONS	1
CONTEXTE SCIENTIFIQUE.....	Erreur ! Signet non défini.
INTRODUCTION.....	9
CHAPITRE I : Les cancers colorectaux	11
I- Incidence et Mortalité :	11
II- Les facteurs de risque du cancer colorectal :	12
III- La carcinogénèse du cancer colorectal :	15
1) Les tumeurs avec instabilité chromosomique :	15
2) Les tumeurs avec instabilité microsatellitaire :	17
3) Les tumeurs avec hyperméthylation des îlots CpG	19
CHAPITRE II : Classification de la progression tumorale et traitements du cancer colorectal.....	21
I- Classification de la progression tumorale :.....	21
1) Les critères retenus :.....	21
2) La classification TNM :	23
3) Une classification moléculaire :.....	27
II- Traitements du cancer colorectal :	30
1) La Chirurgie : Traitement « clé » du CCR	31
2) La radiothérapie :	31
3) La chimiothérapie :	32
4) Les thérapies ciblées :	43
CHAPITRE III : Acquisition d'une résistance au traitement : un souci majeur ..	53
I- Mécanismes cellulaires basés sur le transport.....	54
1) Efflux excessif des médicaments :.....	54
2) Influx difficile des médicaments :	56
II- Echappement à l'apoptose et chimiorésistance	57
III- Mécanismes cellulaire de résistance spécifique à chaque médicament	58
1) 5-FU	58
2) Oxaliplatine.....	59
3) Irinotécan.....	59
CHAPITRE IV : Migration et Invasion, une mobilité nécessaire à la progression tumorale.....	61
I- Un changement phénotypique préalable : la Transition Epithelio-Mésenchymateuse (EMT)	61

II- La Migration : Mobilité planaire des cellules	63
III- L'invasion : atteinte des tissus en profondeur.....	66
CHAPITRE V : La vascularisation tumorale, une étape clé dans l'agressivité tumorale.....	69
I- L'angiogenèse	69
1) Généralités.....	69
2) Importance de l'angiogenèse dans le développement tumoral.....	70
II- Le mimétisme vasculaire : un nouveau mode de vascularisation tumorale agressif	75
1) Mise en évidence et définition du processus de « mimétisme vasculaire »	76
2) Un processus délétère pour la survie des patients	77
3) Un mécanisme moléculaire non élucidé	78
CHAPITRE VI : Facteur tissulaire, Coagulation et Cancer.....	81
I- Structure et activation du TF	81
II- TF et potentiel pro-coagulant des cellules cancéreuses	83
III- TF, Croissance cellulaire, angiogénèse et lien étroit avec VEGF	86
1) Voie de régulation indirecte de l'angiogenèse via le facteur tissulaire	87
2) Voie de régulation directe de l'angiogenèse via le facteur tissulaire	88
3) Activation plaquettaires, coagulation et résistance à la chimiothérapie.....	89
CHAPITRE VII : Le VEGF : acteur central dans le développement de l'agressivité tumorale	91
I- La découverte du VEGF en lien avec la vascularisation	91
II- La signalisation VEGF	92
1) Les ligands.....	92
2) Les récepteurs	95
III- La tumeur colorectale, source de VEGF et implication dans la migration, l'invasion et le mimétisme vasculaire	99
OBJECTIFS DES TRAVAUX.....	100
RESULTATS.....	100
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	100
ANNEXE 1	100
ANNEXE 2 : Liste d'abstracts	100
BIBLIOGRAPHIE.....	100

LISTE DES ABBREVIATIONS

1,2,3....

5-FdUMP : 5-Fluorodesoxyuridine MonoPhosphate

5-FdUTP : 5-Fluorodesoxyuridine TriPhosphate

5-FU : 5-Fluorouracile

5-FUTP : 5-Fluorouridine TriPhosphate

A

ABC : ATP Binding Cassette

ADCC : Antibody-Dependant Cell-mediated Cytotoxicity

ADN : Acide DeoxyriboNucléique

AJCC : American Joint Committee on Cancer

APC : Adenomatous Polyposis Coli

APC : 7-ethyl-10-[4-N-(5-aminopentanoicacid)-1-piperidino] carbonyloxycamptothecin

B

BAX : BCL2-Associated X protein

BRAF : Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B

C

CALCA : Calcitonine

CCR : Cancer Colorectal

CCRH : Cancer ColoRectal Hériditaire

CE : Cellules endothéliales

CES : CarboxylEsterase

CIMP: CpG Island Methylator Phenotype

CIN: Chromosomal Instability

CMS: Consensus Molecular Subtypes

CPT-11 : Camptothecin ou Irinotecan

CT: Chimiothérapie

CTC : Cellules Tumorales Circulantes

CTLA4 : Cytotoxic T Lymphocyte Antigene 4

D

DPD : DihydroPyrimidine Deshydrogénase

E

EGF : Epidermal Growth Factor

EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor

EMT : Epithelial Mesenchymal Transition

EPCAM : Epithelial Cell Adhesion Molecule

EphA2 : Ephrin A2 Receptor

F

FDA : Food and Drug Administration

FIT : Fecal Immunology Test

FOBT: Fecal Occult Blood Test

FT : Facteur de Transcription

H

HIF-1 : Hypoxia Induced Factor 1

HLTF : Helicase-Like Transcription Factor

HNPCC : Hereditary non polyposis Colorectal Cancer

HPCC : Hereditary polyposis Colorectal Cancer

I

IgG : ImmunoGlobuline de type G

K

KRAS : Kirsten Rat Sarcoma viral

L

LN5y2 : Laminin 5y2

LOH : Loss of Heterozygosity

M

MET : Mesenchymal Epithelial Transition

MICI : Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin

MMR : Mismatch Repair

MMP : MetalloProtease

MLH 1 : MutL homolog 1
MRP : Multidrug Resistance associated Protein
MSH : MutS homolog
MSI : MicroSatellite Instability
MSS : MicroSatellite Stability
MTEV : Maladie ThromboEmbolique Veineuse
MYC : Myelocytomatosis

N

NBD : Nucleotid Binding Domain
NCI : National Cancer Institute
NER : Nucleotid Excision Repair
NK : Natural Killer
NPC : 7-ethyl-10-(4-amino-1- piperidino) carbonyloxycamptothecin
NRP : Neuropilin

O

OMS : Organisation Mondiale de la Santé
ORPT : ORotate Phosphoribosyl Transferase
OXA : Oxaliplatine

P

PAF: Polypose Adénomateuse Familiale
PAR-2 : Protease Activated Receptor 2
PD-1 : Program Death 1
PFS: Progression Free Survival
PGE2 : Prostaglandin E2
P-Gp : Glycoprotein P
PI3K : "PhosphoInositide 3-Kinase
PIGF: Placental Growth Factor
PMS2: PostMeiotic Segregation Increased 2
PSGL 1 : P- Selectin Glycoprotein Ligand 1

S

SG : Survie Générale

SSP : Survie Sans Progression

SL : Syndrome de Lynch

SLC : SoLute Carrier

SN-38: 7-Ethyl-10-hydroxycamptothecin

T

TF : Tissue Factor

TFPI : Tissue factor pathway inhibitor

TGF- β : Transforming Growth Factor β

TGF β RII : Transforming Growth Factor β Receptor II

Tj : Tight Junction

TMD : TransMembrane Domain

TNM : Tumor Nodes Metastasis

TP53 : Tumor Protein p53

TP : Thymidilate Phosphate

TS : Thymidilate Synthase

U

UGTA-1 : Uridine diphosphate Glucuronosyl Transferase 1

UICC : Union for International Cancer Control

UP : Uridine Phosphate

uPA : Urokinase Plasminogen Activator

uPAR : Urokinase Plasminogen Activator Receptor

USPSTF: United States Preventive Services Task Force

V

VE-Cadherin : Vascular Endothelial Cadherin

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

VEGFR: Vascular Endothelial Growth Factor Receptor

VM : Vascular Mimicry

W

WT1: Wilms' Tumor protein 1

Résumé

Le cancer colorectal (CCR) touche chaque année plus d'un million de personnes dans le monde. Il est le 3^e cancer le plus fréquent en France et le 2^e en terme de mortalité. La France est d'ailleurs l'un des pays d'Europe où l'incidence du CCR est la plus élevée, tous sexes confondus. Dans les cas de CCR localisés, la chirurgie associée à un traitement adjuvant donne d'assez bons résultats et permet généralement la guérison des patients. Cependant, dans le cas des CCR métastatiques, l'efficacité de ce type de traitement est limitée. C'est pourquoi, la compréhension des processus biologiques fondamentaux dans le cancer reste un enjeu de santé publique majeur. En effet, la mortalité peine à diminuer drastiquement car il existe encore de nombreux échecs thérapeutiques expliqués notamment soit par le développement d'une chimiorésistance, soit par la présence de cellules cancéreuses présentant des caractéristiques agressives (Migration, Invasion, Vascularisation accentuées...).

En utilisant différentes lignées de cellules colorectales cancéreuses chimionaïves et chimiorésistantes, nous montrons dans ces travaux de thèse que l'acquisition d'une chimiorésistance confère tout d'abord un pouvoir migratif et invasif plus importants. Nous montrons également que deux des lignées chimiorésistantes, les HCT-116/5FU et les HCT-116/OXA acquièrent la capacité à former leur propre réseau vasculaire, c'est ce que l'on appelle le mimétisme vasculaire. Cela montre donc qu'une résistance acquise notamment au 5FU ou à l'Oxaliplatine peut se révéler être très « dangereuse ». Nous avons donc cherché à comprendre quel acteur pouvait être responsable des modifications observées. Nous nous sommes alors penchés sur la voie de signalisation VEGF, puisqu'il est connu que les différents agents de chimiothérapie influencent cette voie et nous savons également que les mécanismes cellulaires étudiées ici (migration, invasion, angiogenèse, mimétisme vasculaire...) sont également liés à cette signalisation. Nous montrons finalement que le VEGF-A est sécrété de manière plus abondante dans les cellules chimiorésistantes. Nous confirmons cela par l'utilisation d'un inhibiteur anti-VEGF approuvé cliniquement dans le traitement du CCR, l'aflibercept. En effet, nous montrons que ce dernier est capable de réduire de manière significative le potentiel migratif, invasif des cellules tumorales

chimiorésistantes. Il réduit aussi considérablement le phénomène de mimétisme vasculaire.

Ainsi, nous montrons très clairement l'implication de la signalisation VEGF dans le développement de ce phénotype « agressif » suite à l'acquisition d'une chimiorésistance. Nous offrons même une option thérapeutique partielle, l'aflibercept.



INTRODUCTION



CHAPITRE I : Les cancers colorectaux

I- Incidence et Mortalité :

Le cancer du côlon est un problème majeur de santé publique. En effet à l'échelle mondiale, le cancer colorectal est le troisième cancer le plus fréquent chez les hommes et le deuxième chez les femmes, avec 1,8 millions de nouveaux cas et près de 861 000 décès en 2018 selon la base de données GLOBOCAN de l'OMS¹.

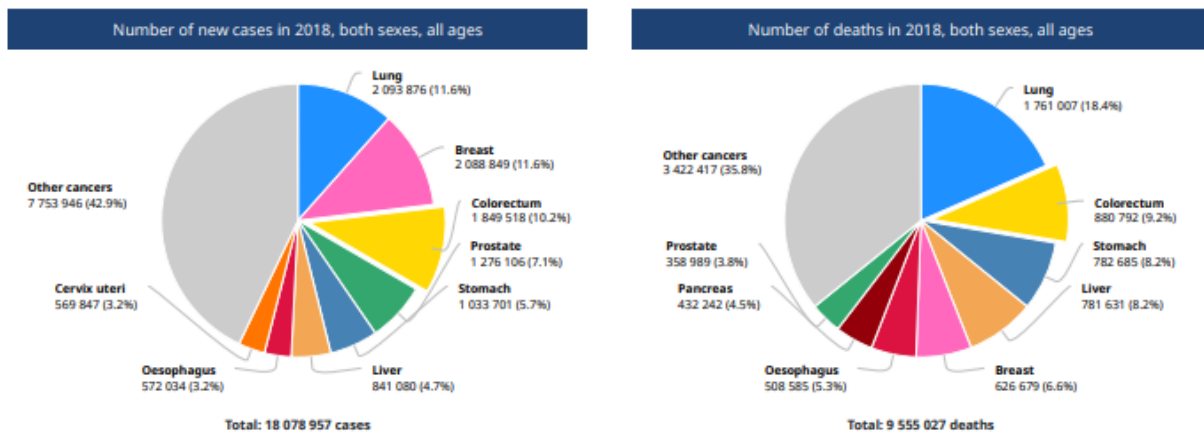


Figure 1: Incidence et mortalité des principaux cancers dans le monde (Globocan, 2018)

En France, le CCR représente 11% de l'ensemble des nouveaux cas de cancers masculins, et féminins et la deuxième cause de mortalité liée au cancer, soit près de 12% de l'ensemble des décès annuels. Il se situe, au 3^{ème} rang des cancers les plus fréquents chez l'homme, après ceux de la prostate et du poumon. Chez les femmes le CCR est le deuxième plus fréquent après le cancer du sein.²

Depuis 1990, l'incidence du CCR est relativement stable voir diminue (-0.6% de nouveaux cas) alors que la mortalité présente une discrète diminution (-1.6% de décès entre 1990 et 2018)².

La mise en place d'une politique de santé publique de prévention et de diagnostic précoce du CCR (i.e. dépistage systématique par colonoscopie chez certains groupes

de citoyens, résection de lésions précancéreuses ; détection de cancers à un stade précoce) est à l'origine en partie de la diminution de la mortalité. Le progrès au niveau des stratégies thérapeutiques (interventions chirurgicales, chimiothérapies et thérapies ciblées, radiothérapie) est un autre facteur déterminant pour l'amélioration du taux de mortalité.

Néanmoins, malgré toutes les avancées thérapeutiques et une meilleure prise en charge des patients, la décroissance de la mortalité observée n'est pas celle attendue. La mortalité chez les patients avec un CCR est multifactorielle. Toutefois, le développement d'une résistance aux traitements anticancéreux - tant aux agents chimiothérapeutiques classiques qu'aux thérapies ciblées - figure parmi les premiers prédictors liés à une évolution défavorable des patients.

II- Les facteurs de risque du cancer colorectal :

Un certain nombre de facteurs de risque, aussi bien environnementaux que génétiques, favorisant le développement d'un CCR ont été décrits :

→ **L'âge** : Le risque de développer un CCR augmente avec l'âge. En effet, plus de 90% des personnes diagnostiquées atteints de la maladie sont âgées de plus de 50 ans, avec un âge moyen au moment du diagnostic de 71 ans. Les personnes âgées de 65 à 85 ans sont six fois plus susceptibles de développer un cancer colorectal que les personnes de moins de 50 ans ³.

→ **Le mode de vie** : L'alimentation influence fortement le risque de cancer colorectal, et des changements dans les habitudes alimentaires pourraient réduire de 70 % son développement ⁴. Les régimes riches en sucres et en graisses, en particulier en graisses animales, et la surconsommation de viandes rouges sont des facteurs de risque majeurs de cancer colorectal. A contrario, un régime riche en fibres permet de diminuer les risques de développer un cancer ⁵.

Des études épidémiologiques ont montré que les facteurs liés au mode de vie et à l'obésité influent sur le développement de divers types de cancer, en particulier le CCR. En effet, une association synergique est observée entre l'inactivité physique et l'obésité puisque plus la BMI est élevée, plus le risque de développer un CCR est

augmenté ⁶. A contrario, une méta-analyse a montré que l'activité physique s'associe à une diminution de 24 % du risque de cancer du côlon ⁷.

La consommation d'alcool (au-delà de 15g par jour) serait responsable d'une augmentation de 8 % du risque de CCR et de 24 % du risque de polypes dentelés.

Le tabac serait associé à une augmentation de 114 % du risque de développer des polypes adénomateux et des CCR chez les fumeurs⁸. En effet, les fumeurs ayant consommés du tabac pendant plus de 20 ans ont un risque plus élevé de développer un cancer du côlon. Le risque attribuable est de 21% chez les hommes et de 12% chez les femmes. Cela s'expliquerait, en partie, par la présence dans la fumée de cigarettes de substances cancérigènes qui interagissent avec le gène APC, responsable de l'initiation de la carcinogénèse colorectale lorsqu'il est muté ³.

→ **Les antécédents personnels ou familiaux d'une autre pathologie** : Le cancer colorectal a été reconnu comme une complication potentielle de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) depuis la description d'un cas de colite ulcéreuse par Burrill Crohn dans les années 1920s ⁹.



Figure 3 : Illustrations d'un côlon humain sain VS atteint de la maladie de Crohn ou d'une colite ulcéreuse

Dans une méta-analyse de plus de 100 études portant sur le risque de CCR dans les colites ulcéreuses, Eaden et al. ont pu confirmer l'augmentation du risque de développer un cancer colorectal dans le temps¹⁰. Dans une seconde méta-analyse chez des patients atteints de la maladie de Crohn, Canavan et al. ont démontré que le risque relatif global de CCR dans la maladie de Crohn était de 4,5 (sur une échelle allant de 1,3 à 14,9)¹¹.

Les femmes ayant présentées 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. En effet, dans l'étude de Lu et al. portant sur une cohorte de 179 733 patientes atteintes d'un cancer du sein en Suède. 2571 cas de cancer ont été identifiés au cours d'un suivi moyen de 9,68 ans ¹².

→ **Les facteurs génétiques et héréditaires** : Le cancer colorectal héréditaire (CCRH) n'est pas une maladie unique ; c'est un groupe de maladies ou de syndromes, qui ont une composante génétique mutationnelle. Il se subdivise en deux grands groupes : les HNPCC (cancer colorectal héréditaire sans polypose) et les HPCC (cancer colorectal par polypose héréditaire).

Le HNPCC est un syndrome de cancer autosomique dominant. L'incidence de ce syndrome est de 1,7 à 4,2% parmi l'ensemble des patients atteints de CCR, (représentant 3 à 8 cas par million d'habitants dans le monde, selon Globocan 2018). Parmi ces HNPCCs, le syndrome de Lynch (SL) est le plus courant et est corrélé avec un risque accru de cancer colorectal, de l'endomètre, des ovaires, de l'estomac et de l'intestin grêle. Les autres HNPCCs moins répandus sont le syndrome de Muir-Torre dont l'incidence est de 2 cas pour dix millions d'habitants, selon Globocan 2018 ; et le syndrome de Turcot de type I (lié à une mutation du gène MMR)¹³.

Le HPCC représente environ 3 à 5 % de tous les cas de CCR (soit 5 à 9 cas par million d'habitants dans le monde, selon Globocan 2018). La polypose adénomateuse familiale (PAF) est liée aux mutations germinales du gène APC responsable de l'apparition de centaines ou de milliers de polypes adénomateux¹³.

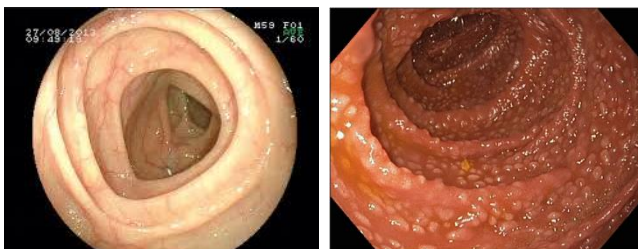


Figure 4 : Illustrations d'un côlon humain sain VS atteint

III- La carcinogénèse du cancer colorectal :

Chaque cellule de l'organisme dotée d'un noyau est composée d'environ 35 000 gènes qui sont dupliqués à chaque division cellulaire, ceci entraînant un risque d'apparition d'anomalies génétiques. L'épithélium digestif se renouvelle tous les trois jours environ. C'est dire la fréquence des processus de mitose, donc la possible fréquence d'apparition de mutations ou d'autres anomalies génétiques, qui dans la très grande majorité sont souvent sans conséquence. Cependant, certaines anomalies génétiques échappant à la surveillance cellulaire, favorisent une prolifération, créant la formation d'un clone de cellules, qui dans des conditions favorables pourrait évoluer à une tumeur.

Toute tumeur, bénigne ou maligne, résulte de nombreuses anomalies génétiques au niveau de cellules qui appartiennent au clone ¹⁴

Trois grands mécanismes sont impliqués dans la carcinogénèse colorectale : l'instabilité chromosomique (CIN), l'instabilité des microsatellites (MSI) et l'hyperméthylation des îlots CpG (Cytosine-Phosphate-Guanine) des promoteurs (CIMP)

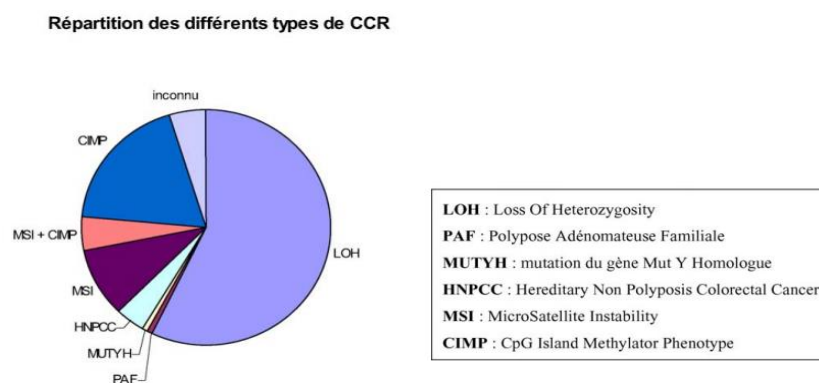


Figure 5 : Répartition des différents types de cancers colorectaux.

1) Les tumeurs avec instabilité chromosomique :

L'instabilité chromosomique est le mécanisme le plus fréquent dans la carcinogénèse colorectale, en effet elle est responsable de 85% des cancers sporadiques mais elle est également observée dans de nombreux cas de PAF (Polyposis Adénomateuse Familiale) ¹⁵.

Dans la majorité des tumeurs, il est observé un nombre anormal de chromosomes au sein des cellules (aneuploïdie) suggérant une instabilité chromosomique, responsable de pertes ou de gains de fragments ou de chromosomes entiers. Ces remaniements chromosomiques ont été mis en évidence par des études de pertes d'hétérozygotie (Loss Of Heterozygosity - LOH). C'est pourquoi ces cancers sont appelés LOH+ ou MicroSatellite Stability cancer (MSS) ou CIN (Chromosomal INstability).

Les régions les plus fréquemment perdues dans les tumeurs colorectales primitives se situent sur le bras court du chromosome 1 (1p32-36, 30 à 50 %), le bras long du chromosome 5 (5q21-q22, 37 %), le bras court du chromosome 8 (8p11.2-p12, 8p22- p22.3), le bras court du chromosome 17 (17p13, 75 %), le bras long du chromosome 18 (18q21->qter, 67 %), et le bras long du chromosome 22 (22q12-q13, 40 %). Un certain nombre de gènes suppresseurs de tumeurs ont été identifiés dans les régions délétées : APC, K-RAS et p53 ¹⁶.

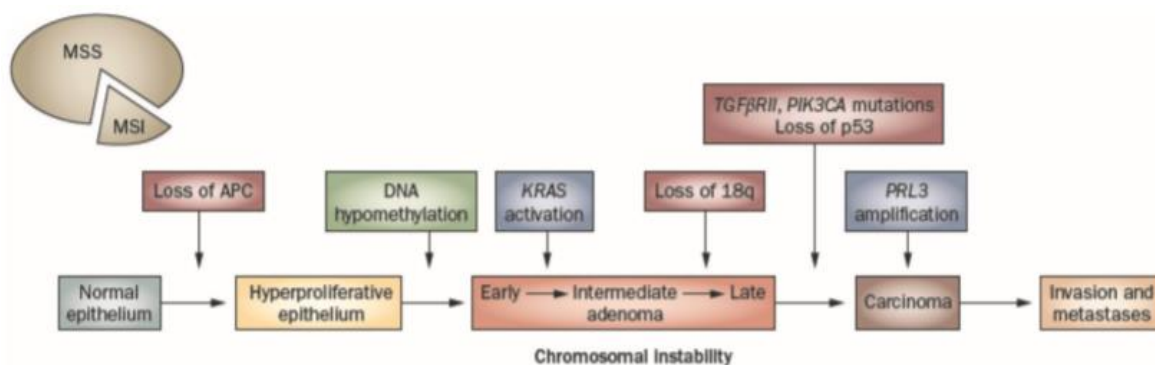


Figure 6 : Carcinogénèse colorectale par instabilité de l'ADN. (D'après Laurenty et al. 2014)

La mutation initiale de cette voie de carcinogénèse porte sur le gène APC qui est un suppresseur de tumeurs. La protéine codée est une protéine multifonctionnelle, qui interagit avec différentes protéines dans la cellule incluant la β -caténine, la γ -caténine, la « glycogen synthase kinase » (GSK-3 β), l'axine et la tubuline. Les mutations spontanées de ce gène sont relativement fréquentes (retrouvées dans 80% des CCR). Les mutations « inactivatrices » du gène APC ont pour résultat l'insuffisance de la régulation de la β -caténine produisant l'hyperprolifération de l'épithélium colique ¹⁷.

Peut s'en suivre, une mutation du gène K-RAS, qui est elle aussi précoce dans la séquence adénome-cancer. Environ 30 à 50 % des tumeurs colorectales sont connues pour avoir un gène K-RAS muté ¹⁸. L'oncogène K-RAS code une protéine de 21 kDa impliquée dans la traduction du signal des voies de régulation importantes pour la prolifération normale et la différenciation. Les mutations « activatrices » du gène KRAS induisent une croissance de l'activité cellulaire (prolifération, résistance à l'apoptose et l'angiogenèse) qui transforme l'épithélium hyperprolifératif en adénome¹⁹.

La troisième mutation importante dans le cas des cancers MSS ou CIN est celle du gène suppresseur de tumeur TP53. En effet, elle est retrouvée dans plus de 60% des cas²⁰. Ce gène code pour une protéine p53 qui joue un rôle essentiel dans la protection du génome. Elle induit un arrêt du cycle cellulaire en phase G1/S et G2/M afin de permettre la correction de potentielles erreurs. Si les erreurs ne sont pas réparées, p53 est capable d'induire des signaux de sénescence (c'est-à-dire un arrêt du cycle prolongé et irréversible), mais aussi d'apoptose, provoquant ainsi la mort des cellules. Sa mutation est dite « inactivatrice », ce qui entraîne donc l'inaction de cette protéine p53 ²¹. Cette dernière intervient dans un stade de développement plus tardif du CCR (voir figure 6) ²².

L'accumulation progressive de mutations génétiques sur cette lésion clonale en expansion régulière par hyperprolifération aboutit de façon peu fréquente au développement d'un cancer colorectal. On estime que 75 adénomes sur 1 000 aboutissent au développement d'un cancer ¹⁴.

2) Les tumeurs avec instabilité microsatellitaire :

Les microsatellites sont des séquences répétées de l'ADN particulièrement exposées à des erreurs de mésappariements lors de la réplication de l'ADN. L'instabilité microsatellitaire (MSI) est impliquée dans 12% à 15% des CCR sporadiques ²². Normalement ces erreurs sont réparées par un complexe de protéines appartenant au système Mismatch Repair (MMR) comprenant les protéines MLH1, MSH2, MSH6 et PMS2 ²³.

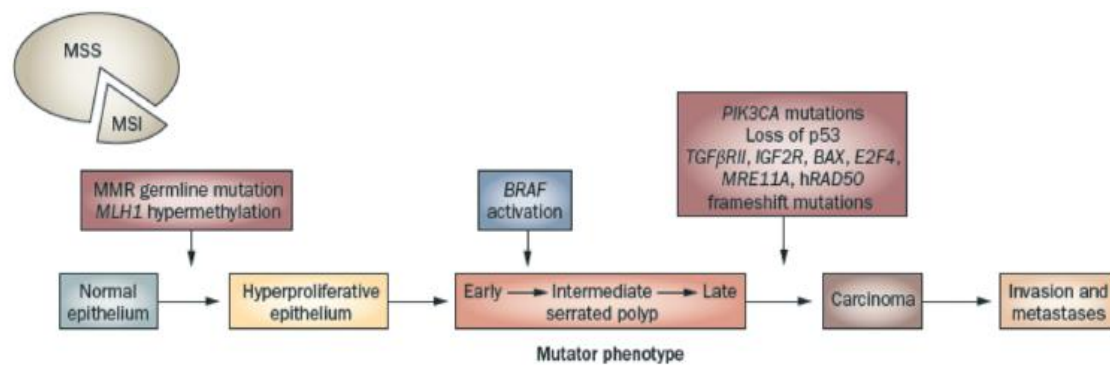


Figure 7 : Carcinogénèse tumorale par instabilité microsatellitaire. (D'après Laurenty et al. 2014)

Les cancers MSI sont dus à un défaut de réparation des mésappariements de l'ADN survenu au cours de la réplication. Ce défaut de réparation est lié à une inactivation bi-allélique de gènes du système MMR (gènes MLH1, MSH2, MSH6, PMS2). Cette inactivation est le plus souvent due à une hyperméthylation de la région promotrice du gène MLH1. Le déficit du système de réparation induit alors une accumulation de mutations secondaires au sein de gènes impliqués dans le contrôle tumoral : oncogènes tels que les gènes pro-apoptotiques ou les gènes suppresseurs de tumeurs tels que le récepteur de type II du TGF β (TGF β RII : Tumor Growth Factor β Receptor II) ²⁴. La chronologie des mutations de ces gènes est mal connue, même si la mutation du TGF β RII semble la plus précoce.

Un exemple de cette instabilité microsatellitaire est le syndrome de lynch dans le cas des cancers héréditaires. Ce syndrome de Lynch est caractérisé par une instabilité des microsatellites élevée, ce qui explique le risque plus important de développer un CCR ou autres cancers gastro-intestinaux ²⁵.

Les cancers colorectaux peuvent donc aussi être classés suivant le degré d'instabilité des microsatellites :

- Les cancers MSI-High ou MSI-H dits à « haut niveau » d'instabilité,
- Les cancers MSI-Low ou MSI-L dits à « bas niveau » d'instabilité,
- Les cancers MSS dits « stable ».

Cette classification est basée sur le panel de microsatellites établi par le NCI (National Cancer Institute). Si deux ou plusieurs des cinq séquences de microsatellites de l'ADN de la tumeur sont mutées, alors cette dernière est classée MSI-H. En opposition, si

une seule des cinq séquences microsatellites a subi une mutation, la tumeur est dite MSI-L. Et enfin, si aucune des séquences n'est mutée, la tumeur est classée MSS ²⁶.

Sur le plan clinique, les cancers MSI sont plus souvent localisés dans le côlon transverse et droit. En ce qui concerne la survie des patients, les cancers MSI-H ont un meilleur pronostic vital que les cancers MSI-L et MSS dans le stade 2 à l'inverse des stades 3 et 4 ²⁷.

3) Les tumeurs avec hyperméthylation des îlots CpG

Des phénomènes épigénétiques ont également été mis en évidence en 1999 par Toyota et al. ²⁸. L'hyperméthylation des îlots CpG des promoteurs est le mécanisme épigénétique impliqué dans une proportion importante des CCR (20-30% des CCR) ²⁹. La méthylation de l'ADN s'effectue uniquement sur des cytosines situées en 5' d'une guanine. Chez les mammifères, les dinucléotides CG se concentrent sur des régions localisées au niveau des promoteurs et des premiers exons des gènes : c'est ce que l'on appelle « îlots CpG ». 50% de nos gènes possèdent un îlot CpG au niveau de leur promoteur. Habituellement, les îlots CpG ne sont pas méthylés. Lorsqu'ils le sont, cela entraîne une extinction transcriptionnelle du ou des gène(s) concerné(s) ³⁰.

Deux types de méthylation sont décrites dans le cancer colorectal :

- Les méthylations qui apparaissent au cours du vieillissement, dites de type A (*"Age-related methylation"*)
- Les méthylations dites cancer spécifique ou type C (*"Cancer-specific methylation"*).

Ces méthylations peuvent notamment toucher des gènes suppresseurs de tumeur, ayant pour conséquence d'empêcher leur transcription et donc ajouter un pas de plus dans la cascade d'événements induisant la formation d'un CCR ³¹. Plus d'une trentaine de gènes ont été identifiés comme étant touchés par cette altération épigénétique (comme WT1, CALCA, HLTF...) ¹⁶.

Le statut CIMP (CpG Island Methylator Phenotype) des tumeurs colorectales semble impacter la survie des patients. En effet, l'étude de Van Rijnsoever et al. comprenant 206 patients opérés d'un CCR de stade III, a montré que les patients avec un CCR CIMP+ avaient une survie à 5 ans significativement inférieure aux patients avec un CCR CIMP-. ³²

Nous avons donc vu que la carcinogenèse colorectale est un processus complexe essentiellement lié à des altérations génétiques successives. L'accumulation de ces anomalies génétiques conduit à l'apparition d'une crypte aberrante, puis d'un adénome, puis d'un cancer colorectal (CCR) avec un phénotype invasif associant prolifération, migration et néo-angiogenèse.

CHAPITRE II : Classification de la progression tumorale et traitements du cancer colorectal

I- Classification de la progression tumorale :

Lors du diagnostic, il est essentiel, en premier lieu d'établir le stade du cancer. D'un point de vue anatomo-pathologique, les médecins cherchent à déterminer jusqu'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. Le type et le stade du cancer constituent des critères pronostics du cancer.

1) Les critères retenus :

Il existe trois critères qui permettent de déterminer le stade du cancer colorectal ³³.

a) La taille et la profondeur de la tumeur

Lorsque les premières cellules cancéreuses apparaissent, elles sont d'abord localisées sur la face interne de la paroi du côlon ou du rectum (c'est-à-dire la muqueuse). Par la suite, ces mêmes cellules vont proliférer et envahir une à une les couches plus profondes.

La taille et la profondeur de la tumeur sont des indicateurs importants pour déterminer le degré d'avancement de la maladie. En effet, plus la tumeur est ancrée dans les couches profondes de la paroi du côlon, plus le cancer est avancé. À contrario, plus la tumeur est localisée et « superficielle », plus elle sera facile à traiter.



Figure 8: Néoplasie colorectale à différents stades : a) Petit adénome sessile. b) Adénome sessile avancé et plus gros. c) Gros carcinome sigmoïde ulcératif, la tumeur couvre la plus grande partie de la circonférence, mais n'a pas encore entraîné d'obstruction substantielle de la lumière. (D'après Kuipers et al. 2015)

b) L'atteinte ou non des ganglions lymphatiques

Les ganglions lymphatiques sont les lieux de stockage des cellules immunitaires (les « lymphocytes ») qui permettent à l'organisme de se défendre contre les infections, les substances étrangères ou les cancers. La biopsie ganglionnaire est une intervention chirurgicale au cours de laquelle on enlève un ou plusieurs ganglions en vue d'un examen microscopique afin de savoir s'ils contiennent des cellules cancéreuses. La lymphe peut faire circuler les cellules cancéreuses de l'emplacement où le cancer a pris naissance jusqu'aux ganglions lymphatiques. Le nombre de ganglions lymphatiques atteints aide à déterminer le stade. De plus si des ganglions sont atteints, cela signifie que la maladie a commencé à se disséminer.

Cette analyse des ganglions permet d'en savoir davantage sur le degré de propagation du cancer. Plus le nombre de ganglions lymphatiques atteints est faible, meilleur est le pronostique.

c) La présence de métastases

D'autres organes, différents des ganglions lymphatiques peuvent aussi être envahis par les cellules cancéreuses et y développer des métastases.

Une étude épidémiologique de 2019 de Nelleke P. M. Brouwer et al., portant sur 36297 patients présentant un cancer colorectal métastatique montrent que les organes les plus souvent touchés par des métastases sont le foie, le péritoine et les poumons ³⁴.

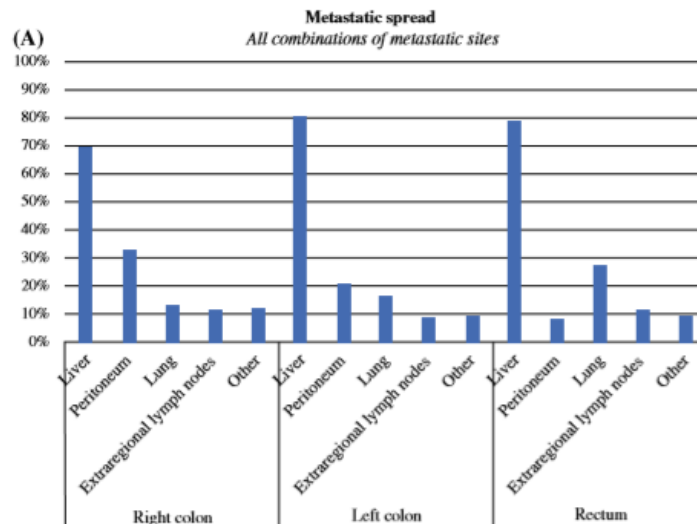


Figure 9 : Prévalence globale des sites métastatiques du CRC en fonction de la localisation de la tumeur initiale (d'après Nelleke et al. 2019)

Suivant les observations obtenues après l'évaluation de ces 3 critères, le pronostic de survie du patient est différent. En effet, le taux de survie à 5 ans des personnes atteintes d'un cancer colorectal localisé est de 90 %. Environ 39% des patients sont diagnostiqués à ce stade précoce. Si le cancer s'est étendu aux tissus ou organes environnants et/ou aux ganglions lymphatiques régionaux, le taux de survie à 5 ans est de 71%. Dans le dernier cas, si le cancer touche d'autres organes plus distants du lieu primaire de la tumeur, le taux de survie à 5 ans n'est plus que de 14% ³⁵.

2) La classification TNM :

Les 3 critères cités précédemment, à savoir : la taille et la profondeur de la tumeur (T), l'atteinte des ganglions lymphatiques atteints et leur nombre (N), et la présence ou non de métastases (M) ont servis de marqueurs pour la détermination du stade du cancer dans une classification internationale appelée TNM (Tumor, Nodes, Metastasis).

Cette classification de référence est celle proposée par l'AJCC et l'UICC. Elle est régulièrement mise à jour et la dernière édition (TNM 8^{ème} édition) est applicable depuis 2017 ³⁶ :

CLASSIFICATION TNM					
Tis	carcinome intra-épithélial ou intra-muqueux (Carcinome in situ)	N0	pas de métastase ganglionnaire régionale	M0	pas de métastase à distance
T1	Tumeur envahissant la sous-muqueuse	N1a	Métastase dans 1 ganglion lymphatique régional	M1a	Métastases à distance confinées à un organe sans atteinte péritonéale: foie, poumon...)
T2	Tumeur envahissant la musculuse	N1b	Métastase dans 2-3 ganglions lymphatique régional	M1b	métastases atteignant plus d'un site métastatique
T3	Tumeur envahissant la sous-séreuse	N1c	dépôts tumoraux « satellites » dans la sous-séreuse, ou dans le tissu péri-colique ou péri-rectal non péritonisé, en l'absence de ganglion métastatique	M1c	métastase péritonéale avec ou sans autre organe atteint
T4a	Tumeur pénétrant le péritoine viscéral	N2a	Métastase dans 4-6 ganglions lymphatiques régionaux		
T4b	Tumeur pénétrant les organes environnants	N2b	métastase dans ≥ 7 ganglions lymphatiques régionaux		

Tableau 1 : Nouvelle classification TNM (Tumor, Nodes, Metastasis) 2017.

Une fois l'atteinte de chaque critère définie, on combine les résultats afin de déterminer le stade global du cancer ³⁷ :

- **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.

IIA : Le cancer s'est développé à travers la paroi du côlon ou du rectum mais ne s'est pas propagé aux tissus voisins ou aux ganglions lymphatiques voisins

IIB : Le cancer s'est développé à travers les couches du muscle jusqu'à la paroi de l'abdomen, appelée péritoine viscéral. Il ne s'est pas propagé aux ganglions lymphatiques voisins ou ailleurs.

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

IIIA : Le cancer s'est développé à travers la paroi interne ou dans les couches musculaires de l'intestin. Il touche 1 à 3 ganglions lymphatiques ou un nodule tumoral dans les tissus entourant le côlon ou le rectum qui ne semblent pas être des ganglions lymphatiques, mais ne s'est pas étendu à d'autres parties du corps.

IIIB : Le cancer a traversé la paroi intestinale ou les organes environnants et s'est développé au sein de 1 à 3 ganglions lymphatiques ou forme un nodule de tumeur dans les tissus autour du côlon ou du rectum qui ne semble pas être des ganglions lymphatiques. Il ne s'est pas propagé à d'autres parties du corps

IIIC : le cancer du côlon, quelle que soit sa profondeur, s'est étendu à 4 ganglions lymphatiques ou plus, mais pas à d'autres parties du corps éloignées.

- **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

IVA : le cancer s'est propagé à une seule partie distante du corps, comme le foie ou les poumons

IVB : le cancer s'est étendu à plus d'une partie du corps

IVC : le cancer s'est propagé au péritoine. Il peut également s'être propagé à d'autres sites ou organes

STADE	TNM		
Stade 0	Tis	N0	M0
Stade I	T1, T2	N0	M0
Stade II	T3, T4	N0	M0
Stade IIA	T3	N0	M0
Stade IIB	T4a	N0	M0
Stade IIC	T4b	N0	M0
Stade III	Quel que soit T	N1, N2	M0
Stade IIIA	T1, T2	N1	M0
	T1	N2a	
Stade IIIB	T3, T4a	N1	M0
	T2, T3	N2a	
	T1, T2	N2b	
Stade IIIC	T4a	N2a	M0
	T3, T4a	N2b	
	T4b	N1, N2	
Stade IVA	Quel que soit T	Quel que soit N	M1a
Stade IVB	Quel que soit T	Quel que soit N	M1b

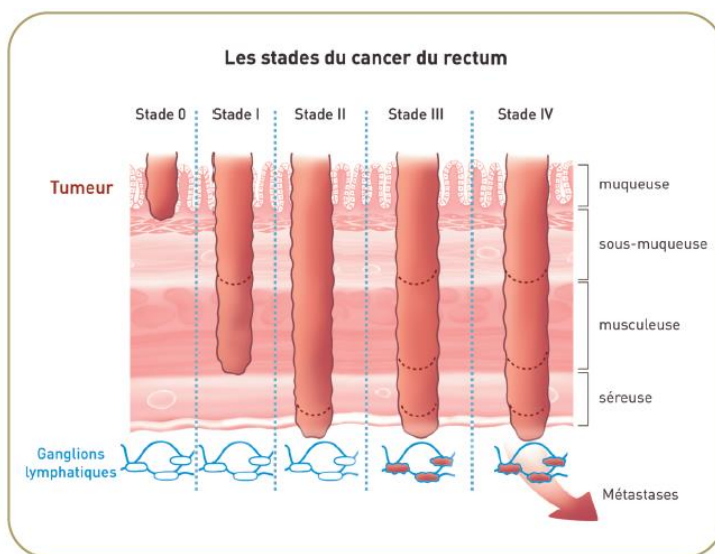


Figure 10 :

(A) Regroupement final par stade du CCR en fonction des 3 paramètres de la classification TNM.

(B) Illustration des lésions cancéreuses suivant le stade.

Il en va de soi que le pronostic vital des patients dépend du stade de la maladie. Plus le stade est élevé d'après la classification TNM, moins bon est le pronostic. En effet, d'après l'AJCC, la survie à 5 ans des patients atteints d'un CCR de stade I est de 93.2%, elle décroît successivement avec l'avancée de la maladie, jusqu'à atteindre 8.1% pour des patients atteints de CCR de stade IV (IVA et IVB confondus) (voir Tableau 2).

	Survie à 5 ans
Stade	
I = T1 or T2, N0	93,2%
Ila = T3, N0	84,7%
Ilb = T4, N0	72,2%
IIla = T1 or T2, N1	83,4%
IIlb = T3 or T4, N1	64,1%
IIlc = Tx, N2	44,3%
IV = Tx, Nx, M1	8,1%

Tableau 2 : Survie globale à 5 ans des patients atteints de CCR suivant le stade. (AJCC, 2011)

3) Une classification moléculaire :

Comme vu précédemment, les cancers du côlon sont un groupe hétérogène. Un consortium international a récemment permis à partir de 6 classifications moléculaires et plus de 4000 patients, d'établir une classification transcriptomique consensuelle permettant la catégorisation des tumeurs en quatre sous-types robustes (consensus molecular subtypes, CMS), désignés CMS1, CMS2, CMS3 et CMS4, associés à une valeur pronostic. Cette classification permet de mettre en lumière différents mécanismes d'échappement immunitaire propres à chaque sous-type. Selon la classification moléculaire, différents traitements peuvent être proposés, tels que l'immunothérapie pour les tumeurs MSI appartenant au groupe CMS1 et les anticorps anti-EGFR pour les tumeurs RAS sauvages du groupe CMS2. La classification CMS est un outil de choix pour la stratification des cancers du côlon et l'identification de sous-types homogènes ayant une valeur pronostique et parfois prédictive d'efficacité des thérapies ³⁸. Les quatre groupes sont donc les suivants :

- Groupe CMS-1 (dits MSI, Immune) : 13% des CCR qui sont caractérisés par des tumeurs avec instabilité des microsatellites, par une infiltration des cellules immunitaires marquée. Les tumeurs de ce groupe sont mutées BRAF. La localisation est préférentiellement au sein du côlon droit.
- Groupe CMS-2 (dits « canonical ») : 35% des CCR localisés plutôt au niveau du côlon gauche sans instabilité des microsatellites (MSS) intègrent cette

classe. Ils sont marqués par une mutation de TP53, d'une surexpression de l'EGFR ainsi qu'une activation de la voie WNT/MYC.

- Groupe CMS-3 (dits « Metabolic ») : 11% des CCR, de type épithélial. Le statut MSI est mixte même si dans 90% des cas ils sont MSS. Ils sont caractérisés par des mutations fréquentes RAS et une dérégulation au niveau du métabolisme. Ils sont répartis de manière assez homogène entre le côlon droit et le côlon gauche.
- Groupe CMS-4 (dits « Mesenchymal ») : 20% des CCR, localisés préférentiellement sur le côlon gauche et de type mésenchymateux. Ils présentent une activation fréquente de la voies TGF- β , de nombreuses altérations somatiques, ainsi que l'implication de l'angiogenèse. Ceux sont des tumeurs à fort potentiel invasif.

CMS1 MSI Immune	CMS2 Canonical	CMS3 Metabolic	CMS4 Mesenchymal
13%	35%	11%	20%
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- β activation, angiogenesis
Worse survival after relapse			Worse relapse-free and overall survival

Tableau 3 : Classification CMS des CCR (d'après Phellp et al. 2018)

La classification CMS a une valeur pronostique indiscutable. En cas de CCR non métastatique, le pronostic vital est favorable pour les tumeurs CMS-1 tandis qu'il est intermédiaire pour les groupe CMS-2 et CMS-3. Les tumeurs CMS-4 ont quant à elles un mauvais pronostic vital ³⁹ (voir figure 11A). À l'inverse, en situation métastatique c'est le sous type 1 qui est lié au plus mauvais pronostic (survie après rechute mauvaise). Une étude de 2017 de Stintzing S et al. confirme bien cette tendance, en effet à partir de 313 patients métastatiques inclus dans l'essai FIRE-3, la survie sans progression moyenne (median PFS) des patients avec des tumeurs de type CMS-1 était de 14.8 mois contre 31.9 mois, 18.7 mois et 24.8 mois pour les patients présentant des tumeurs CMS-2, CMS-3 et CMS-4 respectivement ⁴⁰ (Voir figure 11B).

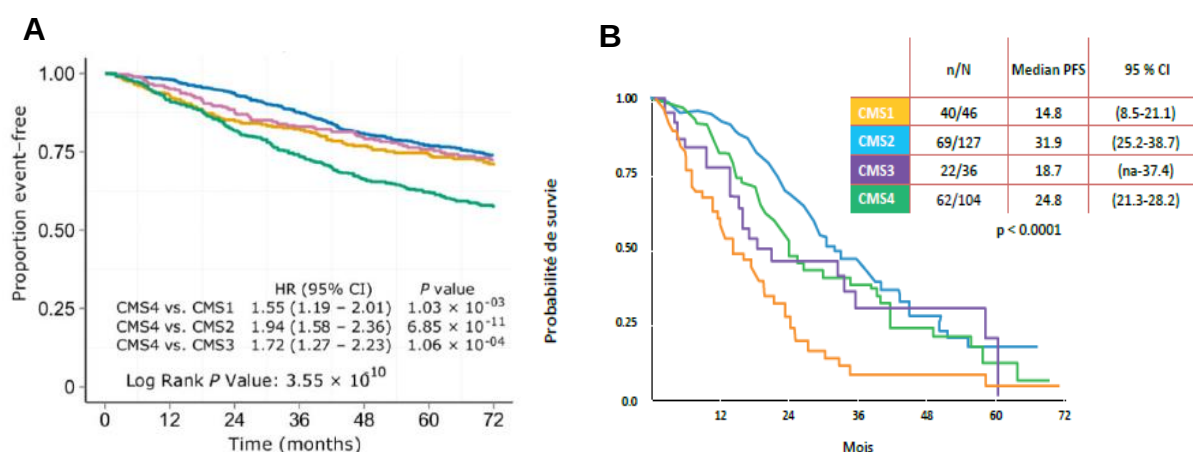


Figure 11 : Impact de la classification CMS sur le pronostic vital des patients en situation (A) non métastatique ou (B) métastatique. (D'après L. 2015 et Stinzinger et al. 2019).

Des essais toujours en cours : CALGB80405 et FIRE-3 suggèrent qu'il y aurait peut-être un impact prédictif de la classification CMS sur la réponse aux traitements. Les essais CALGB80405 et FIRE-3 comptent respectivement 581 patients et 313 patients RAS WT. Il en ressort que pour les patients présentant une tumeur de type CMS-1, localisée préférentiellement à droite, l'association chimiothérapie (CT) de 1^{ère} ligne (Fluorouracile, Oxaliplatine, Irinotecan...) + Bevacizumab pourrait être meilleure en termes de survie générale (SG) et de survie sans progression (SSP) que l'association d'une chimiothérapie (usuelle) + cetuximab (significatif uniquement dans l'essai CALGB80405). Pour les patients présentant des tumeurs CMS-2 et CMS-4, localisées préférentiellement dans le côlon gauche, il existerait un effet favorable du cetuximab en terme de SG (signification uniquement dans CALGB80405 ⁴¹ pour les CMS-2 et dans FIRE-3 ⁴⁰ pour les CMS-4) par rapport au bevacizumab (voir figure 12).

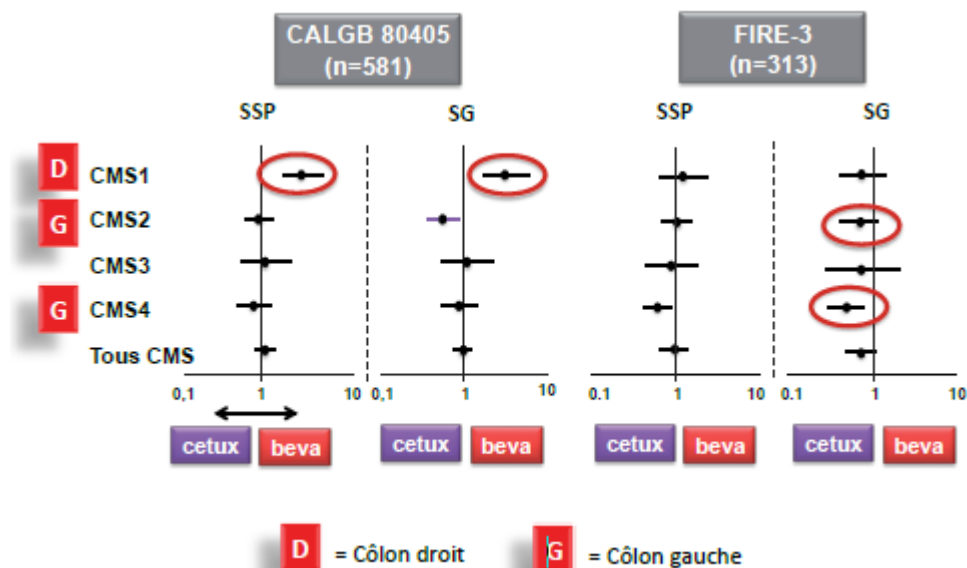


Figure 12 : Impact prédictif de la classification CMS sur l'efficacité du bevacizumab et du cetuximab à partir des données de FIRE-3 et de CALGB. (D'après Lenz et al. 2019 et Stinzing et al. 2019).

Récemment, un autre essai prénommé "MAX" étudiant l'effet du Bevacizumab (Avastin®) sur des patients atteints d'un CCR traités au Xeloda® (traitement de 1ère ligne) a été publié et a confirmé la valeur pronostique de la CMS sur la réponse aux thérapies ⁴².

II- Traitements du cancer colorectal :

Le but du traitement est de guérir le cancer en éliminant la totalité des cellules malignes, d'empêcher la tumeur de se propager, de diminuer les récurrences et d'améliorer le confort et la qualité de vie du patient. Il existe différents types de traitements qui seront utilisés en fonction du stade du cancer, de l'état général du patient etc... En premier lieu, la chirurgie pour extirper la tumeur, la radiothérapie pour les cancers du rectum, la chimiothérapie et les thérapies ciblées. Selon le cas, un seul ou plusieurs traitements associés seront nécessaires. C'est l'étendue du cancer au moment du diagnostic qui détermine le choix et l'ordre des traitements ⁴³.

1) La Chirurgie : Traitement « clé » du CCR

La chirurgie est le traitement principal du cancer du côlon.

Dans le cas de CCR non métastatique, il est essentiel que la qualité de la résection de la tumeur et le curage ganglionnaire soient bien faits, en respectant une marge périphérique de sécurité. Cette marge de sécurité est la partie supposée saine qui entoure la tumeur et qui sera ensuite analysée pour vérifier l'absence ou la présence de cellules cancéreuses. Si après analyse, la marge est positive, c'est-à-dire qu'elle contient des cellules cancéreuses, le patient est parfois opéré à nouveau pour enlever cette partie de tissus. Pour cela, le chirurgien procède dans tous les cas au retrait d'une portion saine du côlon (5 cm minimum). D'excellents résultats oncologiques sont ainsi obtenus avec un taux de survie à 5 ans de 91,4 % au stade II, et de 70,2 % au stade III ⁴⁴.

Dans le cas de CCR métastatique (présence de métastases péritonéales, hépatiques ou pulmonaires) : l'éligibilité des patients pour une intervention chirurgicale est basée sur certains critères (i.e. nombre et localisation des métastases, présence de comorbidités, état général, etc...). Néanmoins, une chimiothérapie néo-adjuvante, ayant pour but de réduire leur taille, est administrée afin de faciliter l'exérèse.

De nombreux patients peuvent aujourd'hui bénéficier, grâce à la qualité de l'exérèse obtenue et aux innovations technologiques, d'une espérance de vie augmentée, d'une guérison de leur CCR et ceci même s'ils présentent une maladie de stade IV ⁴⁵.

Lors du diagnostic, 20 à 25% des patients porteurs d'un CCR ont des métastases synchrones, principalement au niveau hépatique. Dans 75-80% des cas, ces métastases sont jugées non résécables ⁴⁶ (en raison de leur nombre, de leur taille ou de leur inaccessibilité). Des traitements de type chimiothérapie ou thérapie ciblée sont alors proposés.

2) La radiothérapie :

La radiothérapie consiste à détruire les cellules cancéreuses à l'aide de rayons ou de particules de haute énergie (Rayons X). Il s'agit d'un traitement local, visant une partie spécifique du corps. Le but de la radiothérapie est de réduire le risque de

récidive locale du cancer. Cependant, le cancer du côlon a tendance à se propager vers d'autres organes, comme le foie ou les poumons, plutôt que de réapparaître au même endroit. La radiothérapie n'est donc généralement pas indiquée pour traiter le cancer du côlon. En revanche, elle est très utilisée pour les cancers rectaux et quelquefois pour traiter certaines métastases isolées.

3) La chimiothérapie :

La chimiothérapie est un traitement systémique (qui agit dans l'ensemble du corps) et non spécifique pour les cellules cancéreuses. Les cellules cancéreuses sont ainsi atteintes quelle que soit leur localisation, même si elles sont isolées et n'ont pas été détectées lors du diagnostic. Cette action généralisée présente cependant un inconvénient, puisque ces médicaments ont également un effet toxique sur les cellules saines du corps. En effet, il n'y a pas de distinction entre les cellules cancéreuses et les cellules normales. Les chimiothérapies ciblent toutes les cellules qui se divisent rapidement. Cela impacte donc les cellules des cheveux, du sang ou des muqueuses et explique l'apparition fréquente d'effets secondaires (alopécie, leucopénie, mucite...).

Encore une fois, le stade du cancer est déterminant sur la nécessité ou non d'une chimiothérapie et sur l'instant où elle doit être administrée. Selon le moment où la chimiothérapie est administrée, on les classe en deux "familles":

- La chimiothérapie néo-adjuvante : le traitement est prescrit avant une opération chirurgicale, l'objectif étant de réduire la taille de la tumeur primitive ou des métastases et faciliter la résection.
- La chimiothérapie adjuvante : le traitement est après une chirurgie, pour s'assurer de l'élimination de cellules cancéreuses résiduelles et ainsi réduire le risque de récurrence et améliorer les chances de guérison.

La chimiothérapie s'administre par cures. La fréquence et la durée de la chimiothérapie dépendront du type de cancer, du stade, de l'âge, de l'état général, des buts du traitement, des médicaments utilisés et de la réponse de l'organisme à ces derniers. Chaque cure étant suivie d'une période de repos pendant laquelle le traitement n'est pas délivré, ce qui permet au corps de récupérer. Le traitement de chimiothérapie comprend donc généralement plusieurs cycles, et un cycle comprend une ou plusieurs cures.

Trois principaux agents cytotoxiques sont utilisés et ont montrés leur efficacité dans le traitement du cancer colorectal ⁴⁷:

- Le 5-Fluorouracile (5-FU)
- L'Oxaliplatine
- L'Irinotecan.

a) **Le 5-Fluorouracile (5-FU®)**

Développé il y a plus de 60 ans, le 5-Fluorouracile demeure la « pierre angulaire » du traitement contre le cancer colorectal. Le 5FU est un anticancéreux anti-métabolite appartenant à la classe des fluoropyrimidines. Suite à l'observation par des chercheurs à cette époque ayant constatés que les cellules tumorales utilisaient plus d'uracile que les tissus normaux, en 1957 Heidelberger et Duschinsky ont synthétisé un dérivé fluoré de l'uracile (le 5-FU) (voir figure 13) ⁴⁸.

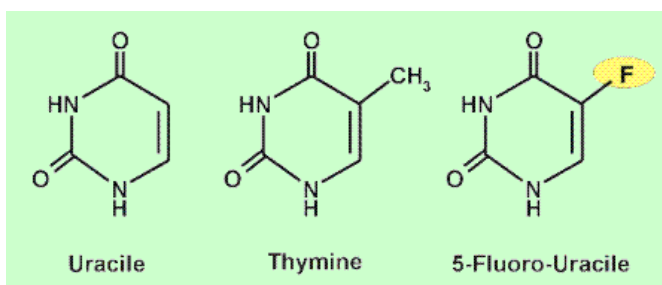


Figure 13 : Structures de l'Uracile, Thymine et 5-Fluorouracile

Il pénètre dans la cellule par un transporteur selon un processus saturable. L'activité pharmacologique du 5FU est possible seulement après que ce dernier est été métabolisé par le foie notamment. Après administration, le 5FU peut s'engager dans deux voies : l'anabolisme ou le catabolisme.

- La voie anabolique (20% du 5-FU administré) : divisée elle-même en 3 voies distinctes. La première consiste en la réduction du 5-FU en 5-FdUMP (5-Fluorodésoxyuridine monophosphate). Le 5-FdUMP inhibe alors l'action de la Thymidilate Synthétase (TS), qui n'est donc plus capable de synthétiser de la thymine à partir du désoxyuridine monophosphate (dUMP). Cela provoque alors une inhibition de la synthèse endogène de la thymine, entraînant alors un déséquilibre dans le pool des nucléotides et in fine l'inhibition de la synthèse de l'ADN et le déclenchement de l'apoptose. L'action cytotoxique du 5FU par les deux autres voies est moins bien détaillée. La seconde voie anabolique est l'incorporation du 5-FUTP (5-Fluorouridine

triphosphate) dans tous les types d'ARN (ARNm, ARNt, ARNr), ce qui provoque des problèmes de maturation bloquant alors la synthèse d'ARN. La dernière voie, la plus marginale, est l'incorporation du 5-FdUTP (5-Fluorodésoxyuridine triphosphate) dans l'ADN, provoquant ainsi sa fragmentation.

- La voie catabolique : Seule une faible fraction du 5-FU est anabolisée en dérivés cytotoxiques dans les tissus car la majorité de la drogue (60 % à 90 %) est catabolisée par la dihydropyrimidine déshydrogénase (DPD). Cette enzyme réduit le 5-FU en 5-fluorodihydrouracile (5-FUH2). La DPD est présente dans de nombreux tissus ; son activité est maximale dans les lymphocytes circulants et le foie. L'activité de la DPD suit un cycle nyctéméral faisant varier le catabolisme du 5FU sur 24 heures. Le catabolisme s'arrête au 5-FUH2 dans les lymphocytes et la plupart des tissus ; en revanche, au niveau hépatique, une deuxième enzyme, la dihydropyrimidase, catabolise le 5-FUH2 en acide 5-fluorouréidopropionique (5-FUPA). Puis une troisième enzyme, la β -uréidopropionase, transforme le 5-FUPA en α -fluoro β -alanine (FBAL) et en urée^{62 48}(voir figure 14) ⁴⁹.

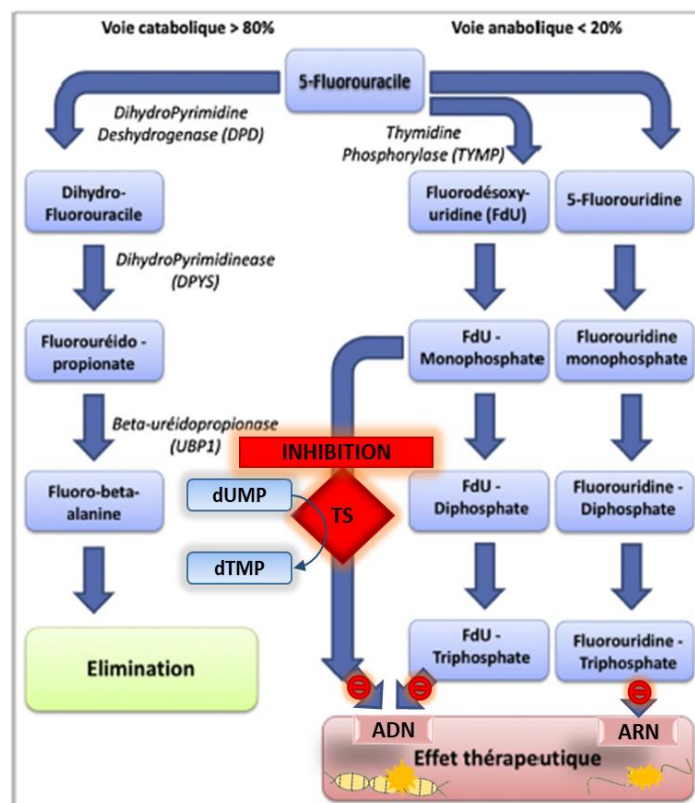


Figure 14 : Principales étapes du métabolisme du 5-FU.
(D'après Lemaitre et al. 2018)

Le 5FU est généralement administré par voie intraveineuse. Du fait de son catabolisme important, ce dernier est éliminé du sang dans les 2 heures suivant son administration. La demi-vie du 5FU serait de 10 à 20 minutes (20% de la dose administrée est directement excrétée dans les urines). L'administration orale du 5FU a donc été étudiée, et a montré qu'il avait une biodisponibilité orale médiocre et énormément variable (allant de 0 à 80%). Le 5FU n'étant donc 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 -FU ont été développés. ⁴⁸. Ainsi, différentes pro-drogues ont été synthétisées afin de tenter d'améliorer l'absorption et la durée d'exposition de la tumeur au 5FU : la Capécitabine (XELODA®), le Tegafur (UFT®). Ces drogues sont absorbées intactes à travers la muqueuse gastro-intestinale et ensuite converties en 5FU par la voie enzymatique dans le foie (voir figure 15) ⁵⁰.

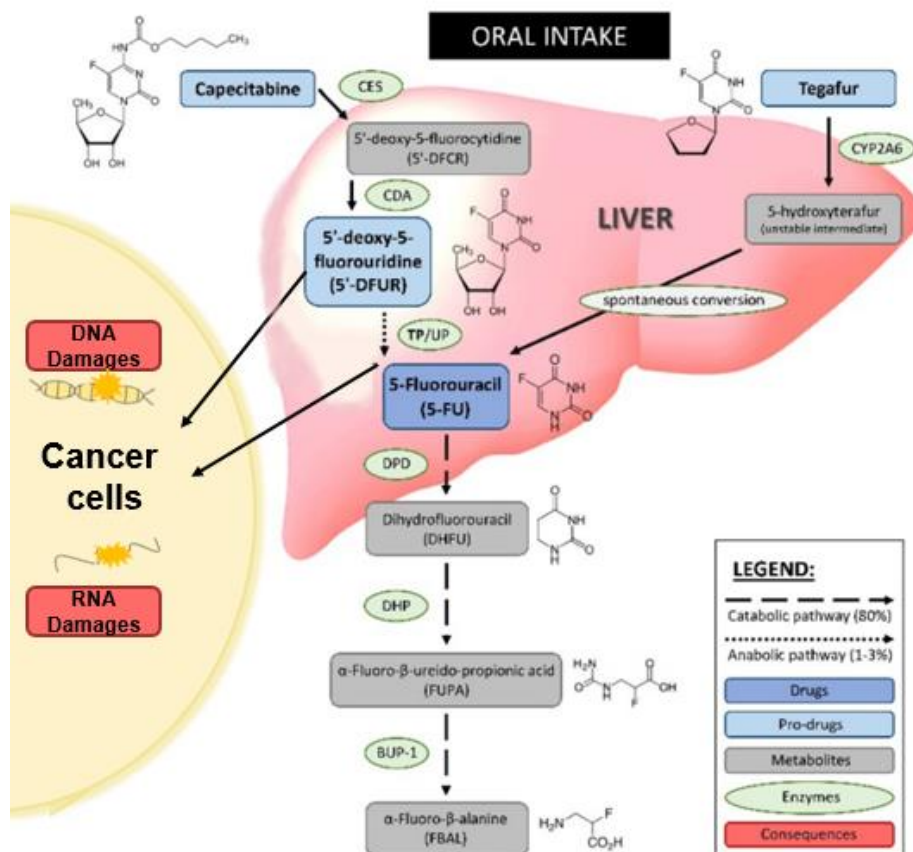


Figure 15 : Principales étapes du métabolisme du 5-FU. (D'après Vodenkova et al. 2020)

Bien qu'étant le composant principal des protocoles de chimiothérapie, le 5FU et son pro-médicament oral, la Capécitabine, entraînent des toxicités dose-dépendante variable suivant le schéma d'administration pouvant être sévères (de grade 3 ou 4). Cela touche essentiellement les épithéliums à renouvellement rapide (Hématologiques : neutropénie, thrombopénie, anémie ; Digestives : mucites, ulcérations des muqueuses, diarrhées sévères ; Cutanées : syndrome « mains-pieds » ; et plus rarement neurologiques) chez 10 à 30% des patients, selon le régime de chimiothérapie. Elles peuvent conduire à des décès chez 0,1 à 1% des patients ⁵¹.

b) L'Oxaliplatine (Eloxatine®)

L'oxaliplatine (1R, 2R-diaminocyclohexane) est un agent alkylant synthétisé dès les années 70, dont la structure chimique se distingue des composés classiques du platine par la présence d'un radical porteur cyclique "DACH" (diaminocyclohexane). L'Oxaliplatine a été découvert en 1976 mais approuvé qu'en 1996 pour son utilisation dans le traitement du CCR ⁵².

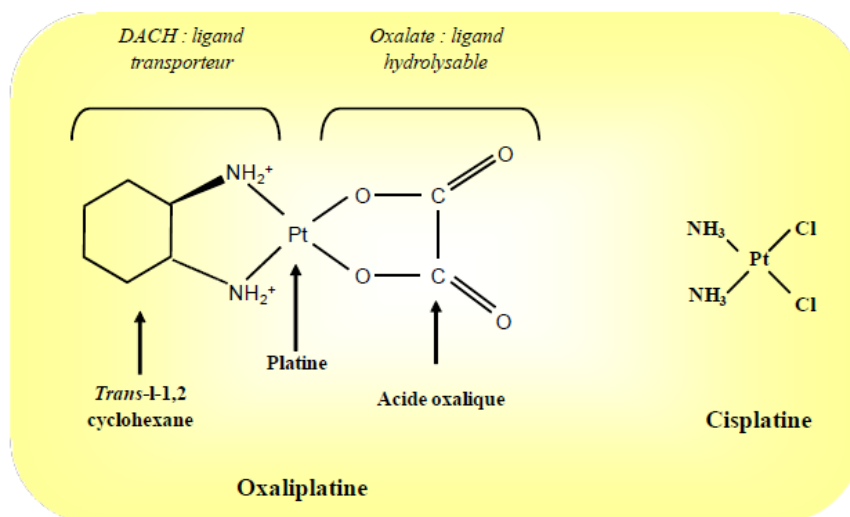


Figure 16 : Formule de l'oxaliplatine comparé à celle de la cisplatine

L'un des buts de développer des analogues du Cisplatine était de résoudre les problèmes de résistance à cette drogue. Burchenal et al. ont ainsi montré que les complexes possédant un cycle DACH à la place de deux groupements amines étaient actifs sur des lignées de cellules résistantes au Cisplatine. C'est donc le cas de l'oxaliplatine qui est utilisée en France depuis 1985 pour traiter les cancers ⁵³. Cette structure particulière lui confère des propriétés uniques. En effet, contrairement au

Cisplatine, l'Oxaliplatine subit une transformation non-enzymatique rapide en complexes réactifs de dichloro-platine : le DACH-dichloro-platine (Voir figure 17) ⁵⁴.

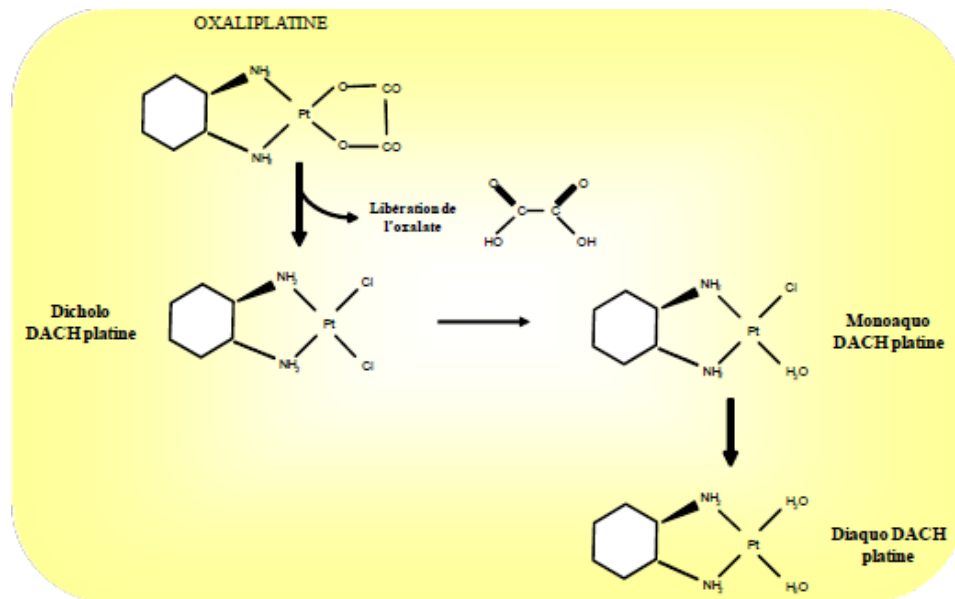


Figure 17 : Transformation non enzymatique de l'Oxaliplatine (D'après Jerremalm et al. 2002)

Deux heures suivant l'administration de cette pro-drogue qu'est l'oxaliplatine, le DACH-dichloro-platine (qui représente 70% de l'oxaliplatine qui pénètre dans les cellules) est déjà détectable dans le sang ⁵⁵. En terme de caractéristiques pharmacologiques, 40% des complexes se fixent irréversiblement aux globules rouges et la demi-vie est estimée à environ 200 heures.

Le mécanisme d'action des dérivés de platine n'est encore pas totalement élucidé. 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'adduit est représenté par les ponts intra brins, qui établissent des liaisons covalentes irréversibles entre deux résidus guanines. Les autres types d'adduits sont les ponts inter brins et les liaisons aux protéines satellites de l'ADN. Les lésions primaires induites par l'oxaliplatine sont similaires à celles induites par le cisplatine, même si elles sont observées en nombre plus restreint pour une concentration molaire équivalente. 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 la croissance et la survenue du processus d'apoptose cellulaire ⁵³.

Raymond et al. ont également montré en 2002 que les systèmes de réparation intervenant dans la correction des dommages créés par l'Oxaliplatine tels que le MMR et le NER présentent une efficacité réduite causant alors l'apoptose des cellules ⁵⁶(voir Figure 18).

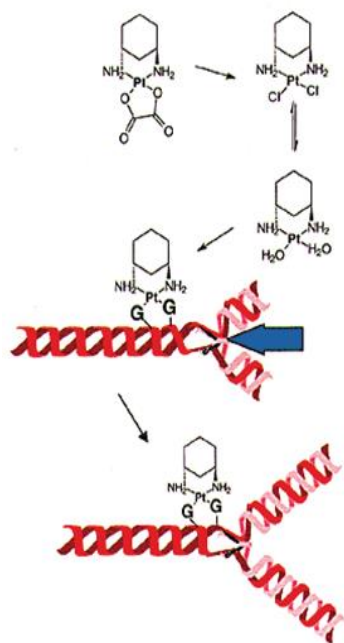


Figure 18 : Mécanisme d'action de l'Oxaliplatine.

Bien que l'Oxaliplatine forme 2 à 10 fois moins de lésions (adduits) que le Cisplatine, elle n'en est pas pour autant moins puissante. Au contraire, du fait de la distorsion importante qu'elle induit au sein de la structure de l'ADN, celle-ci se révèle beaucoup plus efficace dans l'inhibition de la prolifération et dans la survenue du processus d'apoptose cellulaire ⁵⁷. De plus, l'Oxaliplatine a présenté, contrairement au Cisplatine, une activité *in vitro* et *in vivo* sur le cancer colorectal, d'où son utilisation aujourd'hui en première ligne chez des patients ayant un CCR ⁵⁸.

Concernant la toxicité de l'Oxaliplatine, les effets indésirables sont : les nausées et vomissements. Il n'existe pas de toxicité rénale contrairement au Cisplatine et la tolérance hématologique est satisfaisante. La principale toxicité observée est neurologique. Des patients présentent alors des neuropathies périphériques qui peuvent persister dans le temps (dus souvent à une dose cumulée d'oxaliplatine dans l'organisme (800mg/m²)) mais qui sont le plus souvent réversibles après l'arrêt du traitement ⁵³.

c) Irinotécan (Camptosar®)

L'irinotécan est un dérivé hémisynthétique de la camptothécine. Il s'agit d'un agent antinéoplasique qui agit comme inhibiteur spécifique de l'ADN topo-isomérase I⁵⁹. L'irinotécan ou CPT-11 a été synthétisé par Yokokura en 1981. En 1996, il a été approuvé aux Etats-Unis par la FDA pour son utilisation dans le traitement du CCR. La cible des médicaments de la famille des camptothécines est l'ADN topoisomérase I, une enzyme nucléaire qui contrôle la structure topologique de l'ADN, génère des coupures simples brins afin d'enlever les supertours de la double hélice d'ADN et permettre ainsi à la réplication et la transcription d'avoir lieu⁶⁰. L'irinotécan est métabolisé par la carboxylestérase dans la plupart des tissus en un métabolite actif, le SN-38, qui s'est révélé plus actif que l'irinotécan sur la topo-isomérase I, et plus cytotoxique sur plusieurs lignées de cellules tumorales murines ou humaines. 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 et sont responsables de l'activité cytotoxique. Celle-ci est fonction de la durée d'exposition avec les cellules et est spécifique de la phase S.

Plusieurs études ont montré que l'administration concomitante d'anti-convulsivants inducteurs du CYP3A (carbamazépine, phénobarbital ou phénytoïne par exemple) entraîne une diminution de l'exposition à l'irinotécan, au SN-38 et au SN-38 glucuroconjugué et réduit leurs effets pharmacodynamiques.

Lorsque l'irinotécan est transformé en SN-38, la voie de désintoxication de l'organisme ou de catabolisme est la suivante : le SN-38 est converti en un composé glucuronide inactif : le SN-38G par l'UGTA1 (Uridine diphosphate GlucuronosylTransférase 1) (voir Figure 19)⁶¹.

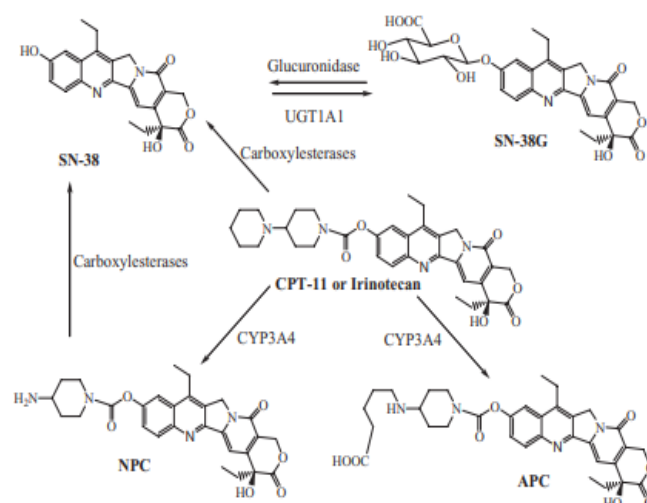


Figure 19 : Principales voies métaboliques de l'irinotecan. (D'après Mullangi et al. 2009)

Au cours de la réplication de l'ADN, la topoisomérase I crée une rupture transitoire dans un brin d'ADN et se lie de manière covalente à l'extrémité 3'-phosphorylée du brin d'ADN entaillé. En stabilisant le complexe ADN-topoisomérase I, l'irinotécan empêche la ligature du brin d'ADN entaillé. La fourche de réplication entre alors en collision avec le complexe ADN-topoisomérase I stabilisé, entraînant ainsi une rupture irréparable du double brin d'ADN, qui déclenche ainsi la cascade apoptotique et donc la mort cellulaire (voir Figure 20) ⁶².

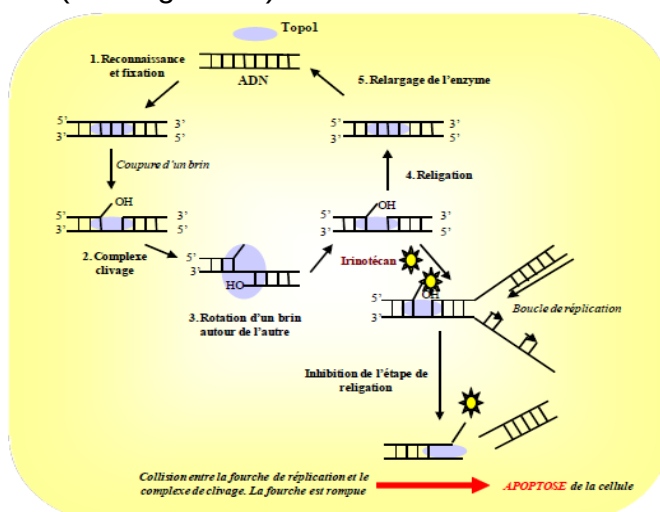


Figure 20 : Fonctionnement de la topoisomérase I en condition normale (Etapes 1 à 5) et Mécanisme d'action de l'irinotécan sur la topoisomérase I. (D'après Fuchs et al. 2006)

Après une perfusion d'Irinotécan, le taux plasmatique de cette molécule décroît de façon exponentielle. Cependant, le SN-38 est quant à lui retrouvé dans le sang, 1 à 3h30 suivant la perfusion d'irinotécan. La demi-vie de l'irinotécan est en moyenne de 6h ⁶³.

Les principales toxicités observées sont la neutropénie (baisse du nombre de neutrophiles dans le sang), l'asthénie (grande fatigue) et une diarrhée qui peut être sévère. Il a été montré que cette toxicité pouvait avoir un lien avec le syndrome de Gilbert (une déficience congénitale de l'activité UGT1A1 retrouvée dans 6% de la population). En effet, les patients souffrant du syndrome de Gilbert ont un organisme moins apte à réaliser la voie de la désintoxication du SN-38 en SN-38G et présentent alors une toxicité beaucoup plus grande lorsqu'ils reçoivent des doses standards d'irinotécan ⁶¹.

Malgré le fait que les taux sériques de SN-38 étaient 100 fois plus faible que le niveau d'irinotecan correspondant, le SN-38 montre une activité remarquablement plus importante que celle de l'irinotecan ⁶⁴. Le SN-38 peut donc jouer un rôle majeur concernant la détermination de la « dose limite » et permettre de limiter la toxicité du médicament ⁶⁵.

d) Influence des agents de chimiothérapies sur la signalisation VEGF

L'exposition aux agents de chimiothérapie cause ce que l'on appelle un stress cellulaire. Des études portant sur l'effet de ce stress cellulaire sur la signalisation VEGF, un facteur dont nous verrons l'implication importante dans l'agressivité du cancer, ont été réalisées.

Il est connu que certains agents de chimiothérapie ont un effet pro-angiogénique au sein des tumeurs. Certaines investigations ont été poussées à l'étude moléculaire notamment l'effet sur la signalisation de la voie du VEGF : signalisation clé de l'angiogénèse.

Le 5FU, l'oxaliplatine et le SN-38 agissent tous sur la signalisation VEGF en augmentant l'expression des ligands (VEGF-A, VEGF-C) et des récepteurs VEGFR1 et NRP1 ⁶⁶⁻⁷⁰.

e) Taux de réponse en monothérapie ou en thérapie combinée des différents agents de chimiothérapie

Le 5-FU est la chimiothérapie principale choisie pour le traitement du cancer colorectal. En monothérapie, le taux de réponse au traitement de patients souffrant d'un CCR varie. Une étude de Pullarkat et al. portant sur une cohorte de patients atteints d'un CCR métastatique, a montré que cela s'expliquait notamment par le polymorphisme existant sur le promoteur du gène TS (ayant des répétitions en tandem doubles ou triples d'une séquence de 28 pb). En effet, Les individus homozygotes pour la variante triple répétition dans le tissus tumoral (L / L) avaient un taux de réponse au 5-FU de 9% alors que ceux homozygotes pour la variante double répétition (S / S) ont un taux de réponse de 50%. Les individus hétérozygotes (c'est-à-dire S/L) présentent un taux de réponse intermédiaire de 15% ⁷¹. Pour améliorer l'efficacité du 5-FU, il est souvent administré avec de l'acide folique. Au sein de la cellule, l'acide folique est métabolisé en Tetrahydrofolate qui va avoir pour rôle de stabiliser le complexe 5-FdUMP/TS et donc prolonger son action cytotoxique. Le taux de réponse moyen des patients atteints de CCR, tout stade confondu, au 5FU + Acide folique ou Leucovorine (acide folinique, métabolite actif de l'acide folique) est en moyenne de 35% (que ce soit en prise orale ou en intraveineuse) ⁷².

Dans plusieurs études cliniques de phase II, il a été démontré que l'oxaliplatine avait une activité minimale lorsqu'elle est administrée en monothérapie, avec un taux de réponse d'environ 20 à 24% ⁷³.

Dans des essais cliniques de phase II, l'irinotecan, en monothérapie, a montré un taux de réponse modeste allant de 11% à 27% chez des patients atteints de CCR métastatiques ⁷⁴.

À la vue des taux de réponse parfois modestes lorsque ces agents de chimiothérapie sont administrés en monothérapie, des essais cliniques ont été conduits afin d'essayer des combinaisons de traitements. La combinaison 5FU/Leucovorine +OXA (protocole FOLFOX ou XELOX si 5-FU sous forme orale) a montré dans plusieurs essais : une augmentation de la SSP (Survie Sans Progression) et de la SG (Survie Générale) des patients sous FOLFOX par rapport aux patients sous 5FU/Leucovorine seuls avec des taux de réponse passant à plus de 50% ⁷⁵. Une combinaison 5FU/Leucovorine +

Irinotecan (protocole FOLFIRI ou IRIS si 5-FU sous forme orale) montre également une meilleure efficacité comparée aux 5FU/leucovorine seuls ou à l'irinotecan seul. L'étude clinique de stade III GERCOR ⁷⁶ a montré l'équivalence des deux schémas thérapeutiques primaires FOLFOX et FOLFIRI. Cela a été confirmé par un second essai clinique de phase III en 2005 ⁷⁷. Le taux de réponse ainsi que la SG étant similaires, il est difficile de rendre préférentiel l'un ou l'autre des protocoles en première intention. Toutefois, il a été montré que les patients ayant suivis le schéma FOLFOX sont plus aptes à subir une résection des métastases hépatiques par rapport aux patients ayant subis le protocole FOLFIRI ⁷⁸.

4) Les thérapies ciblées :

La notion de thérapie ciblée est un concept qui a pris son essor au début des années 1990. La différence entre chimiothérapie et thérapie ciblée repose sur le fait que les thérapies moléculaires ciblent les cellules cancéreuses et ne créaient pas de dommage aux cellules et tissus sains environnants.

Les progrès de la recherche fondamentale ont permis d'établir qu'il existait un « dialogue » entre la tumeur et son environnement. Ces médicaments vont avoir pour but de freiner la croissance tumorale en s'attaquant aux mécanismes qui lui permettent de se développer. Ils vont notamment agir sur :

- Les agents dont la tumeur a besoin pour fabriquer ses propres vaisseaux sanguins (action anti-angiogénique)
- Les mécanismes qui stimulent la division des cellules et de ce fait le développement tumoral lui-même (action contre les facteurs de croissance)

En pratique, ces molécules vont s'intégrer dans une stratégie thérapeutique globale où elles feront partie de schémas utilisant conjointement la chimiothérapie. Ainsi, le nombre de combinaisons thérapeutiques possibles devient plus important et le profil biologique de chaque tumeur oriente la décision thérapeutique vers un traitement de plus en plus personnalisé ⁷⁹.

De plus, cela permettra d'agir à deux niveaux différents. En effet, les agents cytotoxiques ont pour cibles principales les acteurs de la synthèse, de la réplication et de la transcription de l'ADN au sein du noyau, tandis que les agents de thérapie ciblée agissent directement sur l'inhibition au niveau membranaire ou cytoplasmique d'une ou plusieurs molécules impliquées dans une séquence de type ligand-récepteur tyrosine kinase-effecteurs intracellulaires ⁵⁸. Il existe deux types de thérapies ciblées : les anticorps monoclonaux et les inhibiteurs de tyrosine-kinase (voir Figure 21) ⁸⁰.

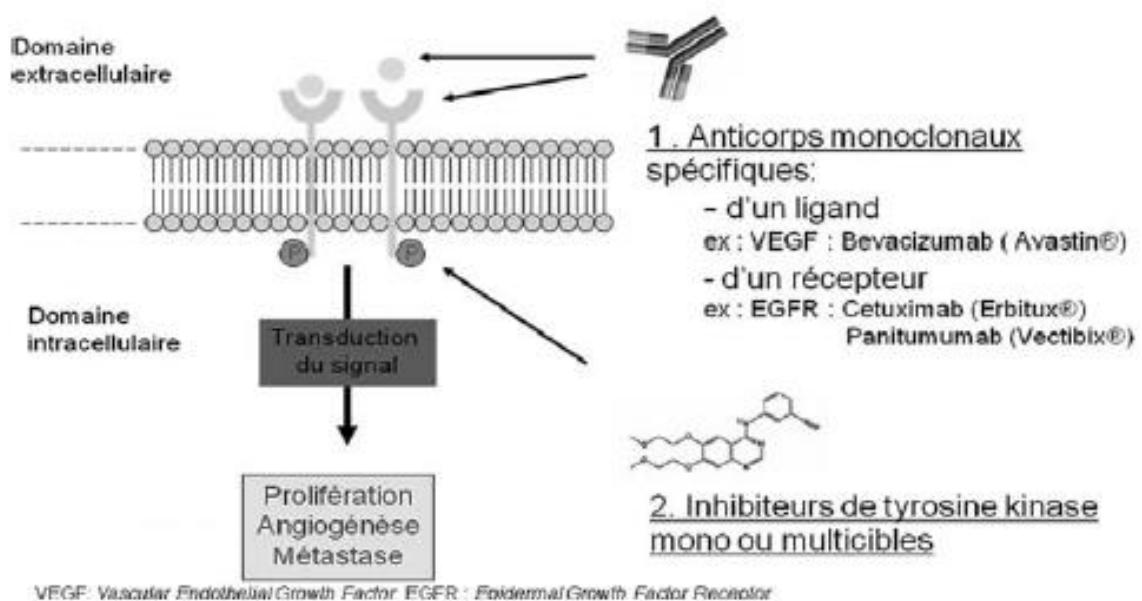


Figure 21 : Les différentes catégories de thérapies ciblées dans le cancer colorectal. (D'après Di Fiore et al. 2009)

a) Les anticorps monoclonaux

Les anticorps monoclonaux sont des substances produites en laboratoire qui ont la capacité de reconnaître une molécule cible particulière (antigène) d'une cellule cancéreuse et de s'y fixer. Ils existent différents anticorps monoclonaux approuvés dans le traitement du cancer colorectal :

▪ **Les inhibiteurs du récepteur du facteur épidermique de croissance ou anti-EGFRs (Epidermal Growth Factor Receptor) :**

❖ **Le Cetuximab (Erbix®)** a obtenu l'autorisation de mise sur le marché en 2004. Il s'agit d'un anticorps monoclonal chimérique de type IgG1 (composé de la région Fv d'un anticorps murin anti-EGFR et des régions constantes IgG1 humaines) qui se fixe sur le récepteur à l'EGF (Epidermal Growth Factor) avec une grande affinité (5 à 10 fois supérieure à celle des ligands endogènes) (Voir figure 22). Il bloque la voie de signalisation de l'EGFR et recrutent des cellules immunes effectrices contre les cellules tumorales rendant possible une cytotoxicité médiée par les cellules dépendantes des anticorps. Il y a donc un blocage de l'activation des voies RAS-RAF-MAPK et PI3K-AKT, impliquées notamment dans le contrôle de la survie cellulaire, de la prolifération mais aussi dans les mécanismes de migration, d'invasion (potentiel métastatique) et d'angiogenèse ⁸¹(Voir Figure 23).

En association avec l'irinotécan, le cetuximab a prouvé son efficacité dans le traitement des CCR métastatiques réfractaires exprimant l'EGFR (test immunohistochimique EGFR pharmDX). Plusieurs études (Etude BOND...) ont montré une amélioration du taux de réponse tumorale et du délai de progression (augmentation de la PFS), mais pas de la survie globale des patients ⁸².

❖ **Le Panitumumab (Vectibix®)** est autre anticorps monoclonal anti-EGFR de type IgG2. Contrairement au cetuximab, il est totalement humanisé limitant ainsi le phénomène d'ADCC (Antibody-Dependant Cell-mediated Cytotoxicity ou Cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps) ⁸³ (Voir figure 22).

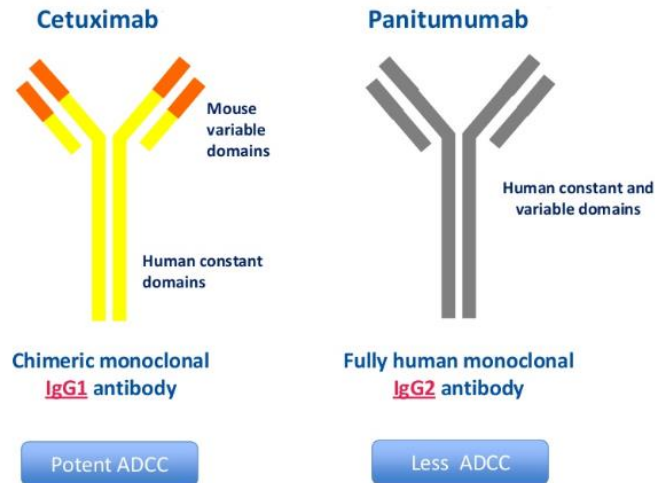


Figure 22 : Structures des deux anticorps monoclonaux dirigés contre EGFR, le Cetuximab et le Panitumumab. (D’après Imai et al. 2006)

Comme le cetuximab, le panitumumab se fixe au domaine de liaison du ligand de l'EGFR et inhibe l'autophosphorylation du récepteur induite par tous les ligands connus de l'EGFR. Cela a pour effet l'internalisation du récepteur, l'inhibition du développement cellulaire, l'induction d'une apoptose et la diminution de la production d'interleukine 8 et du facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF). Son autorisation de mise sur le marché en Europe date de 2007 après avoir montré son efficacité en terme de survie sans progression (augmentation de la PFS) après échec des chimiothérapies conventionnelles ⁸⁴. Comme pour le Cetuximab, il existe une résistance au traitement chez les patients présentant un statut RAS muté ⁸⁵.

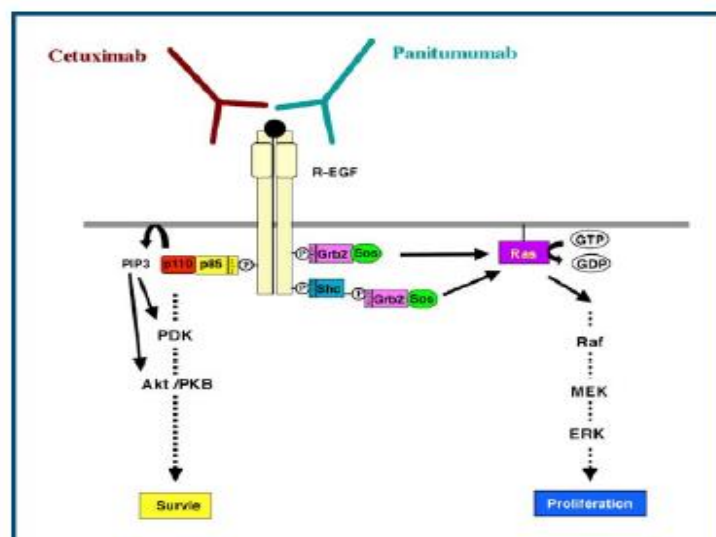


Figure 23 : Mécanisme d’action des anticorps anti-EGFRs. (D’après Cacheux et al. 2011)

Pour mettre en place une thérapie ciblée à base d'anticorps monoclonaux dirigés contre l'EGFR, il faudra donc prendre en compte l'efficacité de cette dernière en fonction des facteurs prédictifs mais également leur toxicité, essentiellement cutanée et immunoallergique (rash violent). Leur usage est toutefois validé en 1^{ère}, 2^{ème} ou 3^{ème} ligne, et en monothérapie ou associé aux chimiothérapies systématiques.

▪ **Les inhibiteurs du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire : anti-VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)** ^{86,87} :

❖ **Le Bévacicumab (Avastin®)** a reçu son autorisation de mise sur le marché par la FDA en 2004. C'est un anticorps monoclonal recombinant de type IgG1, chimérique humanisé (93% humain et 7% murin), dirigé contre le peptide pro-angiogénique VEGF dont il reconnaît toutes les isoformes. Sa demi-vie est de 18 à 21 jours. Le mécanisme d'action du bévacizumab est fondé sur l'inhibition de la liaison entre le VEGF et ses récepteurs (VEGFR-1 et VEGFR-2) situés à la surface des cellules endothéliales des néovaisseaux tumoraux dont la survie est VEGF-dépendante. Bloquer la fixation du ligand, en l'occurrence le VEGF, sur ses récepteurs permet une inhibition en partie de l'angiogenèse tumorale ⁸⁸ (voir Figure 24).

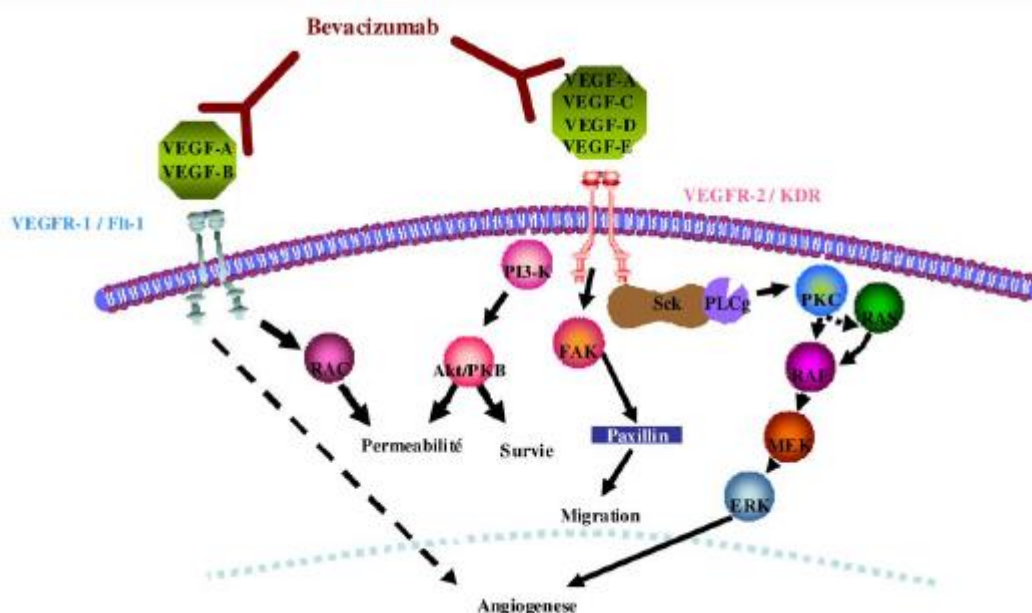


Figure 24 : Mécanisme d'action du Bévacicumab. (D'après Cacheux et al. 2011)

Le Bevacizumab (BV) a montré une bonne efficacité dans plusieurs études pour le traitement du CCR. L'étude BICC-C, évaluant l'association FOLFIRI-BV (5FU – acide folinique – irinotécan et BV) versus FOLFIRI-placebo, a montré une médiane de survie très élevée de l'ordre de 28 mois et des taux de réponse de l'ordre de 63 % dans le groupe traité par BV. Enfin, l'association du BV à une chimiothérapie à base d'oxaliplatine a été évaluée, avec une augmentation significative de la SSP (9,4 mois versus 8 mois) mais sans amélioration significative de la SG ⁸⁹. Aujourd'hui, il est toujours utilisé dans le traitement des CCR en 1^{ère} et 2^{ème} ligne.

❖ **Le Ramucirumab (Cyramza®)** est un anticorps monoclonal humanisé dirigé contre le VEGFR-2 et empêche ainsi la liaison des VEGF-A, VEGF-C et VEGF-D. Il inhibe ainsi l'activation du récepteur du VEGF de type 2 stimulée par le ligand et ses composants de signalisation en aval. Il a été mis sur le marché seulement en 2015 et est indiqué en 2^{ème} ligne dans le traitement des CCR métastatiques. Cependant, les résultats de l'étude RAINFALL ont montré qu'il ne permet pas une augmentation significative de la survie globale et montre des signes indésirables qui peuvent être très importants (perforations gastro-intestinales, saignements sévères...) ⁹⁰.

b) Un inhibiteur hybride de la voie VEGF

Plus récemment, il a été mis au point une stratégie anti-VEGF alternative qui consiste à former des récepteurs VEGF solubles (sur la base des domaines extracellulaires du VEGF). Ces « récepteurs » solubles fonctionnent comme un appât pour le VEGF vis-à-vis de sa liaison avec son récepteur physiologique au niveau de la membrane cellulaire. Ces récepteurs appelés VEGF-trap sont donc capables de capturer le VEGF circulant. **L'Aflibercept (Zaltrap®)** est obtenu par fusion du domaine extracellulaire 2 du VEGFR1 et du domaine extracellulaire 3 du VEGFR2 avec la fraction Fc d'une immunoglobuline humaine IgG1. Il présente une affinité élevée (100 fois plus que le bevacizumab) pour le VEGF-A, le VEGF-B et le PlGF inhibant la liaison à leurs récepteurs endogènes (Voir Figure 25) ⁹¹.



Figure 25 : Structure explicative de l'Aflibercept et ses ligands. (D'après Zaltrap.com)

L'aflibercept a obtenu son autorisation de mise sur le marché (AMM) en Europe, en 2013.

L'étude randomisée de phase III **VELOUR** a conduit à l'approbation de l'Aflibercept en association avec FOLFIRI chez les patients atteints de CCR métastatiques. La SG médiane était de 13,5 contre 12 mois avec une PFS médiane de 6,9 contre 4,67 mois dans le groupe Aflibercept et le groupe placebo, respectivement ⁹². Il est uniquement utilisable en 2^{ème} ligne de traitement.

Les effets indésirables rapportés avec la combinaison d'aflibercept et de FOLFIRI incluent les effets classiques des agents anti-angiogéniques et également une augmentation d'incidence de certaines toxicités en rapport avec la chimiothérapie. L'aflibercept est le deuxième agent anti-angiogénique à avoir une AMM (autorisation de mise sur le marché) dans le cancer colorectal métastatique.

c) Inhibiteurs de protéines kinases

Les inhibiteurs de la tyrosine kinase (tyrosine kinase inhibitors - TKI) reposent sur l'inhibition de la voie de signalisation du récepteur VEGF dans laquelle intervient la tyrosine kinase. Ce sont des petites molécules qui agissent en aval de la transduction du stimulus angiogénique en inhibant le récepteur VEGF. En l'absence des inhibiteurs de tyrosine kinase, la liaison du VEGF à ses récepteurs va provoquer leur dimérisation. On observe alors une cascade d'activation par phosphorylation de protéines partenaires qui va permettre la transcription de gènes cibles, aboutissant ainsi au signal qui va induire la formation de nouveaux vaisseaux permettant la cancérogenèse. Lors de ce processus, l'étape clé de l'activation du signal est

l'autophosphorylation des tyrosines du domaine intracellulaire des récepteurs du VEGF. Les inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase du récepteur vont entrer en compétition avec l'ATP (adénosine triphosphate) ou vont inhiber le site catalytique du domaine tyrosine kinase d'un ou de plusieurs récepteurs du VEGF. Cette inhibition entraîne le blocage de la reconnaissance du substrat, le VEGF, et empêche donc le processus de phosphorylation indispensable à l'activation des voies de signalisation intracellulaires en aval.

Il existe deux types d'inhibiteurs de tyrosine kinase : les TKI uni-cibles et les Multi-cibles. On trouve donc des inhibiteurs qui ont été développés pour inhiber de façon sélective un seul récepteur, ceux qu'on appelle les uni-cibles, comme par exemple le VEGFR2. Cependant, la plupart des TKI sont multi-cibles c'est-à-dire qu'ils sont capables d'agir sur plusieurs récepteurs à activité tyrosine kinase et aussi autres que le VEGFR, tels que le récepteur du FGF-2, la famille des récepteurs de l'EGF, les récepteurs de PDGF ou encore c-Kit et Flt-3.

Peu de TKIs sont approuvés dans le CCR, le principal TKI utilisé est le **Regorafenib (Stivarga®)** approuvé en 2012. C'est un inhibiteur des protéines tyrosines kinases impliquées dans l'angiogenèse tumorale (VEGFR-1,-2,-3, Tie 2), des oncogènes (KIT, RET, RAF-1, BRAF, BRAF V600E) et le microenvironnement tumoral (PDGFR, FGFR). Il est indiqué en 2^{ème} ligne dans le traitement des CCR métastatiques. Le regorafenib est indiqué dans le traitement du cancer colorectal métastatique résistant ou non éligible aux traitements standards à savoir une chimiothérapie, un traitement par anti-VEGF et en cas de gène KRAS sauvage, de traitements par anti-EGFR.

Le **Sorafenib (Nexavar®)** est un inhibiteur multikinase, agissant sur plusieurs cibles moléculaires: les VEGFR2 et 3, le PDGFR- β , le Flt-3, le stem-cell growth factor receptor ou c-Kit, mais aussi Raf-1. L'interruption de la transmission des signaux activant les voies de transduction sous-jacentes entraîne une propriété anti-angiogénique tumorale au sorafenib. Il agit à la fois sur les cellules endothéliales des vaisseaux péri-tumoraux et les cellules tumorales, ce qui empêche le développement des cellules cancéreuses et induit leur mort par apoptose ⁹³.

Plus de 60 TKIs sont étudiées tels que l'**Erlotinib (Tarceva®)** (étude DREAM ⁹⁴), ou le **Nintedanib (Ofev®)** ⁹⁵. Ils sont soit pas encore approuvés soit utilisés en dernier recours pour le traitement du CCR métastatique.

d) Immunothérapie

Le nom immunothérapie dérive du latin *immunis* qui veut dire exempt et du grec *thérapie* qui signifie soin. Ce terme général désigne les méthodes de traitement ayant pour but de modifier les moyens de défense naturelle de l'organisme, autrement dit le système immunitaire. Dans le cas du cancer, elle ne s'attaque pas directement à la tumeur, mais stimule les cellules immunitaires impliquées dans sa reconnaissance et sa destruction. Au cours des 10 dernières années, l'immunothérapie a connu un boom en oncologie. En effet, le cancer n'est plus considéré du seul point de vue de la tumeur, mais comme une maladie du microenvironnement tumoral (comprenant notamment le système immunitaire). En effet, les cellules tumorales ont la capacité de « manipuler » les cellules environnantes et ainsi proliférer hors de tout contrôle. Et c'est en comprenant comment elles y parviennent que les chercheurs peuvent aujourd'hui proposer de nouvelles solutions thérapeutiques ⁹⁶.

Les inhibiteurs de point de contrôle sont un type important d'immunothérapie utilisé pour traiter le cancer colorectal. Des anticorps monoclonaux ciblant la mort cellulaire programmée (via PD-1) ou l'antigène 4 des lymphocytes T cytotoxiques (CTLA4) ont été créés :

❖ Le **Pembrolizumab (Keytruda®)** et le **Nivolumab (Opdivo®)** sont des anticorps monoclonaux humains de type IgG4 anti-PD-1, qui préviennent la transformation du lymphocyte T effecteur en lymphocyte T cytotoxique. L'étude KEYNOTE a montré sur une cohorte de patients souffrant d'un cancer colorectal métastatique MSI que 59% d'entre eux présentaient soit une réponse objective soit une stabilité de la progression de la maladie ⁹⁷.

❖ L'**Ipilimumab (Yervoy®)** est également un anticorps monoclonal, mais dirigé cette fois contre CTLA4(*Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4*), lequel est un régulateur négatif de l'activation des cellules T. L'ipilimumab potentialise alors les cellules T en bloquant spécifiquement le signal inhibiteur du CTLA-4, conduisant ainsi à une activation et une prolifération des cellules T. Les lymphocytes T s'infiltrèrent alors au sein de la tumeur, aboutissant à la mort des cellules tumorales.

Ces anticorps monoclonaux ont été approuvés en 2017 pour le traitement du CCR. Cependant, ce type de thérapie est uniquement indiqué chez les patients souffrant d'un CCR présentant une déficience du système de réparation MMR (dMMR)

et ayant un statut MSI-H (forte instabilité microsatellitaire). A contrario, elle est contre-indiquée pour les patients ayant un CCR de type MSS (stable) ou MSI-L (faible instabilité des microsatellites) et avec un système MMR fonctionnel. Cela s'explique par le fait que les CCR de type MMR/MSI-H présentent une infiltration immunitaire importante⁹⁸.

Malgré les différents traitements, qu'ils soient cytotoxiques ou ciblés, la mortalité liée au CCR persiste. Cette mortalité est notamment dû à des phénomènes de résistances aux traitements.

CHAPITRE III : Acquisition d'une résistance au traitement : un souci majeur

Depuis les années 1950, comme nous avons pu le voir précédemment le traitement médical du cancer colorectal a fait de grands progrès, allant du « simple » agent cytotoxique (le 5-FU), au protocole de combinaison (FOLFOX, FOLFIRI), pour finir par l'avènement des thérapies ciblées (anticorps monoclonaux...). Malgré l'amélioration des taux de réponse obtenus avec les diverses stratégies thérapeutiques, le taux de survie à 5 ans pour le CCR métastatique n'excède pas les 14% ⁹⁹. L'un des principaux obstacles à ce constat est dû à l'apparition d'une résistance des cellules cancéreuses aux médicaments de chimiothérapie ¹⁰⁰. On parle alors de chimiorésistance. Le cancer continue alors de progresser même si le patient est sous traitement.

Cliniquement, on peut distinguer trois types de tumeurs d'un point de vue de la sensibilité ou résistance au traitement :

- Celles pour lesquelles on obtient une réponse rapide et complète par la chimiothérapie.
- Celles qui sont, au départ, très sensibles à la chimiothérapie, mais qui progressivement deviennent résistantes (chimio-résistance acquise) ; la récurrence aboutit, en général, à des tumeurs peu ou pas chimiosensibles et à la mort du malade.
- Celles qui, d'emblée, sont peu sensibles à la chimiothérapie, même si quelques réponses sont obtenues de façon plus ou moins anecdotiques.

Au cours des dernières décennies, un certain nombre de mécanismes sous-jacents conférant une résistance aux médicaments ont été décrit et classé notamment en trois catégories :

- Mécanismes de résistance basés sur le transport
- Mécanismes de résistance basés sur l'échappement à l'apoptose
- Mécanisme de résistance spécifique à chaque médicament ¹⁰¹.

I- Mécanismes cellulaires basés sur le transport

1) Efflux excessif des médicaments :

Les mécanismes cellulaires de résistance aux médicaments basés sur le transport se réfèrent principalement à l'efflux de médicaments hors des cellules cancéreuses à travers une variété de transporteurs membranaires, conduisant ainsi à une diminution de l'accumulation intracellulaire de médicaments anti-cancéreux et à l'échec de la chimiothérapie ¹⁰².

Les transporteurs membranaires sont un groupe de protéines associées à la membrane qui contrôlent le transport de molécules dans et hors des cellules. À ce jour, on dénombre plus de 400 transporteurs membranaires différents répertoriés en deux superfamilles principales: les transporteurs ABC (ATP Binding Cassette) et les transporteurs de soluté (SLC). Les transporteurs ABC comprennent notamment la P-Glycoprotéine (P-Gp) et des protéines MRP (Multidrug Resistance-associated Protein) associées à la résistance à plusieurs médicaments ¹⁰³. La P-Gp est organisée en quatre domaines : deux domaines transmembranaires (TMD comprenant 6 hélices alpha chacun) et deux domaines de liaisons aux nucléotides (NBD) possédant une cassette de fixation de l'ATP. Cet ATP est nécessaire à l'efflux par les pores délimités par les hélices transmembranaires. La MRP1 possède la même structure que celle de la P-Gp avec un domaine transmembranaire supplémentaire (TMD0) (voir figure 26)¹⁰⁴.

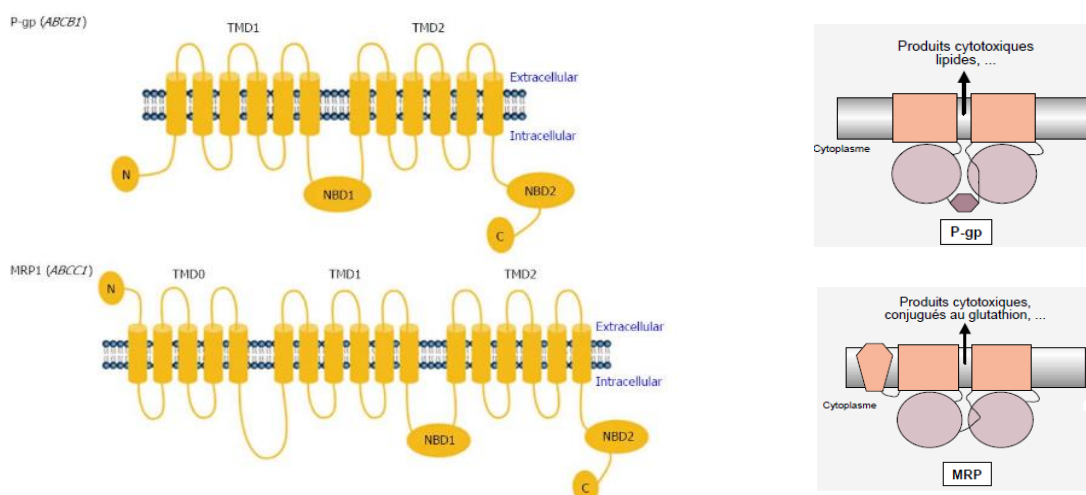


Figure 26 : Structures des deux principaux transports ABC impliqués dans la chimiorésistance dans le CCR. (D'après Hu et al. 2016)

Les transporteurs ABC ont un rôle pivot dans l'absorption, la distribution et l'excrétion des substances médicamenteuses, affectant ainsi leur efficacité et leurs profils de sécurité (détoxification).

Les transporteurs ABC, en particulier la P-gp et la MRP1 seraient « up-régulés » dans certaines tumeurs ^{105,106}. En effet, il a été montré qu'un certain nombre de cancers du côlon étaient insensibles à la plupart des agents de chimiothérapie dès le début du traitement. Cela s'explique notamment par le niveau d'expression basal de la P-Gp (codé par le gène MDR1) et de la MRP1 (expression anormalement élevée retrouvée dans 50% des CCRs) dans certaines tumeurs qui confère ainsi une résistance intrinsèque aux médicaments ^{107,108}. De plus, l'expression de P-Gp et MRP1 peut être induite par les agents de chimiothérapie au cours du traitement (Expression à la hausse après exposition accrue aux médicaments) ^{109,110}.

Ainsi, la surexpression des transporteurs ABC peut faciliter l'efflux des médicaments cytotoxiques hors des cellules cancéreuses, ce qui a pour conséquence de diminuer leurs concentrations intracellulaires et leurs effets thérapeutiques. A terme, cela cause donc une résistance aux médicaments (voir Figure 27) ¹⁰⁴.

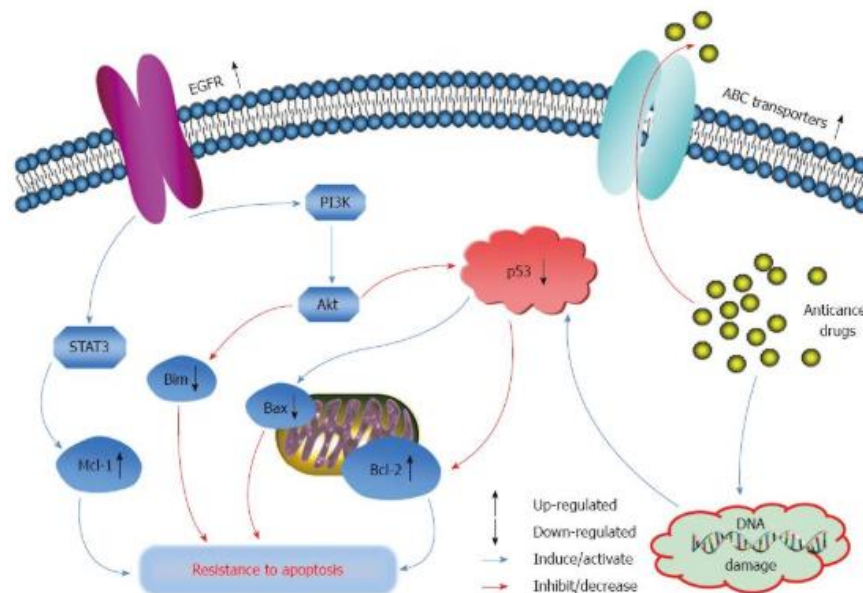


Figure 27 : L'implication des transporteurs ABC et de l'apoptose dans les phénomènes de résistance aux médicaments dans le CCR (D'après Hu et al. 2016)

Des inhibiteurs de P-Gp ou de MDR1 (Tariquidar, vérapamil, quinine, dextvérapamil...) sont à l'étude, cependant ils sont difficile à utiliser en clinique car en inhibant ces protéines, le métabolisme et l'excrétion des médicaments co-administrés sont affectés, ce qui entraîne des réactions pharmacologiques imprévisibles ¹¹¹.

Un autre type de récepteur serait également impliqué de manière importante dans l'efflux des médicaments et par conséquent dans la chimiorésistance : il s'agit du récepteur hedgehog Patched 1 (Ptch1). En effet, il a été montré que Ptch1 était surexprimé dans de nombreux cancers (des poumons, du sein, de la prostate, des ovaires mais également du côlon)¹¹². La signalisation hedgehog joue d'ailleurs un rôle dans l'expression des transporteurs ABC tels que P-gP (surexpression de ces derniers). En plus de l'implication de la voie hedgehog, Ptch1 contribue lui-même à l'efflux des agents chimiothérapeutiques tels que la doxorubicine ou encore le 5FU en utilisant la force proton-motrice. Cela est permis par la présence d'un gradient de pH inversé, spécifique aux cellules cancéreuses ¹¹³. Ptch1 présente d'ailleurs une homologie de séquence avec les transporteurs de la famille des RND (Resistance-Nodulation-Division) utilisant eux aussi la force proton-motrice et également impliqué dans la résistance aux traitements chimiothérapeutiques. Ainsi, la recherche d'un inhibiteur de l'activité de Ptch1 était une évidence. Hasanovic et al. ont donc mis en évidence une molécule anti-Ptch1 : la méthiothépine qui favoriserait l'accumulation du traitement chimiothérapeutique dans les cellules cancéreuses et donc son efficacité. Par conséquent, la combinaison d'un inhibiteur de l'activité d'efflux des médicaments par Ptch1 avec une chimiothérapie classique pourrait être une option thérapeutique prometteuse dans les cas de cancer surexprimant Ptch1 ¹¹⁴.

2) Influx difficile des médicaments :

Il s'agit d'un mécanisme très fréquent de résistance, en rapport avec des défauts de système de transport. Certains médicaments ont besoin d'un transporteur pour pénétrer dans la cellule : la perte d'activité d'un transporteur entraîne une résistance vis à vis de l'activité anti-tumorale avec une perte d'entrée du médicament. Ce mécanisme peut jouer dans le sens plasma - compartiment intracellulaire (la perte d'activité d'un transporteur entraîne une résistance vis à vis de l'activité anti-tumorale).

II- Echappement à l'apoptose et chimiorésistance

Outre l'efflux « exagéré » des agents de chimiothérapie via les transporteurs ABC, un autre mécanisme important de résistance aux médicaments est l'altération des voies de signalisation de la mort cellulaire, en particulier l'apoptose ¹¹⁵. Ce type de résistance aux médicaments se développe avec la surexpression de protéines qui inhibent la mort cellulaire et/ou avec la perte de protéines nécessaires à la mort cellulaire ¹¹⁶. Cette « évasion » à l'apoptose contribue alors à la progression tumorale.

En effet, il a été montré que la suppression de l'apoptose dans les cellules cancéreuses est souvent associée à une expression accrue des gènes et des protéines anti-apoptotiques (Bcl-2, Mcl-1...), et à contrario, une diminution de l'expression des gènes et des protéines pro-apoptotiques (p53, Bax, Bim...) ¹¹⁷. En tant que gène mutant le plus fréquent dans le cancer colorectal, le suppresseur de tumeur p53 joue un rôle central dans la régulation de l'apoptose et dans la protection de l'organisme contre le cancer. Habituellement, p53 exécute sa fonction par la trans-activation de gènes cibles qui sont principalement impliqués dans la régulation de l'arrêt du cycle cellulaire et de l'apoptose ^{118,119}. Lorsque l'ADN est légèrement endommagé, l'activation de p53 entraîne l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 afin de permettre sa réparation. Cependant, si les dommages à l'ADN sont graves et ne peuvent pas être réparés avec succès, p53 déclenche l'apoptose en ciblant Bax (pro-apoptotique) et en inhibant Bcl-2 (anti-apoptotique) (voir Figure 28)¹²⁰

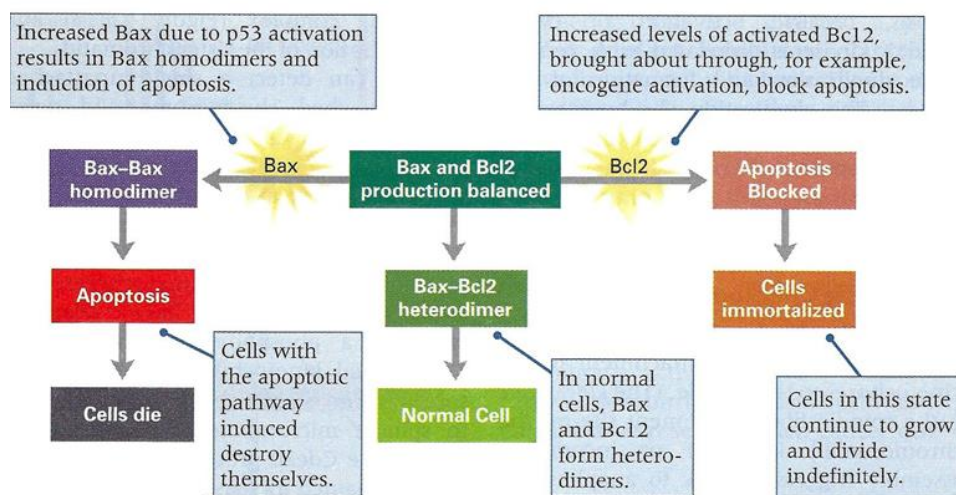


Figure 28 : Bax et Bcl-2 régule le mécanisme d'apoptose (Lecture 20, Cancer Genetics, 2013)

Dans 80 % des CCRs, la mutation p53 est retrouvée et conduit à une perte de fonction de p53. Son action pro-apoptotique est donc considérablement atténuée : la balance « expression de gènes pro-apoptotiques » / « expression de gènes anti-apoptotiques » est inversée (surexpression de Bcl-2 et sous-expression de Bax) (Revoir Figure 27). Les cellules cancéreuses deviennent alors insensibles aux dommages à l'ADN, augmentant ainsi le seuil requis pour activer l'apoptose et provoquant finalement une chimiorésistance ¹²¹. Ce mécanisme est assez souvent observé dans les traitements au cisplatine.

Les inhibiteurs de l'EGFR tels que le cetuximab et le panitumumab sont utilisés pour tenter restaurer la fonction apoptotique.

III- Mécanismes cellulaire de résistance spécifique à chaque médicament

En plus des mécanismes de résistance généraux susmentionnés, chaque agent de chimiothérapie conventionnel présente ses propres mécanismes de résistance. Ces derniers dépendent notamment d'une modification d'activité d'enzymes spécifiques à leur mode d'action.

1) 5-FU

Bien que le 5-FU soit la pierre angulaire du traitement du CCR, près de la moitié des patients présentent soit une résistance spontanée, ou acquise au cours de la cure.

Le mécanisme majeur de la résistance dans les carcinomes métastatiques est dû à une altération des enzymes impliquées dans l'anabolisme du 5-FU : Thymidylate synthétase, Thymidine phosphorylase, Uridine phosphorylase, Orotate phosphoribosyl-transférase¹²²⁻¹²⁴. Cela a comme conséquence une faible formation de FdUMP, responsable de l'action cytotoxique amoindrie du 5-FU. La surexpression des enzymes du catabolisme, notamment la DPD, sont responsables de la chimiorésistance à cette molécule dans les tumeurs coliques ¹²⁵. Ainsi, le 5-FU est dégradé et éliminé rapidement de l'organisme sans même avoir pu agir sur les cellules cancéreuses.

2) Oxaliplatine

La résistance spécifique à l'oxaliplatine est principalement liée à la voie de réparation de l'excision nucléotidique (NER). Les niveaux d'expression des gènes codant pour des protéines impliquées dans le NER (ERCC1, XRCC1, XDP...) sont corrélés à la résistance à l'oxaliplatine et peuvent être utilisés comme indice de prédiction de la sensibilité au traitement ¹²⁶. En effet, l'induction des enzymes impliquées dans ces systèmes est responsable d'une augmentation de l'activité réparatrice manifestée par une élimination plus importante des adduits créés, expliquant ainsi la diminution de la sensibilité cellulaire au médicament ¹²⁷.

3) Irinotécan

Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent le CPT-11 ou son métabolite actif le SN-38 sont des inhibiteurs de la topoisomérase I. Le premier mécanisme de résistance est donc plutôt de type cellulaire avec une modification de l'expression et de l'activité de la topoisomérase I. En effet, une activité réduite ou une sous expression de la topoisomérase I confère une protection des cellules cancéreuses envers l'irinotécan ou le SN-38 ¹²⁸.

Comme le 5-FU et l'Oxaliplatine, le second mécanisme de résistance concerne les enzymes impliquées dans l'anabolisme (altération de la carboxylestérase (CES) ou de la β -Glucuronidase) ou dans le catabolisme du CPT-11 (surexpression ou activité augmentée de l'uridine glucuronosyltransférase (UGT) et de la CYP3A)¹²⁹.

Toutefois, il est actuellement impossible de prédire d'emblée une résistance à l'Irinotécan. Les différents mécanismes potentiels de résistances aux agents de chimiothérapie ci-dessus sont récapitulés dans la figure ci-dessous :

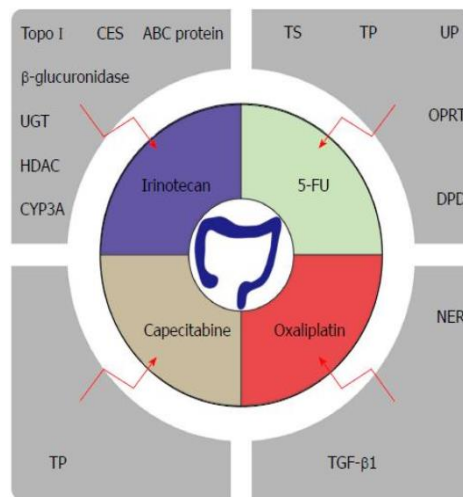


Figure 29 : Mécanismes potentiels de résistance spécifique à chaque agent de chimiothérapie. (D'après Van der Jeught et al. 2018)

Topo I : Topoisomerase I ; CES: Carboxylesterases; UGT: Uridine diphosphate glucuronosyltransferase; CYP3A: Hepatic cytochrome P450 enzymes; HDAC: Histone deacetylase; ABC protein: ATP-binding cassette transporter protein; TP: Thymidine phosphorylase; NER: Nucleotide excision repair; TGF- β 1: Transforming growth factor β 1; TS: Thymidylate synthase; UP: Uridine phosphorylase; OPRT: Orotate phosphoribosyl transferase; DPD: Dihydropyrimidine dehydrogenase.

CHAPITRE IV : Migration et Invasion, une mobilité nécessaire à la progression tumorale

En clinique, on considère qu'une tumeur devient maligne dès qu'elle détient un pouvoir invasif. C'est à partir de ce stade qu'on considère véritablement qu'on est en présence d'un cancer ¹³⁰. Cela dépend notamment de la capacité de migration et d'invasion des cellules cancéreuses.

I- Un changement phénotypique préalable : la Transition Epithelio-Mésenchymateuse (EMT)

Au cours du développement embryonnaire, les cellules peuvent passer d'un état épithélial à un état mésenchymateux de manière très plastique et dynamique. Un passage à l'état mésenchymateux, dans un processus appelé Transition Epithelio-Mésenchymateuse (EMT), modifie les molécules d'adhésion exprimées par la cellule, lui permettant d'adopter un comportement migratoire et invasif. L'inverse de ce processus - la transition Mésenchymato-Epithéliale (MET) - est associé à une perte de cette liberté migratoire (elles peuvent uniquement migrer mais de manière limitée et au sein d'un même épithélium) ¹³¹.

La EMT est exécutée en réponse à des facteurs de signalisation pléiotropiques qui induisent l'expression de facteurs de transcription (FT) spécifiques appelés EMT-FT (comme Snail, Zeb, Twist...), de miARN ainsi que de régulateurs épigénétiques et post-traductionnels, dont beaucoup sont impliqués dans le développement embryonnaire, la cicatrisation des plaies, la fibrose et les métastases du cancer.

La description classique de la EMT comme la transformation de cellules épithéliales en cellules mésenchymateuses peut avoir invoquée la perception de ce processus comme un passage entre deux états alternatifs, mésenchymateux ou épithélial. Cependant, des états dits « intermédiaires » sont retrouvés dans plusieurs études *in vitro* et *in vivo*, notamment dans des cellules circulantes tumorales ^{132,133} (voir Figure 30).

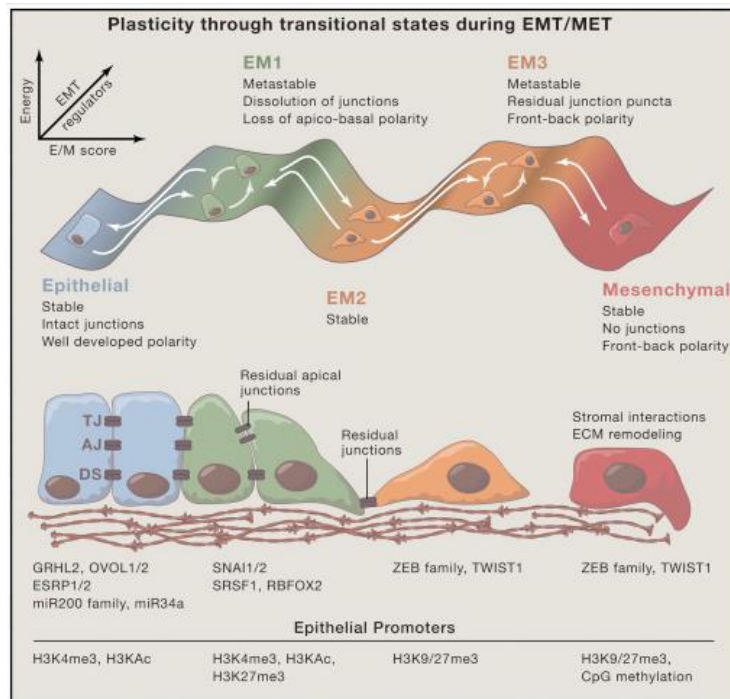


Figure 30 : Les différents états phénotypiques possibles des cellules en EMT et les facteurs associés. (D'après Nieto et al. 2016)

L'EMT peut être considérée comme un continuum, dans lequel les cellules présentent des caractéristiques épithéliales (E), intermédiaires (EM) et mésenchymateux (M). TJ, tight junction; AJ, adherens junction; DS, desmosome.

Les parallèles significatifs entre la plasticité cellulaire dans le développement embryonnaire et la progression des carcinomes ont conduit à la proposition que la EMT est un moteur central des tumeurs malignes dérivées de l'épithélium. Il a depuis été démontré qu'elle déclenche la dissociation des cellules cancéreuses des carcinomes primaires, qui migrent et se disséminent ensuite vers des sites distants. De manière significative, c'est la MET qui est alors censée déclencher l'arrêt de la migration, induisant la prolifération des mêmes cellules et l'ensemencement de la nouvelle tumeur (voir Figure 31) ¹³⁴.

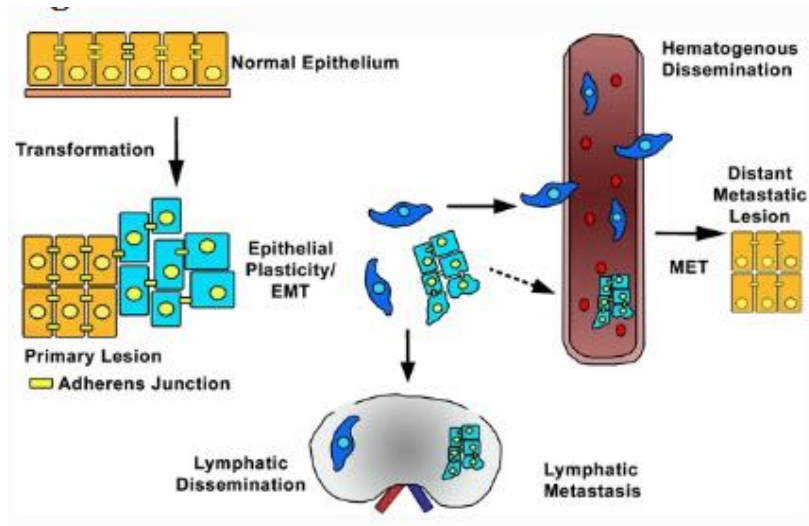


Figure 31 : Les différents états phénotypiques possibles des cellules en EMT et les facteurs associés. (D'après Micalizzi et al. 2010)

Les signatures EMT dans le cancer sont donc associées à un mauvais pronostic vital¹³⁵.

II- La Migration : Mobilité planaire des cellules

La migration cellulaire est un processus hautement intégré et en plusieurs étapes qui joue un rôle important dans la progression de diverses maladies, notamment le cancer, l'athérosclérose et l'arthrite.

Son mécanisme a été étudié dans de nombreuses études. Premièrement, la cellule commence par émettre une extension cytoplasmique (de type : filopode, lamellipode ou pseudopode) sous l'effet de la polymérisation de l'actine corticale qui déforme la membrane plasmique. Une fois formée, cette extension s'ancre au « support ». Si ce dernier est la matrice extracellulaire, l'ancrage est assuré via des adhérences focales, dans lesquelles des protéines comme les intégrines relient le cytosquelette à la matrice. Dans le cas où le support est une autre cellule, l'ancrage s'effectue grâce à des molécules d'adhérence cellule-cellule comme les cadhérines. Ensuite, la contraction du cytosquelette d'acto-myosine assure le déplacement cellulaire par traction sur les adhérences focales et rétraction de l'arrière de la cellule (qui, au contraire, se détache du support) ¹³⁶. Afin d'être efficace, ces processus doivent être polarisés ¹³⁷.

Dans la cellule, cette polarité est essentiellement contrôlée par les petites GTPases de la famille Rho, Rac1, Cdc42 et RhoA, qui régulent la dynamique du cytosquelette. Au front de migration, Rac1 et Cdc42 favorisent la formation des protrusions, alors qu'à l'arrière, RhoA induit la formation de fibres de stress assurant la contractilité cellulaire ¹³⁸ (voir Figure 32) .

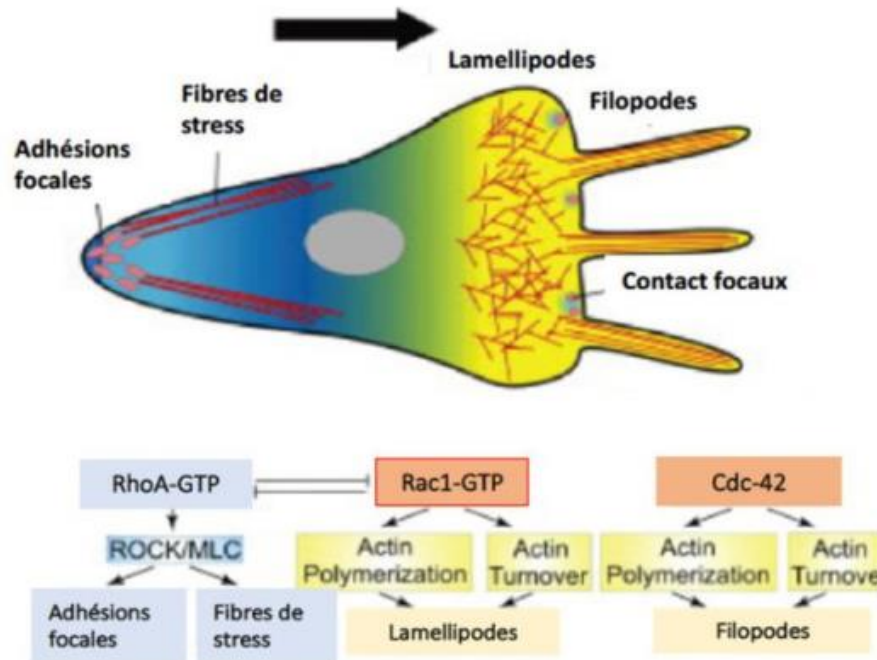


Figure 32 : Régulation de la migration cellulaire par les petites protéines G (D'après Darber et al. 2012)

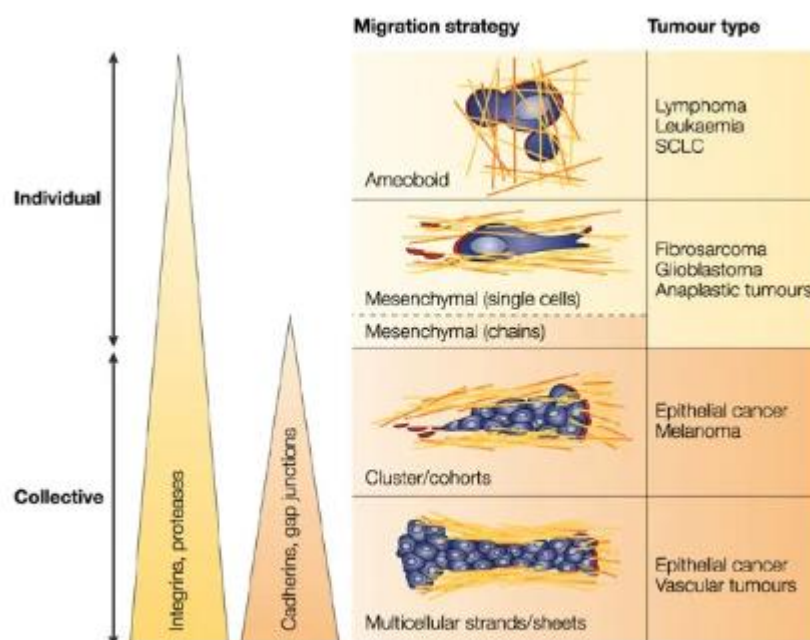
Les cellules cancéreuses possèdent une capacité unique à s'adapter à différentes conditions micro-environnementales. Pour cela, elles sont capables d'adopter différentes morphologies et caractéristiques de migration afin de rester mobiles :

- La migration individuelle ou mésenchymateuse
- La migration collective

La migration individuelle ou mésenchymateuse est le processus migratif dit « classique » puisqu'il se base sur le mécanisme cité précédemment c'est-à-dire : (1) Polarisation de la cellule, (2) Formation d'extensions cytoplasmiques, (3) Etablissement d'adhérences, (4) Translocation du corps cellulaire et (5) Rétractation.

La migration cellulaire est définie comme collective lorsque plusieurs cellules se déplacent de manière cohésive et coordonnée. Pendant la migration collective, les cellules conservent leurs contacts physiques et fonctionnels entre elles. De plus, pour migrer collectivement, la polarisation cellulaire doit se produire au niveau de l'ensemble du groupe cellulaire. Ainsi, la dynamique du cytosquelette d'actine doit être coordonnée entre toutes les cellules. Par conséquent, le groupe de cellules fonctionne comme une seule unité ¹³⁹.

Dans de nombreuses tumeurs, les deux modes de migrations sont simultanément présents. Alors que les leucémies, les lymphomes et la plupart des tumeurs stromales solides, telles que les sarcomes, se disséminent via des cellules uniques ; les tumeurs épithéliales utilisent généralement des mécanismes de migration collective (cas de certains carcinomes colorectaux) ¹⁴⁰. En principe, plus le stade de différenciation de la tumeur est bas, plus la tumeur est susceptible de se disperser via les cellules individuelles. De telles différences dans la structuration cellulaire reflètent de manière putative les variations du répertoire moléculaire utilisées par une cellule cancéreuse pour migrer (voir Figure 33) ¹⁴¹.



Nature Reviews | Cancer

Figure 33 : Les différentes stratégies de migration des cellules tumorales suivant le type de programme moléculaire. (D'après Sfakianakis et al. 2018)

III- L'invasion : atteinte des tissus en profondeur

L'invasion cellulaire est liée à la migration des cellules et en dépend, sauf que les cellules font plus que migrer. En effet, la migration seule n'est pas suffisante pour former une tumeur secondaire à distance ou métastase à partir de la tumeur « mère ». Pour cela, les cellules se déplacent à travers la matrice extracellulaire (MEC) dans les tissus voisins grâce à un processus qui implique la dégradation de la matrice extracellulaire et la protéolyse.

Cette protéolyse fait intervenir des enzymes : les métalloprotéases matricielles (MMP) et les constituants du système de la plasmine ¹⁴² (voir Figure 34).

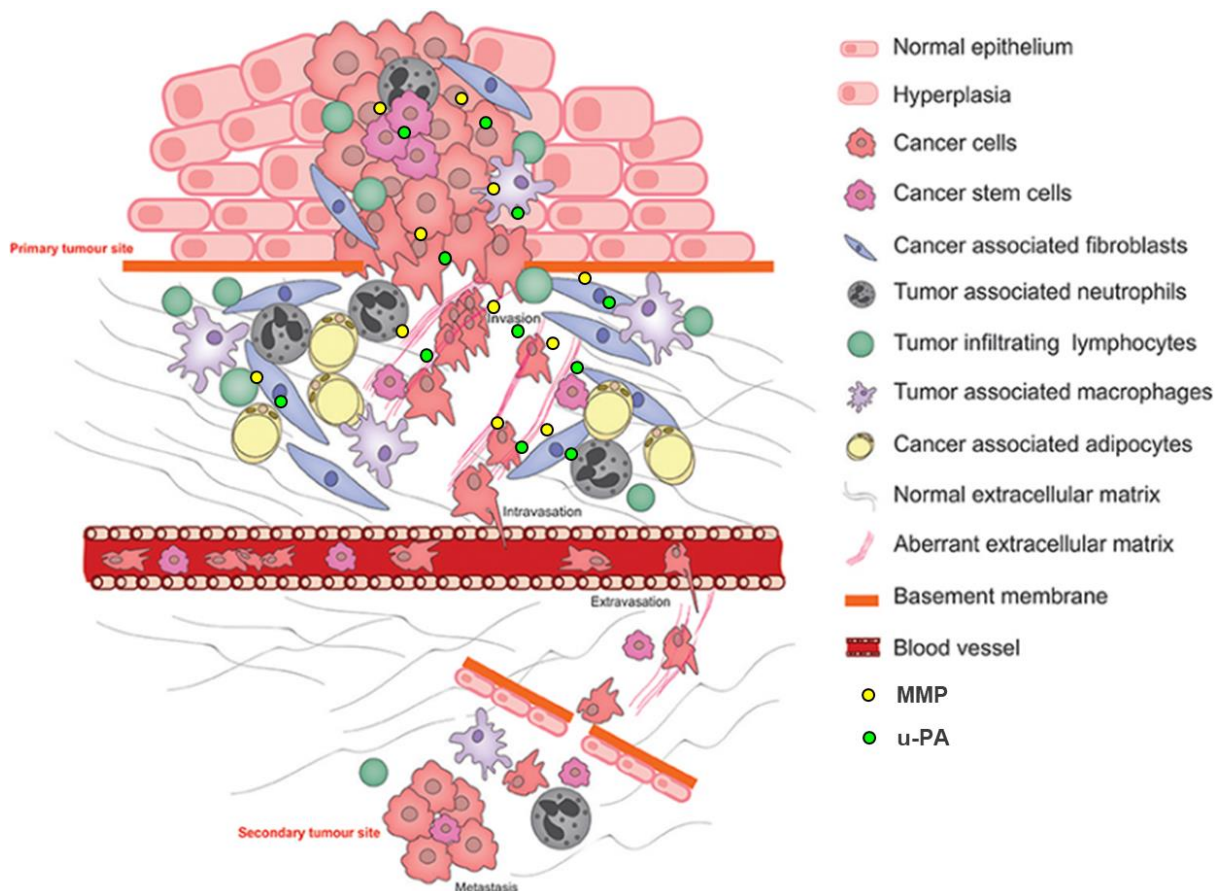


Figure 34 : Développement physiopathologique d'une tumeur montrant la prolifération, l'invasion et la dissémination (D'après Poltavets et al. 2018)

Dès le début des années 80, Liotta et al ont montré l'implication des MMP dans cette étape clé de l'invasion tumorale. Bien qu'initialement on ait supposé que les MMP étaient synthétisées par les cellules tumorales, il a été montré depuis que se sont les cellules du stroma (activées par des facteurs solubles sécrétés par les cellules tumorales) qui sont à l'origine de la majeure partie de cette sécrétion et plus particulièrement les fibroblastes (normaux ou associés au cancer), les macrophages et les cellules endothéliales ¹⁴³. Cependant, certaines lignées cellulaires tumorales humaines colorectales produisent des MMP dont l'expression est régulée par la présence de facteurs de croissance. Dans certains cas, une corrélation entre le stade tumoral et le niveau d'expression des MMP existe. Dans le mélanome, l'expression de MMP-2 augmente avec le grade tumoral et l'apparition de MMP-9 correspond au passage d'une croissance horizontale à une croissance en profondeur, et à l'apparition de métastases. De plus, le stroma des tumeurs bénignes précurseurs de cancer produit une moindre variété de MMP en comparaison de celui des tumeurs malignes correspondantes. Ainsi, dans les polypes bénins seule MMP-7 est exprimée, alors que dans les adénocarcinomes coliques, les MMP-1, 2, 3, 7 et 11 sont exprimées. Plusieurs études ont montré une absence totale de sécrétion de MMP dans le colon normal tandis que plusieurs d'entre-elles le sont au cours du cancer ¹⁴⁴. Ainsi, MMP-2 active est uniquement présente dans le cancer et non dans la muqueuse normale suggérant une corrélation avec les modifications du phénotype tissulaire induites par le cancer. Leur niveau d'expression dans la tumeur primitive est d'ailleurs corrélé au risque de développer des métastases hépatiques ¹⁴⁵. Une activité accrue est donc corrélée avec un pronostic plus sévère et un taux de récurrence élevé ¹⁴⁶.

Grâce aux mécanismes de prolifération, migration et invasion, le cancer passe d'un stade de carcinome in situ à invasif. Ces mécanismes sont connus pour être potentialisés notamment par le VEGF. Les cellules tumorales parviennent alors à la circulation sanguine et vont potentiellement former des métastases. Cette circulation sanguine joue un rôle essentiel que nous allons voir dans la partie suivante.

CHAPITRE V : La vascularisation tumorale, une étape clé dans l'agressivité tumorale

I- L'angiogenèse

1) Généralités

L'angiogenèse signifie littéralement la création de nouveaux vaisseaux sanguins. Le mot «angio» signifie les vaisseaux sanguins tandis que «genèse» signifie la création.

L'angiogenèse est un processus physiologique qui est indispensable, notamment au cours du développement embryonnaire et post-natal. L'établissement du réseau vasculaire se fait en deux étapes :

- La vasculogenèse est l'étape préalable consistant à former des vaisseaux sanguins primitifs grâce à la migration, la différenciation et l'association de cellules progénitrices endothéliales (angioblastes).

- La seconde étape est l'angiogenèse, à proprement parler, c'est-à-dire la formation de nouveaux vaisseaux sanguins afin d'étendre le réseau vasculaire primitif. Cela implique des cellules spécialisées appelées cellules endothéliales qui tapissent les vaisseaux sanguins.

Sous l'effet de facteurs de croissance angiogéniques présents dans le microenvironnement des cellules endothéliales, ces dernières sont « activées » via la fixation de ces facteurs sur les récepteurs présents à leur surface. Une fois activées, les cellules endothéliales commencent à libérer des enzymes comme des protéases. Ces protéases dégradent les protéines et les cellules de la membrane basale, provoquant ainsi une ouverture dans le vaisseau sanguin préexistant. La cellule de front bourgeonne et acquiert de nombreuses protrusions membranaires (filopodes...). Les cellules endothéliales, guidées par cette cellule de front, empruntent alors cette « brèche » et se multiplient dans la matrice environnante afin de former des germes solides. Ces germes s'étendent jusqu'à former de nouveaux vaisseaux sanguins tubulaires qui vont se connecter au réseau vasculaire préexistant grâce aux nouvelles jonctions établies entre les nouvelles cellules endothéliales (voir Figure 35) ^{147,148}.

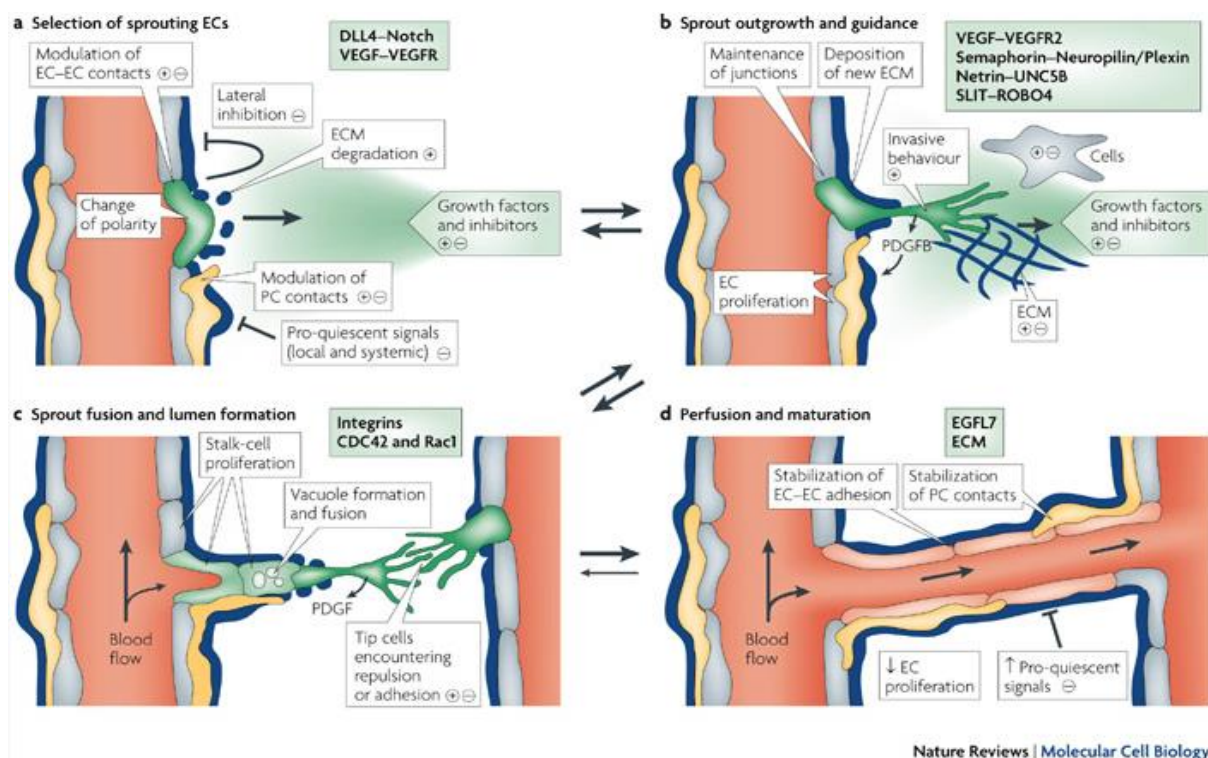


Figure 35 : Mécanismes généraux de l'angiogenèse classique (D'après Lavoie et al. 2018)

2) Importance de l'angiogenèse dans le développement tumoral

Il est aujourd'hui établi que la formation de nouveaux vaisseaux au sein d'une tumeur (c'est-à-dire angiogenèse tumorale) est une condition *sine qua non* du développement et de la progression tumorale ¹⁴⁹. Cela n'a pas toujours été une évidence.

a) Histoire évolutive du lien entre cancer et angiogenèse

En 1869, Carl Thiersch a été le premier à démontrer la formation de nouveaux vaisseaux dans le stroma de la tumeur. Il a montré que les nouveaux vaisseaux provenaient de vaisseaux préexistants. Pour montrer l'importance de l'interaction entre les cellules épithéliales tumorales et les vaisseaux sanguins, Thiersch a écrit : "L'épithélium dépend du stroma vasculaire de la même manière qu'une plante du sol dans lequel il a pris racine. Comme la plante, l'épithélium apporte avec lui un potentiel de développement et de croissance autonome et ne demande rien d'autre que l'apport de substances nécessaire à son développement". Il avait déjà anticipé cette relation étroite entre la tumeur et les vaisseaux. Cependant, il n'avait pas, à son époque, émis

l'hypothèse d'un rôle actif des cellules tumorales pour induire la croissance des vaisseaux, ce qui impliquait nécessairement l'existence d'un médiateur (biochimique) produit par les cellules tumorales.

Ce n'est qu'en 1908 qu'Ernst Goldmann est allé plus loin en décrivant la germination et le bourgeonnement des capillaires au sein des tumeurs. Cependant, il a vu en l'angiogenèse tumorale, un mécanisme de défense contre la croissance de la tumeur et non un effet favorisant le développement de la tumeur. Cette explication a été clairement contestée par Michael Gimbrone et Judah Folkman en 1972, qui ont démontré que les tumeurs du lapin ne se développent que dans un environnement tumoral vascularisé et avec la découverte de facteurs d'angiogenèse tumorale. Folkman a implicitement déclaré que les cellules tumorales et la population de cellules endothéliales capillaires au sein d'un néoplasme peuvent constituer un écosystème hautement intégré. Toutefois, l'effet « protecteur » n'est pas complètement faux. Ce concept de mécanisme de défense de l'hôte précède l'effet promoteur de la tumeur, et il a retrouvé des lettres de noblesse grâce à des recherches récentes dans le domaine de l'immunité tumorale. Ainsi, historiquement parlant, le concept de microenvironnement de la tumeur vasculaire a subi trois étapes de modifications conceptuelles : (Voir Figure 36) ¹⁵⁰.

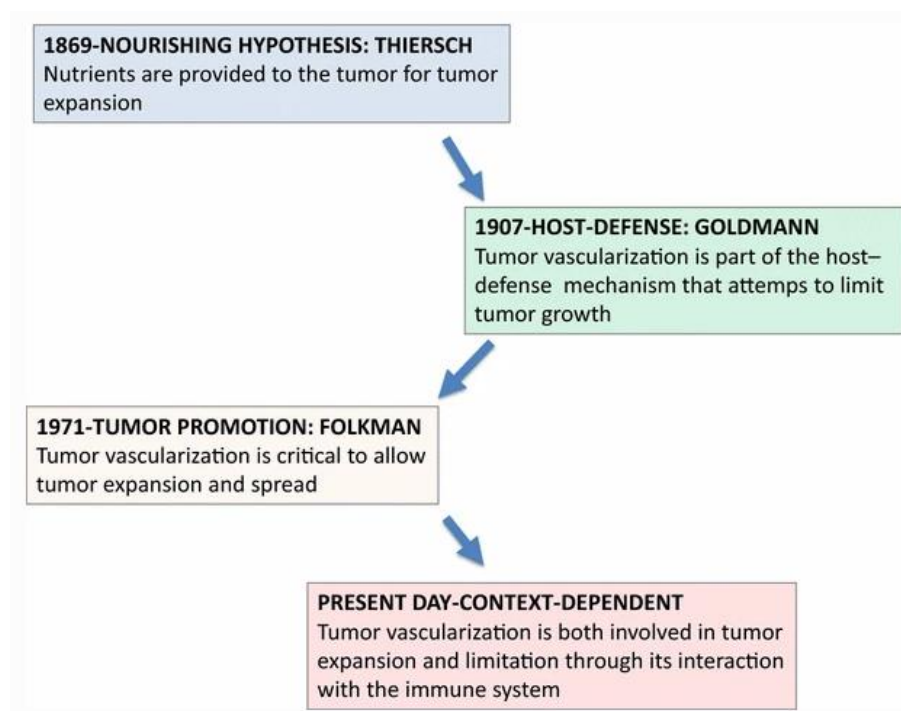


Figure 36 : Evolution du concept de vascularisation tumorale. (D'après Bikfalvi et al. 2017)

b) La notion de switch angiogénique

Le développement tumoral n'est pas linéaire mais se déroule en deux phases.

Dans un premier temps, les cellules cancéreuses prolifèrent et forment une masse avasculaire. Mais au-delà de quelques millimètres cubes, sans angiogenèse, on observe un arrêt de la croissance de la tumeur mais sans pour autant provoquer la mort cellulaire. On parle alors de phase de dormance. Cela a notamment été mis en évidence dans une étude datant de 1987 lors d'autopsies médico-légales réalisées sur 110 femmes (jeunes ou d'âge moyen) décédées de causes non naturelles et non liées au cancer. En effet, 20% d'entre-elles présentaient des tumeurs mammaires microscopiques, alors qu'un cancer du sein n'avait été diagnostiqué que sur l'une d'entre elles ^{151,152}. Une tumeur peut rester dormante un certain temps avant d'emprunter la deuxième phase de son développement.

Dans un second temps, au-delà d'un volume d'un à deux millimètres cubes, une vascularisation est nécessaire à la croissance tumorale, le plus souvent induite par l'hypoxie. Les cellules tumorales doivent alors acquérir la capacité d'induire le développement de nouveaux vaisseaux sanguins afin de permettre l'apport d'oxygène et de nutriments nécessaires à sa croissance. Pour cela, elles stimulent la prolifération des cellules endothéliales des capillaires voisins, qui forment des boucles vasculaires en direction de la tumeur, pour l'irriguer et permettre son développement.

Ainsi, une tumeur contenant de 100 à 300 cellules est suffisante pour déclencher une angiogenèse qui évolue en plusieurs étapes. Pour cela, la tumeur stimule la prolifération des cellules endothéliales des capillaires voisins, qui forment des boucles vasculaires en direction de la tumeur, pour l'irriguer et permettre son développement.

Ce passage d'une hyperplasie avascularisée dormante à un état (plus agressif) de prolifération de la tumeur vascularisée, est appelé « Switch angiogénique » et a été mis en évidence à la fin des années 80 par Folkman ¹⁵³. Ce phénomène est dû à un déséquilibre entre les facteurs pro et anti-angiogéniques causant la libération davantage de facteurs pro-angiogéniques favorisant ainsi la formation de nouveaux vaisseaux sanguins (Voir Figure 37).

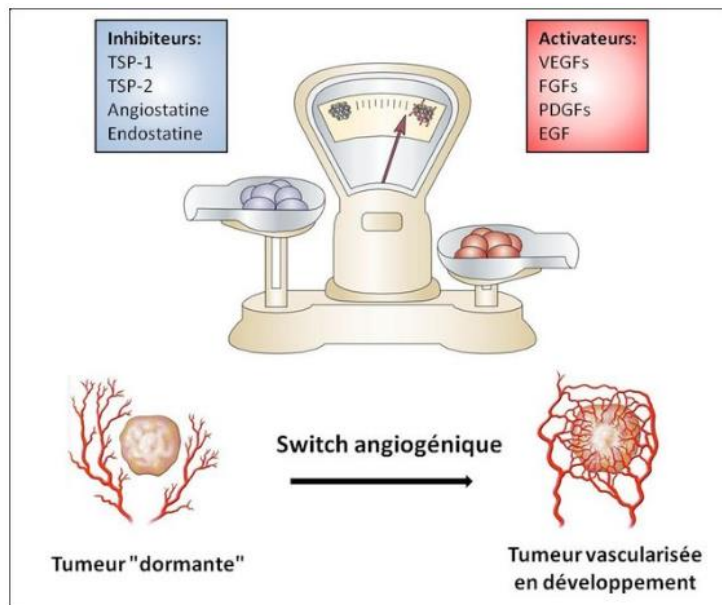


Figure 37 : Notion de switch angiogénique. (D'après Bergers et al. 2003)

La production de ces facteurs pro-angiogéniques est soit une réaction normale à l'hypoxie des cellules cancéreuses ou des cellules normales avoisinantes, soit le fait d'une mutation génétique particulière (p53...) ¹⁵⁴. Cela cause une prolifération active des cellules endothéliales dans la zone périphérique de la tumeur (index de prolifération 50 à 200 fois plus élevé que pour les mêmes cellules des tissus normaux) afin de créer les vaisseaux sanguins essentiels.

c) Une vascularisation essentielle mais structurellement et fonctionnellement différente

Cette croissance vasculaire est essentielle pour nourrir la tumeur. Celle-ci est non seulement stimulée par les facteurs pro-angiogéniques, mais les néo-vaisseaux qui en découle, sont également anormaux, que ce soit au niveau de leur structure mais également au niveau de leur fonction ¹⁵⁵.

En effet, les vaisseaux tumoraux présentent une structure tortueuse. Ils se ramifient irrégulièrement dans un réseau chaotique d'enchevêtrements, se connectent les uns aux autres de manière anarchique et sillonnent le stroma de manière aléatoire. Ils sont également très hétérogènes en termes de types de vaisseaux. Leurs diamètres sont inégaux, car leur paroi est parfois comprimée par des cellules tumorales ou stromales.

Certains vaisseaux sont alors surdimensionnés, alors que d'autres sont au contraire plus petits et plus immatures ¹⁵⁶ (Voir figure 38).

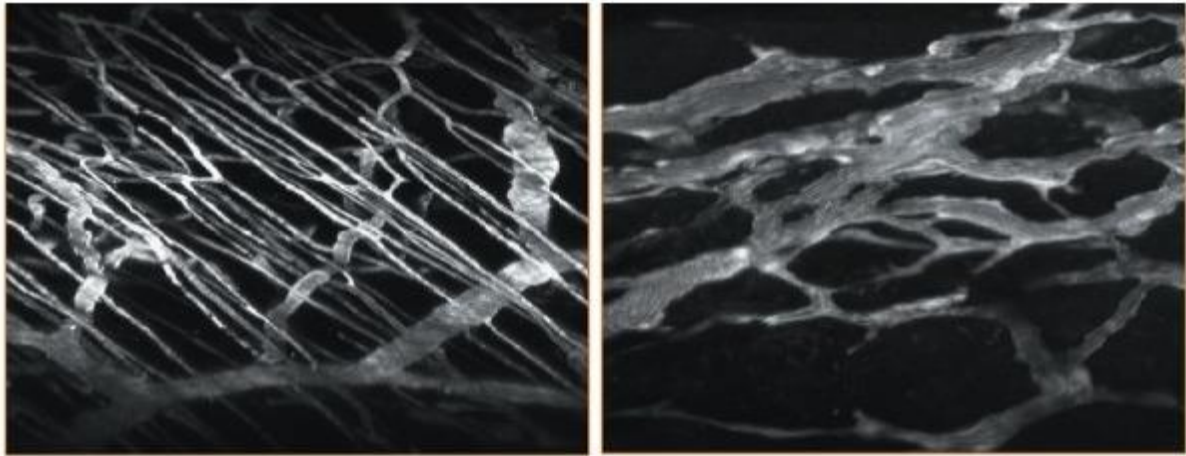


Figure 38 : Aspect normal (à gauche) et anormal (à droite) de la vascularisation en microscopie électronique à balayage. (D'après Ravaud et al. 2007)

Au sein d'une même tumeur, on peut donc avoir une partie très vascularisée alors qu'une autre peut présenter une absence totale de vaisseaux. Leur fonction est également altérée puisque leur paroi présente de multiples perforations, causant des modifications du flux sanguin ¹⁵⁷(Voir Figure 39).

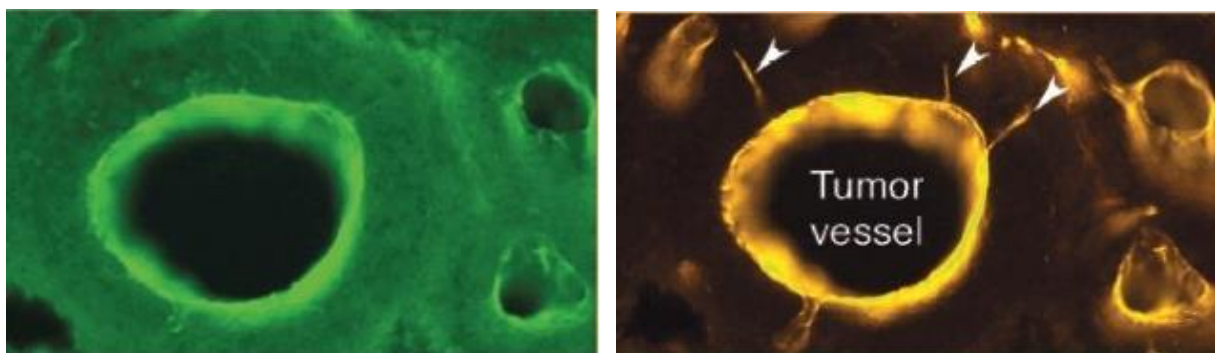


Figure 39 : Observation de la perméabilité vasculaire observée dans les vaisseaux normaux (à gauche) et tumoraux (à droite) . (D'après Ravaud et al. 2007)

Il en résulte un microenvironnement tumoral hostile qui peut altérer les caractéristiques intrinsèques des cellules tumorales de telle sorte que certains clones

tumoraux sont sélectionnés. L'« évasion » de ces clones par les vaisseaux est ainsi facilitée (Voir Figure 40) ¹⁵⁶.

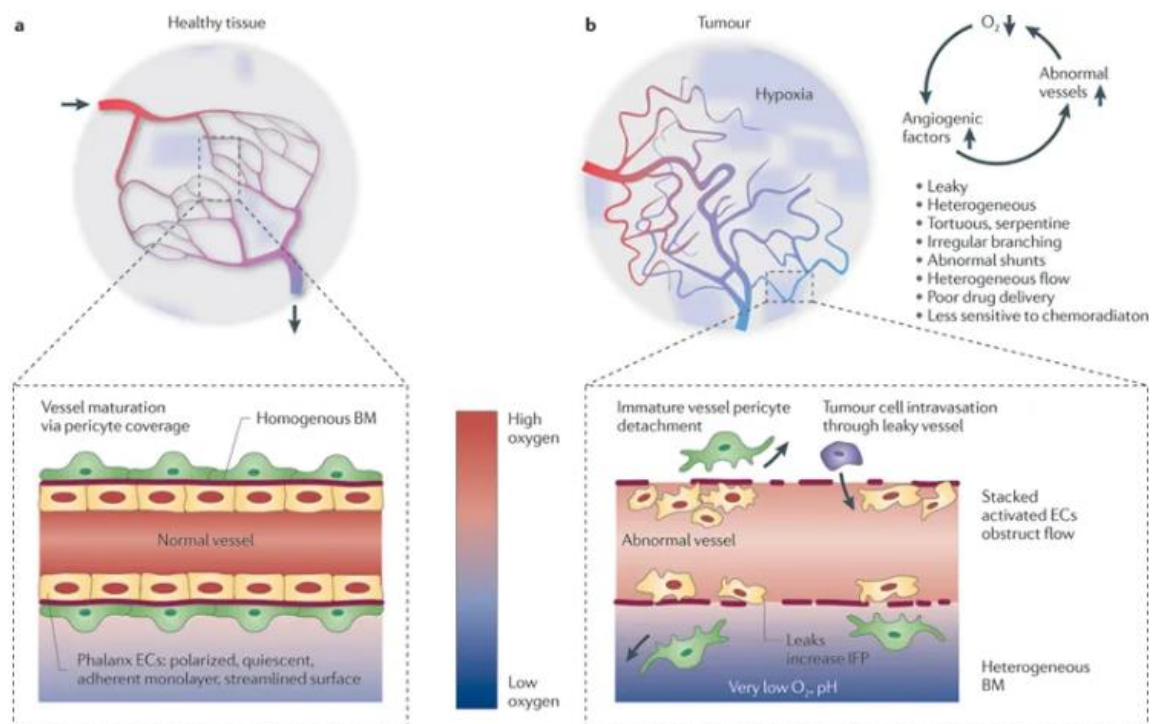


Figure 40 : Comparaison structurelle et fonctionnelle du système vasculaire (a) normal et (b) tumoral. (D'après Carmeliet et al. 2011) Dans les tissus sains, un système vasculaire régulier et fonctionnel est formé, avec une paroi vasculaire et un endothélium normal. Dans les tumeurs établies, le système vasculaire, ainsi que l'endothélium et la paroi vasculaire présentent des anomalies structurelles et fonctionnelles, conduisant à des régions d'hypoxie sévère (représentées par des ombres bleues).

II- Le mimétisme vasculaire : un nouveau mode de vascularisation tumorale agressive

La vascularisation tumorale se produit à travers plusieurs processus biologiques distincts, qui varient non seulement entre le type de tumeur et l'emplacement anatomique, mais se produisent également simultanément dans le même tissu cancéreux. Comme nous l'avons vu, ces processus font intervenir une gamme de facteurs sécrétés et de voies de signalisation sur les cellules endothéliales. Cependant, des cellules non endothéliales peuvent intervenir également dans cette vascularisation.

1) Mise en évidence et définition du processus de « mimétisme vasculaire »

Initialement, les chercheurs savaient que les tumeurs pouvaient induire les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins normaux à former de nouvelles « voies d'alimentation » au sein de la tumeur. Ce processus est appelé angiogenèse.

Cependant, en 1999, Maniotis et Hendrix ont publié un article qui a déclenché de nombreuses réactions au sein du monde scientifique. L'idée soutenue dans cette article est la suivante : les cellules tumorales (de mélanome uvéal) elles-mêmes pourraient créer dans un certain contexte leurs propres « structures vasculaires ». Ce processus novateur est alors appelé « mimétisme vasculaire »¹⁵⁸ (Voir figure 41).

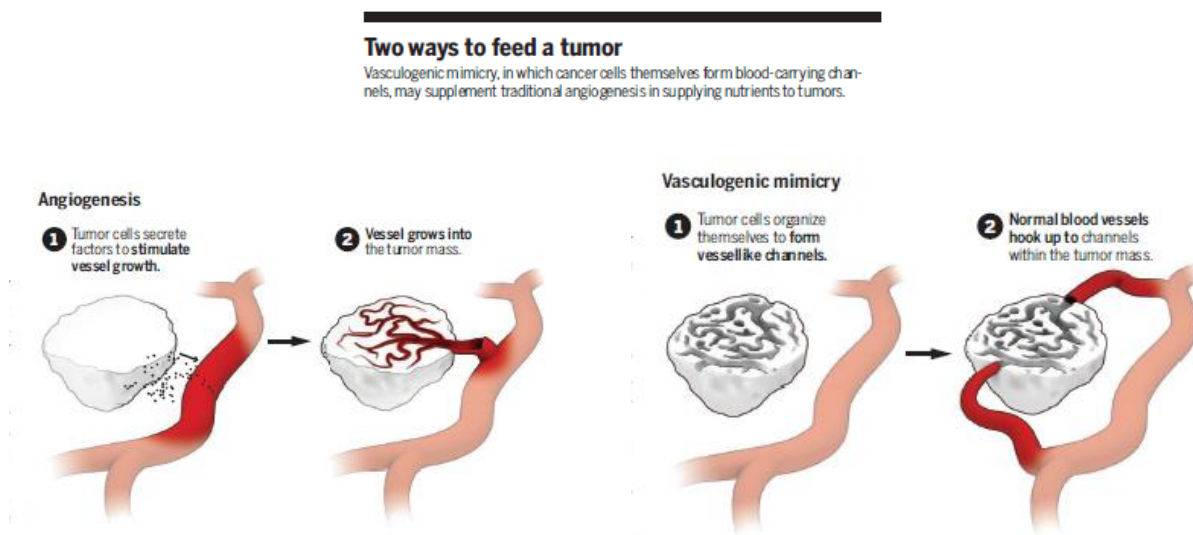


Figure 41 : Illustration des deux modes de vascularisation d'une tumeur (D'après Leslie et al. 2016)

La première question posant un certain débat fut soulevée par McDonald qui présentait une certaine interrogation quant à la confirmation que les cellules endothéliales n'étaient pas impliquées et la capacité réelle de ses structures à médier le flux sanguin.

En 2000, Folberg et Hendrix ont continué les investigations à ce sujet. En effet, en examinant de plus près les mélanomes agressifs oculaires, ils ont confirmé que les cellules endothéliales n'étaient pas impliquées dans ce processus. Dans ces structures, aucune cellule endothéliale n'a été observée ni par microscopie optique, ni par microscopie électronique à transmission et confirmer par l'absence de marqueurs spécifiques de cellules endothéliales en immunohistochimie (CD31, CD34, Flk-1). De

plus, ils ont retrouvé dans ces mêmes « structures », non tapissées par des cellules endothéliales, la présence de globules rouges ¹⁵⁹.

En 2008, Folberg et son équipe finirent par fournir la preuve que ces « vaisseaux » transportent bel et bien le sang. 30 secondes après l'injection d'un colorant fluorescent dans le bras de patients souffrant d'un mélanome de l'œil, ce dernier était retrouvé dans ces « structures » au niveau de la tumeur de l'œil, confirmant ainsi la capacité à médier un flux sanguin ¹⁶⁰.

Aujourd'hui, le « standard » pour identifier si des cellules tumorales réalisent du mimétisme vasculaire est : une coloration Acide Périodique-Shiff positive (PAS +) et la non expression du marqueur endothéliale CD31 (CD31 -) ¹⁶¹. Il s'agit donc d'une identification par défaut puisque les cellules endothéliales ont un profil PAS+/CD31+.

Outre le mélanome, le processus de mimétisme vasculaire a été observé dans d'autres tumeurs malignes telles que le glioblastome ¹⁶², le cancer de la tête et du cou ¹⁶³, du sein ¹⁶⁴, du poumon ¹⁶⁵, le cancer colorectal ¹⁶⁶ et le cancer de la prostate ¹⁶⁷.

2) Un processus délétère pour la survie des patients

Du fait du nouvel apport sanguin, la tumeur peut alors avoir accès à davantage de nutriments et d'oxygène favorisant ainsi sa croissance. Mais cela lui permet aussi d'avoir un nouvel accès à la circulation sanguine, ce qui sous-entend une augmentation de la capacité à se disséminer dans l'organisme.

En 2013, une méta-analyse recueillant les données de 22 études et comportant 3062 patients au total a étudiée la survie globale associée au mimétisme vasculaire (VM). Cao et al. ont alors montré que les patients atteints d'un mélanome métastatique présentaient plus de tumeurs VM (+) (45,3%) que les cas de mélanome primaire (23.1%). Le VM contribue donc au développement des métastases tumorales et donc au pronostic vital.

Dans cette même étude, l'impact du VM sur le taux de survie à 5 ans a été étudié sur 15 types de cancer (dont le cancer colorectal). Elle a révélé que le taux de survie à 5 ans des patients VM (+) était de 31% contre 56% pour les patients VM (-) ¹⁶⁸. Une étude portant spécifiquement sur 117 patients avec un cancer colorectal a été également réalisée. Sur 117 patients, 23 présentaient une tumeur avec VM soit 19.7%. La survie globale était significativement plus courte chez ces patients VM (+) avec un

taux de survie global à 5 ans de 0% contre 40% pour les patients VM (-) (voir Figure 42) ¹⁶⁹ .

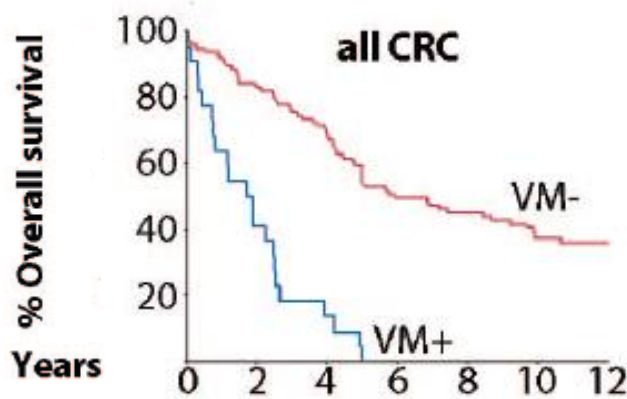


Figure 42 : Comparaison des courbes de survie Kaplan-Meier de patients souffrant d'un CRC avec ou sans VM (D'après Baeten et al. 2009)

3) Un mécanisme moléculaire non élucidé

Le mimétisme vasculaire étant responsable du mauvais pronostic vital des patients, les études moléculaires sont importantes afin d'en connaître davantage sur ce phénomène et trouver de potentiels cibles thérapeutiques.

L'étude moléculaire a été importante dans le mélanome mais reste cependant encore floue. Parmi les gènes qui sembleraient être impliqués dans le cas de mélanome VM (+), il y aurait ceux impliqués dans l'angiogenèse et la vasculogenèse, tels que la cadhérine endothéliale vasculaire, EphA2 (Ephrin Type A receptor 2) et la laminine 5 γ 2. Ces protéines sont essentielles à la formation et au maintien des vaisseaux sanguins ¹⁷⁰. Des études supplémentaires se sont intéressées à la matrice extracellulaire associée aux cellules tumorales qui est activement remodelée par des cellules de mélanome agressif et contribue à un phénotype vasculogène et plus migratoire qui implique des interactions coopératives de la chaîne de laminine 5 γ 2 avec les MMP ¹⁷¹. D'autres gènes sont régulés à la hausse dans le cas du mélanome agressif tels que le TF, TFPI-1 et TFPI-2 impliqués dans la voie de la coagulation ¹⁷².

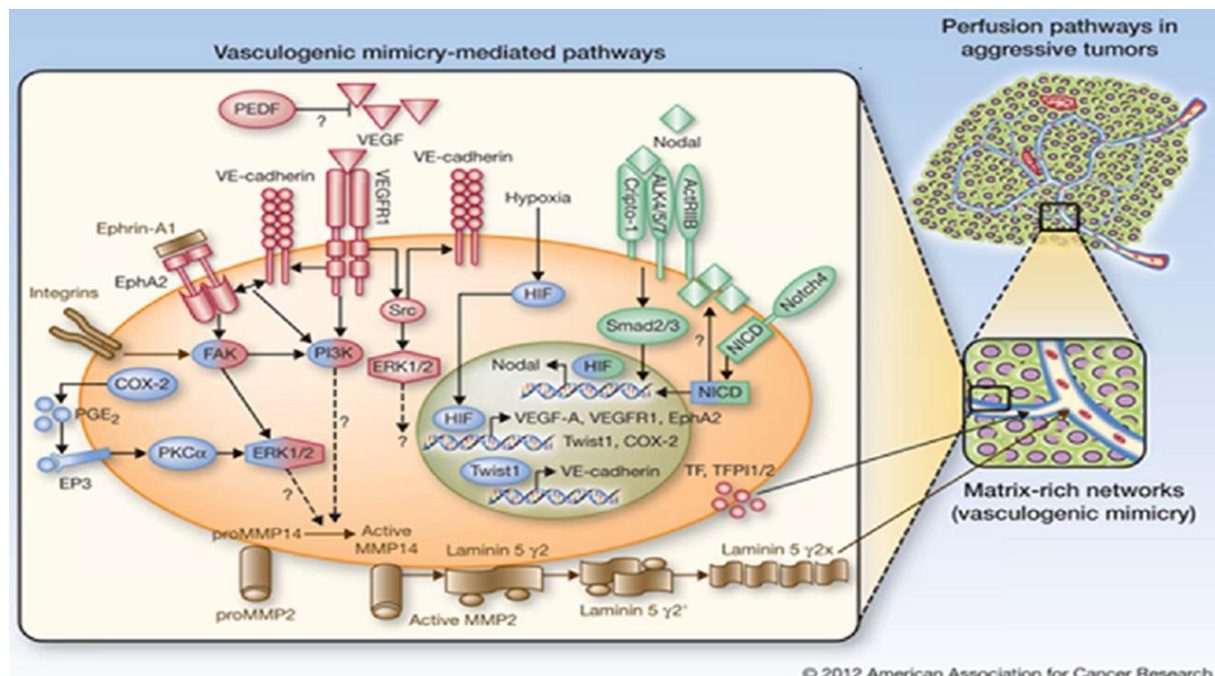


Figure 43 : Mécanisme moléculaire supposé du mimétisme vasculaire (D'après Qiao et al. 2015)

Le mécanisme décrit ci-dessus (Figure 43) est non seulement encore indéterminé dans le cas des cancers étudiés mais il semble être tumeur et tissus spécifiques. En effet, suivant le type de tumeurs, les acteurs mis en évidence ne sont pas les mêmes. Dans le cancer du sein, une augmentation de l'expression de Serpine 2 et Sipi ont été associés au phénomène de VM ¹⁶⁴.

CHAPITRE VI : Facteur tissulaire, Coagulation et Cancer

L'expression du facteur tissulaire (FT), qui est le détonateur de la coagulation, fait partie des principales caractéristiques des cellules cancéreuses et est impliquée dans la prolifération, la migration des cellules cancéreuses ainsi que dans les processus métastatiques et angiogéniques. Néanmoins l'intensité de l'expression du FT varie selon le type histologique du cancer. Une expression intense est décrite chez les cellules du cancer pancréatique ou du cancer ovarien. L'expression du FT est modérée au niveau de la membrane des cellules du cancer du côlon et du poumon et plus faible chez les cellules du cancer du sein. En revanche, l'expression du FT au niveau de la membrane des cellules cancéreuses augmente suite à l'acquisition d'une résistance à la chimiothérapie (comme la doxorubicine). Dans la plupart des études menées sur des patients, l'expression accrue du TF est directement associée au nombre de vaisseaux tumoraux, à l'indice métastatique, à la progression du grade de la tumeur, à l'agressivité du cancer et à la survie ^{173,174}. L'expression du TF est associée de manière significative à la régulation à la hausse d'autres marqueurs de mauvais pronostic et à une incidence accrue de la MTEV (Maladie ThromboEmbolique Véineuse)¹⁷⁵.

I- Structure et activation du TF

Le facteur tissulaire (TF) est une glycoprotéine transmembranaire de 47 kDa synthétisée sous forme d'un pro-peptide de 295 AA et qui après clivage du peptide signal de 32 AA donne la protéine mature de 263 AA. Cette protéine comporte un domaine extracellulaire, un domaine transmembranaire et un domaine cytoplasmique. Le TF est le principal responsable de l'activation des cascades de la coagulation en cas de brèche vasculaire ¹⁷⁶.

Le facteur tissulaire, normalement absent de la circulation sanguine, se lie avec son domaine extracellulaire au facteur VII activé (FVIIa) présent dans le plasma (environ 1% de la protéine du facteur VII dans le plasma est sous forme active). Le complexe FT/FVIIa active le FVII et FVIIa. Le complexe TF/FVIIa déclenche le processus de génération de thrombine. Selon le modèle cellulaire de la coagulation sanguine, la génération de thrombine est initiée par le complexe FT/FVIIa et est amplifiée par la

formation des complexes enzymatiques de la prothrombinase et de la ténase intrinsèque composés par une serine protéase (les facteurs Xa ou IXa respectivement), un cofacteur (les facteurs Va et VIIIa respectivement), des phospholipides procoagulants fournis par la membrane cellulaire ou les microparticules dérivées des cellules, et des ions calciques ^{177,178}.

La génération de thrombine se fait en deux phases consécutives (phase d'initiation et d'amplification) suivies de la phase d'inhibition¹⁷⁹. Lors de la phase d'initiation, le complexe FVIIa/TF active le facteur IX (FIX) et le FX mais l'activation du FX est plus rapide que celle du FIX ¹⁸⁰. Le FXa libre est initialement produit et génère des quantités picomolaires de thrombine, conduisant à une activation initiale des plaquettes. En outre, le FXa clive le FIX et génère le FIX α , qui est également le produit intermédiaire après le clivage protéolytique du FIX par le complexe FVIIa/TF¹⁸¹. La phase d'amplification est caractérisée par une activation supplémentaire des plaquettes induite par la thrombine. La thrombine active également le FVIII, le FV et le FXI. Le facteur XIa activé (FXIa) active le FIX par rapport au facteur IXa activé (FIXa). Ainsi, la formation de la ténase intrinsèque, un complexe enzymatique composé de FIXa, de FVIIIa, de phospholipides chargés négativement et d'ions calcium (FIXa/FVIIIa/prophospholipides coagulants/Ca⁺⁺), est renforcée, ce qui entraîne une activation supplémentaire du FX qui, en présence de FVa, de phospholipides et d'ions calcium, forme le complexe prothrombinase (FXa/FVa/procoagulants phospholipides) qui entraîne une explosion de la production de thrombine ¹⁸². La prothrombinase active la thrombine environ 2,5 à 105 fois plus vite que le FXa libre. Le concept moderne du processus de la coagulation du sang et de la séquence des phases de génération de la thrombine sont présentés dans la figure 44^{183,184}.

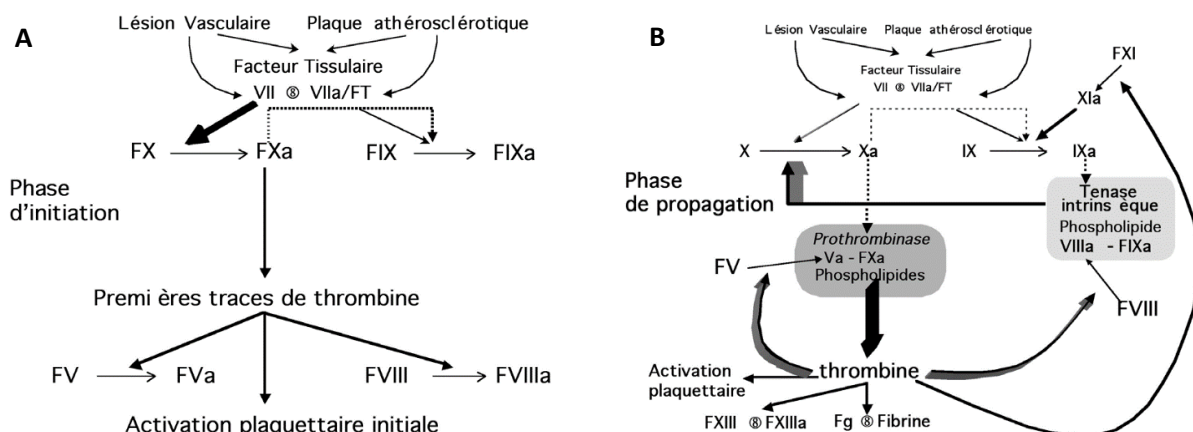


Figure 44 : Le schéma moderne de la coagulation

A. La phase d'initiation. Le complexe FVIIa/TF est la gâchette de la coagulation. Le complexe FVIIa/TF active plus rapidement le FX en FXa et plus lentement le FIX en FIXa. Toutefois, le FXa, une fois formé, active le FIX en FIXa, qui accélère alors cette réaction. Le FXa libre active la thrombine. Les premières traces de thrombine activent le FVIII, le FV et les plaquettes provoquant l'amplification de la coagulation. B. La phase de la propagation. Après l'activation initiale des facteurs VIII et V par la thrombine, les complexes enzymatiques (la tenase intrinsèque et la prothrombinase) sont formés. Ils sont composés d'une serine protéase (le FIXa ou le FXa), un cofacteur (le FVIIIa ou le FVa), des phospholipides procoagulants et des ions calciques. Pendant la phase de la propagation, l'activateur prépondérant du FX est la tenase intrinsèque. La formation de la tenase intrinsèque et de la prothrombinase accélèrent la génération de thrombine. De plus, la thrombine générée active le FXI en FXIa qui active le FIX, induisant une amplification supplémentaire de la génération de thrombine. Le caillot de fibrine apparaît lorsque seulement 3 % de thrombine est générée. La génération de thrombine se poursuit et la thrombine formée est absorbée sur le caillot.

II- TF et potentiel pro-coagulant des cellules cancéreuses

Les cellules cancéreuses sont supposées être impliquées dans la pathogénèse de la thrombose par le déclenchement de la génération de thrombine, le déséquilibre des forces procoagulantes et anticoagulantes dans le sang (impliquant à la fois les composants cellulaires et plasmatiques) et l'activation des cellules endothéliales.

Il est généralement admis que le TF est la principale molécule procoagulante exprimée par les cellules cancéreuses. Les cellules cancéreuses porteuses du TF déclenchent la coagulation en se liant au FVII/VIIa pour former un complexe d'activation qui favorise la génération de thrombine à proximité de la tumeur. Théoriquement, une expression plus élevée du TF par les cellules cancéreuses entraîne une activité procoagulante élevée. Cela a été confirmé par des études récentes qui ont mesuré la génération de thrombine *in vitro* dans le plasma humain en présence de cellules cancéreuses de différents types histologiques^{185,186}. En fait, le

contact des cellules cancéreuses avec le plasma humain déclenche et augmente la génération de thrombine de manière partiellement dépendante du TF. Il est intéressant de noter que les cellules de divers types histologiques de cancer diffèrent par leur potentiel de pro-coagulation et par la quantité de TF exprimée, c'est-à-dire que les cellules d'adénocarcinome pancréatique BXP3 expriment des quantités de TF nettement plus élevées que les cellules de cancer du sein MCF7 (Voir figure 45).

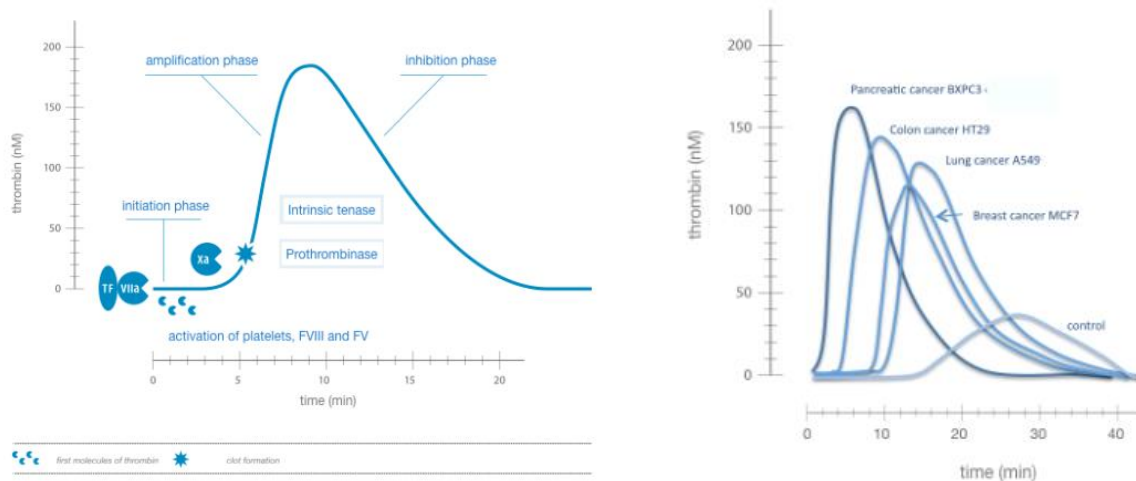


Figure 45 : La cinétique de génération de thrombine après l'activation de la voie du facteur tissulaire, schéma explicatif et observation dans différents types de cancer (Gerotziafas et al. 2018)

Nous devons souligner que les données disponibles montrent que dans les cellules cancéreuses, la voie du TF n'est pas la seule voie importante pour l'initiation de la génération de thrombine. En effet, en présence de cellules cancéreuses du pancréas, la génération de thrombine dans le plasma déficient en FVII est complètement abrogée alors qu'en présence de cellules cancéreuses du sein MCF7, elle persiste. Cela révèle que certains types de cellules cancéreuses peuvent déclencher la coagulation du sang par des voies alternatives telles que l'activation du FXII.

Les preuves expérimentales disponibles montrent que les cellules cancéreuses du pancréas et du sein ne possèdent pas d'autres voies d'activation de la coagulation sanguine que le TF et/ou l'activation du facteur XII (FXII)¹⁸⁷. Les cellules cancéreuses déclenchent et renforcent la génération de thrombine à la fois par la voie du TF et la voie intrinsèque. Bien que la voie TF soit dominante, le système intrinsèque - dépendant du FXII - ne doit pas être négligé car l'impact relatif des deux voies varie

en fonction du type de cellule cancéreuse. La modélisation de l'activation de la coagulation par les cellules cancéreuses est illustrée à la figure 46.

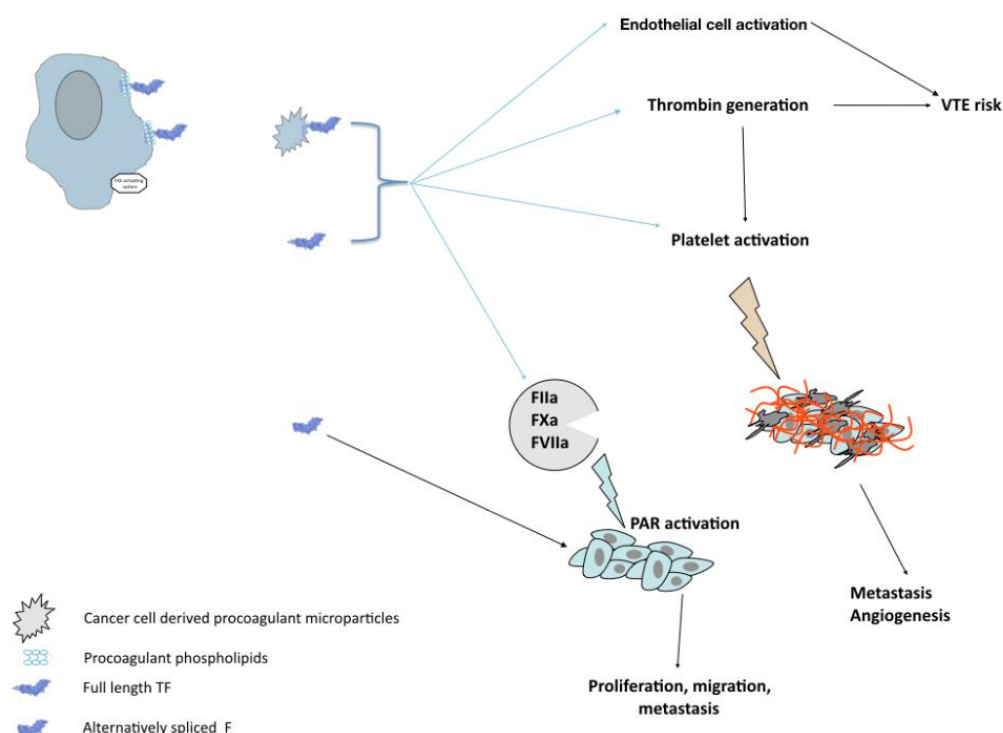


Figure 46 : Activation de la coagulation par les cellules cancéreuses.
(Gerotziafas et al., 2018)

Il est important de noter que la génération de thrombine en présence de cellules cancéreuses est nettement inférieure à celle observée en présence de concentrations physiologiques de TF. Ainsi, les propriétés procoagulantes inhérentes des cellules cancéreuses sont nécessaires, mais pas suffisantes, pour induire l'hypercoagulabilité, car les éléments procoagulants du microenvironnement, en particulier le TF et les phospholipides, sont des éléments indispensables à l'hypercoagulabilité induite par le cancer ¹⁸⁸.

Parmi les autres activités procoagulantes des cellules tumorales, le rôle de l'enzyme héparanase gagne en importance. En particulier, l'héparanase, au-delà de la dégradation de la matrice extracellulaire, régule l'expression du TF et interagit avec le TFPI sur la membrane de surface des cellules endothéliales et tumorales, entraînant la dissociation du TFPI et une augmentation de l'activité de coagulation à la surface des cellules ¹⁸⁹

III- TF, Croissance cellulaire, angiogenèse et lien étroit avec VEGF

Le « switch angiogénique » nécessite un déséquilibre des facteurs pro- et anti-angiogéniques qui maintiennent normalement la quiescence des cellules endothéliales. L'expression du TF par les cellules cancéreuses compense cet équilibre en modifiant l'équilibre entre le facteur de croissance vasculaire endothéliale (VEGF) proangiogénique et la thrombospondine, un peptide anti-angiogénique. Des études de la croissance tumorale dans des modèles de souris ont montré qu'elle est dépendante du TF et est principalement attribuable à une augmentation de l'angiogenèse au sein de la tumeur. La déficience en facteur tissulaire chez la souris transgénique (TF0/0) entraîne une létalité embryonnaire avec des similitudes histopathologiques retrouvées dans les embryons déficients en VEGF, ce qui suggère que le TF et le VEGF sont liés ^{190,191}. L'expression aberrante du TF dans les tumeurs contribue au phénotype angiogénique en partie en régulant à la hausse la synthèse et la libération du VEGF et en régulant à la baisse la thrombospondine ^{192,193}. Les tumeurs dont les cellules cancéreuses expriment le TF ont une densité de micro-vaisseaux et une expression du VEGF plus élevées que les cellules qui expriment des niveaux plus faibles de TF. Des niveaux accrus de TF sont exprimés sur les cellules endothéliales au sein de la masse tumorale ^{194,195}. Les preuves expérimentales disponibles sont en faveur du concept selon lequel le TF enraciné dans la membrane des cellules cancéreuses est lié à la régulation à la hausse des propriétés angiogéniques des cellules tumorales en améliorant la production de molécules régulatrices de croissance qui ciblent les cellules endothéliales vasculaires ¹⁹⁶. Les voies métaboliques intracellulaires relient le TF à la régulation à la hausse du VEGF à la fois dans l'angiogenèse physiologique et pathologique. Le TF améliore l'angiogenèse par deux voies distinctes :

- La voie de régulation indirecte de l'angiogenèse via TF
- La voie de régulation directe de l'angiogenèse via TF

1) Voie de régulation indirecte de l'angiogenèse via le facteur tissulaire

Cette voie est principalement médiée par la génération de thrombine induite par le TF. Les sérine-protéases de la coagulation (FVIIa, FXa, FIXa et thrombine ou FIIa) générées suite à l'activation de la coagulation sanguine activent les récepteurs activés par les protéases (protease activated receptors - PAR). Des expériences utilisant des inhibiteurs spécifiques du complexe TF/FVIIa/FXa ou du FXa seul montrent que le processus angiogénique dépend du FVIIa mais pas du FXa. La thrombine induit une activation plaquettaire résultant, entre autre, de la libération de facteurs pro-angiogéniques à partir de granules α tels que le VEGF, le facteur de croissance des fibroblastes β (β -FGF) et le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF)¹⁹⁷. La thrombine se lie aux récepteurs 1 à 4 couplés aux protéines G activées par la protéase (PAR 1-4) sur les cellules tumorales et les cellules endothéliales vasculaires associées aux tumeurs, créant un cercle vicieux entre la formation de caillots et la croissance tumorale. La thrombine peut induire une angiogenèse indépendante de la formation de caillots en clivant les PAR liés à la membrane cellulaire. L'activation des PAR par la thrombine entraîne une régulation positive de nombreux gènes liés à l'angiogenèse, notamment le VEGF, le TF, β FGF, et la métalloprotéase 2 de la matrice (MMP-2). Ces gènes peuvent entraîner un certain nombre de réponses pléiotropes, telles qu'une modification de la forme des cellules endothéliales, une augmentation de la perméabilité vasculaire, une prolifération accrue des cellules endothéliales et une protéolyse accrue, ce qui entraîne une amélioration de l'angiogenèse tumorale. La thrombine diminue l'adhésion des cellules endothéliales aux protéines de la membrane basale via l'adénosine monophosphate cyclique, ce qui les rend plus mobiles. La thrombine mobilise également les molécules d'adhésion (par exemple la P-sélectine) à la surface endothéliale, facilitant ainsi l'adhésion des plaquettes et des cellules cancéreuses¹⁹⁸. Le dépôt de fibrine réticulée, fournit une matrice pro-angiogénique provisoire qui facilite l'infiltration des vaisseaux sanguins. La matrice de fibrine fournit également un échafaudage efficace qui contribue à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins. La fibrine induit également l'expression à la fois du TF et de la cytokine proangiogénique interleukine-8 (IL-8) sur les cellules endothéliales vasculaires humaines¹⁹⁹. Les caillots de fibrine contiennent également du VEGF piégé qui induit la sécrétion d'IL-8 et d'interleukine-6 (IL-6) par les monocytes. Une étude

récente a suggéré que l'activité du TF est également nécessaire pour l'adhésion des plaquettes induite par le VEGF aux cellules endothéliales ²⁰⁰.

2) Voie de régulation directe de l'angiogenèse via le facteur tissulaire

Le TF fonctionne comme un récepteur transmembranaire. Lors de l'activation du TF, les voies intracellulaires sont activées indépendamment de toute activité procoagulante du complexe TF/FVIIa. Le domaine intracellulaire du TF a les caractéristiques d'un récepteur de signalisation car il contient trois sites présumés de phosphorylation sérine. Ces résidus de sérine peuvent être phosphorylés par une protéine kinase C déclenchant des événements de signalisation en aval qui entraînent l'activation ou l'inactivation transcriptionnelle de gènes impliqués dans le processus angiogénique, c'est-à-dire la régulation à la hausse de la synthèse de la protéine pro-angiogénique VEGF et à la baisse de la thrombospondine anti-angiogénique. Le VEGF, à son tour, régule à la hausse l'expression du TF provoquant ainsi un phénomène de rétro-amplification. La pertinence physiologique des voies d'angiogenèse dépendantes du TF dans les tumeurs est étudiée dans le cadre d'expériences réalisées sur des modèles de souris. Chez la souris, l'administration d'inhibiteurs du FVIIa (c'est-à-dire sous forme de TFPI ou de la protéine anticoagulante de nématode rNAPc2) inhibe la croissance tumorale et l'angiogenèse dans les cancers primaires et métastatiques, ce qui prouve que ce processus dépend de l'activité protéolytique du TF/FVIIa indépendamment de l'activation de la coagulation²⁰¹. Le complexe TF/FVIIa/FXa active le PAR-1 ou le PAR-2 (en fonction de l'efficacité de l'internalisation du PAR et de la phosphorylation de la kinase liée au signal extracellulaire)^{202,203}. Seule la signalisation PAR-2 entraîne une activation prolongée de la protéine kinase C α et une phosphorylation du domaine cytoplasmique du TF en aval. L'activation de la phospholipase C spécifique à la phosphatidylcholine en amont de la protéine kinase C α explique cette réponse de signalisation unique après l'activation de PAR-2. D'autres voies sont médiées par l'activation de PAR-2 par le FVIIa et le FXa, par exemple le complexe TF/FVIIa/Xa déclenche des récepteurs couplés à la protéine G activée par la protéase, par l'intermédiaire de PAR-1 et PAR-2 ²⁰⁴. L'anticorps monoclonal 5G9 inhibe l'activité coagulante du complexe TF/FVIIa et l'anticorps monoclonal 10H10 inhibe l'activation directe de PAR2 par le TF/VIIa et perturbe l'interaction du TF avec les intégrines. Dans les cellules endothéliales

exprimant le TF, l'association du TF avec les intégrines $\beta 1$ est régulée par la liaison du ligand extracellulaire du TF indépendamment de la signalisation de PAR2 ou de l'activité protéolytique de VIIa. Les deux anticorps monoclonaux 5G9 et 10H10 ont une activité anti tumorale in vivo. La signalisation TF-PAR2 des cellules tumorales est cruciale pour la croissance des tumeurs et suggère que les stratégies anti-TF peuvent être appliquées dans le traitement du cancer avec une altération mineure des voies hémostatiques dépendantes du TF. Comme mentionné ci-dessus, le TFPI est le principal inhibiteur du complexe TF/FVIIa. Le TFPI est également impliqué dans l'inhibition de l'angiogenèse. Il est fortement exprimé par les cellules cancéreuses du sein et du colon ainsi que par les cellules endothéliales proches de ces tumeurs. Des études récentes ont montré que le TFPI s'oppose à la croissance et à l'invasion tumorales. Il a récemment été démontré que le TFPI interfère avec la migration des cellules endothéliales en inhibant la voie à la fois des protéines Erk et d'adhésion focale

205.

3) Activation plaquettaires, coagulation et résistance à la chimiothérapie

Dans des conditions physiologiques normales, le sang reste sous forme liquide grâce à la présence des forces anticoagulantes au niveau du plasma) et au niveau de la parois vasculaire (effet antithrombotique des cellules endothéliales). La thrombose, selon la règle de Virchow, est le résultat de la coexistence dans le temps et l'espace, d'un état d'hypercoagulabilité (déséquilibre entre les forces procoagulantes et anticoagulantes en faveur des premières), de l'altération des conditions du flux sanguin et d'une activation (ou lésion) des cellules endothéliales. Schématiquement, deux voies de thrombogénèse différentes peuvent être activées :

- La voie de la coagulation plasmatique qui est activée par l'exposition de facteur tissulaire conduisant ensuite à l'amplification de la génération de thrombine et à la formation du réseau de fibrine après la protéolyse du fibrinogène par la thrombine.

- La deuxième voie est principalement celle des plaquettes. Les plaquettes adhèrent aux molécules d'adhésion exposées au niveau de la lésion vasculaire (i.e. collagène, fibronectine), et probablement d'autres dont le fibrinogène/fibrine (c'est la nature des tissus exposés lors de la lésion qui détermine la composition de la surface réactive).

Elles s'activent et forment l'agrégat plaquettaire ; collaborent avec la coagulation plasmatique, en particulier en créant une surface phospholipidique propice au développement des complexes de coagulation. Les monocytes interviennent également. Après activation, ils fournissent une surface phospholipidique propice au développement des complexes de coagulation ; activent directement la voie efficace de la coagulation en exprimant à leur surface le facteur tissulaire ²⁰⁶.

Il est de plus en plus reconnu qu'il existe de multiples composantes biologiques qui participent à une relation de coopération entre l'hôte et les cellules tumorales. Il a été démontré que la diaphonie entre divers types de cellules, notamment les plaquettes, les leucocytes et les cellules endothéliales, participe à l'invasion du cancer, à la dissémination métastatique, ainsi qu'à l'arrêt de l'embolie tumorale avec l'établissement de la niche métastatique ^{207,208}. Il a été démontré que les plaquettes séquestrent les régulateurs de l'angiogenèse en plus d'autres mitogènes ²⁰⁹ et libèrent ces composés à partir de granules alpha d'une manière qui module l'angiogenèse ²¹⁰. Il existe des preuves que la numération plaquettaire élevée est associée à une évolution défavorable des patients avec un cancer alors qu'un traitement antithrombotique diminue la libération de VEGF par les plaquettes ^{211 212}. Des investigations concernant la possible implication des plaquettes sur la réponse aux traitements anticancéreux ont donc été menées. Toujours dans le cas du cancer des ovaires, il a été observé que chez les patients présentant un taux élevé de plaquettes, le taux de rechute était plus élevé et le taux de réponse aux traitements était plus faible. De nombreuses études ont ensuite démontrées que les plaquettes augmentaient la survie, la prolifération et la chimiorésistance des cellules d'adénocarcinomes traitées à des agents de chimiothérapies utilisés de manière standard dans les protocoles médicaux. Radziwon-Balicka et al. ont confirmé cela en montrant que des cellules d'adénocarcinomes coliques ou ovariens traitées avec deux anticancéreux standards : le 5-FU et le paclitaxel, présentent une augmentation de la prolifération (malgré le traitement) en échappant à l'apoptose (régulation à la hausse des gènes anti-apoptotiques et à la baisse des gènes pro-apoptotiques), en activant des protéines du cycle cellulaire (cyclines, protéines de réparation de l'ADN...). La modulation des interactions entre les cellules cancéreuses et les plaquettes peut donc offrir une nouvelle stratégie pour améliorer l'efficacité des chimiothérapies²¹³.

CHAPITRE VII : Le VEGF : acteur central dans le développement de l'agressivité tumorale

I- La découverte du VEGF en lien avec la vascularisation

L'observation de la croissance vasculaire a été fortement étudiée et l'implication de facteurs favorisant cette vascularisation fut une évidence d'où l'engouement suscité afin de les identifier et trouver un traitement adapté.

En 1939, Ide et al. ont postulé que les tumeurs produisaient des facteurs qui stimulent la prolifération des vaisseaux sanguins, compte tenu de la rapidité et de l'ampleur de la croissance vasculaire associée aux tumeurs transplantées dans des chambres transparentes.

Quelques années plus tard, en 1948, Michaelson a proposé qu'un facteur « X » diffusible produit par la rétine soit responsable de la néo-vascularisation de la rétine et de l'iris qui se produit dans la rétinopathie diabétique proliférative. Ces domaines de recherche étant pourtant différents, ils finirent par converger.

En effet, en 1968, les premières expériences pour tester directement l'hypothèse selon laquelle les tumeurs produisent des facteurs angiogéniques ont été réalisées. Greenblatt et Shubik ainsi qu'Ehrmann et Knoth ont démontré que la transplantation de cellules de mélanome ou de choriocarcinome favorisait la prolifération des vaisseaux sanguins même lorsqu'un filtre Millipore est interposé entre la tumeur et l'hôte, fournissant ainsi la preuve que l'angiogenèse tumorale était médiée par un facteur diffusible produit par les cellules tumorales.

En 1971, Folkman et al. ont alors cherché à isoler un de ces facteurs afin de développer de potentiels traitements anti-angiogéniques pensant déjà qu'il s'agissait d'une approche efficace pour soigner le cancer.

Les recherches se sont concentrées sur deux facteurs angiogéniques identifiés : aFGF et bFGF. Cependant, il a été démontré que ces molécules n'étaient pas sécrétées efficacement et étaient principalement associées aux cellules. Ainsi, il ne s'agissait pas du facteur « X » diffusible impliqué dans l'angiogenèse ²¹⁴.

Ce ne sera qu'entre 1983 et 1989 qu'un mitogène diffusible spécifique aux cellules endothéliales et capable d'induire une fuite vasculaire sera isolé à partir d'un milieu conditionné par des cellules folliculaires hypophysaires bovines mais également par une lignée cellulaire tumorale de cobaye. Il s'agit du VEGF « Vascular Endothelial Growth Factor » appelé aussi VPF « tumor Vascular Permeability Factor » au moment de sa découverte ²¹⁵. Depuis, il est considéré comme l'un des facteurs principaux impliqué dans la néo-vascularisation tumorale.

Son action sur la formation de néovaisseaux a depuis été clairement démontrée comme on le voit ci-dessous sur la prolifération des cellules endothéliales (Voir figure 47).

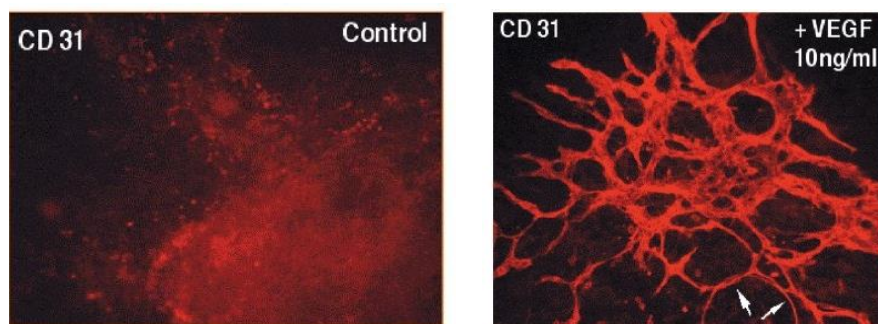


Figure 47 : Visualisation de l'effet du VEGF sur la prolifération des cellules endothéliales au microscope optique par marquage CD31 (D'après Ravaud et al. 2007)

Le VEGF ou appelé aussi VEGF-A fut donc le premier membre de la famille VEGF à être découvert.

II- La signalisation VEGF

1) Les ligands

Il existe 7 glycoprotéines dans la famille VEGF : les VEGF-A, B, C, D, E et F ainsi que le PlGF (Placental Growth Factor). Elles ont un rôle et un mode d'action différents.

Le VEGF-A est l'un des plus puissants stimulateurs de l'angiogenèse en provoquant la prolifération des cellules endothéliales, l'inhibition de l'apoptose, l'augmentation de la perméabilité vasculaire ²¹⁶. Il existe sous différentes formes appelées isoformes issues de l'épissage alternatif de l'ARNm aboutissant à la formation de 9 protéines se distinguant par leur poids moléculaire : VEGF-111, VEGF-

121, VEGF-145, VEGF-148, VEGF-162, VEGF-165, VEGF-183, VEGF-189, VEGF-206. Toutefois, elles contiennent toutes une séquence signal commune permettant leur sécrétion. La forme prédominante chez l'Homme est le VEGF-165 ²¹⁷. Le VEGF-A exerce son action en se liant à deux récepteurs tyrosine kinase : le VEGFR-1 ou Flt-1 et le VEGFR-2 ou Flk-1 et à deux récepteurs aux neuropillines : NRP-1 et NRP-2. L'affinité du VEGF-A pour le VEGFR-1 est 10 fois plus importante ²¹⁸.

Le VEGF-B a été découvert en 1995. Il est exprimé essentiellement dans le myocarde, les muscles squelettiques et le pancréas. De même que pour le VEGF-A, deux isoformes issues de l'épissage alternatif existent : VEGF-B167 et VEGF-B186. Il a une affinité uniquement pour le VEGFR-1 ²¹⁹. Sa contribution dans l'angiogenèse est discutée. Cependant, il a été démontré par Aase et al. chez des souris homozygotes VEGFB -/- que le VEGF-B n'était pas essentiel dans la vasculogenèse puisque les souris étaient viables à la naissance et ne présentaient pas de défaut de vascularisation autant au stade embryonnaire qu'au stade adulte ²²⁰.

Le VEGF-C et le VEGF-D ont été découverts en 1996 ²²¹. La structure du VEGF-C est à 48 % identique à celle du VEGF-D ²²². Ces cytokines présentent des propriétés similaires : elles contribuent toutes deux à la lymphangiogenèse, au stade embryonnaire pour le VEGF-C et plutôt à l'âge adulte pour le VEGF-D ²¹⁸. Les vaisseaux lymphatiques régulent l'homéostasie des fluides tissulaires, le trafic de cellules immunitaires et l'absorption des graisses alimentaires. Leur dysfonctionnement entraîne donc un œdème chronique et des réponses immunitaires altérées. Ce processus survient notamment durant des processus inflammatoires mais également tumorales par dissémination des métastases ²²³. L'action de VEGF-C et VEGF-D sur la lymphangiogenèse est médiée par leur fixation sur le récepteur VEGFR-3 pour lequel elles ont une grande affinité. Cela explique leur action réduite sur le processus d'angiogenèse car leur fixation sur le récepteur VEGFR-2 est moindre au vu de leur affinité faible pour ce dernier ²²⁴. Le VEGF-C est essentiel à la lymphangiogenèse puisqu'il a été montré par Nurmi et al. chez des souris VEGF-C -/- qu'il avait un rôle crucial dans le maintien des vaisseaux lymphatiques et l'absorption des graisses alimentaires ²²⁵. Sa perte peut notamment causer la mort à la naissance contrairement à la perte du VEGF-D qui peut engendrer des atrophies modérées des vaisseaux ne causant pas de changements significatifs ²²⁶.

Le Placental Growth Factor (PlGF) a été le second facteur de la famille VEGF à être découvert en 1991 par Persico et al.. Le PlGF humain existe sous 4 isoformes : PlGF-1 (-131) , PlGF-2 (-152) , PlGF-3 (-203) et PlGF-4 (-224) en raison de l'épissage alternatif de l'ARNm. Le PlGF-1, -3 et -4 se fixe au récepteur VEGFR-1, tandis que le PlGF-2 se fixe aux récepteurs NRP-1 et NRP-2. Le PlGF contribue à l'angiogenèse via plusieurs mécanismes en :

- Affectant les cellules endothéliales directement via le VEGFR-1;
- Séparant le VEGF du VEGFR-1, permettant au VEGF d'activer le VEGFR-2
- Agissant comme un stimulateur en se liant au VEGFR-1, ce qui augmenterait à son tour la sensibilité cellulaire au VEGF agissant via le VEGFR-2 (par un mécanisme encore inconnu)
- Recrutant des monocytes / macrophages, qui jouent un rôle essentiel dans la croissance des vaisseaux
- Mobilisant les cellules progénitrices hématopoïétiques de la moelle osseuse

²²⁷.

Il ne joue pas un rôle essentiel dans la vasculogenèse embryonnaire (puisque les souris PlGF-/- sont viables), mais intervient plutôt dans l'angiogenèse pathologique (ischémie, inflammation, cancer), par une synergie avec le VEGF-A ²²⁸.

Les VEGF-E et -F ne sont pas présents dans le génome humain. Elles sont issues respectivement du virus Orf et du venin de serpent. Le VEGF-E se fixe spécifiquement à VEGFR-2 et le VEGF-F lui se fixe avec plus d'affinité au VEGFR-1 mais peut aussi se lier au VEGFR-2. C'est de cette manière qu'elles jouent un rôle dans l'angiogenèse ²²⁹.

VEGF ligands	Receptors	Functions
VEGF (VEGF-A)	VEGFR-1, VEGFR-2, neuropilin-1	Angiogenesis Vascular maintenance
VEGF-B	VEGFR-1	Not established
VEGF-C	VEGFR-2, VEGFR-3	Lymphangiogenesis
VEGF-D	VEGFR-2, VEGFR-3	Lymphangiogenesis
VEGF-E (viral factor)	VEGFR-2	Angiogenesis
Placental growth factor	VEGFR-1, neuropilin-1	Angiogenesis Inflammation

Tableau 4 : Récapitulatif des ligands de la voie VEGF ainsi que leur action (D'après biooncology.com)

2) Les récepteurs

L'action de ces différents ligands est médiée par le récepteur sur lequel elle se fixe. Il existe 3 types de récepteurs aux VEGFs : VEGFR-1, VEGFR-2 et VEGFR-3 ; ainsi que deux co-récepteurs : NRP-1 et NRP-2 ²³⁰.

Les récepteurs aux VEGF sont des récepteurs transmembranaires à activité tyrosine kinase. Ils se dimérisent suite à l'induction par le ligand, permettant ainsi l'activation de certaines voies de signalisation. Il a été montré que les NRPs pouvaient être impliqués dans la voie de signalisation VEGF, cependant, étant donné qu'ils ne possèdent pas de domaine à activité tyrosine kinase ils sont dans l'incapacité d'activer seul des voies de signalisation. Il est suggéré qu'ils agissent en tant que co-récepteur permettant ainsi de moduler la signalisation ²³¹.

Le principal récepteur de signalisation pour le VEGF, est le VEGFR-2. Il est exprimé classiquement sur les cellules endothéliales uniquement. La fixation du ligand (VEGF-A, -C, -D, -E, -F) induit la dimérisation puis l'activation du récepteur. Une fois activé, il y a déclenchement de la cascade Raf-1 / MEK / ERK, une voie de signalisation cruciale, entraînant une différenciation et une prolifération des cellules endothéliales ainsi qu'une perméabilité vasculaire ²³². Via la voies Akt/PI3K, il joue un rôle également dans la survie cellulaire endothéliale ²³³. Son importance a été démontré par Shalaby et al. chez des souris VEGFR-2 ^{-/-}. En effet, ces souris déficientes en VEGFR-2 mourraient entre les jours embryonnaires 8,5 et 9,5, présentant un manque d'îlots sanguins de la vésicule vitelline et de vaisseaux sanguins organisés. Ces observations

démontrent que la prolifération et la migration des progéniteurs hématopoïétiques / endothéliaux nécessitent une signalisation via VEGFR-2 ²¹⁶.

Le second récepteur à jouer un rôle essentiel est le VEGFR-1. Il est exprimé principalement par les cellules endothéliales vasculaires mais aussi par les monocytes, les macrophages et certaines cellules tumorales ²³⁴. Il existe sous deux formes : transmembranaire et soluble ; et se lie au VEGF-A, -B et PlGF. Initialement, il a été montré qu'il avait un rôle de leurre et se comportait comme un régulateur négatif du VEGF. En effet, du fait de son affinité importante pour les ligands, ces derniers se lient davantage au VEGFR-1 qu'au VEGFR-2. Il diminue ainsi l'activité angiogénique importante du VEGFR-2 ²³⁵. Bien que son activité de transduction du signal est plus faible que le VEGFR-2, il reste important. En effet, dans une étude de Fong et al., des souris VEGFR-1 ^{-/-} mourraient au cours du développement embryonnaire précoce en raison de l'augmentation de la prolifération des cellules endothéliales et de la formations de vaisseaux sans lumière et désorganisés ²³¹. Son implication dans la croissance et la progression de la tumeur a aussi été démontrée notamment dans le CCR ²³⁶.

Le VEGFR-3 quant-à lui se lie aux VEGF-C et -D. Si le VEGFR-3 a été découvert principalement comme un acteur dans le développement et le maintien du réseau lymphatique ²³⁷, il est également impliqué dans la vascularisation ²³⁸. Dumont et al. ont montré son importance dans le développement cardiaque et vasculaire. En effet, l'inactivation du gène VEGFR-3 a entraîné un développement défectueux des vaisseaux sanguins causant une accumulation de liquide dans la cavité péricardique et une insuffisance cardiovasculaire à des stades embryonnaires précoces (jour 9) ²³⁹. Dans le cancer, sa surexpression a été associée à un développement tumoral agressif et à un mauvais pronostic vital ²⁴⁰. Cette surexpression de VEGFR-3 et VEGF-C a été retrouvée dans le cancer colorectal ²⁴¹.

L'action de ces récepteurs peut être modulée suite à la formation d'hétérodimères. Il existe des hétérodimères VEGFR-1/VEGFR-2 ²⁴² et VEGFR-2/VEGFR-3 ²⁴³ (Voir figure 57).

NRP-1 et NRP-2 sont deux co-récepteurs dépourvus d'activité tyrosine kinase. NRP-1 se lie à VEGF-A, -B, -C, -D et PlGF tandis que NRP-2 se lie à VEGF-A, -C, -D, - PlGF. Il a été montré qu'ils étaient essentiels à la morphogenèse vasculaire, mais le

mécanisme par lequel cela a lieu n'est pas élucidé ²⁴⁴. Il a simplement été démontré qu'ils amélioreraient la fixation des ligands aux VEGFRs et auraient donc également un rôle régulateur (notamment entre NRP-1 et VEGFR-2) ²⁴⁵. Au sein des tumeurs, les NRPs sont exprimés et se lient au VEGF-A. Une surexpression de NRP-1 est positivement corrélée à une progression tumorale, entraînant notamment une augmentation de la taille et du caractère invasif des tumeurs ainsi qu'une angiogenèse tumorale accrue ²⁴⁶. Il existe également une forme soluble de NRP-1 (sNRP-1) qui joue un rôle totalement opposé. En effet Gagnon et al. ont montré que sNRP-1 inhiberait la liaison de VEGF au VEGFR-2. Cela entraîne alors des liaisons vasculaires (vaisseaux sanguins endommagés) et une activation de l'apoptose au sein des tumeurs ²⁴⁷.

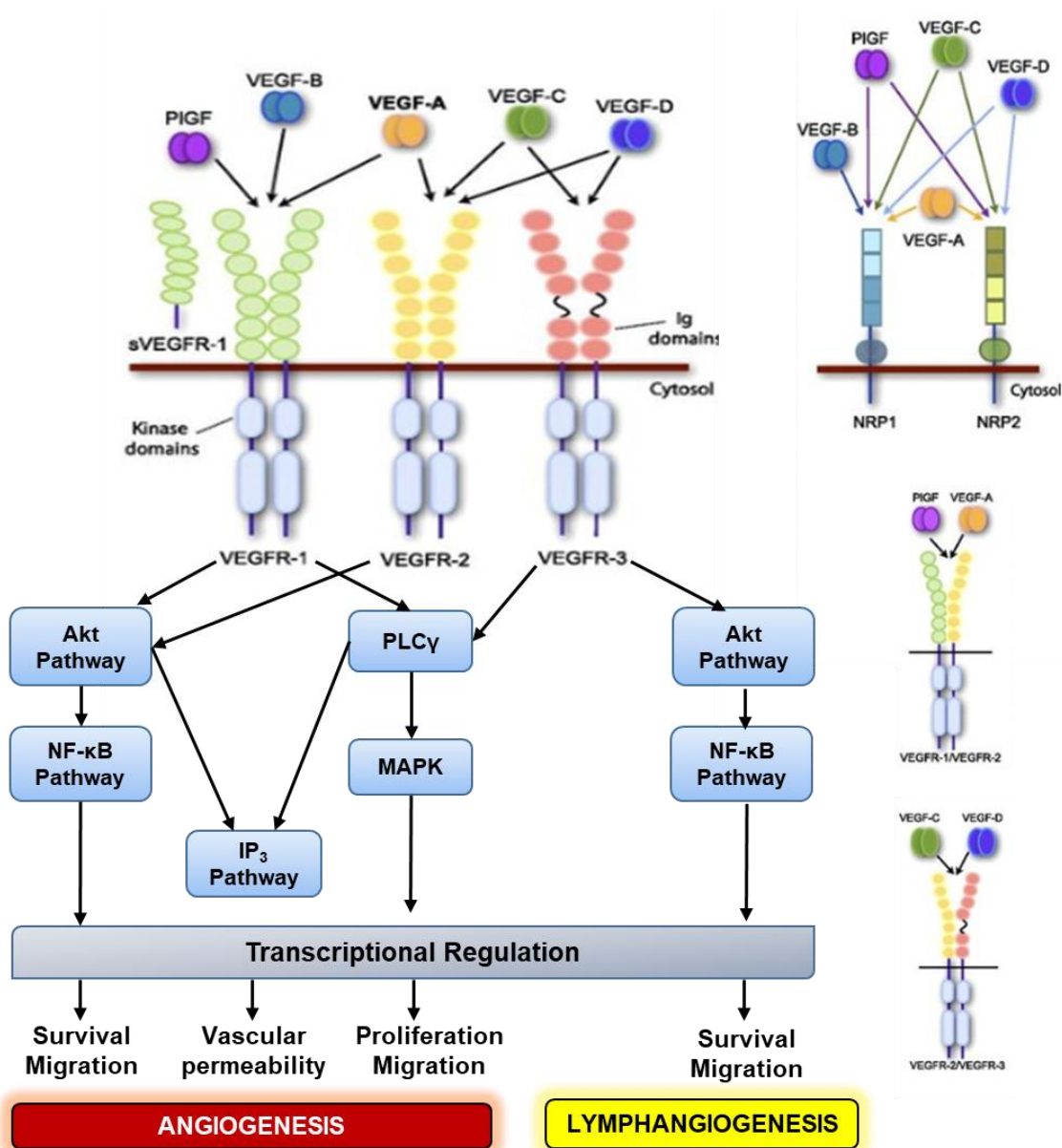


Figure 48 : Schéma des voies activées par les différentes isoformes de la famille VEGF ainsi que les hétérodimerisations possibles. (D'après Falk et al. 2010)

III- La tumeur colorectale, source de VEGF et implication dans la migration, l'invasion et le mimétisme vasculaire

Des travaux précédents au sein de notre équipe ont montré que les cellules tumorales colorectales étaient une source majeure en VEGF ²⁴⁸. Par la voie paracrine, le VEGF sécrété par ces cellules peut agir sur les cellules endothéliales environnantes exprimant les VEGFR, entraînant une fois de plus la formation de néo-vaisseaux. Néanmoins, les cellules tumorales colorectales expriment elles-aussi les récepteurs VEGFR fonctionnels qui donnent lieu à une signalisation autocrine du VEGF.

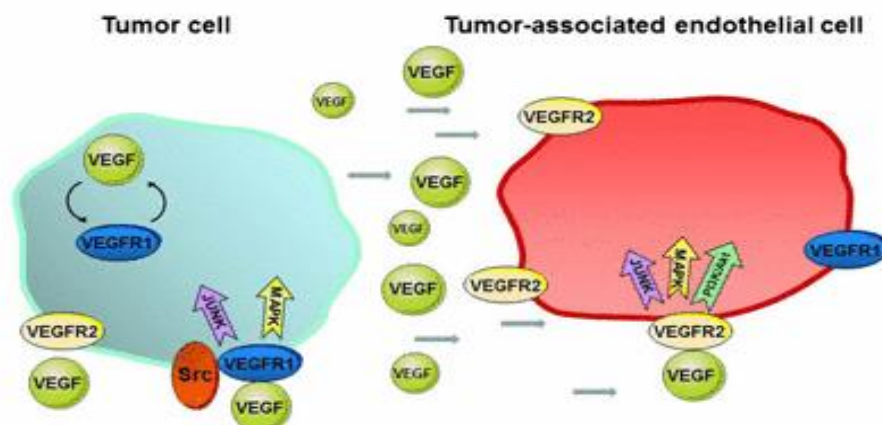


Figure 49 : Voies autocrine et paracrine du VEGF dans le cancer colorectal. (Mésange et al., 2013)

Les cellules endothéliales et les cellules colorectales tumorales expriment donc toutes deux les récepteurs VEGFR-1 et VEGFR-2. Cependant, les cellules CRC expriment davantage le VEGFR-1 contrairement aux cellules endothéliales qui montre une expression plus importante de VEGFR-2 ^{249,250}.

Nous avons vu précédemment qu'il s'agit d'un récepteur à activité tyrosine kinase qui active notamment les voies de signalisation (Akt, NF- κ B, IP3...) favorisant la survie durant un stress cellulaire comme par exemple une exposition prolongée à un agent de chimiothérapie, la migration, l'invasion ainsi que la formation de vaisseaux sanguins. Cette expression de VEGFR-1 est également retrouvée dans chaque type de cancer associé à du VM ^{251,252}

L'implication des mécanismes agressifs tumoraux cités précédemment notamment le VM, suscite beaucoup d'intérêt dans le monde scientifique. Cependant, un lien de causalité entre la résistance aux traitements et l'intervention de ces mécanismes agressifs dans la mortalité des cancers colorectaux n'a pas encore été établi.

OBJECTIFS DES TRAVAUX

Le cancer du côlon est un souci majeur de santé publique, puisqu'il est le troisième cancer le plus fréquent, tous sexes confondus avec 1,8 millions de nouveaux cas dans le monde par an. Avec ses 861 000 décès par an, il est aussi la deuxième cause de décès par cancer.

Malgré toutes les avancées thérapeutiques et l'amélioration de la prise en charge des patients, la décroissance de la mortalité observée depuis 1990 n'est pas celle attendue. L'importance de comprendre les causes de cette persistance des mortalités semble donc essentiel.

Ces dernières années, plusieurs études ont montré que cette mortalité persistante était soit liée à une résistance acquise aux traitements chimiothérapeutiques, soit à l'acquisition d'un phénotype agressif mettant en jeu différents phénomènes cellulaires tels que la migration, l'invasion, l'angiogenèse et le statut coagulant. Cependant, un lien possible entre ces deux causes n'a jamais été étudié.

De plus, dans le CCR, les cellules tumorales sont une source majeure de VEGF. Il a été montré que les cellules tumorales colorectales expriment à leur surface des récepteurs au VEGF. De ce fait, elles possèdent donc une signalisation VEGF autocrine et paracrine. Des thérapies anti-angiogéniques ont donc été approuvées dans le traitement du CCR telles que le bevacizumab (approuvé en première ligne) et l'aflibercept (approuvé en seconde ligne). Bien que l'influence de ces inhibiteurs angiogéniques sur les cellules endothéliales associées à la tumeur a déjà été grandement caractérisée, peu de choses sont connues sur la caractérisation moléculaire et fonctionnelle de la signalisation VEGF.

Le but de ce travail de thèse a été de caractériser d'un point de vue moléculaire et fonctionnel, l'influence de la signalisation VEGF sur des cellules tumorales chimio-naïves (répondant aux traitements chimiothérapeutiques) et chimio-résistantes (présentant une résistance acquise aux traitements chimiothérapeutiques).

Dans un premier temps, il a été question d'étudier l'influence de différents ligands et récepteurs du VEGF sur la motilité des cellules humaines chimionaïves du cancer colorectal et d'étudier l'effet d'un inhibiteur de l'angiogenèse cliniquement approuvé, l'aflibercept, (qui se lie et neutralise spécifiquement les trois ligands VEGFR1, VEGF-

A, VEGF-B et PlGF). Dans un second temps, une étude comparative de l'influence du VEGF et l'effet de l'aflibercept sur la motilité des cellules endothéliales et des cellules tumorales colorectales, a été réalisée. Dans un dernier point, nous avons étudié l'implication de la signalisation VEGF et l'effet de l'aflibercept sur le phénotype agressif des cellules tumorales chimiorésistantes.



RESULTATS



ARTICLE N°1:

Motility of colorectal cancer cells is mediated by VEGFR1 homo-dimers and VEGFR1-VEGFR2 hetero-dimers and can be attenuated by aflibercept.

Statut: En attente des possibles suggestions du jury et de la révision de l'article par l'industrie pharmaceutique avant la soumission de l'article.

Journal visé : **Biochemical Pharmacology**

Résumé:

Nous savons que la signalisation VEGF (Facteur de croissance Endothéliale Vasculaire) est une signalisation "phare" dans les processus d'angiogenèse impliquant les cellules endothéliales. Cette dernière a été fortement étudiée dans les cellules endothéliales mais encore très peu dans les autres types cellulaires comme les cellules tumorales.

Dans cette première étude, nous avons donc déterminé l'influence de la signalisation VEGF sur la capacité des cellules tumorales colorectales (CCR) à se "déplacer", migrer. Nous avons notamment étudié l'influence des différents ligands et les interactions possibles avec leurs récepteurs.

A partir d'un panel de 12 lignées cellulaires, nous avons pu observer que suivant le type cellulaire, le potentiel à se mouvoir diffère. De plus, en condition d'hypoxie (condition mimant le cœur d'une tumeur), la majorité d'entre elles (9 lignées sur 12) montre une augmentation plus ou moins importante de leur migration.

Des études précédentes ont montré que la signalisation VEGF pouvait être impliquée dans la mobilité des cellules tumorales colorectales, nous avons donc étudié l'influence des différents ligands sur la migration des cellules tumorales colorectales et déterminé quels récepteurs étaient impliqués.

Les résultats montrent que le VEGF-A, -B et le facteur de croissance placentaire (PIGF) sont capables de promouvoir la migration des cellules tumorales colorectales, tandis que le VEGF-C, -D, -E n'ont eu aucun effet. Cela a été confirmé par l'utilisation d'anticorps bloquant. En effet un anticorps bloquant le VEGFR1 (récepteur sur lequel

VEGF-A, -B et PlGF se fixent) a pour conséquence l'atténuation de la migration des cellules du CCR en présence de VEGF-A, -B ou PlGF. Étonnamment, l'utilisation d'un anticorps bloquant le VEGFR2 (récepteur sur lequel VEGF-A, -C, -D et -E se fixent) a révélé être capable d'atténuer la migration des cellules tumorales colorectales uniquement en présence de PlGF. Cette diminution a été d'autant plus importante lorsque nous avons mis ces mêmes cellules en présence d'anticorps dirigés contre le VEGFR2 mais aussi contre le VEGFR1. PlGF n'étant pas un ligand direct de VEGFR2, ces résultats suggèrent que la migration des cellules du CCR pourrait être médiée par les homodimères VEGFR1-VEGFR1 ainsi que par les hétérodimères VEGFR1-VEGFR2. L'aflibercept, inhibiteur de l'angiogenèse, étant approuvé en seconde ligne dans le CCR et ayant pour effet « d'emprisonner » les ligands VEGF-A, -B et PlGF de manière spécifique, nous avons décidé d'étudier son efficacité sur le phénomène migratoire de nos cellules du CCR. On montre ici que cet agent anti-angiogénique est capable d'atténuer la migration de 11 lignées cellulaires du CCR sur les 12 étudiées. Cependant, cet effet n'est pas le même suivant les lignées. L'étude de l'expression des récepteurs au VEGF nous révèle que les lignées présentant un niveau d'expression de VEGFR1 et NRP1 plus élevée répondent mieux à l'aflibercept que celles qui présentent un niveau plus faible.

Ainsi, pour la première fois, nos résultats montrent que les thérapies dirigées contre le VEGF (notamment l'aflibercept) inhibent de manière directe la motilité des cellules tumorales en plus de leur activité anti-angiogénique basale. De plus, la réponse à ces agents semble être corrélée au niveau d'expression des récepteurs au VEGF qui est peut-être le miroir de l'expression des ligands.

Motility of colorectal cancer cells is mediated by VEGFR1 homo-dimers and VEGFR1-VEGFR2 hetero-dimers and can be attenuated by aflibercept

Anaïs Bouygues^{a,b,c}, Sandrine Thouroude^{a,b,c}, Grigoris T. Gerotziafas^{a,b,c,d},
Annette K. Larsen^{a,b,c,e}

^aCancer Biology and Therapeutics, Centre de Recherche Saint-Antoine (CRSA), Paris 75571, France

^bInstitut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U938, Paris 75012, France

^cInstitut Universitaire de Cancérologie (IUC), Faculté de Médecine, Sorbonne Université, Paris 75005 France

^dService d'Hématologie Biologique Hôpital Tenon, Hôpitaux Universitaires Est Parisien, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Paris, France.

^eCentre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Paris 75016, Paris

Keywords: Cancer cell motility, VEGF signaling, colorectal cancer, VEGF-targeted agents, angiogenesis inhibitors, aflibercept

Correspondence to: Dr Annette K. Larsen, Cancer Biology and Therapeutics, Kourilsky Research Building 1st floor, Hôpital Saint-Antoine, 184 rue du Faubourg Saint-Antoine, 75571 PARIS Cedex 12 France.

E-mail: annettelarsen004@gmail.com; annette.larsen@sorbonne-universite.fr

Area: Antibiotics and Chemotherapeutics

ABSTRACT

Vascular endothelial growth factor (VEGF)-signaling plays a key role for the function of blood and lymphatic vessels under both physiological and pathological conditions. Although the VEGF-VEGFR interaction has been studied intensively in endothelial cells, the data are limited for other cell types including tumor cells. In this work we determined the influence of different VEGF ligands and VEGF receptors on the motility of human colorectal cancer (CRC) cells. The findings show that VEGF-A, VEGF-B and placental growth factor (PIGF), but not VEGF-C, VEGF-D and VEGF-E are able to promote CRC cell migration. Accordingly, VEGFR1-blocking antibodies attenuated CRC cell migration in the presence of VEGF-A, VEGF-B or PIGF. Unexpectedly, VEGFR2-blocking antibodies were able to attenuate CRC cell migration in the presence of PIGF, which was further enhanced in the presence of blocking antibodies to both VEGFR1 and VEGFR2. These findings suggest that CRC cell migration is mediated via VEGFR1-VEGFR1 homodimers as well as by VEGFR1-VEGFR2 heterodimers. We further show that a clinically approved angiogenesis inhibitor, aflibercept, that specifically binds and neutralizes the three VEGFR1 ligands, VEGF-A, VEGF-B and PIGF, is able to attenuate the motility of the majority (11/12, 92%) of the CRC cell lines examined. These findings indicate for the first time that VEGF-directed therapies directly inhibit tumor cells motility in addition to their classical anti-vascular activities. We finally determined the expression levels of VEGF receptors on CRC cells and correlated this with the response to aflibercept.

1. Introduction

Vascular endothelial growth factor (VEGF)-signaling is essential for vascular development during embryogenesis and controls the function of blood and lymphatic vessels in the adult. The effect of the VEGFs is mediated via vascular endothelial growth factor receptors (VEGFRs) which upon ligand binding become auto-phosphorylated on specific tyrosine residues thereby permitting docking of selected adaptor proteins and triggering of downstream signaling. In mammals, there are three structurally related VEGFRs, VEGFR1/Flt1, VEGFR2/Flk1/KDR and VEGFR3/Flt4 ([Koch et al., 2011](#); [Simons et al., 2016](#)). Although catalytically active VEGFRs are usually considered as homodimers, there is solid experimental evidence from signaling studies and computational modelling to support the existence of VEGFR1-VEGFR2 and VEGFR2-VEGFR3 heterodimers ([Autiero et al., 2003](#); [Cudmore et al., 2012](#); [Simons et al., 2016](#); [Cai et al., 2017](#)).

In a simplified manner, VEGFR1 is expressed by monocytes and macrophages, VEGFR2 by vascular endothelial cells and VEGFR3 by lymphatic endothelial cells. However, VEGFR1 is also expressed by a wide range of other cell types including endothelial cells, dendritic cells, smooth muscle cells and human trophoblast as well as by different tumor types like colorectal cancer (CRC) cancer ([Bates et al., 2003](#); [Fan et al., 2005](#); [Lesslie et al., 2006](#); [Naik et al., 2009](#); [Koch et al., 2011](#); [Ceci et al., 2020](#)). Importantly, most, if not all, colorectal cancer cells and human CRC xenografts express catalytically active VEGFR1 and, to a lesser extent, VEGFR2 indicating that VEGF-signaling plays a role *in vivo* for this type of cells ([Mésange et al., 2014](#); [Mésange et al., 2018](#)). Furthermore, the expression of both VEGFs and VEGFRs has been reported to increase during tumor progression in patients, while strong VEGFR1 immunoreactivity in tumor cells and stromal vessels has been correlated

with shorter post-operative survival of CRC patients ([Okita et al., 2009](#); [Eppenberger et al., 2010](#); [Yin et al., 2010](#); [Yeh et al., 2019](#)). Therefore, VEGF/VEGFR expression in CRC cells is closely associated with the malignant phenotype.

The importance of VEGF-signaling for cancer growth, invasion and metastasis has prompted the development of a wide range of compounds that target different steps of the VEGF-signaling cascade. This involves binding and neutralization of the ligand by antibodies or recombinant proteins (bevacizumab, aflibercept), blocking antibodies to the receptor (ramucirumab), small molecule tyrosine kinase inhibitors that blocks the catalytic activity of the VEGFRs (sunitinib, regorafenib, nintedanib) and inhibition of the intracellular signaling triggered by VEGFR activation (the PKC inhibitor enzastaurin). Most of these compounds are approved for clinical use, including treatment of metastatic CRC.

Although the VEGF-VEGFR interaction has been studied intensively in endothelial cells, the data are limited for other cell types including tumor cells. In this work we determined the influence of different VEGF ligands and VEGF receptors on the motility of CRC cells. We further show that a clinically approved agent, aflibercept, that specifically binds the VEGF ligands VEGF-A, VEGF-B and Placental growth factor (PIGF) ([Papadopoulos et al., 2012](#)), is able to attenuate the mobility of most CRC cell lines examined. These findings indicate for the first time that VEGF-directed therapies directly inhibit tumor cells motility in addition to their classical anti-vascular activities. We finally determined the expression levels of VEGF receptors on CRC cells and correlated this with the response to aflibercept.

2. Materials and Methods

2.1. Drugs

Aflibercept (Zaltrap) was provided by Sanofi-Aventis (Gentilly, France).

2.2. Cell culture

LS513, FET, LS174T, SW48, DLD1, LIM1215 and LoVo cells were kindly provided by Richard Hamelin (Saint-Antoine Research Center, Paris, France). SW480 colon carcinoma 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 kind gift from Bert Vogelstein (John Hopkins, Baltimore, MD).

Upon defreezing, cells were monitored for mycoplasma contamination using the “MycoAlertTM mycoplasma detection kit (Lonza). The tumor cell panel was characterized by next generation sequencing of 50 cancer-related genes using the Ion AmpliSeq Cancer Hotspot Panel v2 (ThermoFisher) and were replaced after 3 months in culture.

The cells were maintained in, McCoy's A (HCT-116 and SW620), DMEM (HT-29, LS513, FET, LS174T, SW48, DLD1, LoVo, SW480, CoLo205) or RPMI (LIM1215) supplemented with 5% fetal calf serum and 1% penicillin/streptomycin (PAA). To determine the migration under hypoxia, the trans-well assay was carried out in a hypoxic incubator at 1% O₂.

2.3. VEGF ligands, VEGFR-directed antibodies and ELISA kits

All VEGF ligands, VEGFR-directed antibodies and ELSA kits were obtained from R&D System (Minneapolis, MN). This includes the following VEGF ligands: VEGF-A (293-VE), VEGF-B (751-VEB), VEGF-C (752-

VC), VEGF-D (622-VD), VEGF-E (293-V) and PlGF (264-PGB/CF). The following VEGFR-blocking antibodies were used: anti-VEGFR1 (321-FL) and anti-VEGFR2 (357-KD). Quantikine ELISA kits were used to determine the expression of VEGFR1 (DVR100C), VEGFR2 (DVR200) and neuropilin1 (DNRP10).

2.4. Trans-well migration (Boyden chamber) assay

Cell migration was assessed by the trans-well assay (Dutscher, Issy-les-Moulineaux, France) according to the manufacturer's instructions. Briefly, 50 000 to 250 000 cells in serum-free media with or without aflibercept (50 µg/ml) were plated in the upper chamber on membranes with a pore size of 8 µm while the lower chamber contained culture media with fetal calf serum (5%) as chemoattractant. After 24 hours, 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 deviation (SD) and represent triplicate samples from at least two independent experiments. All results have been normalized to an initial loading of 250 000 cells.

2.5. Influence of VEGF ligands and VEGF receptors on migration

Cells were suspended in drug-free media and incubated for 30 min in the absence or presence of 10 µg/ml VEGFR1-blocking antibodies (321-FL), VEGFR2-blocking antibodies (357-KD) or both and then added to the upper chambers. The lower chambers contained drug-free media in the absence or presence of VEGF ligands as follows: VEGF-A (10 ng/ml), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E or PlGF (all at 50 ng/ml). After 24 hours, 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 deviation and represent triplicate samples from at least two independent experiments.

2.6. Cell migration by the Scratch (wound-healing) assay

Cells were cultured on petri dishes until confluence and then wounded using a yellow pipette tip. Then, serum-containing media with or without aflibercept (50 μ g/ml) was added. The width of the wound were photographed and measured at time 0 and at various time points for 72 hours. The values represent the average of 3 independent experiments, each done in duplicate.

2.7. Cellular viability

Cellular viability was determined by the MTT (methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide) viability assay after 120 hours continuous incubation in the absence or presence of aflibercept (50 μ g/ml) as described previously ([Soares et al., 2007](#)). For the determination of viability under hypoxia, cells were incubated in the in the absence or presence of aflibercept (50 μ g/ml) in 1% O₂ followed by 3 days post-incubation under normoxia. The media was removed after 3 days and renewed with fresh media under the same conditions. All values are averages of at least three independent experiments each done in duplicate.

2.8. Expression of VEGF receptors

To characterize the expression of VEGF receptors, protein extracts were prepared in RIPA buffer according to the manufacturer's instructions and the presence of VEGFR1, VEGFR2 and neuropilin1 (NRP1) was determined by ELISA analysis as described previously ([Mésange et al.,](#)

2018). The values represent the average of 3 independent experiments, each done in duplicate.

2.9. Statistics

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

3. Results

3.1. Motility of CRC cells under normoxia and hypoxia

VEGF-signaling has been reported to promote CRC cell motility (Bates et al., 2003; Fan et al., 2005). We here determined the motility of a tumor cell panel consisting of twelve well-characterized CRC cell lines by the trans-well (Boyden chamber) assay. The results (Fig. 1) showed that CRC cells display a wide range of cellular motility with more than 100-fold difference between the most and the least migrating cell lines. Since solid tumors are often hypoxic, we also determined the migration under hypoxic conditions (1% O₂). The results (Fig. 1) show that hypoxia was accompanied by increased motility for 9 of the 12 cell lines (75%) whereas no significant changes were observed for the other 3 cell lines (25%).

3.2. CRC cell migration is stimulated by VEGF-A, VEGF-B and PlGF

We selected two cell lines with good motility, HCT-116 and SW480, for further studies. The results show that the motility of HCT-116 cells is strongly stimulated in the presence of fetal calf serum (5%) compared to serum-free media (Fig 2A). We then determined the cellular migration in serum-free media in the presence of individual VEGF ligands. VEGF-B and PlGF specifically bind VEGFR1, VEGF-E targets VEGFR2 only while

VEGF-C and VEGF-D selectively activate VEGFR3. In comparison, VEGF-A is able to activate both VEGFR1 and VEGFR2. The results (Fig. 2A) show that VEGF-A, VEGF-B and PlGF significantly increased the motility of HCT-116 cells whereas VEGF-C, VEGF-D and VEGF-E had no detectable effect, compared to serum-free media. Comparable results were observed for SW480 (Fig. 2B).

3.3. VEGF-induced signaling is mediated via VEGFR1-containing dimers

The previous results indicate that VEGF-induced migration is mediated via VEGFR1, since neither VEGF-E (selective for VEGFR2) nor VEGF-C and VEGF-D (selective for VEGFR3) showed any detectable effect. For further confirmation we used blocking antibodies directed against VEGFR1 or VEGFR2 following stimulation with VEGF-A, VEGF-B, PlGF and, as negative controls, VEGF-E and serum-free media. The results show that blocking antibodies to VEGFR1 attenuated the migration induced by VEGF-A, VEGF-B and PlGF while blocking antibodies to VEGFR2 had no significant influence on the migration induced by VEGF-A or VEGF-B (Fig. 2C). However, unexpectedly, blocking antibodies to VEGFR2 significantly decreased the migration of HCT-116 cells in the presence of PlGF. These findings were not limited to a particular cellular model since similar results were obtained for SW480 (Fig. 2D).

To further understand the influence of PlGF, the experiment was repeated under four different conditions: without antibodies, in the presence of VEGFR1-blocking antibodies, in the presence of VEGFR2-blocking antibodies or in the presence of both VEGFR1- and VEGFR2-blocking antibodies. The results (Fig. 3A and B) confirmed that not only VEGFR1-, but also VEGFR2-blocking antibodies can attenuate PlGF mitigated migration of both HCT-116 and SW480 cells. Furthermore, the effect of the two antibodies together was significantly more important than

the presence of either antibody by itself. Taken together, these findings are consistent with a model where either VEGFR1 homodimers or VEGFR1-VEGFR2 heterodimers are able to promote CRC cell motility ([Fig 3C](#)).

3.4. Aflibercept inhibits the motility of CRC cells

Our results indicate that the motility of CRC cells is promoted by VEGF-A, VEGF-B and PlGF via activation of VEGFR1-containing dimers. The recombinant protein aflibercept specifically binds and neutralize these three VEGF ligands ([Papadopoulos et al., 2012](#)). We therefore determined if aflibercept was able to attenuate CRC cell migration at clinically relevant concentrations. The results ([Fig. 4](#)) shows that aflibercept (50 µg/ml) was able to significantly attenuate the migration for 11 out of the 12 cell lines (92%), the exception being LS174T, where aflibercept had no significant effect ([Fig. 4](#)). To determine if the influence of aflibercept on migration was due to a potential cytotoxic or cytostatic effect, we performed the MTT viability test after 5 days continuous exposure of the cells to serum-containing media with or without aflibercept (50 µg/ml). The average viability of the aflibercept-treated group was 99% ± 4.9% under normoxia and 99% ± 4.6% under hypoxia, compared to the corresponding untreated cells. Therefore, there is no detectable influence of aflibercept on the viability of any of the cell lines under neither normoxia nor hypoxia ($p = 0.39$ and 0.23 , respectively).

3.5. LS174T CRC cells do not respond to VEGF-signaling

The previous result showed that only the LS174T cells did not respond to aflibercept, as determined by the trans-well assay. To exclude that the observed result was assay-dependent, the influence of aflibercept was also determined by the scratch (wound healing) assay ([Kramer et al.,](#)

2013). The results (Fig. 5A) confirm that aflibercept has no influence on the motility of LS174T cells. Taken together these results show that aflibercept is able to attenuate the migration for the majority of CRC cells (11 out of 12 cell lines, 92%) while a minority of cells (1 out of 12, 8%) do not respond to aflibercept independent of the type of migration assay.

Next, the influence of VEGF-signaling on LS174T cells was studied in further detail. At baseline, LS174T cells show low motility in serum-free media but were strongly stimulated in the presence of fetal calf serum (Fig. 5B). In clear contrast, none of the VEGF ligands, including VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E or PlGF had any detectable influence on the motility (Fig. 5B). In agreement with these findings, neither VEGFR1- nor VEGFR2-blocking antibodies showed any detectable influence on the motility (Fig. 5C). Therefore, the migration of LS174T cells is independent of VEGF-signaling.

3.6. *Expression levels of VEGF receptors in CRC cells*

Next, we determine the expression of VEGFR1 and VEGFR2 as well as their co-receptor Neuropilin 1 (NRP1) for four CRC cell lines with different sensitivity to aflibercept. The results (Table 1) reveal important differences in the expression of VEGFR1 between the different cell lines, with up to 8-fold differences in VEGFR1 expression between the highest and lowest values. In contrast, VEGFR2 was expressed at low levels, whereas NRP1 expression was high for all cell lines. Overall, the inhibitory effect of aflibercept seems to be closely associated with the expression of VEGFR1. Importantly, the LS174T cells that only marginally respond to aflibercept, showed low expression of VEGFR1 and NRP1, whereas HCT-116 cells, which are strongly inhibited by aflibercept, showed the highest expression of VEGFR1 as well as high NRP1 expression.

4. Discussion

VEGF-signaling has been extensively characterized in endothelial cells. In contrast, less is known about this signaling pathway in other cell types as well as in cancer cells. Most, if not all, CRC cells, xenografts and patient tumors express VEGFR1 and, to a lesser degree, VEGFR2 ([Bates et al., 2003](#); [Fan et al., 2005](#); [Lesslie et al., 2006](#); [Okita et al., 2009](#); [Eppenberger et al., 2010](#); [Yin et al., 2010](#); [Yeh et al., 2019](#)). Furthermore, immunohistochemistry with phospho-specific antibodies show that both VEGFR1 and VEGFR2 are present in the active phospho-tyrosine phosphorylated form in the tumor cells of CRC xenografts ([Mésange et al., 2014](#); [Mésange et al., 2018](#)). We here characterized VEGF-signaling in CRC cells and determined the therapeutic implications. Our results show that cell migration is stimulated by VEGF-A, VEGF-B and PlGF that all bind to VEGFR1. In contrast, cellular motility was not stimulated by VEGF-E, that is specific for VEGFR2 or by VEGF-C and VEGF-D that selectively activates VEGFR3. In agreement, VEGFR1-blocking antibodies attenuated the migration of CRC cells following stimulation with VEGF-A, VEGF-B and PlGF while VEGFR2-blocking antibodies had no influence on the migration following stimulation with VEGF-A or VEGF-B. Surprisingly, VEGFR2-blocking antibodies attenuated the migration in the presence of PlGF, which was enforced in the presence of both VEGFR1- and VEGFR2-directed antibodies. The most likely explanation is that CRC cell migration can be mediated by both VEGFR1 homodimers and VEGFR1-VEGFR2 heterodimers. Our findings are in agreement with previous work reporting that PlGF, but not other VEGFR1 ligands, stimulates the formation of VEGFR1/VEGFR2 heterodimers ([Autiero et al., 2003](#); [Cudmore et al., 2012](#)). Furthermore, it was reported that the activity of PlGF-stimulated vascular endothelial cells could be inhibited by

antibodies to both VEGFR1 and VEGFR2 ([Autiero et al., 2003](#)) which is coherent with the findings reported here.

The likely presence of VEGFR1-VEGFR2 heterodimers raises several questions. First, how common are these heterodimers? A computational model of VEGF receptor subunit dimerization concluded that a tenfold excess of one VEGF receptor subunit would result in minimal homo-dimerization of the less abundant receptor ([Mac Gabhann and Popel, 2007](#)). Therefore, considering the relative amounts of VEGFR1 and VEGFR2 present in the CRC cells, we would predict that the majority of VEGFR2 is present in the form of VEGFR1-VEGFR2 heterodimers rather than as VEGFR2 homodimers. Second, how important are these heterodimers? Considering their relative abundance, which would be within the same dose range as the total amounts of VEGFR2, we would not predict the heterodimers to play a major functional role. However, this might not necessarily be the case. Classical studies with endothelial cells show that the binding-affinity of VEGFR1 for the VEGF-A ligand is one order of magnitude higher than that of VEGFR2, whereas the kinase activity of VEGFR1 is about 10-fold weaker than that of VEGFR2 ([Sawano et al., 1996](#)). Similar findings were observed for human CRC xenografts where almost all the immunoreactive VEGFR2 in the tumor cells was found to be in the active, tyrosine-phosphorylated form whereas only 5-10% of the VEGFR1 was present in the catalytically active form^a. Therefore, one might speculate that ligand binding to the VEGFR1-VEGFR2 heterodimers might be determined by the high affinity VEGFR1 subunit whereas the kinase activity might depend on the highly catalytically active VEGFR2 subunit. If this is indeed the case, we would expect the VEGFR1-VEGFR2 dimers to have much higher functional activity compared to the VEGFR1 homodimers.

VEGFR1 is activated by three different ligands, VEGF-A, VEGF-B and PlGF. Aflibercept, a recombinant protein approved for treatment of patients with metastatic CRC, specifically binds and neutralizes the same ligands ([Papadopoulos et al., 2012](#)). Therefore, we speculated that aflibercept might be able to attenuate CRC cell motility. Indeed, the results show that the migration of eleven of twelve CRC cell lines (92%) was inhibited by clinically relevant concentrations of aflibercept. Interestingly, this effect was observed for both poorly migrating and highly mobile CRC cell lines, indicating a general involvement of VEGF-signaling in the motility of CRC cells. Only one cell line, LS174T, did not respond to aflibercept. In agreement, the migration of this cell line was not stimulated by any of the VEGF ligands and was not affected by the presence of VEGFR1- or VEGFR2-blocking antibodies suggesting that the migration of these cells is independent of VEGF-signaling.

Interestingly, even prolonged (120 hours) exposure to aflibercept had no detectable influence on the growth and viability of any of our cell lines suggesting that VEGF-signaling does not play a crucial role in the proliferation of CRC cells, at least not under standard cell culture conditions. In agreement, it has been reported that VEGFR1 activation is principally associated with cell migration, rather than proliferation, in macrophages ([Weddell et al., 2017](#)). Furthermore, it has been shown that activation of VEGFR1-VEGFR2 heterodimers is accompanied by VEGFR phosphorylation and increased migration in endothelial cells without any effect on proliferation ([Cudmore et al., 2012](#)).

All CRC cells studied expressed VEGFR1 at high, but variable levels, as was the case for the VEGFR co-receptor neuropilin 1. In comparison, VEGFR2 were expressed at low levels. Interestingly, there was an overall correlation between the inhibitory activity of aflibercept and the expression levels of the VEGFR1 receptor. In particular, the LS174T cell line that did

not respond to neither aflibercept nor to the presence of VEGF ligands showed low expression of VEGFR1 as well as of NRP1.

Taken together, we here show that migration of CRC cells is, at least in part, mediated by VEGF signaling via VEGFR1-containing dimers. We further show that the migration of the vast majority of our CRC cell lines (11/12, 92%) can be inhibited by clinically relevant concentrations of aflibercept. Since tumor cell migration is closely associated with invasion and metastasis, these findings suggest for the first time, that aflibercept has direct anti-invasive properties in addition to its well-established anti-vascular activities.

Footnotes

^aP Mésange and AK Larsen, unpublished results

Credit authorship contribution statement

Anaïs Bouygues: Investigation, Methodology, Data analysis, Writing- original drafts, Writing-review and editing. **Sandrine Thouroude:** Investigation, Methodology, Writing- original drafts, Writing-review and editing. **Grigoris Gerotziafas:** Funding acquisition, Writing-review and editing. **Annette K. Larsen:** Conceptualization, Funding acquisition, Supervision, Data analysis, Writing- original drafts, Writing-review and editing.

Conflict of interest

This work was financed in part by research funding to Annette K. Larsen from Sanofi-Aventis. Sandrine Thouroude was supported by an unrestricted research grant from Leo Pharma, Greece and by the RSFN association, France.

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.

Acknowledgements

Anaïs Bouygues was generously supported by a Mouna Nasrallah fellowship. The authors would like to acknowledge Fanis Choulis from Leo Pharma Greece, for precious support of the project and Emanuelle Dochy, Marika Crohns and Christine Geffriaud-Ricouard from Sanofi-Aventis Europe for stimulating and fruitful discussions. We also thank Patrick van Dreden for careful review of the manuscript.

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. doi: 10.1038/nm884. PMID: 12796773.

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. doi: 10.1016/j.cub.2003.09.002. PMID: 14521839.

Cai M, Wang K, Murdoch CE, Gu Y, Ahmed A. Heterodimerisation between VEGFR-1 and VEGFR-2 and not the homodimers of VEGFR-1 inhibit VEGFR-2 activity. *Vascul Pharmacol.* 2017 Jan;88:11-20. doi: 10.1016/j.vph.2016.11.007. Epub 2016 Nov 22. PMID: 27884759.

Ceci C, Atzori MG, Lacal PM, Graziani G. Role of VEGFs/VEGFR-1 Signaling and its Inhibition in Modulating Tumor Invasion: Experimental Evidence in Different Metastatic Cancer Models. *Int J Mol Sci.* 2020 Feb 18;21(4):1388. doi: 10.3390/ijms21041388. PMID: 32085654; PMCID: PMC7073125.

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. doi: 10.1038/ncomms1977. PMID: 22828632.

Eppenberger M, Zlobec I, Baumhoer D, Terracciano L, Lugli A. Role of the VEGF ligand to receptor ratio in the progression of mismatch repair-proficient colorectal cancer. *BMC Cancer*. 2010 Mar 11;10:93. doi: 10.1186/1471-2407-10-93. PMID: 20222950; PMCID: PMC2841667.

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. doi: 10.1038/sj.onc.1208246. PMID: 15735759.

Koch S, Tugues S, Li X, Gualandi L, Claesson-Welsh L. Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Biochem J*. 2011 Jul 15;437(2):169-83. doi: 10.1042/BJ20110301. PMID: 21711246.
Review

Kramer N, Walzl A, Unger C, Rosner M, Krupitza G, Hengstschläger M, Dolznig H. In vitro cell migration and invasion assays. *Mutat Res*. 2013 Jan-Mar;752(1):10-24. doi: 10.1016/j.mrrev.2012.08.001. Epub 2012 Aug 23. PMID: 22940039.

Lesslie DP, Summy JM, Parikh NU, Fan F, Trevino JG, Sawyer TK, Metcalf CA, Shakespeare WC, Hicklin DJ, Ellis LM, Gallick GE. Vascular

endothelial growth factor receptor-1 mediates migration of human colorectal carcinoma cells by activation of Src family kinases. *Br J Cancer*. 2006 Jun 5;94(11):1710-7. doi: 10.1038/sj.bjc.6603143. PMID: 16685275; PMCID: PMC2361330.

Mac Gabhann F, Popel AS. Dimerization of VEGF receptors and implications for signal transduction: a computational study. *Biophys Chem*. 2007 Jul;128(2-3):125-39. doi: 10.1016/j.bpc.2007.03.010. Epub 2007 Mar 24. PMID: 17442480; PMCID: PMC2711879.

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. doi: 10.18632/oncotarget.1671. PMID: 25015210; PMCID: PMC4148093.

Mésange P, Bouygues A, Ferrand N, Sabbah M, Escargueil AE, Savina A, Chibaudel B, Tournigand C, André T, de Gramont A, Larsen AK. Combinations of Bevacizumab and Erlotinib Show Activity in Colorectal Cancer Independent of *RAS* Status. *Clin Cancer Res*. 2018 Jun 1;24(11):2548-2558. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-17-3187. Epub 2018 Feb 28. PMID: 29490990.

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 Dec 15;15(24):7529-7537. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-0336. PMID: 20008853; PMCID: PMC2797340.

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. doi: 10.1093/jjco/hyp066. Epub 2009 Jun 17. PMID: 19535387.

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. doi: 10.1007/s10456-011-9249-6. PMID: 22302382; PMCID: PMC3338918.

Sawano A, Takahashi T, Yamaguchi S, Aonuma M, Shibuya M. Flt-1 but not KDR/Flk-1 tyrosine kinase is a receptor for placenta growth factor, which is related to vascular endothelial growth factor. *Cell Growth Differ*. 1996 Feb;7(2):213-21. PMID: 8822205.

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. doi: 10.1038/nrm.2016.87. Epub 2016 Jul 27. PMID: 27461391. Review

Soares DG, Escargueil AE, Poindessous V, Sarasin A, de Gramont A, Bonatto D, Henriques JA, Larsen AK. Replication and homologous recombination repair regulate DNA double-strand break formation by the antitumor alkylator ecteinascidin 743. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Aug

7;104(32):13062-7. doi: 10.1073/pnas.0609877104. Epub 2007 Jul 26. PMID: 17656556; PMCID: PMC1941813.

Weddell JC, Chen S, Imoukhuede PI. VEGFR1 promotes cell migration and proliferation through PLC γ and PI3K pathways. NPJ Syst Biol Appl. 2017 Dec 19;4:1. doi: 10.1038/s41540-017-0037-9. PMID: 29263797; PMCID: PMC5736688.

Yeh CC, Shih LJ, Chang JL, Tsuei YW, Wu CC, Hsiao CW, Chuu CP, Kao YH. Synchronous vascular endothelial growth factor protein profiles in both tissue and serum identify metastasis and poor survival in colorectal cancer. Sci Rep. 2019 Mar 12;9(1):4228. doi: 10.1038/s41598-019-40862-6. PMID: 30862805; PMCID: PMC6414611.

Yin Y, Cao LY, Wu WQ, Li H, Jiang Y, Zhang HF. Blocking effects of siRNA on VEGF expression in human colorectal cancer cells. World J Gastroenterol. 2010 Mar 7;16(9):1086-92. doi: 10.3748/wjg.v16.i9.1086. PMID: 20205278; PMCID: PMC2835784.

Figure and Table legends

Fig. 1.

The migration of twelve well-characterized colorectal CRC cell lines was determined by the trans-well assay (Boyden chamber assay) under normoxia (white columns) or hypoxia (1% O₂, black columns) after 24 hrs migration with 5% fetal calf serum as the chemo-attractant in the lower chamber. All values are normalized to an initial loading of 250 000 cells. The values represent the averages of 3 independent experiments, each done in duplicate. The bars indicate the mean $\pm$ SD for each cell line under the indicated condition. p-values indicate the difference between migration under normoxia and hypoxia and were calculated using Student's paired *t*-test. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. NS, non-significant.

Fig 2.

Migration of HCT-116 (A) and SW480 cells (B) in serum-free media in the absence or presence of VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E and PlGF was determined by the trans-well assay. The upper well contained the indicated cells in serum-free media whereas the lower well contained serum-free media in the presence of the indicated VEGF ligand. The negative control (Control) corresponds to serum-free media in both the upper and the lower well, whereas the positive control (Serum) contained 5% fetal calf serum in the lower well as chemoattractant. (C) The influence of VEGFR1- and VEGFR2-blocking antibodies on the migration of HCT-116 (C) and SW480 cells (D) in the presence of VEGF-A, VEGF-B, PlGF and, as negative controls, VEGF-E or serum-free media (Control). Cells were incubated with VEGFR-blocking antibodies for 30 min and placed in the upper well while the lower well contained the indicated VEGF ligands as chemoattractant. All values are normalized to

an initial loading of 250 000 cells. The values represent the averages of 3 independent experiments, each done in duplicate. The bars indicate the mean $\pm$ SD for each cell line under the indicated condition. p-values indicating the difference between cells incubated in the absence or presence of VEGFR-blocking antibodies using Student's paired *t*-test. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; NS, non-significant.

Fig. 3.

Migration HCT-116 (A) and SW480 cells (B). Cells were incubated with the indicated VEGFR-blocking antibodies and placed in the upper well. PlGF was placed in the lower well as chemoattractant while serum-free media was used as negative control. Migrating cells were counted after 24 hrs. All values are normalized to an initial loading of 250 000 cells. The values represent the averages of 3 independent experiments, each done in duplicate. The bars indicate the mean $\pm$ SD for each cell line under the indicated condition. p-values indicate the difference between cells incubated in the absence or presence of VEGFR-blocking antibodies using Student's paired *t*-test. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. (C). Model depicting the VEGF ligands and receptors that can promote motility of CRC cells

Fig. 4.

The influence of aflibercept on the migration of CRC cells was determined by the trans-well assay during 24 hrs. Briefly, 50 000 to 250 000 cells in serum-free media with or without aflibercept (50 $\mu\text{g/ml}$) were plated in the upper chamber while the lower chamber contained culture media with fetal calf serum (5%) as chemoattractant. All values are normalized to an initial loading of 250 000 cells. The values represent the averages of 3 independent experiments, each done in duplicate. The bars indicate the mean $\pm$ SD for each cell line under the indicated condition. p-

values indicate the difference between migration under normoxia and hypoxia and were calculated using Student's paired *t*-test. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; NS, non-significant.

Fig 5.

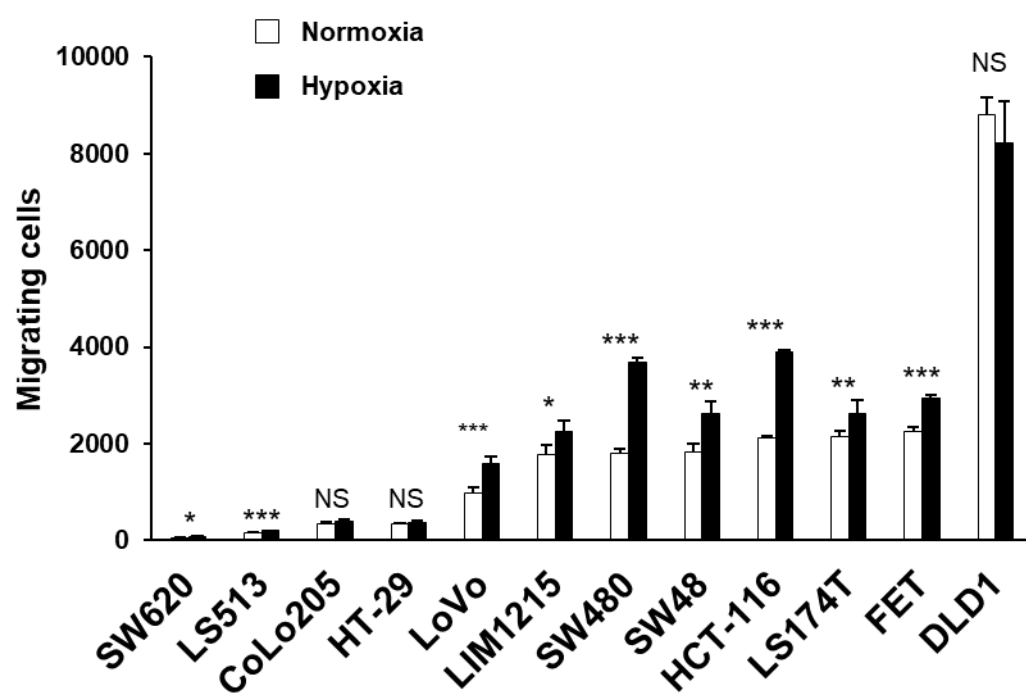
(A) The influence of aflibercept on the migration of LS174T cells was determined by the wound-healing assay. A continuous layer of LS174T cells were wounded in the middle and the cells allowed to migrate for 48 hours in the absence or presence of aflibercept (50 $\mu\text{g/ml}$). The numbers indicate the remaining width of the wound at the specified time and are expressed as % of the width at time 0. (B) The influence of VEGF ligands on the migration of LS174T cells was determined by the trans-well assay. The upper well contained the LS174T cells in serum-free media whereas the lower well contained serum-free media in the presence of the indicated VEGF ligands. The negative control (Control) corresponds to serum-free media in both wells, whereas the positive control (Serum) contained 5% fetal calf serum in the lower well as chemoattractant. All values are normalized to an initial loading of 250 000 cells. The values represent the averages of 3 independent experiments, each done in duplicate. The bars indicate the mean $\pm$ SD for each cell line under the indicated condition. *p*-values indicate the difference between cells incubated in the absence or presence of VEGFR-blocking antibodies using Student's paired *t*-test. NS, non significant. (C) The influence of VEGFR1- and VEGFR2-blocking antibodies on the migration of LS174T cells in the presence of VEGF-A, VEGF-B, PlGF and, as negative controls, VEGF-E or serum-free media (Control). Cells were incubated with VEGFR-blocking antibodies for 30 min and placed in the upper well while the lower well contained the indicated VEGF ligands as chemoattractant. All values are normalized to an initial loading of 250 000 cells. The values represent the averages of 3

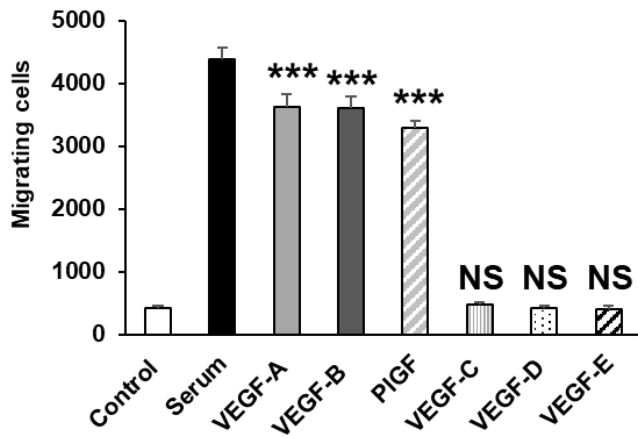
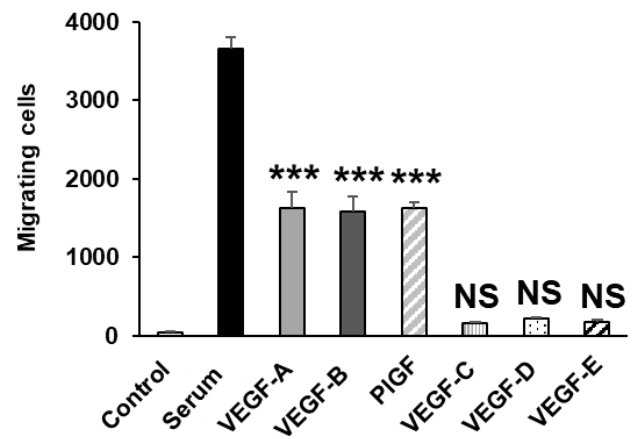
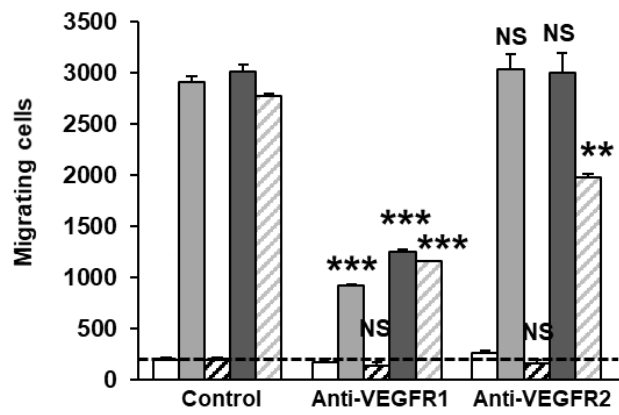
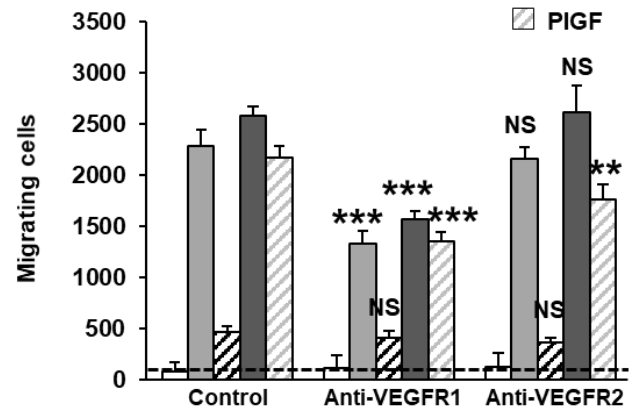
independent experiments, each done in duplicate. The bars indicate the mean $\pm$ SD for each cell line under the indicated condition. p-values indicate the difference between cells incubated in the absence or presence of VEGFR-blocking antibodies using Student's paired *t*-test. NS, non-significant.

Table 1.

Expression of VEGF receptors in CRC cells with different sensitivity to aflibercept. Protein extracts were prepared and the expression of VEGFR1, VEGFR2 and neuropilin1 (NRP1) was determined by ELISA analysis. The values represent the average of 3 independent experiments, each done in duplicate. The data for the influence of aflibercept on the migration were obtained from Fig. 4.

FIGURE 1



A HCT-116**B SW480****FIGURE 2****C HCT-116****D SW480**

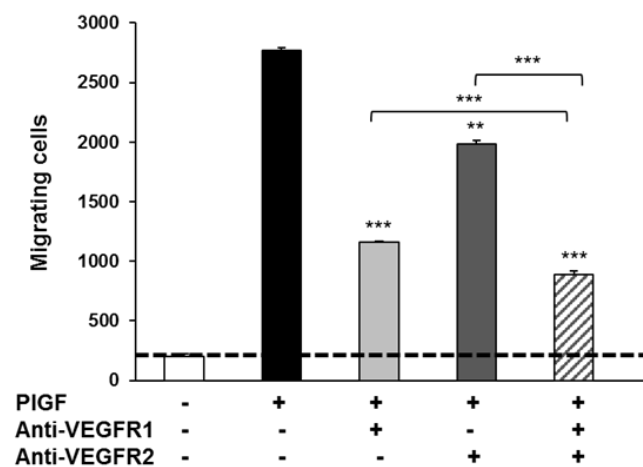
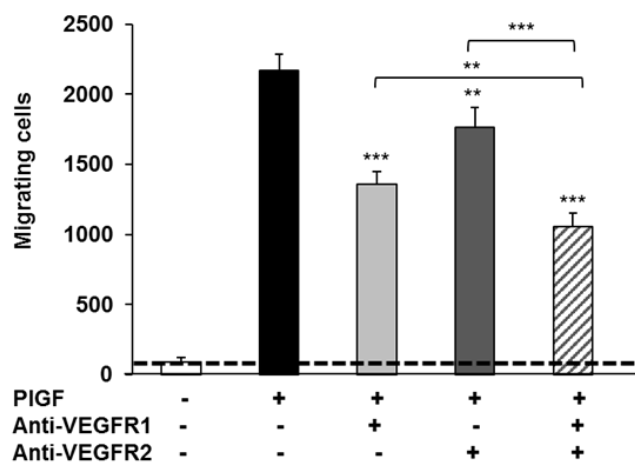
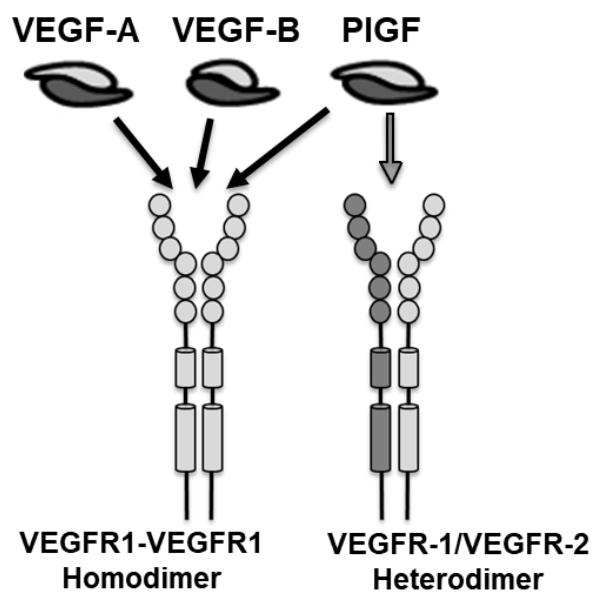
A**HCT-116****B****FIGURE 3****SW480****C**

FIGURE 4

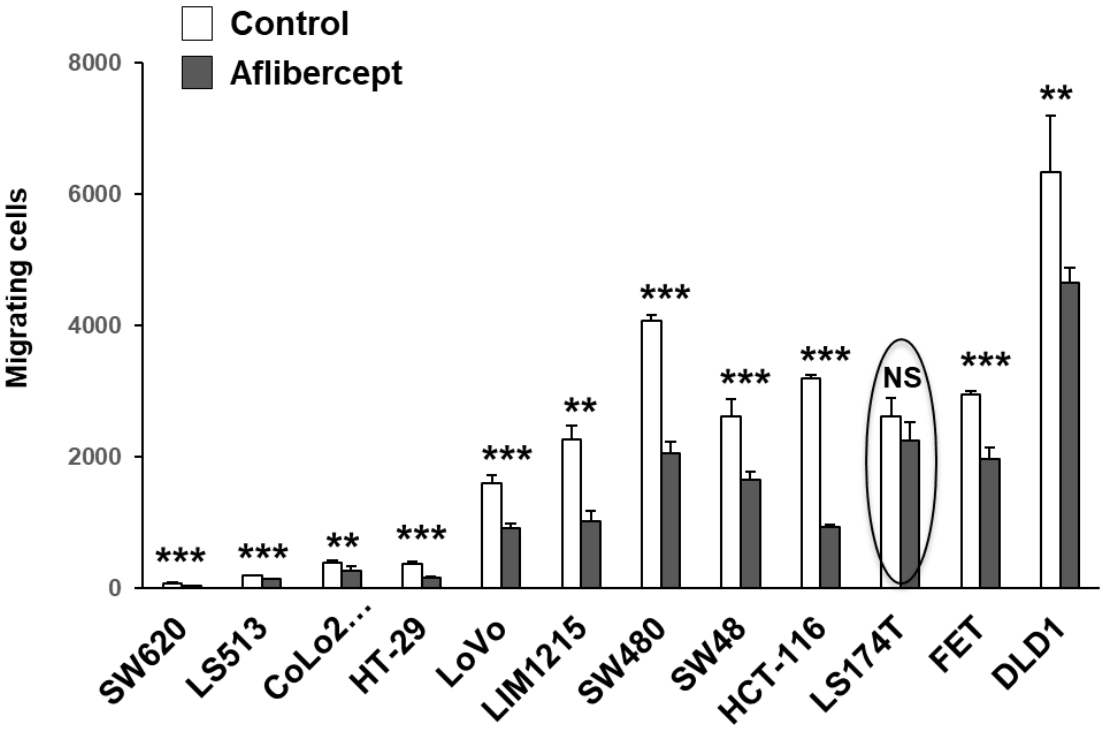
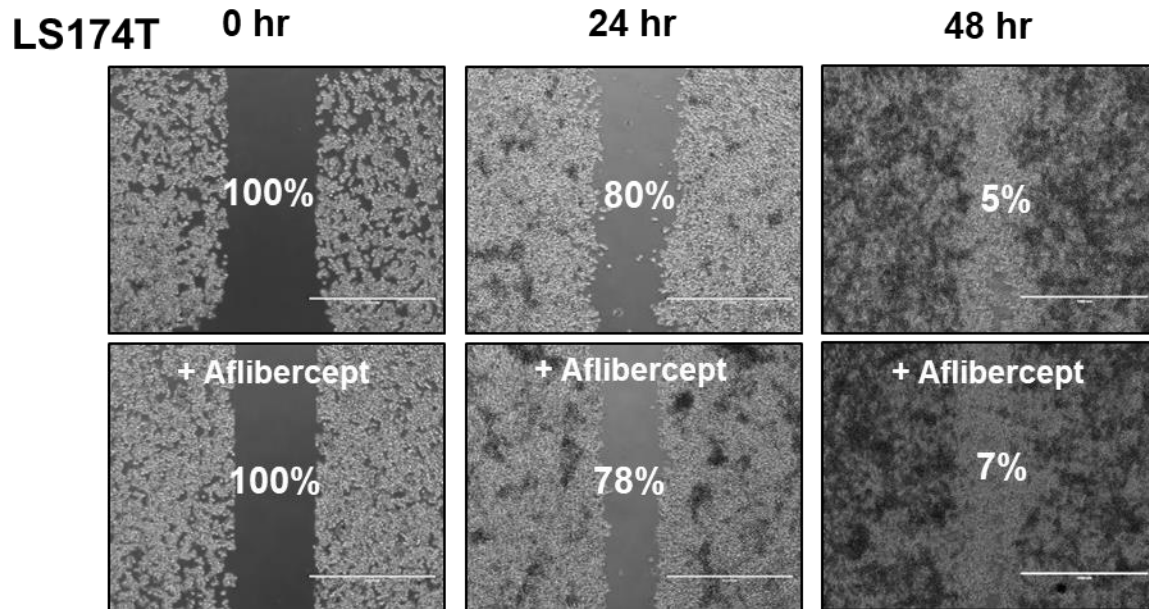
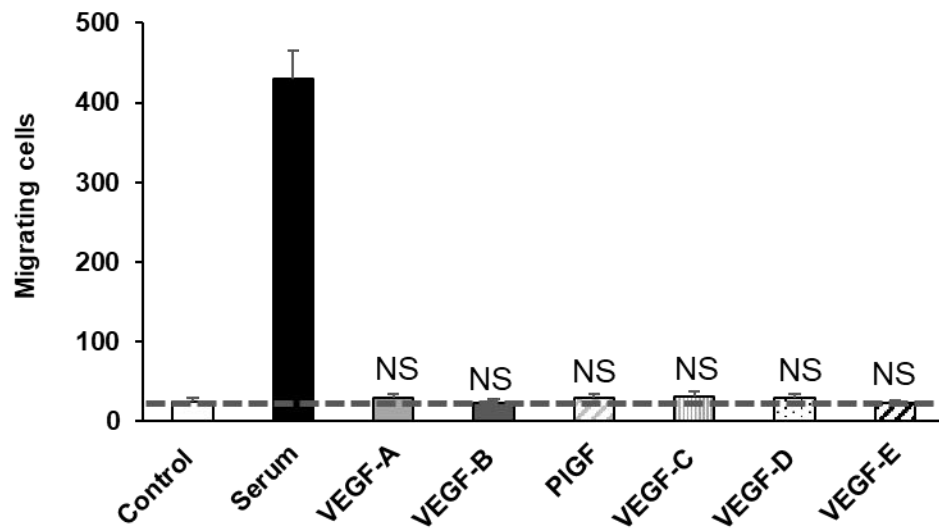


FIGURE 5

A



B



C

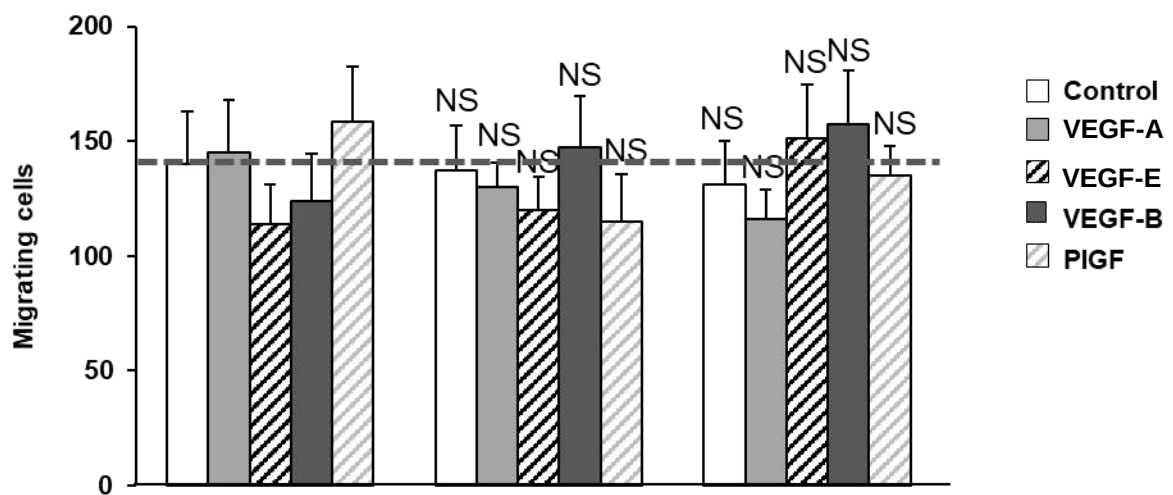


TABLE 1

pg/μg protein	VEGFR1	VEGFR2	NRP1	% Inhibition by aflibercept
HCT-116	36 $\pm$ 3,0	0.40 $\pm$ 0,82	62 $\pm$ 9,6	76
SW480	14 $\pm$ 1,9	0,20 $\pm$ 0,15	65 $\pm$ 6,5	45
DLD1	8,7 $\pm$ 0,51	0,27 $\pm$ 0,16	80 $\pm$ 6,3	27
LS174T	4,5 $\pm$ 0,21	0,30 $\pm$ 0,14	29 $\pm$ 3,5	12

ARTICLE N°2 :

Endothelial and colorectal cancer cells show differential cellular motility, VEGF-signaling and response to the angiogenesis inhibitor aflibercept

Statut: En attente des possibles suggestions du jury et de la révision de l'article par l'industrie pharmaceutique avant la soumission de l'article.

Journal visé : **International Journal of Oncology**

Résumé:

Nous savons qu'il existe un lien étroit entre les cellules endothéliales et tumorales. Il a notamment été rapporté que la progression de la croissance tumorale était associée à une augmentation de la capacité à se mouvoir des cellules tumorales mais également des cellules endothéliales.

La signalisation VEGF étant très impliquée à la fois dans les cellules endothéliales mais également dans les cellules tumorales colorectales, nous avons décidé de comparer les phénomènes impliquant des mouvements cellulaires tels que la migration et l'invasion des cellules endothéliales et des cellules tumorales. Nous avons ensuite étudié l'implication de la signalisation VEGF dans ces phénomènes chez ces deux types cellulaires ainsi que leur réponse à notre agent anti-angiogénique : l'aflibercept.

Premièrement, nous montrons que les cellules endothéliales ont une capacité à migrer et « envahir » les tissus beaucoup plus importants que les cellules tumorales. Cependant, la migration et l'invasion des cellules endothéliales semblent beaucoup plus dépendantes de facteurs externes (facteur de croissance...) que les cellules tumorales.

Etant donné l'implication de la voie VEGF dans ces deux types cellulaires, nous avons cherché à déterminer l'expression des récepteurs et des ligands. D'autant plus que les facteurs externes pouvant médier les phénomènes de migration et d'invasion

pourraient être des acteurs de cette voie. Nos résultats montrent que l'expression du VEGFR1 est assez similaire pour les différentes cellules endothéliales, tandis que cette dernière varie pour les cellules tumorales. Les cellules tumorales présentent également un taux d'expression faible du récepteur VEGFR2 et du co-récepteur NRP1 comparé aux cellules endothéliales.

Le récepteur VEGFR1 dans les cellules endothéliales et dans les cellules tumorales serait à la fois un régulateur positif de l'angiogenèse tumorale et de la motilité des cellules tumorales.

Nous avons donc cherché à étudier les deux ligands principaux de ce récepteur : le VEGF-A et le PlGF. Les cellules endothéliales présentent des taux faibles de VEGF-A sécrété tandis que les cellules tumorales en sécrètent jusqu'à 100 fois plus. Le PlGF est quant-à lui sécrété de façon variable dans les deux types cellulaires.

L'aflibercept, inhibiteur de l'angiogenèse, étant approuvé en seconde ligne dans le CCR et ayant pour but de lier (avec plus d'affinité que le VEGFR1) le VEGF-A, -B et le PlGF, nous avons décidé de comparer son efficacité sur les phénomènes cellulaires tels que la migration et l'invasion des cellules endothéliales et des cellules tumorales, au vue de l'expression différentielle des récepteurs et ligands de la voie de signalisation VEGF. Nos résultats révèlent que l'aflibercept montre un pouvoir inhibiteur plus important sur les cellules tumorales que sur les cellules endothéliales à la fois en terme de migration que d'invasion. En effet, on inhibe la migration tumorale d'environ 53% contre 28% pour la migration endothéliale. On obtient la même chose d'un point de vue de l'invasion avec 49% d'inhibition pour les cellules tumorales contre 26% pour les cellules endothéliales.

Ainsi, nous avons caractérisé davantage la signalisation VEGF dans les cellules du CCR mais également dans les cellules endothéliales. Nous avons confirmé l'effet « anti-migratif » et montré l'effet « anti-invasif » de l'aflibercept sur les cellules du CCR, effet qui s'est révélé être plus important que sur les cellules endothéliales initialement ciblées.

Endothelial and colorectal cancer cells show differential cellular motility, VEGF-signaling and response to the angiogenesis inhibitor aflibercept

Sandrine Thouroude^{1,2,3}, Patrick van Dreden⁴, Grigoris T. Gerotziafas^{1,2,3,5},
Annette K. Larsen^{1,2,3,6},

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

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

³Institut Universitaire de Cancérologie (IUC), Faculté de Médecine, Sorbonne Université, Paris 75005, France

⁴Clinical Research Department, Diagnostica Stago, Gennevilliers 92230, France

⁵Service d'Hématologie Biologique Hôpital Tenon, Hôpitaux Universitaires Est Parisien, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Paris, France.

⁶Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Paris 75016, Paris

Keywords: endothelial and cancer cell motility, colorectal cancer, VEGF signaling, VEGF-targeted agents, angiogenesis inhibitors, aflibercept

Correspondence to: Dr. Annette K. Larsen, Cancer Biology and Therapeutics, Kourilsky Research Building 1st floor, Hôpital Saint-Antoine, 184 rue du Faubourg Saint-Antoine, 75571 PARIS Cedex 12 France.

E-mail: annettelarsen004@gmail.com; annette.larsen@sorbonne-universite.fr

Abstract

Enhanced motility of both tumor and endothelial cells represent a key step in the tumorigenic process. Tumor angiogenesis is strongly dependent on vascular endothelial cell (VEGF)-signaling. Colorectal cancer (CRC) cells also display functional VEGF-receptors (VEGFRs) and produce the majority of VEGF in the tumor environment, thereby mediating both endocrine and paracrine VEGF-signaling. Furthermore, we recently reported that aflibercept, a clinically used angiogenesis inhibitor, directly inhibits CRC cell motility. We here compared three types of endothelial cells, HUVECs, HCAECs and HMECs with three different CRC cell lines, HCT-116, SW480 and LoVo. The results show that the ECs display an up to 30-times higher migratory and invasive potential, compared to the CRC cells, which was most pronounced for the microvascular HMEC cells. Interestingly, the motility of all ECs was highly serum-dependent indicating their functional dependence of external factors. All ECs expressed similar levels of VEGFR1 while the expression was variable for the CRC cells. CRC cells expressed low levels of VEGFR2 and the co-receptor neuropilin1, compared to ECs. In contrast, VEGF-A was secreted in low amounts by the ECs while the secretion by the CRC cells was up to 100-times higher. Unexpectedly, aflibercept had a stronger inhibitory effect on the CRC cells than on ECs with 50-56% vs 27-29% inhibition for migration, respectively, and 43-56% vs 25-28% inhibition for invasion, respectively. These findings clarify the molecular and functional differences between VEGF-signaling in endothelial and CRC cells and validates the direct anti-migratory and invasive activity of aflibercept toward CRC cells.

Introduction

Tumor progression is associated with transition of small localized tumors to an invasive disease able to penetrate the surrounding tissues and colonize distant sites. The phenotypic shift is in part mediated by the enhanced capacity of tumor cells to attract microvascular endothelial cells by a process called sprouting angiogenesis. Tumor angiogenesis provides the tumor with increased access to nutrients and oxygen thereby promoting tumor growth and facilitates the access of tumor cells to the blood stream and the establishment of secondary tumors ([Folkman 2007](#)). In addition, the tumor cells acquire the capacity to invade surrounding tissues by passing the basement membrane and intruding into the underlying interstitial tissues ([Kramer et al., 2013](#)). Therefore, for both endothelial and tumor cells, enhanced migration and invasion represent a key element in the tumorigenic process.

Tumor angiogenesis is principally controlled by the vascular endothelial growth factor (VEGF) pathway. This signaling pathway is triggered by binding of VEGF ligands (VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D or placental growth factor (PlGF)) to their receptors (VEGFR1/Flt1, VEGFR2/Flk1/KDR and VEGFR3/Flt4). Ligand binding is associated with auto-phosphorylation of the receptor on specific tyrosine residues thereby permitting docking of selected adaptor proteins and triggering of downstream signaling. The output signal is both ligand- and receptor dependent ([Koch et al., 2011](#); [Simons et al., 2016](#)).

The importance of VEGF-signaling for cancer growth, invasion and metastasis has prompted the development of a wide range of compounds that target different steps of the VEGF-signaling cascade. This involves binding and neutralization of the ligand by antibodies or recombinant proteins, blocking antibodies to the receptor, small molecule angiokinase inhibitors that block the catalytic activity of the VEGFRs and protein kinase

C inhibitors that attenuate the intracellular VEGF-signaling. Although angiogenesis inhibitors have been approved for clinical use in different tumor types, colorectal cancer (CRC) is generally considered to be the tumor type where angiogenesis inhibition works the best.

A striking feature of CRC cells and tumors is the capacity for both paracrine and autocrine VEGF-signaling. CRC cells represent the major source of VEGF in the tumor environment ([Mésange et al., 2014](#); [Chiron et al., 2018](#)) and are therefore a principal regulator of endothelial cells (ECs) ([Larsen et al., 2011](#)). In addition, CRC cells express VEGF receptors (VEGFRs) giving rise to autocrine VEGF signaling ([Larsen et al., 2013](#)). Results from different laboratories indicate that most, if not all, human CRC cells and tumors express functional active VEGFR1 ([Bates et al., 2003](#); [Fan et al., 2005](#); [Okita et al., 2009](#); [Naik et al., 2009](#); [Mésange et al., 2014](#); [Mésange et al., 2018](#)) and, to a lesser degree, VEGFR2/Fik1/KDR ([Mulkeen et al., 2006](#); [Giatromanolaki et al., 2007](#); [Calvani et al., 2008](#); [Mésange et al., 2014](#); [Mésange et al., 2018](#)). Motility of CRC cells is principally associated with activation of VEGFR1 homodimers and, to a lesser degree, VEGFR1-VEGFR2 heterodimers ([Bates et al., 2003](#); [Fan et al., 2005](#); [Lesslie et al., 2006](#); [Koch et al., 2011](#); [Ceci et al., 2020](#); [Bouygues et al., 2021](#)) whereas the motility of endothelial cells is principally mediated via VEGFR2 homodimers and likely VEGFR1-VEGFR2 heterodimers ([Autiero et al., 2003](#); [Cudmore et al., 2012](#); [Simons et al., 2016](#)).

Importantly, we have recently shown that a clinically used angiogenesis inhibitor, aflibercept, that specifically binds the VEGF ligands VEGF-A, VEGF-B and PlGF ([Papadopoulos et al., 2012](#)), is able to attenuate the motility of most CRC cell lines examined ([Bouygues et al., 2021](#)). These findings indicate for the first time that VEGF-directed

therapies may directly inhibit tumor cells motility in addition to their well-established anti-vascular activities.

Our recent findings prompted us to compare the migratory potential of ECs and CRC cells and their response to VEGF-signaling inhibition. The results show that the ECs display a much higher migratory and invasive potential, compared to the CRC cells. In contrast, aflibercept emerged as a more efficient inhibitor of cellular motility in CRC cells, compared to the ECs.

Materials and methods

Drugs. Aflibercept (Zaltrap) was provided by Sanofi-Aventis (Gentilly, France).

Cell culture. HUVECs (human umbilical vein endothelial cells) were kindly provided by Xavier Houard (Saint-Antoine Research Center, Paris, France) while HCAECs (human coronary artery endothelial cells) were a kind gift from Martine Auclair (Saint-Antoine Research Center, Paris, France). HMECs (HMEC-1, human microvascular endothelial cells) were a generous gift from Karim Fallague, the Vascular Research Center, Marseille, France).

LoVo cells were kindly provided by Richard Hamelin (Saint-Antoine Research Center, Paris, France). SW480 colon carcinoma cells were purchased from American Type Culture Collection (Rockville, MD) while HCT-116 cells were a kind gift from Bert Vogelstein (John Hopkins, Baltimore, MD).

The HUVEC and HCAEC cells were used between passage 5 and 8. For the established cell lines, cells were monitored for mycoplasma contamination using the “MycoAlertTM” mycoplasma detection kit (Lonza) and the cells were replaced after 3 months in culture. The tumor cell panel

was characterized by next generation sequencing of 50 cancer-related HMEC-1 genes using the Ion AmpliSeq Cancer Hotspot Panel v2 (ThermoFisher). CRC cells were maintained in the following cell culture media: McCoy's A (Gibco) for HCT-116 or DMEM (Gibco) for SW480 and LoVo supplemented with 5% fetal calf serum and 1% penicillin/streptomycin. The endothelial cells were maintained as follows: MCDB-131 (Gibco) for HMECs and Endothelial Cells Growth Medium (Promocell) for HUVECs and HCAECs supplemented with 2% fetal calf serum and 1% penicillin/streptomycin.

ELISA kits for the VEGF receptors and ligands. All ELISA kits were obtained from R&D System (Minneapolis, MN). Quantikine ELISA kits were used to determine the expression of VEGFR1 (DVR100C), VEGFR2 (DVR200), Neuropilin1 (DNRP10), VEGF-A (DVE00) and placental growth factor (PIGF, DPG00).

Cellular morphology. Cells (500) were seeded on glass coverslips (18 mm) and allowed to attach for 24 hours, followed by fixation with 4% paraformaldehyde (PFA) for 20 minutes. Samples were then saturated in PBS containing 1% bovine serum albumin and 0.2% gelatin followed by incubation with Alexa Fluor 488 Phalloidin (Invitrogen) to visualize actin filaments. Microscopy analyses was performed using a laser-scanning confocal microscope (Leica SP2) at 60x magnification

Migration and invasion assays. Cell migration was assessed by the transwell (Boyden chamber) assay according to the manufacturer's instructions. Briefly, 50 000 to 250 000 cells in serum-free media were plated in the upper chamber on membranes with a pore size of 8 μ m while the lower chamber contained either serum-free media or culture media

with fetal calf serum (5% for CRCs, 2% for the ECs) as chemoattractant. Alternatively, cells in serum-free media with or without aflibercept (50 µg/ml) were plated in the upper chamber while the lower chamber contained cell culture media with fetal calf serum (5% for CRCs, 2% for the ECs) as chemoattractant. After 24 hours, 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. Invasion assays was carried out the same way except that the membrane of the upper chamber was over laid with a thin layer of Matrigel (growth-factor reduced basement membrane matrix, Corning #356231). Results are expressed as means $\pm$ standard deviation (SD) and represent triplicate samples from at least three independent experiments. All results have been normalized to an initial loading of 250 000 cells.

Expression of VEGF receptors

To characterize the expression of VEGF receptors, protein extracts were prepared in RIPA buffer according to the manufacturer's instructions and the presence of VEGFR1, VEGFR2 and neuropilin1 (NRP1) was determined by ELISA analysis as described previously ([Mésange et al., 2018](#)). The values represent the average of 3 independent experiments, each done in duplicate.

Secretion of VEGF ligands. The secretion of VEGF ligands was determined with conditioned media. Cells were grown in serum-free media for 24 hours followed by collection of the conditioned media and centrifugation to remove cellular debris. The secretion of VEGF-A and PlGF was then determined by ELISA analysis with dedicated kits. The

values represent the average of 3 independent experiments, each done in duplicate.

Cellular viability. Cellular viability was determined by the MTT (methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide) viability assay after 120 hours continuous incubation in the absence or presence of aflibercept (50 µg/ml) as described previously (Soares et al., 2007). All values are averages of at least three independent experiments each done in duplicate.

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

Results

Morphology of ECs and CRC cells.

The morphology of ECs and CRC cells was compared following staining with phalloidin. Phalloidin selectively binds to actin filaments (F-actin), an important part of the cytoskeleton that plays a crucial role in cellular movement. The results show that all three ECs (Figure 1, upper panels) display a flat morphology with numerous stress fibers, typically associated with highly mobile cells. The HCT-116 CRC cells (Figure 1, lower panels) display a spindle-like morphology usually associated with mesenchymal migration where cells migrate individually (Kramer et al., 2013). In contrast, SW480 and LoVo cells display an epithelial-like morphology with round cells that are closely associated between them. This phenotype is usually associated with low motility or, alternatively, with

collective migration where the cells move as cellular cohorts ([Kramer et al., 2013](#)).

ECs show higher motility than CRC cells.

The migration of ECs and CRC cells was studied by the Boyden chamber (trans-well) assay in the absence or presence of serum (5%) in the lower well. All ECs displayed a higher migratory potential compared to the CRC cells, with the capillary ECs (HMECs) showing the highest motility ([Figure 2](#)). Interestingly, the requirement for serum was highly variable. The three EC types and HCT-116 CRC cells were strongly serum-dependent with 24- to 165-times more migration when serum was present in the culture media. In contrast, the migration of SW480 and LoVo cells was only stimulated 3-5 times in the presence of serum, compared to serum-free media. These results suggest that the migration of ECs and HCT-116 cells is strongly dependent on external factors whereas the migration of SW480 and LoVo cells is partly autonomous.

ECs show higher invasive capacity than CRC cells

The invasive capacity of ECs and CRCs was compared using a modified Boyden chamber where the porous filter is overlaid with a thin layer of extracellular matrix before seeding the cells into the top chamber. The results show that all ECs show higher invasive capacity than the CRC cells, which was particularly marked for the microvascular HMECs ([Figure 3](#)). The invasion of the ECs was strongly serum dependent with 40-230 times more cells invading in the presence of serum compared to serum-free media. In comparison, serum only increased the invasion 4-14 times for the CRC cells. These findings indicate that invasion of ECs is tightly controlled by external factors whereas the invasive properties of the CRC cells are partly autonomous.

A comparison between the fractions of migrating cells that also showed invasive properties revealed additional differences between the ECs and the CRC cells. A high fraction of migrating ECs were also able to invade, ranging from around 60% for the HUVECs and HCAECs to 80% for the HMECs. In contrast, the fraction of migrating CRC cells that also was able to invade was highly variable ranging from 12% for the HCT-116 cells, 39% for the SW480 cells and 64% for the LoVo cells.

The expression of VEGF receptors differs between ECs and CRC cells

The expression of VEGFR1, VEGFR2 and NRP1 in cellular lysates from the six cellular models was determined by dedicated ELISA assays. The results ([Figure 4](#)) show that the three types of ECs expressed comparable amounts of VEGFR1 whereas the expression in CRC cells was more variable with an 8-fold difference between the most and the least VEGFR1-expressing cell lines. As expected, VEGFR2 was highly expressed in HUVEC and HCAEC cells, but unexpectedly less in the capillary HMECs. In comparison, all CRC cells expressed low levels of VEGFR2. Neuropilin 1 (NRP1) was expressed at high, but variable levels in the ECs while the expression of NRP1 in CRC cells was lower.

The expression of VEGF ligands differs between ECs and CRC cells

The motility of CRC cells is principally mediated by VEGF-A (VEGF) and placental growth factor (PIGF) ([Bouygues et al., 2021](#)). The secretion of VEGFA and PIGF was determined by ELISA analysis of conditioned media from the six cellular models. The results ([Figure 5](#)) show that the secretion of VEGF-A is low for all the ECs. In contrast, the CRC cells secrete important amounts of VEGF-A, ranging from 4 to 140 times more VEGF-A compared to the ECs.

The secretion of Placental growth factor (PIGF) was variable for both the ECs and the CRC cells with 10-fold difference between the HUVECs and the HMECs and 12-fold difference between LoVo and HCT-116. It is interesting to note that the capillary HMEC cells secrete low levels of both VEGF-A and PIGF suggesting that they are highly dependent on external factors in order to activate VEGF-signaling. In contrast, CRC cells secrete important levels of VEGF-A and/or PIGF, which is particularly marked for the LoVo cells.

Migration and invasion of both ECs and CRC cells can be attenuated by aflibercept

To determine the impact of VEGF-signaling on the migration of EC and CRC cells, aflibercept was added to the growth media. Aflibercept is a chimeric protein that specifically binds and neutralizes the VEGFR1 ligands VEGF-A, VEGF-B and PIGF ([Papadopoulos et al., 2012](#)) and is approved for treatment of patients with metastatic CRC. The results ([Table 1](#)) show that aflibercept (50 µg/ml) is able to inhibit the migration of both ECs and CRC cells at a clinically relevant dose. Unexpectedly, the effect on the CRC cells was more important than for the ECs. In contrast, there was little difference between the different types of ECs as well as between the three types of CRC cells. Similar findings were observed for the influence of aflibercept on invasion.

To determine if the attenuation of migration and invasion might be due to a potential cytotoxic or cytostatic activity rather than to a direct effect on the motility, the influence of aflibercept on the different cell lines was determined by the MTT viability test after 5 days continuous exposure (50 µg/ml). The results ([Supplementary data 1](#)) are expressed as % viability of each cell line in the presence of aflibercept compared to the viability of the corresponding cells grown in drug-free media. The results clearly show

that aflibercept has no detectable influence on the growth or viability of neither ECs nor CRC cells under standard culture conditions.

Discussion

Tumor progression is closely associated with increased motility of both endothelial and tumor cells. The recent literature has focused on the role of the mesenchymal phenotype in cellular movement. Specifically, a flat or spindle-shaped mesenchymal morphology is considered as an indication of a strong migratory phenotype, whereas a more epithelial morphology characterized by round cells that are closely attached to each other are less motile. Whereas this paradigm was correct for the three ECs as well for the HCT-116 CRC cells, the epithelial-like SW480 and LoVo cells still showed substantial motility. The most likely explanation is that SW480 and LoVo cells do not move as single cells but rather in collective migration that is movement of cellular cohorts with the preservation of cell-cell junctions ([Kramer et al., 2013](#)).

Endothelial cells and the microvascular HMEC cells in particular, were much more migratory and invasive compared to the CRC cells with up to 30x differences between the two cell types. Interestingly, the fraction of migrating cells with invasive potential (compare Figures 2 and Figure 3) was also the highest for HMECs (80%) while the corresponding values were 57% and 58% for HUVECs and HCAECs, respectively. In comparison, the fraction of migrating cells that was also invasive was

12%, 39% and 64% for HCT-116, SW480 and LoVo cells. Therefore, a strong migratory potential might not necessarily be associated with invasiveness. Interestingly, both migration and invasion of the ECs was strongly serum-dependent indicating that the motility of ECs is tightly

controlled by external factors. In comparison, the motility of at least some tumor cells, like SW480, may in part be autonomous.

The three types of ECs expressed comparable levels of VEGFR1 as well as of VEGFR2 and high levels of the co-receptor neuropilin 1. In comparison, the CRC cells express variable levels of VEGFR1 and low levels of both VEGFR2 and neuropilin-1. Traditionally, VEGFR2 has been considered as more important for tumor development than VEGFR1 which has motivated the development of the VEGFR2-targeted antibody ramucirumab ([Clarke and Hurwitz 2013](#)). However, this paradigm is currently being challenged ([Lacala and Grazianib, 2018](#); [Ceci et al., 2020](#)). VEGFR1 is expressed by a wide range of tumor cells including, but not limited to, CRC, gastric, breast and lung cancer, myeloma and acute myeloid leukemia ([Bates et al., 2003](#); [Fan et al, 2005](#), [Zhang et al., 2002](#); [Wu et al., 2006](#); [Lee et al., 2007](#); [Roybal et al., 2011](#), [Kumar et al., 2003](#) [Pillozzital., 2007](#)) where VEGFR1-mediated signaling promotes tumor motility and/or viability. VEGFR1 expression is also associated with mobilization of myeloid progenitors and tumor infiltration by VEGFR1-expressing M2 macrophages. This inflammatory environment promotes tumor cell proliferation, stimulates angiogenesis and inhibits the recruitment of anti-tumor T cells via production of a wide range of cytokines chemokines and proteases. ([Shibuya 2006](#); [Kerber et al., 2008](#); [Wedell et al., 2018](#)).

Even in endothelial cells, the respective roles of VEGFR1 and VEGFR2 might be less straight-forward than initially thought. In endothelial cells, VEGFR2 is believed to be a positive regulator while VEGFR1 a negative regulator of angiogenesis. However, the actual situation might be more complex. In particular, high VEGFR1 expression in the endothelial cells of tumors from CRC patients has been associated with bad prognosis in at least two studies. The first study reported that high expression of

VEGFR1, but not of VEGFR2 or VEGFR3, in the tumor cells and blood vessels of patients with StageII/III disease was correlated with shorter post-operative survival ([Okita et al., 2009](#)). A more recent study reported that high expression of VEGFR1 in the endothelial cells in the tumors of CRC patients was an independent prognostic factor for overall survival. Furthermore, high VEGFR1 and low VEGFR2 expression was a negative prognostic marker for both metastasis-free survival and overall survival ([D'Haene et al., 2018](#)). These clinical data are clearly in odds with the suggested role of VEGFR1 as a negative regulator of angiogenesis and suggest that VEGFR1-expression in tumor-associated ECs serve as a positive regulator of angiogenesis.

With respect to VEGF ligands, all three endothelial cell lines secreted low levels of VEGF-A, while VEGF-A secretion could reach very high levels for the CRC cells, as illustrated for the LoVo cells. Interestingly, the expression of PlGF was high for the HUVECs and HCAECs but low for the HMECs. This is not limited to the HMEC cellular model of microvascular cells used in the present study since similar findings have been reported for primary cultures of microvascular cells ([Xiang et al., 2014](#)).

Aflibercept is a chimeric protein that specifically binds the VEGF ligands VEGF-A, VEGF-B and PlGF ([Papadopoulos et al., 2012](#)). Aflibercept inhibited both CRC cell migration and invasion more potently than was the case for the ECs. More surprising, our results showed that the three types of endothelial cells were inhibited to the same extent by aflibercept. However, it should be born in mind that these experiments were carried out under standard cell culture conditions where neither oxygen nor nutrients are in short supply. This would not be the case within the tumor environment which is often hypoxic and with limited nutrient supply. The HMEC cells secrete low levels of both VEGF-A and PlGF and are therefore expected to be highly dependent of external factors provided

by the tumor environment. We speculate that this might make them more sensitive to depletion of VEGF-A and PlGF *in vivo* compared to HUVECs and HCAECs that secrete substantial levels of PlGF.

Taken together, we here show that ECs display a much higher migratory and invasive potential than CRC cells but are more dependent on external factors. Interestingly, the angiogenesis inhibitor aflibercept was a more potent inhibitor of migration and invasion for CRC cells than for ECs. The result presented here suggest that aflibercept has at least two types of anti-invasive activity, one mediated through inhibition of the tumor associated endothelial cells and the other mediated via a direct effect on the tumor cells.

Acknowledgements

The authors would like to acknowledge Fanis Choulis from Leo Pharma Greece, for precious support of the project and Emmanuelle Dochy, Marika Crohns and Christine Geffriaud-Ricouard from Sanofi-Aventis Europe for stimulating and fruitful discussions.

Funding

This work was financed in part by research funding to AKL from Sanofi-Aventis. ST was supported by an unrestricted research grant from Leo Pharma, Greece and by the RSFN association, France.

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.

Availability of data and materials

Not applicable

Authors' contributions

ST: Investigation, Methodology, Writing of original drafts, Review and editing. GTG: Funding acquisition, Writing-review and editing. PvD; Writing-review and editing. AKL: Conceptualization, Funding acquisition, Supervision, Data analysis, Writing of original drafts, Writing-review and editing.

Ethics approval and consent to participate

Not applicable

Patient consent for publication

Not applicable

Competing interests

The authors declare no competing interest.

References

Ades EW, Candal FJ, Swerlick RA, George VG, Summers S, Bosse DC, Lawley TJ. HMEC-1: establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line. *J Invest Dermatol*. 1992 Dec;99(6):683-90. doi: 10.1111/1523-1747.ep12613748. PMID: 1361507.

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. doi: 10.1038/nm884. PMID: 12796773.

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. doi: 10.1016/j.cub.2003.09.002. PMID: 14521839.

Bouygues A, Thouroude S, Gerotziafas GT, Larsen AK. Motility of colorectal cancer cells is mediated by VEGFR1 homo-dimers and VEGFR1-VEGFR2 hetero-dimers and can be attenuated by aflibercept. *Biochem Pharmacol* 2021 Under preparation.

Calvani M, Trisciuglio D, Bergamaschi C, Shoemaker RH, Melillo G. Differential involvement of vascular endothelial growth factor in the survival of hypoxic colon cancer cells. *Cancer Res.* 2008 Jan 1;68(1):285-91. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-5564. PMID: 18172321.

Ceci C, Atzori MG, Lacal PM, Graziani G. Role of VEGFs/VEGFR-1 Signaling and its Inhibition in Modulating Tumor Invasion: Experimental Evidence in Different Metastatic Cancer Models. *Int J Mol Sci.* 2020 Feb 18;21(4):1388. doi: 10.3390/ijms21041388. PMID: 32085654; PMCID: PMC7073125.

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. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-13-0753. Epub 2014 Mar 31. PMID: 24688047.

Clarke JM, Hurwitz HI. Targeted inhibition of VEGF receptor 2: an update on ramucirumab. *Expert Opin Biol Ther.* 2013 Aug;13(8):1187-96. doi: 10.1517/14712598.2013.810717. Epub 2013 Jun 26. PMID: 23803182; PMCID: PMC4131847.

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. doi: 10.1038/ncomms1977. PMID: 22828632.

D'Haene N, Koopmansch C, Van Eycke YR, Hulet F, Allard J, Bouri S, Rorive S, Remmelink M, Decaestecker C, Maris C, Salmon I. The Prognostic Value of the Combination of Low VEGFR-1 and High VEGFR-2 Expression in Endothelial Cells of Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci.* 2018 Nov 9;19(11):3536. doi: 10.3390/ijms19113536. PMID: 30423986; PMCID: PMC6274874.

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. doi: 10.1038/sj.onc.1208246. PMID: 15735759.

Folkman J. Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? *Nat Rev Drug Discov.* 2007 Apr;6(4):273-86. doi: 10.1038/nrd2115. PMID: 17396134.

Giatromanolaki A, Koukourakis MI, Sivridis E, Chlouverakis G, Vourvouhaki E, Turley H, Harris AL, Gatter KC. Activated VEGFR2/KDR pathway in tumour cells and tumour associated vessels of colorectal cancer. *Eur J Clin Invest.* 2007 Nov;37(11):878-86. doi: 10.1111/j.1365-2362.2007.01866.x. Epub 2007 Sep 20. PMID: 17883421.

Imoukhuede PI, Popel AS. Quantification and cell-to-cell variation of vascular endothelial growth factor receptors. *Exp Cell Res.* 2011 Apr 15;317(7):955-65. doi: 10.1016/j.yexcr.2010.12.014. Epub 2010 Dec 23. PMID: 21185287; PMCID: PMC3073416.

Kerber M, Reiss Y, Wickersheim A, Jugold M, Kiessling F, Heil M, Tchaikovski V, Waltenberger J, Shibuya M, Plate KH, Machein MR. Flt-1 signaling in macrophages promotes glioma growth in vivo. *Cancer Res.* 2008 Sep 15;68(18):7342-51. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-6241. PMID: 18794121.

Koch S, Tugues S, Li X, Gualandi L, Claesson-Welsh L. Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Biochem J.* 2011 Jul 15;437(2):169-83. doi: 10.1042/BJ20110301. PMID: 21711246.
Review

Kramer N, Walzl A, Unger C, Rosner M, Krupitza G, Hengstschläger M, Dolznig H. In vitro cell migration and invasion assays. *Mutat Res.* 2013

Jan-Mar;752(1):10-24. doi: 10.1016/j.mrrev.2012.08.001. Epub 2012 Aug 23. PMID: 22940039.

Kumar S, Witzig TE, Timm M, Haug J, Wellik L, Fonseca R, Greipp PR, Rajkumar SV. Expression of VEGF and its receptors by myeloma cells. *Leukemia*. 2003 Oct;17(10):2025-31. doi: 10.1038/sj.leu.2403084. PMID: 14513053.

Lacal PM, Graziani G. Therapeutic implication of vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1) targeting in cancer cells and tumor microenvironment by competitive and non-competitive inhibitors. *Pharmacol Res*. 2018 Oct;136:97-107. doi: 10.1016/j.phrs.2018.08.023. Epub 2018 Aug 28. PMID: 30170190.

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. doi: 10.1016/j.pharmthera.2011.03.012. Epub 2011 Mar 23. PMID: 21439312.

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

Lee TH, Seng S, Sekine M, Hinton C, Fu Y, Avraham HK, Avraham S. Vascular endothelial growth factor mediates intracrine survival in human breast carcinoma cells through internally expressed VEGFR1/FLT1. *PLoS Med*. 2007 Jun;4(6):e186. doi: 10.1371/journal.pmed.0040186. PMID: 17550303; PMCID: PMC1885450.

Lesslie DP, Summy JM, Parikh NU, Fan F, Trevino JG, Sawyer TK, Metcalf CA, Shakespeare WC, Hicklin DJ, Ellis LM, Gallick GE. Vascular endothelial growth factor receptor-1 mediates migration of human colorectal carcinoma cells by activation of Src family kinases. *Br J Cancer*. 2006 Jun 5;94(11):1710-7. doi: 10.1038/sj.bjc.6603143. PMID: 16685275; PMCID: PMC2361330.

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. doi: 10.18632/oncotarget.1671. PMID: 25015210; PMCID: PMC4148093.

Mésange P, Bouygues A, Ferrand N, Sabbah M, Escargueil AE, Savina A, Chibaudel B, Tournigand C, André T, de Gramont A, Larsen AK. Combinations of Bevacizumab and Erlotinib Show Activity in Colorectal Cancer Independent of *RAS* Status. *Clin Cancer Res*. 2018 Jun 1;24(11):2548-2558. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-17-3187. Epub 2018 Feb 28. PMID: 29490990.

Mulkeen AL, Silva T, Yoo PS, Schmitz JC, Uchio E, Chu E, Cha C. Short interfering RNA-mediated gene silencing of vascular endothelial growth factor: effects on cellular proliferation in colon cancer cells. *Arch Surg*. 2006 Apr;141(4):367-74; discussion 374. doi: 10.1001/archsurg.141.4.367. PMID: 16618894.

Naik S, Dothager RS, Marasa J, Lewis CL, Piwnica-Worms D. Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 Is Synthetic Lethal to Aberrant {beta}-Catenin Activation in Colon Cancer. *Clin Cancer Res*. 2009; 15: 7529-7537.

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. doi: 10.1093/jjco/hyp066. Epub 2009 Jun 17. PMID: 19535387.

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. doi: 10.1007/s10456-011-9249-6. PMID: 22302382; PMCID: PMC3338918.

Pillozzi S, Brizzi MF, Bernabei PA, Bartolozzi B, Caporale R, Basile V, Boddi V, Pegoraro L, Becchetti A, Arcangeli A. VEGFR-1 (FLT-1), beta1 integrin, and hERG K⁺ channel for a macromolecular signaling complex in acute myeloid leukemia: role in cell migration and clinical outcome. *Blood*. 2007 Aug 15;110(4):1238-50. doi: 10.1182/blood-2006-02-003772. Epub 2007 Apr 9. PMID: 17420287.

Roybal JD, Zang Y, Ahn YH, Yang Y, Gibbons DL, Baird BN, Alvarez C, Thilaganathan N, Liu DD, Saintigny P, Heymach JV, Creighton CJ, Kurie JM. miR-200 Inhibits lung adenocarcinoma cell invasion and metastasis by targeting Flt1/VEGFR1. *Mol Cancer Res*. 2011 Jan;9(1):25-35. doi:

10.1158/1541-7786.MCR-10-0497. Epub 2010 Nov 29. PMID: 21115742; PMCID: PMC3232024.

Shibuya M. Vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1/Flt-1): a dual regulator for angiogenesis. *Angiogenesis*. 2006;9(4):225-30; discussion 231. doi: 10.1007/s10456-006-9055-8. Epub 2006 Nov 16. PMID: 17109193.

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. doi: 10.1038/nrm.2016.87. Epub 2016 Jul 27. PMID: 27461391. Review

Soares DG, Escargueil AE, Poindessous V, Sarasin A, de Gramont A, Bonatto D, Henriques JA, Larsen AK. Replication and homologous recombination repair regulate DNA double-strand break formation by the antitumor alkylator ecteinascidin 743. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Aug 7;104(32):13062-7. doi: 10.1073/pnas.0609877104. Epub 2007 Jul 26. PMID: 17656556; PMCID: PMC1941813.

Weddell JC, Chen S, Imoukhuede PI. VEGFR1 promotes cell migration and proliferation through PLCγ and PI3K pathways. *NPJ Syst Biol Appl*. 2017 Dec 19;4:1. doi: 10.1038/s41540-017-0037-9. PMID: 29263797; PMCID: PMC5736688.

Wu Y, Hooper AT, Zhong Z, Witte L, Bohlen P, Rafii S, Hicklin DJ. The vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR-1) supports growth and survival of human breast carcinoma. *Int J Cancer*. 2006 Oct 1;119(7):1519-29. doi: 10.1002/ijc.21865. PMID: 16671089.

Xiang L, Varshney R, Rashdan NA, Shaw JH, Lloyd PG. Placenta growth factor and vascular endothelial growth factor have differential, cell-type specific patterns of expression in vascular cells. *Microcirculation*. 2014 Jul;21(5):368-79. doi: 10.1111/micc.12113. PMID: 24410720; PMCID: PMC4632205.

Zhang H, Wu J, Meng L, Shou CC. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors KDR and Flt-1 in gastric cancer cells. *World J Gastroenterol*. 2002 Dec;8(6):994-8. doi: 10.3748/wjg.v8.i6.994. PMID: 12439912; PMCID: PMC4656405.

Table and Figure legends.

Table 1. The influence of aflibercept on the migration and invasion of ECs and CRC cells. The % indicates the inhibition of cellular viability in the presence of aflibercept compared to the viability of the corresponding untreated cells.

Figure 1. Morphology of the indicated ECs and CRC cells. Cells were fixed and colored with Phalloidin to visualize actin filaments. Microscopy analyses was performed using a laser-scanning confocal microscope (Leica SP2) at 60x magnification.

Figure 2. The influence of serum on the migration of ECs and CRC cells was determined by the trans-well assay during 24 hrs. Briefly, 50 000 to 250 000 cells in serum-free media were plated in the upper chamber while the lower chamber contained either serum-free media or culture media with fetal calf serum (2% for the ECs, 5% for the CRCs) as chemoattractant. All values are normalized to an initial loading of 250 000 cells. The values represent the averages of 3 independent experiments, each done in duplicate. The bars indicate the mean $\pm$ SD for each cell line under the indicated condition. p-values indicate the difference between the migration in the absence or presence of serum and were calculated using Student's paired *t*-test. *** $p < 0.001$.

Figure 3. The influence of serum on the invasion of ECs and CRC cells was determined by the trans-well assay during 24 hrs. Briefly, the membrane of the upper chamber was overlaid with a thin layer of Matrigel followed by plating of 50 000 to 250 000 cells in serum-free media. The lower chamber contained either serum-free media or culture media with

fetal calf serum (2% for the ECs, 5% for the CRCs) as chemoattractant. All values are normalized to an initial loading of 250 000 cells. The values represent the averages of 3 independent experiments, each done in duplicate. The bars indicate the mean $\pm$ SD for each cell line under the indicated condition. p-values indicate the difference between the invasion in the absence or presence of serum and were calculated using Student's paired *t*-test. *** $p < 0.001$.

Figure 4. Expression of VEGF receptors in ECs and CRC cells. Protein extracts were prepared and the expression of VEGFR1, VEGFR2 and neuropilin1 (NRP1) was determined by ELISA analysis. The values represent the average of 3 independent experiments, each done in duplicate.

Figure 5. Expression of VEGF ligands in ECs and CRC cells. Conditioned media was prepared from cells incubated for 24 hrs in serum-free media followed by determination of the expression of VEGF-A and PlGF by ELISA analysis. The values represent the average of 3 independent experiments, each done in duplicate.

Supplementary data 1. The influence of aflibercept on the viability of ECs and CRCs was determined by the MTT assay after 120 hrs continuous incubation of the respective cells in the absence or presence of aflibercept. The values represent the average of 3 independent experiments, each done in duplicate.

Figure 1. Cell Morphology

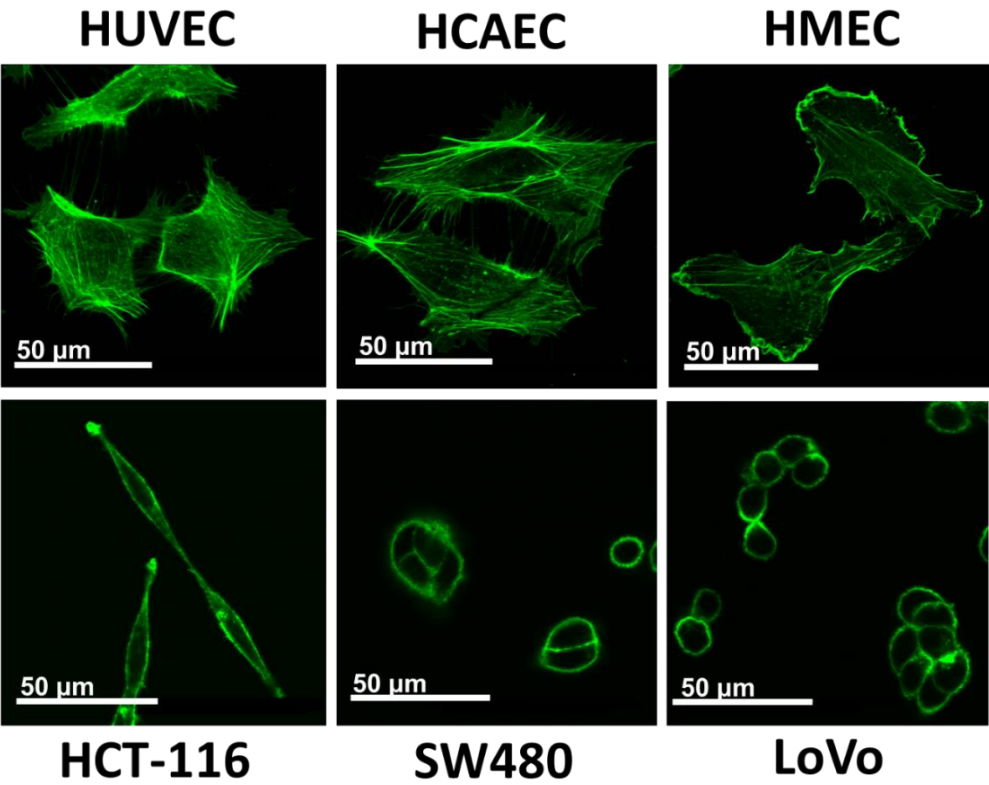


Figure 2. Migration

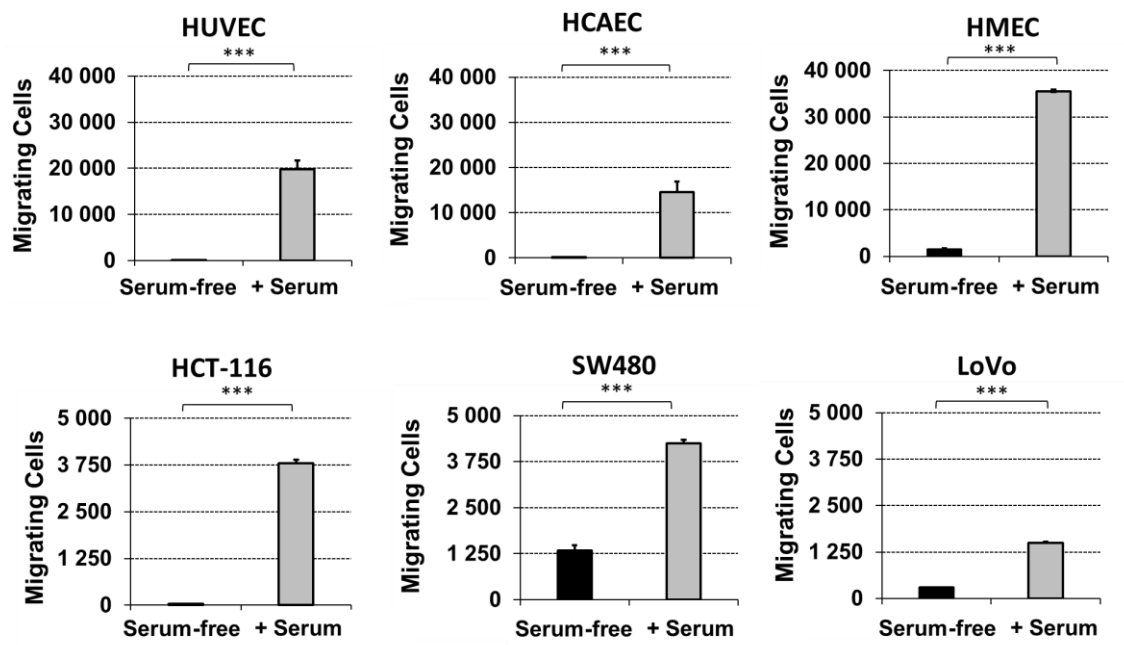


Figure 3. Invasion

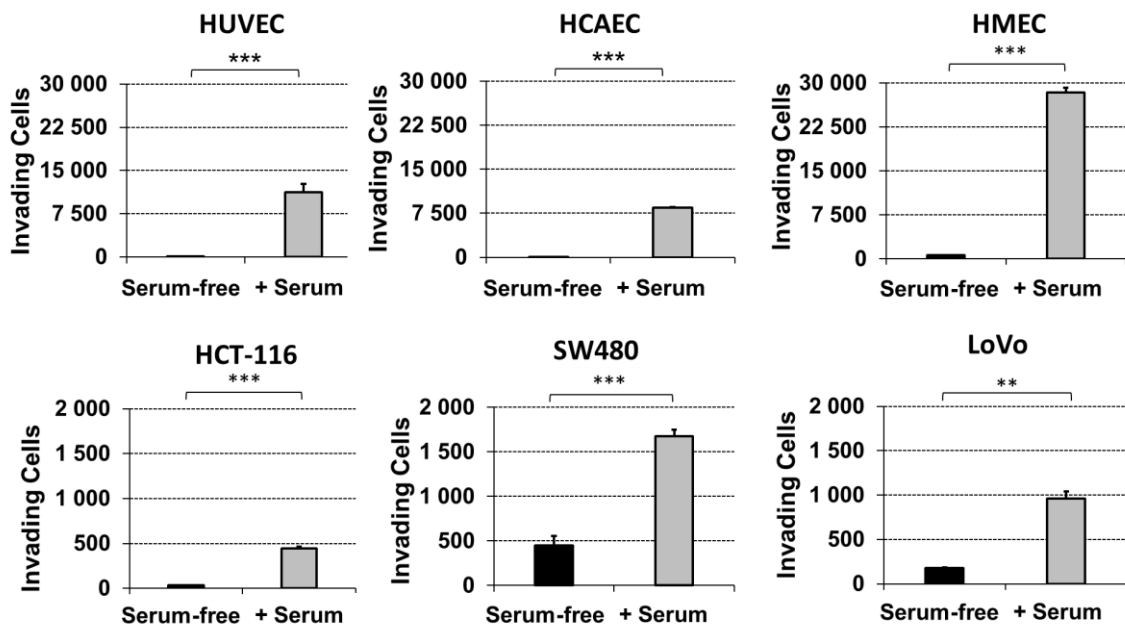


Figure 4. Expression of VEGF receptors

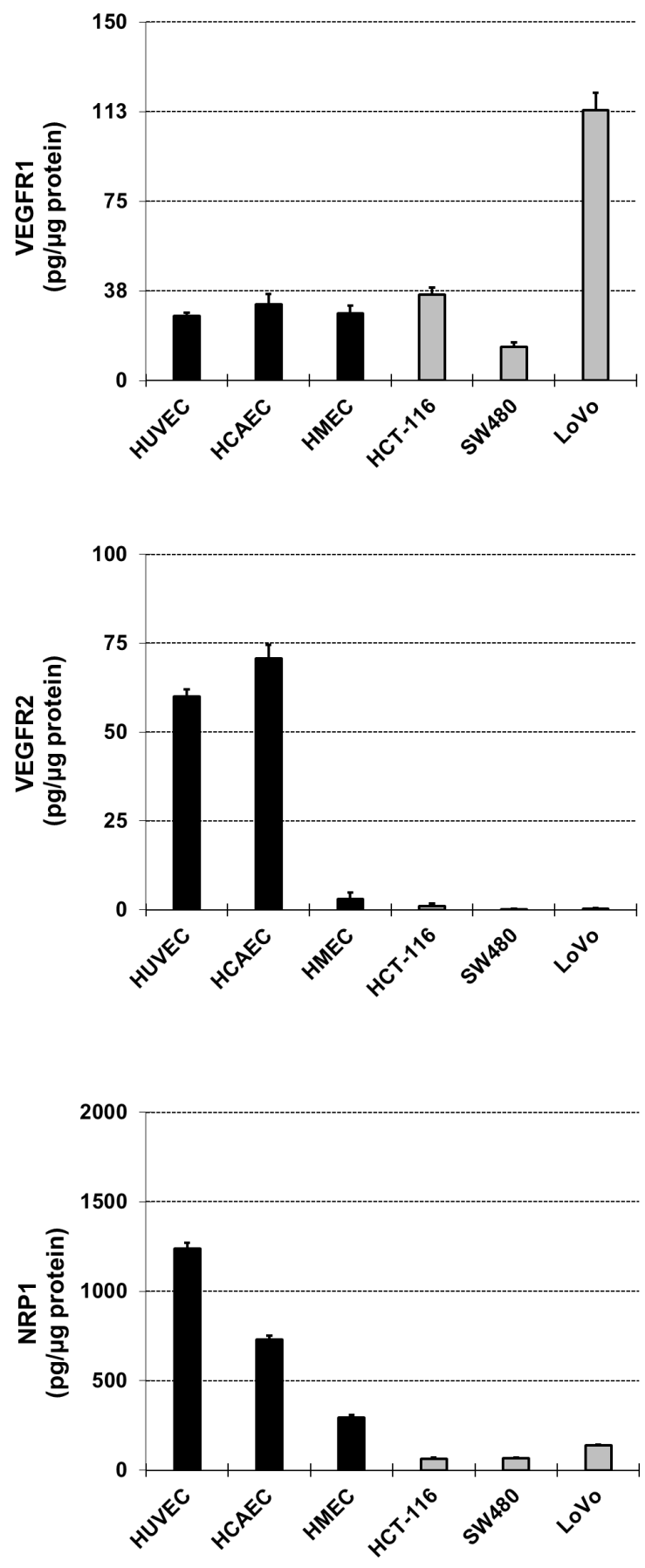


Figure 5. Expression of VEGF ligands

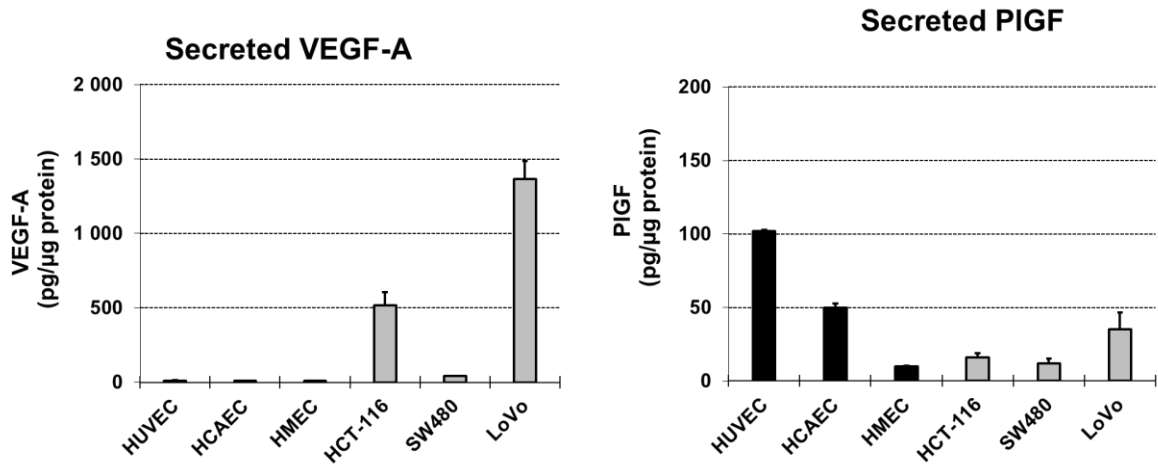
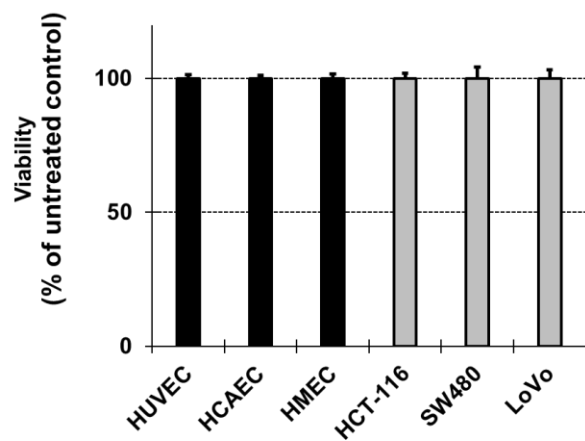


Table 1. Influence of Aflibercept on migration and invasion

	Inhibition of migration (%)	Inhibition of invasion (%)
HUVEC	29 ± 4 (**)	27 ± 4 (**)
HCAEC	27 ± 4 (**)	25 ± 7 (**)
HMEC	27 ± 2 (**)	28 ± 3 (**)
HCT-116	56 ± 2 (***)	54 ± 1 (***)
SW480	51 ± 2 (***)	43 ± 6 (***)
LoVo	50 ± 2 (***)	56 ± 3 (***)

Supplementary data 1. Influence of aflibercept on growth/viability



ARTICLE N°3 :

Prolonged chemotherapeutic stress of colorectal cancer cells is accompanied by altered VEGF-signaling, increased motility and vascular mimicry that can be attenuated by aflibercept

Statut: En attente des possibles suggestions du jury et de la révision de l'article par l'industrie pharmaceutique avant la soumission de l'article.

Journal visé: **Angiogenesis**

Résumé :

Depuis plusieurs années, les traitements chimiothérapeutiques utilisés couramment dans le cancer colorectal sont le 5-Fluorouracile (5FU), l'oxaliplatine (OXA) et l'irinotecan (SN-38).

Nous avons vu dans les travaux précédents l'implication de la signalisation VEGF sur les phénomènes de migration et d'invasion des cellules chimionaires (n'ayant « vu » aucun traitement) tumorales. Nous nous intéressons donc à son influence sur ces mêmes phénomènes « agressifs » mais cette fois-ci sur des cellules dites chimiorésistantes (acquisition d'une résistance au traitement).

Premièrement, nous avons établi trois modèles cellulaires les HCT-116/5FU, les HCT-116/OXA et les HCT-116/SN38, toutes trois issues d'une même lignée parentale HCT-116 lesquelles ont été exposées progressivement aux 3 agents chimiothérapeutiques : le 5FU, l'OXA et le SN-38 respectivement. Suite à cela une chimiorésistance a été acquise chez ces trois types cellulaires. Notre modèle a été confirmé par la méthode de MTT nous permettant de déterminer les IC50.

Nous avons donc observé que l'acquisition de cette chimiorésistance provoque un changement morphologique avec l'apparition d'un phénotype de type mésenchymateux (cellules filiformes avec des extensions d'actines (lamellipodes, filopodes)). Les colonies formées par ces lignées présentent également des cellules non jointives les unes aux autres et très dispersées comparées à celles formées par la lignée parentale.

Ainsi, cela suggère que les lignées chimiorésistantes auraient un potentiel migratif plus important.

Cela a été confirmé par l'étude des phénomènes de migration et d'invasion des cellules chimiorésistantes comparés à la lignée parentale. En effet, les cellules chimiorésistantes migrent jusqu'à 5 fois plus que les cellules parentales. Le potentiel invasif des cellules chimiorésistantes est quant-à lui augmenté jusqu'à 15 fois comparé à la lignée parentale.

Lorsqu'une tumeur solide a atteint 2 à 3mm de diamètre, il lui est nécessaire d'avoir un apport sanguin afin de continuer à croître et avoir la possibilité de se disséminer.

Ainsi, nous avons étudié ici un nouveau concept de vascularisation tumorale : « le mimétisme vasculaire ». Le mimétisme vasculaire reflète la capacité des cellules tumorales à former elles-mêmes un réseau vasculaire sans avoir besoin de recruter les cellules endothéliales environnantes. Nos résultats montrent que deux de nos lignées chimiorésistantes ont acquis cette capacité à former cette structure vasculaire. De plus, le VEGF-A semble influencé de manière positive ce phénomène tandis que le PlGF et le VEGF-B n'ont quant-à eux aucun effet.

Il a été rapporté que dans le cas du CCR, la signalisation VEGF était impliquée dans la motilité des cellules tumorales et dans l'angiogenèse tumorale. Ainsi, nous avons décidé d'étudier la sécrétion des ligands VEGF, ainsi que l'expression des récepteurs au VEGF afin de voir l'effet de l'acquisition de la chimiorésistance sur cette signalisation.

L'expression du VEGFR1 se révèle être différentielle chez les cellules chimiorésistantes (Diminuée chez les HCT-116/OXA et HCT-116/SN38 et augmentée chez les HCT-116/5FU) comparée à la lignée parentale. Il n'y a pas de modification de l'expression du VEGFR2. Quant-au co-récepteur NRP1, l'expression de ce dernier est augmentée dans les trois lignées chimiorésistantes (10 fois plus dans les HCT-116/OXA) comparée à la lignée parentale.

La sécrétion du VEGF-A est quant-à elle largement augmentée dans les trois lignées chimiorésistantes (4 à 7 fois plus) comparée à la lignée parentale. La sécrétion du VEGF-B ne semble pas être influencée par l'acquisition de la chimiorésistance. La sécrétion du PlGF est uniquement augmentée pour la lignée HCT-116/5FU comparée à la lignée parentale. Ainsi l'acquisition de la chimiorésistance semble influencée la signalisation VEGF.

Le facteur tissulaire étant également exprimé par de nombreux types tumoraux, et impliqué dans l'augmentation de l'expression de nombreux facteurs angiogéniques tels que le VEGF-A, nous avons étudié l'influence possible de l'acquisition de la chimiorésistance sur ce facteur. La sécrétion du facteur tissulaire est uniquement augmentée chez les HCT-116/5FU comparée à la lignée parentale. Elle se révèle être diminuée chez les deux autres lignées chimiorésistantes comparée à la lignée parentale.

Ainsi, nous avons cherché à voir si l'altération de la sécrétion du facteur tissulaire jouait un rôle dans l'activité pro-coagulante de ces dernières. Seules les HCT-116/5FU montrent un fort potentiel pro-coagulant surement associée à cette augmentation de la sécrétion du facteur tissulaire.

L'aflibercept est encore ici une potentielle option thérapeutique. Nous avons donc cherché à voir s'il pouvait avoir un effet sur le phénotype agressif acquis par les lignées résistantes. Nos résultats montrent alors que la migration et l'invasion sont diminuées pour toutes nos lignées. Il en est de même pour la capacité à former un réseau vasculaire. En effet, l'aflibercept diminue de manière significative la formation du réseau vasculaire en termes de longueur mais également de jonctions.

Pour conclure, nous montrons ici que l'acquisition d'une chimiorésistance influence la signalisation VEGF et favorise ainsi la progression tumorale en augmentant la motilité des cellules mais également sa capacité à accéder à un apport sanguin suffisant à sa croissance et à sa dissémination. L'aflibercept montre également son potentiel anti-migratif et anti-invasif sur ces lignées chimiorésistantes ainsi que son effet anti-vasculaire sur ce « réseau sanguin » particulier.

PREAMBULE DE L'ARTICLE :

Caractérisation des lignées chimiorésistances HCT-116 (Travaux précédents de l'équipe)

1) Acquisition de la chimiorésistance et marqueur de cellules souches

La plupart des tumeurs solides contiennent une sous-population de cellules qui présentent des similitudes moléculaires et fonctionnelles avec les cellules souches. Ces dernières sont d'ailleurs naturellement chimiorésistantes en raison de l'expression élevée de certains transporteurs, d'un cycle cellulaire lent et de l'activation de diverses voies de signalisation telles que WNT. Une première étude a été de caractériser le lien entre l'acquisition de la chimiorésistance et le caractère « souche » de ces cellules.

Pour cela, une batterie de quatre marqueurs de cellules souches a été utilisée : CD44, CD133, CD166 et Lgr5). Nos résultats ont montré que les trois variantes chimiorésistantes HCT-116/5FU, HCT-116/OXA et HCT-116/SN38 ont perdu l'expression de CD133 notamment. Suggérant ainsi que l'acquisition de la chimiorésistance chez la lignée HCT-116 confère une perte du caractère souche des cellules. De plus, l'activité de l'aldéhyde déshydrogénase (ALDH), considérée également comme un biomarqueur du phénotype des cellules souches et progénitrices, est considérablement diminuée dans les trois cellules chimiorésistantes comparées à la lignée parentale. Cela confirme donc que l'acquisition de la chimiorésistance chez la lignée HCT-116 aurait fait perdre le caractère souche de cette cellule, suggérant ainsi que ces dernières ont subies une différenciation. Nous avons fait l'hypothèse que les HCT-116/5FU, HCT-116/OXA et HCT-116/SN38 ont subi une transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) ²⁵³.

2) Acquisition de la chimiorésistance et EMT

La transition épithélio-mésenchymateuse est un mécanisme de transdifférenciation transitoire et réversible permettant de convertir des cellules épithéliales en cellules mésenchymateuses.

De récentes données établissent une forte corrélation entre la plasticité octroyée par la EMT et l'acquisition d'une chimiorésistance.

Une seconde étude au sein de notre équipe a été réalisée afin d'étudier le lien possible entre la EMT et l'acquisition d'une chimiorésistance dans la lignée HCT-116.

Dans cette étude (en cours de publication), nous observons un switch au niveau des marqueurs épithéliaux et mésenchymateux. En effet, les cellules chimiorésistantes expriment davantage de marqueurs mésenchymateux (vimentine, N-cadhérine, Fibronectine...) et moins de marqueurs épithéliaux (E-cadhérine, Snail, Twist...) contrairement à la lignée parentale. Preuve indéniable de la réalisation d'une transition épithélio-mésenchymateuse associée à l'acquisition de la chimiorésistance.

3) Acquisition de la chimiorésistance et transporteurs de la famille ABC

Il est connu qu'il existe un lien entre le développement d'une chimiorésistance et l'expression de transporteurs ABC. De plus, l'induction d'une EMT conduit également à un gain d'expression de divers transporteurs de cette famille.

Des travaux précédents au sein de l'équipe ont permis de caractériser les cellules chimiorésistantes HCT-116/5FU, HCT-116/OXA et HCT-116/SN38 d'un point de vue de l'expression de ce type de transporteur. On met en évidence une implication des transporteurs ABC par l'utilisation d'un inhibiteur spécifique : le vérapamil. En effet, suite à l'utilisation du vérapamil, on observe une diminution de la capacité des trois variants chimiorésistants à extruder un colorant initialement injecté (Hoechst). L'expression des différents types de récepteurs ABC a ensuite été étudiée. Nous révélons une augmentation de l'expression des transporteurs de médicaments ABCB1, ABCG2 et ABCC1 chez les HCT-116/OXA et HCT-116/SN38. Tandis que les HCT-116/5FU surexpiment uniquement l'ABCB1 ²⁵³.

Prolonged chemotherapeutic stress of colorectal cancer cells is accompanied by altered VEGF-signaling, increased motility and vascular mimicry that can be attenuated by aflibercept

Sandrine Thouroude^{1,2,3}, Michèle Sabbah^{1,2,3,4}, Patrick van Dreden⁵, Grigoris T. Gerotziafas^{1,2,3,6}, Annette K. Larsen^{1,2,3,4}

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

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

³Institut Universitaire de Cancérologie (IUC), Faculté de Médecine, Sorbonne Université, Paris 75005, France

⁴Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Paris 75016, Paris

⁵Clinical Research Department, Diagnostica Stago, Gennevilliers 92230, France

⁶Service d'Hématologie Biologique, Hôpital Tenon and Department of Hematology and Cell Therapy, Hôpital Saint Antoine. Assistance Publique Hôpitaux de Paris (APHP), Paris, France

Keywords: chemotherapy, colorectal cancer, VEGF signaling, migration, invasion, vascular mimicry, aflibercept

Correspondence to: Dr. Annette K. Larsen, Cancer Biology and Therapeutics, Kourilsky Research Building 1st floor, Hôpital Saint-Antoine, 184 rue du Faubourg Saint-Antoine, 75571 PARIS Cedex 12 France.

E-mail: annettelarsen004@gmail.com; annette.larsen@sorbonne-universite.fr

Abstract

Colorectal cancer (CRC) cells secrete the majority of the VEGF in the tumor environment and display functional VEGF receptors thereby promoting both autocrine and paracrine VEGF-signaling. The most common chemotherapeutic agents for treatment of CRC, 5-fluorouracil, oxaliplatin and irinotecan have all been reported to interfere with VEGF signaling when given as a single dose. To determine the influence of prolonged drug exposure on VEGF-signaling, we here characterize three CRC cell lines, HCT-116/5-FU, HCT-116/Oxa and HCT-116/SN38, with stable resistance to each of these drugs in comparison with the parental HCT-116 cells. Resistant cells secreted markedly higher levels of VEGF-A and for HCT-116/5-FU, placental growth factor (PlGF) as well. Neuropilin1 expression was increased for all cell lines, in particular for the oxaliplatin-resistant HCT-116/Oxa cells where the expression had increased 10-fold. The upregulation of VEGF-signaling was accompanied by increased migration and invasion and could be attenuated by VEGF-targeting with the angiogenesis inhibitor aflibercept. Two of the three resistant cell lines, HCT-116/5-FU and HCT-116/Oxa, were able to form cellular networks, the first step in vascular (vasculogenic) mimicry (VM). The formation of VM cellular network was stimulated in the presence of VEGF-A and attenuated by aflibercept clearly indicating the implication of VEGF-signaling in this process. Taken together, our results show that prolonged exposure to clinically used chemotherapeutic agents interferes with VEGF-signaling and can promote tumor progression. The results further indicate that aflibercept possess direct anti-invasive activity toward CRC cells via different mechanisms in addition to its well-established anti-vascular effects.

Introduction

Development and characterization of cancer cells with acquired drug resistance has proven a powerful tool not only to identify mechanisms associated with resistance and sensitivity to the drug of interest, but also to clarify the link between a given anticancer agent and seemingly unrelated cellular signaling pathways. 5-fluorouracil (5-FU), oxaliplatin and irinotecan are the most common chemotherapeutic agents used for treatment of patients with colorectal cancer (CRC). While all three agents target nuclear DNA, they do so with different mechanisms of action. 5-FU is an antimetabolite that is incorporated into DNA, thereby interfering with normal DNA and RNA synthesis ([Longley et al., 2003](#)). Oxaliplatin forms covalent DNA adduct that deforms local DNA structure ([Culy et al., 2000](#)) while irinotecan promotes formation of covalent topoisomerase I-DNA complexes that can be converted into single-and double DNA strand breaks ([Larsen and Gobert, 1999](#)). In addition, exposure to oxaliplatin is accompanied by oxidative stress as witnessed by formation of active oxygen and nitrogen species ([McQuade et al., 2016](#)).

Interestingly, all three agents have been reported to interfere with the vascular endothelial growth factor- (VEGF) signaling pathway. This signaling pathway is triggered by binding of VEGF ligands (VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D or placental growth factor (PlGF)) to their receptors (VEGFR1/Flt1, VEGFR2/Flk1/KDR and VEGFR3/Flt4) while the neuropilins (NRP1 and NRP2) serve as co-receptors ([Koch et al., 2011](#); [Simons et al., 2016](#)). Most, if not all, CRC cells, xenografts and patient tumors express functional, phosphorylated VEGFR1 ([Bates et al., 2003](#); [Fan et al., 2005](#); [Okita et al., 2009](#); [Naik et al., 2009](#); [Mésange et al., 2014](#); [Mésange et al., 2018](#)) and, to a lesser degree, VEGFR2 ([Mulkeen et al., 2006](#); [Giatromanolaki et al., 2007](#); [Calvani et al., 2008](#); [Mésange et al.,](#)

2014; Mésange et al., 2018). Importantly, high expression of VEGFR1 by the tumor cells and their associated microvasculature has been correlated with bad prognosis of CRC patients in several clinical studies, with respect to both progression-free and overall survival (Okita et al., 2009; D'Haene et al., 2018).

The chemotherapeutic agents used for treatment of CRC patients have differential effects on VEGF-signaling. Acute exposure of CRC cells to oxaliplatin was accompanied by stimulation of VEGF-signaling as witnessed by increased expression of VEGF-A, VEGF-C, PlGF, VEGFR1 and neuropilin1 (Fan et al., 2008). In contrast, high-throughput screening of a large chemical library revealed that cellular exposure to topotecan and other camptothecins (like irinotecan and SN38) was associated with downregulation of the master hypoxia transcriptional regulator HIF-1 and its target genes including VEGF-A (Rapisarda et al., 2002). In agreement, irinotecan treatment of mice bearing different patient-derived colon xenografts revealed that strong antitumor activity was closely associated with downregulation of VEGF-A and other HIF-1 target genes and decreased tumor angiogenesis (Guérin et al., 2012). Topotecan treatment of cancer patients was also associated with attenuation of tumor-associated HIF-1 and was accompanied by decreased VEGF-A levels (Kummar et al., 2011).

There are contradictory reports concerning 5-FU. Acute exposure of CRC cells to 5-FU had no detectable influence on VEGF-signaling (Fan et al., 2008). Similar results were found in patients after a single bolus injection of 5-FU (Hoyama et al., 2015). In contrast, continuous exposure to low levels of 5-FU has been associated with increased angiogenesis in a rat model (Albertsson et al., 2009).

We have developed and characterized three independent cellular CRC models, that show stable resistance to 5-FU, SN-38 (the active

metabolite of irinotecan) and oxaliplatin, respectively ([Soares et al., 2011](#); [Petitprez et al., 2013](#); [Petitprez and Larsen, 2013](#); [Ayadi et al., 2015](#)). In the current work we characterize the molecular and functional features of VEGF-signaling in these CRC models in order to clarify the long-term molecular and functional effects of the indicated drugs. In addition, we determined the influence of aflibercept, a clinically used angiogenesis inhibitor that specifically binds all three VEGFR1 ligands, VEGF-A, VEGF-B and PlGF ([Papadopoulos et al., 2012](#)).

The results show that acquired chemo-resistance was accompanied by significant alterations of the VEGF signaling cascade, markedly increased motility and, for two of the three resistant cells, the capacity to form cellular networks, the first step of vascular (vasculogenic) mimicry. Importantly, aflibercept was able to attenuate migration, invasion and vasculogenic mimicry in all cell lines, clearly indicating the importance of VEGF-signaling for these functions. The results further indicate that the aflibercept possess direct anti-invasive activity toward tumor cells via different mechanisms in addition to its well-established anti-vascular effects.

Materials and methods

Drugs

5-Fluorouracil (5-FU), Oxaliplatin and SN-38 were obtained from Teva-Pharma, Sanofi-Synthelabo or Selleckchem, respectively. Aflibercept (Zaltrap) was provided by Sanofi-Aventis.

Plasma

Samples of normal platelet poor plasma (PPP) for thrombin generation experiments were purchased from Stago (Ref 00539) in compliance with Helsinki Declaration.

Cell culture

The parental HCT-116 cells were a kind gift from Bert Vogelstein (John Hopkins, Baltimore, MD). The resistant cells were obtained by exposing the parental cells to increasing doses of 5-FU, oxaliplatin or SN-38 (the active metabolite of irinotecan) in the culture media as described in detail elsewhere ([Soares et al., 2011](#); [Petitprez et al., 2013](#); [Petitprez and Larsen, 2013](#); [Ayadi et al., 2015](#)). Cells were maintained in McCoy's A (Gibco) media supplemented with 5% fetal calf serum and 1% penicillin/streptomycin (PAA). To maintain the resistant phenotype, the three resistant sublines were passaged once every three weeks in the presence of drug at their respective IC₅₀ dose followed by at least one week post-incubation in drug-free media before experimental use. Cells were monitored for mycoplasma contamination using the "MycoAlert™" mycoplasma detection kit (Lonza) and the cells were replaced after 3 months in culture.

HUVECs (human umbilical vein endothelial cells) were kindly provided by Xavier Houard (Saint-Antoine Research Center, Paris,

France) while HMEC-1 (human microvascular endothelial cells) were a generous gift from Karim Fallague (the Vascular Research Center, Marseille, France). The endothelial cells were maintained as follows: *MCDB-131* (Gibco) for HMEC-1 and Endothelial Cells Growth Medium (Promocell) for HUVEC supplemented with 2% fetal calf serum and 1% penicillin/streptomycin. The HUVECs were used between passage 5 and 8 while the HMEC-1 cells were replaced after 3 months in culture.

ELISA kits

The following ELISA kits were all obtained from R&D System. Quantikine ELISA kits were used to determine the expression of VEGFR1 (DVR100C), VEGFR2 (DVR200), Neuropilin1 (DNRP10), VEGF-A (DVE00), placental growth factor (PIGF, DPG00) and tissue factor (TF, DCF300). The ELISA kit for VEGF-B was from Raybio (#ELH-VEGFB-1).

Cellular morphology

Cells (250 000) were seeded on glass coverslips (18 mm) and allowed to attach for 24 hours, followed by fixation with 4% paraformaldehyde (PFA) for 20 minutes. Samples were then saturated in PBS containing 1% bovine serum albumin and 0.2% gelatin followed by incubation with Alexa Fluor 488 Phalloidin (Invitrogen) to visualize the actin filaments. Microscopy analyses was performed using a laser-scanning confocal microscope (Leica SP2) at 60x magnification

Clonal morphology

To observe cellular migration over a prolonged time period, 500 cells were plated in petri dishes (60 mm diameter) for 10 days and the resulting clones observed under an optical microscope (EVOS M5000) at 10x

magnification. A clone is defined as a colony that originates from a single cell and contains at least 50 cells.

Migration and invasion assays

Cell migration was assessed by the trans-well (Boyden chamber) assay according to the manufacturer's instructions. Briefly, 50 000 to 250 000 cells in serum-free media were plated in the upper chamber on membranes with a pore size of 8 μ m while the lower chamber contained either serum-free media or culture media with fetal calf serum (5%) as chemoattractant. Alternatively, cells in serum-free media with or without aflibercept (50 μ g/ml) were plated in the upper chamber while the lower chamber contained cell culture media with fetal calf serum (5%) as chemoattractant. After 24 hours, 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. Invasion assays were carried out the same way except that the membrane of the upper chamber was overlaid with a thin layer of Matrigel (growth-factor reduced basement membrane matrix, Corning #356231). Results are expressed as means $\pm$ standard deviation (SD) and represent triplicate samples from at least three independent experiments. All results have been normalized to an initial loading of 250 000 cells.

Expression of VEGF receptors

To characterize the expression of VEGF receptors, protein extracts were prepared in RIPA buffer according to the manufacturer's instructions and the presence of VEGFR1, VEGFR2 and neuropilin1 (NRP1) was determined by ELISA analysis as described previously ([Mésange et al.](#),

2018). The values represent the average of 3 independent experiments, each done in duplicate.

Secretion of tissue factor and VEGF ligands

The secretion of VEGF ligands was determined with conditioned media. Cells were grown in serum-free media for 24 hours, followed by collection of the conditioned media and centrifugation to remove cellular debris. The secretion of VEGF-A, PlGF or TF was then determined by ELISA analysis with dedicated kits. The values represent the average of 3 independent experiments, each done in duplicate.

Cellular viability

Cellular viability was determined by the MTT (methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide) viability assay after 120 hours continuous incubation in the absence or presence of aflibercept (50 µg/ml) as described previously (Soares et al., 2007). All values are averages of at least three independent experiments each done in duplicate.

Thrombin Generation Assay

In each well of a micro-plate, 80 µl of platelet poor plasma (PPP) samples were mixed with saline (20 µl). Thrombin generation was initiated by adding 20 µl of triggering solution containing CaCl₂ (16.7 mM final concentration) and fluorogenic substrate (Z-Gly-Gly-Arg-AMC, 417 µM final concentration). Thrombin generation was assessed with the Calibrated Automated Thrombogram assay (Thrombinoscope b.v.) as described elsewhere (Gerotziafas et al., 2005; AmraneDjedidi et al., 2020). The thrombogram parameters analyzed included lag-time, the time to Peak (ttPeak) and the Peak.

Dye Coloration

The cell membranes of living cells were stained with vital dyes. The endothelial cells were stained in red with a Red fluorescent cell linker minikit (PKH26GL-1KT, Merck) while tumor cells were stained in green with a Green fluorescent cell linker minikit (PKH67FL-1KT, Merck). Staining was carried out for 15 min according to the manufacturer's instructions.

Vascular mimicry

The first step in vascular (vasculogenic) mimicry is the formation of cellular networks on 3-D gels. To characterize the formation of cellular networks, microslides for angiogenesis (Ibidi, ref 81501) were coated with growth factor-depleted Matrigel (BD Biosciences), and allowed to polymerase for 30 min at 37 °C. Cells were seeded in triplicate (25 000 cells/well) in their respective growth media in the presence of 2% calf serum for the endothelial cells and 5% serum for the tumor cells. Cells were placed in the “cellVivo incubation system” and maintained for 24 hours at 37 °C in the presence of 5 or 10% CO₂. Photos were taken every 30 min for 24 hours on an Olympus IX73 Inverted Microscope (Olympus, Japan), and analyzed on Fiji with the **Angiogenesis Analyzer** as previously described ([Schindelin et al., 2012](#)).

For experiments with individual VEGF ligands, cells were incubated with their respective serum-containing media in the absence or presence of VEGF-A (10 ng/ml), VEGF-B or PlGF (all at 50 ng/ml) for 24 hours as described above. For the experiments with aflibercept, cells were incubated with their respective serum-containing media in the absence or presence of aflibercept (50 µg/ml) for 24 hours and analyzed as described above.

Statistical analysis

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

Results

Morphology

Cellular morphology is indicative of the migratory potential. To characterize the cellular morphology, parental and drug-resistant cells were colored with phalloidin (in green) that specifically binds to filamentous actin. The results show that both parental and resistant cells exhibit a flat morphology with prominent lamellapodia and filopodia, characteristic of a migratory phenotype (**Figure 1A**)

To observed cell-cell organization over a prolonged period of time, cells were plated at low density and the resulting clones observed after 10 days (**Figure 1B**). Colonies from the parental HCT-116 cells formed irregular compact clones. In clear contrast, the clones of all three resistant sublines were widely spread out with limited cell-cell contact. Taken together, these results suggest that the resistant cell lines have become more motile compared to the parental cells.

Resistant cells show increased motility and invasion

We then characterized the migration and invasion of parental and resistant cells. The migration was studied by the trans-well (Boyden chamber) assay in the presence of serum (5%) in the lower well as chemoattractant. All sublines displayed a significant higher migratory potential compared to

the parental cells, ranging from 4-times more for HCT-116/5-FU, 5-times more for HCT-116/Oxa and 3-times more for HCT-116/SN-38 (Figure 2A).

The invasive capacity of parental and resistant cells was compared using a modified Boyden chamber where the porous filter in the top chamber is overlaid with a thin layer of extracellular matrix before the cells are seeded. All sublines were more invasive than the parental cells ranging from 15-times more for HCT-116/5-FU, 14-times more for HCT-116/Oxa and 6-fold more for HCT-116/SN38 (Figure 2B).

The expression of VEGF receptors differs between parental and resistant cells

The expression of VEGFR1, VEGFR2 and NRP1 was determined by ELISA analysis of cellular lysates. The results (Figure 3) show that the expression of VEGFR1 was different in drug-resistant variants compared to the parental cells. Specifically, VEGFR1 expression had increased 1.2-fold for HCT-116/5-FU and decreased 22% and 53% for HCT-116/Oxa and HCT-116/SN38 cells, respectively. The overall tendency was the same for VEGFR2, although the results did not reach significance. For both parental and drug-resistant variants, the expression of VEGFR1 was much higher (at least 45-times) than the expression of VEGFR2 in the corresponding cells. Therefore, the acquired drug resistance was not accompanied by alterations in the relative proportions of VEGFR1 and VEGFR2. Neuropilin1 (NRP1) was expressed at high levels in all 4 cell lines. Generally, resistant cells expressed higher levels of NRP1, which was particularly marked for HCT-116/Oxa where the expression of neuropilin1 had increased 10-times.

The expression of VEGF ligands differs between parental and resistant cells

The motility of CRC cells is principally mediated by VEGF-A (also called VEGF), VEGF-B and placental growth factor (PIGF) ([Bouygues et al., 2021](#)). The secretion of the three VEGF ligands was determined by ELISA analysis of conditioned media from each of the four cellular models. The results ([Figure 3](#)) show that the secretion of VEGF-A had increased dramatically for all the resistant sublines ranging from 7-fold for HCT-116/5-FU to about 4-fold for both HCT-116/Oxa and HCT-116/SN38. No detectable alterations were observed for VEGF-B. In contrast, the secretion of PIGF had increased 2-fold for HCT-116/5-FU but remained stable for HCT-116/Oxa and HCT-116/SN38.

Migration and invasion can be attenuated by aflibercept in both parental and resistant cells

To determine the impact of VEGF-signaling on the overall migration and invasion in parental and resistant cells, aflibercept was added to the growth media. Aflibercept is a chimeric protein that specifically binds and neutralizes the VEGFR1 ligands VEGF-A, VEGF-B and PIGF ([Papadopoulos et al., 2012](#)). The results ([Figure 4](#)) show that aflibercept is able to inhibit the migration of both parental and resistant cells at a clinically relevant dose. The migration of parental cells, HCT-116/5-FU and HCT-116/Oxa was inhibited to a similar degree by aflibercept (43 to 47% inhibition) while the migration of HCT-116/SN38 was only inhibited 29%. In comparison, aflibercept inhibited the invasion of HCT-116, HCT-116/5-FU and HCT-116/SN38 to a similar extent (49 to 55% inhibition) while the effect was slightly higher for HCT-116/Oxa (67% inhibition). Therefore, VEGF signaling is an important mediator of cellular motility for both parental and resistant cells.

To determine if the attenuation of migration and invasion might be due to a potential cytotoxic or cytostatic activity, rather than to a direct effect

on the motility, the influence of aflibercept on the different cell lines was determined by the MTT viability test after 5 days continuous exposure. The results ([Supplementary data 1](#)) are expressed as % viability of each cell line in the absence or presence of aflibercept. The results clearly show that aflibercept has no detectable influence on the growth or viability of any of the cell lines under standard culture conditions.

The expression of tissue factor (TF) differs between parental and resistant cells

Tissue factor (coagulation factor III, thromboplastin) is expressed by many tumor cells including CRC cells ([Van Dreden et al., 2017](#)). TF can promote the expression of different factors involved in angiogenesis including VEGF-A ([Abe et al., 1999](#)). We therefore determined the levels of secreted TF to establish if the upregulation of VEGF-A in the drug-resistant cells might be related to increased TF expression. The results show that HCT-116/5-FU cells secreted 35% more TF compared to the parental cells ([Figure 5](#)). Unexpectedly, TF was strongly downregulated in HCT-116/Oxa cells (8-fold) and HCT-116/SN38 cells (11-fold).

The cells show variable procoagulant activity

To establish if the altered expression of tissue factor was accompanied by differences in the coagulation potential, thrombin generation was assessed for the four CRC cell lines and the lag-time, the time to peak (ttPeak) and the Peak determined. ([Figure 5A](#)). All cancer cells studied showed increased procoagulant activity as compared to the negative control (recalcified normal plasma) as indicated by the decreased lag time and decreased time to peak whereas the peak of thrombin formation was significantly increased. However, the thrombotic potential for all cell was

less than observed for the positive control (plasma with tissue factor (5 pM) and procoagulant phospholipids (4 μ M)).

Among the cell lines, HCT-116/SN38 had the weakest pro-coagulant potency while HCT-116/5-FU had the strongest. The parental HCT-116 cells and the oxaliplatin-resistant HCT-116/Oxa cells showed intermediate pro-coagulant activity with the parental cells being slightly more pro-coagulant.

Cellular network formation

Besides promoting the cellular motility of tumor cells, VEGF-signaling has also been implicated in vascular (vasculogenic) mimicry ([Jinjun et al., 2017](#); [Xu et al., 2018](#); [Liu et al., 2020](#)). To quantify the formation of VM cellular networks, cells were grown with 3-D gels derived from basement membranes (Matrigel). After plating, network formation was recorded for 24 hours by time-lapse photography under the microscope followed by image analysis to determine the total length of the network as well as the number of junctions. We first compared the structures of the four cell lines on Matrigel. For comparison, HUVECs and HMEC microvascular endothelial cells (ECs) were plated under similar conditions. As expected, HUVECs and HMECs were able to form cellular networks ([Figure 6A a,b, red cells](#)). Similar structures were observed for HCT-116/5-FU and HCT-116/Oxa cells whereas no organized structures were observed for the parental HCT-116 cells and the HCT-116/SN38 irinotecan-resistant cells ([Figure 6A c-f, green cells](#)). Next, the networks were quantified with respect to total length ([Figure 6B,C](#)). Although the structures were morphologically similar, the quantitative analysis revealed several differences between the ECs and the CRC tumor cells. In particular, the lag time was shorter for the ECs than for the CRC cells while the length of

the network at peak as well as the stability of the networks was superior for the CRC cells.

To confirm the role of VEGF-signaling in our resistant tumor cells, similar experiments were carried out in the presence of specific VEGF ligands. No networks were formed in the absence of Matrigel or in the absence of serum (results not shown). Addition of VEGF-A to the serum-containing growth media shortened the lag time and enhanced the total length of the networks, but did not influence the stability (Figure 7). In contrast, VEGF-B or PlGF had no detectable influence on the quantitative parameters (Figure 7). In comparison, the addition of VEGF-A, VEGF-B or PlGF did not have any detectable influence on network formation of the parental cells (results not shown).

Next, the influence of aflibercept on VM was determined. The results show that aflibercept had profound effect on the tumor cells studied which was particularly prominent with respect to the number of junctions (Figure 8). Taken together, these findings show that VEGF signaling is an important mediator in the formation of VM cellular networks for the drug-resistant CRC cells since VEGF-A can enhance the formation of the networks while aflibercept, a specific VEGF-target agent, can attenuate network formation.

Discussion

VEGF-signaling plays an important role in the motility of CRC cells. The most common chemotherapeutic agents for the treatment of CRC patients are 5-FU, oxaliplatin and irinotecan (SN38). Interestingly, acute exposure to all three compounds has been reported to interfere with VEGF-signaling, although in different ways. To establish if prolonged exposure to the three drugs may have a stable impact on VEGF-signaling,

we here characterized a cell panel consisting of three independently selected resistant cell lines and their corresponding parental cell line. Acute exposure to oxaliplatin has been associated with increased expression of VEGF-A, PlGF, VEGFR1 and neuropilin 1 ([Fan et al., 2008](#)). In comparison, our results show that prolonged exposure to oxaliplatin was accompanied by a strong increase in the secretion of VEGF-A (7-fold) and NRP1 expression (10-fold). In contrast, VEGFR1 was only slightly increased while no detectable changes were observed for PlGF. The prolonged exposure to oxaliplatin was accompanied by increased motility as determined by both migration and invasion assays as well as the capacity to form vascular mimicry (VM) cellular networks.

Acute exposure to irinotecan (SN38) is associated with decreased levels of HIF1 and its transcriptional target VEGF in cells, animals and patients ([Rapisarda et al., 2002](#); [Guérin et al., 2012](#); [Kummar et al., 2011](#)). In contrast, both VEGF-A and NRP1 were increased in the SN-38-resistant cells, although the increase was less than observed for the other two resistant cell lines. In contrast, the expression of both VEGFR1 and VEGFR2 was downregulated. Interestingly, Western blot analysis revealed that HIF1 was strongly downregulated in HCT-116/SN38 cells^a in spite of the increased levels of VEGF-A. These findings suggest that the tight link between HIF1 and VEGF-A has been uncoupled during the selection process resulting in the use of alternative pathways for the expression of VEGF-A. Indeed, VEGF-A is believed to promote the survival of CRC cells under stress ([Masuda et al., 2008](#); [Yin et al., 2010](#); [Samuel et al., 2011](#); [Goel and Mercurio, 2013](#)), likely making it essential for the SN-38 exposed cells to switch to alternative pathway(s) to prevent downregulation of VEGF-A. Although HCT-116/SN38 cells showed increased migration and invasion, they did not acquire the capacity to form VM networks.

The situation for 5-FU is more complex since no changes in VEGF signaling was observed after a bolus exposure to 5-FU while continuous exposure was accompanied with upregulation of VEGF-A ([Fan et al., 2008](#); [Hoyama et al., 2015](#); [Albertsson et al., 2009](#)). Both observations are clinically relevant, since 5-FU can be administered either as a bolus exposure or as continuous infusion. Interestingly, prolonged exposure to 5-FU was accompanied by a strong augmentation in the secretion of VEGF-A and PlGF as well as increased motility and the capacity to form VM cellular networks. Taken together, prolonged exposure to 5-FU and oxaliplatin were accompanied by permanent changes of the VEGF-signaling pathway comparable to the acute changes happening after a single drug exposure. This was not the case for SN-38, most likely because VEGF-A expression had become uncoupled from HIF1.

Tissue factor (coagulation factor III, thromboplastin) is expressed by many tumor cells including CRC cells ([Van Dreden et al., 2017](#)). In addition to its role as the primary initiator of the coagulation cascade, TF also contribute to the activation of transmembrane G protein-coupled protease-activated receptors (PARs), receptor tyrosine kinases and integrins ([Bluff et al., 2008](#); [Unruh and Horbinski, 2020](#)). VEGF-A is a major downstream target of TF ([Abe et al., 1999](#)). We therefore determined the levels of secreted TF to establish if the increased levels of secreted VEGF-A by drug-resistant cells might be correlated with increased TF expression. The results showed that the 5-FU resistant HCT-116/5-FU secreted increased levels of TF, compared to the parental cells. Unexpectedly, TF expression in HCT-116/Oxa and HCT-116/SN38 resistant cells were strongly downregulated (8 to 11-fold). Therefore the increase of VEGF in these cells cannot be attributed to increased levels of TF.

Interestingly, the thrombotic potential of the four cell lines closely followed the expression of TF with HCT-116/5-FU showing the strongest

pro-coagulant potency while HCT-116/SN38 had the weakest. Importantly, clinical exposure to 5-FU has been associated with increased risk of thrombosis in several studies ([Oppelt et al., 2015](#)). However, it is generally believed that the increased thrombotic risk is due to 5-FU mediated toxicity to endothelial cells ([Kinhult et al., 2001](#)). The results presented here suggest that increased secretion of TF by the tumor cells may also contribute to the higher thrombotic risk.

Current evidence suggests that a subset of tumors is able to form vascular channels that augment the angiogenic response, the so-called vascular mimicry ([Weis and Cheresh, 2011](#)). Vascular mimicry is a multi-step process that evolves from the formation of organized cellular networks that subsequently matures into capillary-like tubes able to sustain blood flow. Vascular mimicry (VM) in CRC patients has been associated with bad prognosis and poor 5-year survival ([Baeten et al., 2009](#); [Cao et al., 2013](#)). Although VM is likely a multifactorial process, VEGF signaling is believed to be one of the contributing factors both in CRC and in other tumor types ([Jinjun et al., 2017](#); [Xu et al., 2018](#); [Liu et al., 2020](#)).

Although the later steps of VM are best suited for *in vivo* observation, the earlier steps can be studied quantitatively *in vitro*. Specifically, cells are grown on 3-D gels derived from isolated basement membrane (Matrigel) and the VM network formation is characterized under the microscopy by time-lapse photography followed by image analysis with dedicated software. The results show that HCT-116/5-FU and HCT-116/Oxa are able to form cellular networks which are morphologically similar to networks formed by HUVECs and the HMEC microvascular cells. However, the lag time was shorter for the ECs than for the CRC cells while the length of the network at peak as well as the stability of the networks was superior for

the CRC cells. In comparison, neither the parental cells nor the HCT-116/SN38 cells formed cellular networks under comparable conditions.

Further characterization of the tumor cell VM networks revealed that they can only be formed when the cells are plated with Matrigel in the presence of serum-containing media. Importantly, addition of VEGF-A, but not VEGF-B or PlGF, in the growth media promoted network formation. Furthermore, addition of aflibercept decreased VM network formation. Taken together these findings indicate a clear role for VEGF-signaling in network formation for the resistant CRC cells.

Taken together, our results show that prolonged exposure to clinically used chemotherapeutic agents interferes with VEGF-signaling and can promote tumor progression as witnessed by increased tumor cell motility and by formation of VM cellular networks. The results further indicate that aflibercept possess direct anti-invasive activity toward CRC cells via different mechanisms in addition to its well-established anti-vascular effects.

Footnote

^aUnpublished data, L Louadj and AK Larsen

Acknowledgements

We are grateful to Romain Morichon, CISA (Cytométrie Imagerie Saint-Antoine) at the Saint-Antoine Research Center for his competent assistance with confocal microscopy, data acquisition and image analysis.

The authors would like to acknowledge Fanis Choulis from Leo Pharma Greece, for precious support of the project and Emmanuelle Dochy, Marika Crohns and Christine Geffriaud-Ricouard from Sanofi-Aventis Europe for stimulating and fruitful discussions.

Disclosure

This work was financed in part by research funding to Annette K Larsen from Sanofi-Aventis. Sandrine Thouroude was supported by an unrestricted research grant to Grigoris Gerotziafas from Leo Pharma, Greece and by the RSFN association, France. Michèle Sabbah and Patrick Van Dreden declare no conflicting interest.

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.

References

Abe K, Shoji M, Chen J, Bierhaus A, Danave I, Micko C, Casper K, Dillehay DL, Nawroth PP, Rickles FR. Regulation of vascular endothelial growth factor production and angiogenesis by the cytoplasmic tail of tissue factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Jul 20;96(15):8663-8. doi: 10.1073/pnas.96.15.8663. PMID: 10411932; PMCID: PMC17573.

Albertsson P, Lennernäs B, Norrby K. Low-dose continuous 5-fluorouracil infusion stimulates VEGF-A-mediated angiogenesis. *Acta Oncol*. 2009;48(3):418-25. doi: 10.1080/02841860802409512. PMID: 18932044.

AmraneDjedidi R, Rousseau A, Larsen AK, Elalamy I, Van Dreden P, Gerotziafas GT. Extracellular vesicles derived from pancreatic cancer cells BXPC3 or breast cancer cells MCF7 induce a permanent procoagulant shift to endothelial cells. *Thromb Res*. 2020 Mar;187:170-179. doi: 10.1016/j.thromres.2019.09.003. Epub 2019 Sep 5. PMID: 32006891.

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. doi: 10.18632/oncotarget.3934. PMID: 26041882; PMCID: PMC4621907.

Baeten CI, Hillen F, Pauwels P, de Bruine AP, Baeten CG. Prognostic role of vasculogenic mimicry in colorectal cancer. *Dis Colon Rectum*. 2009 Dec;52(12):2028-35. doi: 10.1007/DCR.0b013e3181beb4ff. PMID: 19934926.

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. doi: 10.1016/j.cub.2003.09.002. PMID: 14521839.

Bluff JE, Brown NJ, Reed MW, Staton CA. Tissue factor, angiogenesis and tumour progression. *Breast Cancer Res*. 2008;10(2):204. doi: 10.1186/bcr1871. Epub 2008 Mar 17. PMID: 18373885; PMCID: PMC2397518.

Bouygues A, Thouroude S, Gerotziafas GT, Larsen AK. Motility of colorectal cancer cells is mediated by VEGFR1 homo-dimers and VEGFR1-VEGFR2 hetero-dimers and can be attenuated by aflibercept. *Biochem Pharmacol* 2021 Under preparation.

Calvani M, Trisciuglio D, Bergamaschi C, Shoemaker RH, Melillo G. Differential involvement of vascular endothelial growth factor in the

survival of hypoxic colon cancer cells. *Cancer Res.* 2008 Jan 1;68(1):285-91. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-5564. PMID: 18172321.

Cao Z, Bao M, Miele L, Sarkar FH, Wang Z, Zhou Q. Tumour vasculogenic mimicry is associated with poor prognosis of human cancer patients: a systemic review and meta-analysis. *Eur J Cancer.* 2013 Dec;49(18):3914-23. doi: 10.1016/j.ejca.2013.07.148. Epub 2013 Aug 27. PMID: 23992642.

Culy CR, Clemett D, Wiseman LR. Oxaliplatin. A review of its pharmacological properties and clinical efficacy in metastatic colorectal cancer and its potential in other malignancies. *Drugs.* 2000 Oct;60(4):895-924. doi: 10.2165/00003495-200060040-00005. PMID: 11085200.

D'Haene N, Koopmansch C, Van Eycke YR, Hulet F, Allard J, Bouri S, Rorive S, Remmelink M, Decaestecker C, Maris C, Salmon I. The Prognostic Value of the Combination of Low VEGFR-1 and High VEGFR-2 Expression in Endothelial Cells of Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci.* 2018 Nov 9;19(11):3536. doi: 10.3390/ijms19113536. PMID: 30423986; PMCID: PMC6274874.

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. doi: 10.1038/sj.onc.1208246. PMID: 15735759.

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 Sep;7(9):3064-70. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-08-0615. PMID: 18790786; PMCID: PMC2581833.

Gerotziafas GT, Depasse F, Busson J, Leflem L, Elalamy I, Samama MM. Towards a standardization of thrombin generation assessment: the influence of tissue factor, platelets and phospholipids concentration on the normal values of Thrombogram-Thrombinoscope assay. *Thromb J.* 2005 Oct 26;3:16. doi: 10.1186/1477-9560-3-16. PMID: 16250908; PMCID: PMC1291409.

Giatromanolaki A, Koukourakis MI, Sivridis E, Chlouverakis G, Vourvouhaki E, Turley H, Harris AL, Gatter KC. Activated VEGFR2/KDR pathway in tumour cells and tumour associated vessels of colorectal cancer. *Eur J Clin Invest.* 2007 Nov;37(11):878-86. doi: 10.1111/j.1365-2362.2007.01866.x. Epub 2007 Sep 20. PMID: 17883421.

Goel HL, Mercurio AM. VEGF targets the tumour cell. *Nat Rev Cancer.* 2013 Dec;13(12):871-82. doi: 10.1038/nrc3627. PMID: 24263190; PMCID: PMC4011842.

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 α target genes and decreases tumor angiogenesis. *Mol Med.* 2012 Feb 10;18(1):83-94. doi: 10.2119/molmed.2011.00120. PMID: 22033674; PMCID: PMC3269639.

Hoyama E, Viveiros MM, Shiratori C, de Oliveira DE, Padovani CR, Selva D, Schellini SA. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF)

in macrophages, fibroblasts, and endothelial cells in pterygium treated with 5-Fluorouracil. *Semin Ophthalmol.* 2015 May;30(3):171-6. doi: 10.3109/08820538.2013.835838. Epub 2013 Oct 30. PMID: 24171833.

Jinjun W, Zhaowei W, Qiang L, Zhijun X, Juanzi Z, Lin L, Guixi J. sFLT-1 inhibits proliferation, migration, and invasion of colorectal cancer SW480 cells through vascular mimicry formation suppression. *Tumour Biol.* 2017 May;39(5):1010428317698339. doi: 10.1177/1010428317698339. PMID: 28468595.

Kinhult S, Albertsson M, Eskilsson J, Cwikiel M. Antithrombotic treatment in protection against thrombogenic effects of 5-fluorouracil on vascular endothelium: a scanning microscopy evaluation. *Scanning.* 2001 Jan-Feb;23(1):1-8. doi: 10.1002/sca.4950230101. PMID: 11272331.

Koch S, Tugues S, Li X, Gualandi L, Claesson-Welsh L. Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Biochem J.* 2011 Jul 15;437(2):169-83. doi: 10.1042/BJ20110301. PMID: 21711246.
Review

Kummar S, Raffeld M, Juwara L, Horneffer Y, Strassberger A, Allen D, Steinberg SM, Rapisarda A, Spencer SD, Figg WD, Chen X, Turkbey IB, Choyke P, Murgo AJ, Doroshow JH, Melillo G. Multihistology, target-driven pilot trial of oral topotecan as an inhibitor of hypoxia-inducible factor-1 α in advanced solid tumors. *Clin Cancer Res.* 2011 Aug 1;17(15):5123-31. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-0682. Epub 2011 Jun 14. PMID: 21673063; PMCID: PMC3149769.

Larsen AK, Gobert C. DNA topoisomerase I in oncology: Dr Jekyll or Mr Hyde? *Pathol Oncol Res.* 1999;5(3):171-8. doi: 10.1053/paor.1999.0209. PMID: 10491013.

Liu H, Gao M, Gu J, Wan X, Wang H, Gu Q, Zhou Y, Sun X. VEGFR1-Targeted Contrast-Enhanced Ultrasound Imaging Quantification of Vasculogenic Mimicry Microcirculation in a Mouse Model of Choroidal Melanoma. *Transl Vis Sci Technol.* 2020 Feb 7;9(3):4. doi: 10.1167/tvst.9.3.4. PMID: 32704424; PMCID: PMC7347284.

Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer.* 2003 May;3(5):330-8. doi: 10.1038/nrc1074. PMID: 12724731.

Masuda K, Teshima-Kondo S, Mukaijo M, Yamagishi N, Nishikawa Y, Nishida K, Kawai T, Rokutan K. A novel tumor-promoting function residing in the 5' non-coding region of vascular endothelial growth factor mRNA. *PLoS Med.* 2008 May 20;5(5):e94. doi: 10.1371/journal.pmed.0050094. PMID: 18494554; PMCID: PMC2386836.

McQuade RM, Carbone SE, Stojanovska V, Rahman A, Gwynne RM, Robinson AM, Goodman CA, Bornstein JC, Nurgali K. Role of oxidative stress in oxaliplatin-induced enteric neuropathy and colonic dysmotility in mice. *Br J Pharmacol.* 2016 Dec;173(24):3502-3521. doi: 10.1111/bph.13646. Epub 2016 Nov 16. PMID: 27714760; PMCID: PMC5120153.

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. doi: 10.18632/oncotarget.1671. PMID: 25015210; PMCID: PMC4148093.

Mésange P, Bouygues A, Ferrand N, Sabbah M, Escargueil AE, Savina A, Chibaudel B, Tournigand C, André T, de Gramont A, Larsen AK. Combinations of Bevacizumab and Erlotinib Show Activity in Colorectal Cancer Independent of *RAS* Status. *Clin Cancer Res*. 2018 Jun 1;24(11):2548-2558. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-17-3187. Epub 2018 Feb 28. PMID: 29490990.

Mulkeen AL, Silva T, Yoo PS, Schmitz JC, Uchio E, Chu E, Cha C. Short interfering RNA-mediated gene silencing of vascular endothelial growth factor: effects on cellular proliferation in colon cancer cells. *Arch Surg*. 2006 Apr;141(4):367-74; discussion 374. doi: 10.1001/archsurg.141.4.367. PMID: 16618894.

Naik S, Dothager RS, Marasa J, Lewis CL, Piwnica-Worms D. Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 Is Synthetic Lethal to Aberrant {beta}-Catenin Activation in Colon Cancer. *Clin Cancer Res*. 2009; 15: 7529-7537.

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. doi: 10.1093/jjco/hyp066. Epub 2009 Jun 17. PMID: 19535387.

Oppelt P, Betbadal A, Nayak L. Approach to chemotherapy-associated thrombosis. *Vasc Med.* 2015 Apr;20(2):153-61. doi: 10.1177/1358863X14568705. PMID: 25832603; PMCID: PMC4655120.

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. doi: 10.1007/s10456-011-9249-6. PMID: 22302382; PMCID: PMC3338918.

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. PMID: 22973964.

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. doi: 10.3892/ijo.2013.1868. Epub 2013 Mar 27. PMID: 23546019.

Rapisarda A, Uranchimeg B, Scudiero DA, Selby M, Sausville EA, Shoemaker RH, Melillo G. Identification of small molecule inhibitors of hypoxia-inducible factor 1 transcriptional activation pathway. *Cancer Res.* 2002 Aug 1;62(15):4316-24. PMID: 12154035.

Samuel S, Fan F, Dang LH, Xia L, Gaur P, Ellis LM. Intracrine vascular endothelial growth factor signaling in survival and chemoresistance of human colorectal cancer cells. *Oncogene.* 2011 Mar 10;30(10):1205-12.

doi: 10.1038/onc.2010.496. Epub 2010 Nov 8. PMID: 21057529; PMCID: PMC3224802.

Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez JY, White DJ, Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak P, Cardona A. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*. 2012 Jun 28;9(7):676-82. doi: 10.1038/nmeth.2019. PMID: 22743772; PMCID: PMC3855844.

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. doi: 10.1038/nrm.2016.87. Epub 2016 Jul 27. PMID: 27461391. Review

Soares DG, Machado MS, Rocca CJ, Poindessous V, Ouaret D, Sarasin A, Galmarini CM, Henriques JA, Escargueil AE, Larsen AK. Trabectedin and its C subunit modified analogue PM01183 attenuate nucleotide excision repair and show activity toward platinum-resistant cells. *Mol Cancer Ther*. 2011 Aug;10(8):1481-9. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-11-0252. Epub 2011 May 27. PMID: 21622731.

Unruh D, Horbinski C. Beyond thrombosis: the impact of tissue factor signaling in cancer. *J Hematol Oncol*. 2020 Jul 14;13(1):93. doi: 10.1186/s13045-020-00932-z. PMID: 32665005; PMCID: PMC7362520.

Xu S, Bai J, Zhuan Z, Li B, Zhang Z, Wu X, Luo X, Yang L. EBV-LMP1 is involved in vasculogenic mimicry formation via VEGFA/VEGFR1 signaling

in nasopharyngeal carcinoma. *Oncol Rep.* 2018 Jul;40(1):377-384. doi: 10.3892/or.2018.6414. Epub 2018 May 3. PMID: 29749553.

Yin Y, Cao LY, Wu WQ, Li H, Jiang Y, Zhang HF. Blocking effects of siRNA on VEGF expression in human colorectal cancer cells. *World J Gastroenterol.* 2010 Mar 7;16(9):1086-92. doi: 10.3748/wjg.v16.i9.1086. PMID: 20205278; PMCID: PMC2835784.

Van Dreden P, Elalamy I, Gerotziafas GT. The Role of Tissue Factor in Cancer-Related Hypercoagulability, Tumor Growth, Angiogenesis and Metastasis and Future Therapeutic Strategies. *Crit Rev Oncog.* 2017;22(3-4):219-248. doi: 10.1615/CritRevOncog.2018024859. PMID: 29604900.

Weis SM, Cheresh DA. Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets. *Nat Med.* 2011 Nov 7;17(11):1359-70. doi: 10.1038/nm.2537. PMID: 22064426.

Figure legends

Figure 1. Cellular morphology and organization

A, Cellular morphology of HCT-116 parental cells, 5-FU resistant HCT-116/5-FU cells, oxaliplatin-resistant HCT-116/Oxa cells and SN38 (the active metabolite of irinotecan)-resistant HCT-116/SN38 cells. Filamentous actin is outlined in green following phalloidin staining. **B**, Clonal morphology of the indicated cell lines after 10 days incubation.

Figure 2. Migration and invasion of parental and drug-resistant cells.

A, The migration of parental and drug-resistant cells was determined by the trans-well assay after 24 hours. Briefly, 50 000 to 250 000 cells in serum-free media were plated in the upper chamber while the lower chamber contained culture media with 5% fetal calf serum as chemoattractant. **B**, The invasion of parental and drug-resistant cells was determined by the trans-well assay after 24 hours. Briefly, the membrane of the upper chamber was overlaid with a thin layer of Matrigel followed by plating of 50 000 to 250 000 cells in serum-free media. The lower chamber contained culture media with 5% fetal calf serum as chemoattractant. All values are normalized to an initial loading of 250 000 cells. The values represent the averages of 3 independent experiments, each done in duplicate. The bars indicate the mean $\pm$ SD for each cell line. p-values indicate the difference between the migration of the parental and the indicated drug-resistant cells and were calculated using Student's paired *t*-test. *** $p < 0.001$.

Figure 3. Expression of VEGF receptors and ligands in parental and drug-resistant cells

For VEGF receptors (left panels), protein extracts were prepared from the indicated cell lines and the expression of VEGFR1, VEGFR2 and neuropilin1 (NRP1) was determined by ELISA analysis. For VEGF ligands (right panels), conditioned media was prepared from cells incubated for 24 hours in serum-free media followed by determination of the expression of VEGF-A, VEGF-B and PlGF by ELISA analysis. The values represent the average of 3 independent experiments, each done in duplicate. p-values indicate the difference between the migration of parental and the indicated drug-resistant cell line and were calculated using Student's paired *t*-test. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; NS, non-significant.

Figure 4. Influence of aflibercept on the migration and invasion of parental and drug-resistant cells

A, The migration of parental and drug-resistant cells was determined by the trans-well assay after 24 hours. Briefly, 50 000 to 250 000 cells in serum-free media with or without aflibercept (50 $\mu\text{g/ml}$) were plated in the upper chamber while the lower chamber contained culture media with fetal calf serum (5%) as chemoattractant. **B**, The invasion of parental and drug-resistant cells was determined by the trans-well assay after 24 hrs. Briefly, the membrane of the upper chamber was overlaid with a thin layer of Matrigel followed by plating of 50 000 to 250 000 cells in serum-free media with or without aflibercept (50 $\mu\text{g/ml}$). The lower chamber contained culture media with 5% fetal calf serum as chemoattractant. All values are normalized to an initial loading of 250 000 cells. The values represent the averages of 3 independent experiments, each done in duplicate. The bars indicate the mean $\pm$ SD for each cell line. p-values indicate the difference between the migration of parental and the indicated drug-resistant cells and were calculated using Student's paired *t*-test. *** $p < 0.001$.

Figure 5. Expression of tissue factor (TF) and thrombin generation by parental and resistant cells

A, For TF secretion, conditioned media was prepared from cells incubated for 24 hours in serum-free media followed by ELISA analysis. The bars indicate the mean $\pm$ SD for each cell line. p-values indicate the difference between the migration of parental and the indicated drug-resistant cells and were calculated using Student's paired *t*-test. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

B, Representative thrombograms depicting the effect of paternal colon cancer cells HCT-116 and resistant HCT-116 on thrombin generation of normal human platelet poor plasma. Representative thrombograms from one out of 5 experiments.

Figure 6. Network formation by endothelial and CRC cells

A, The membranes of the indicated cells were labeled with vital dyes in red (endothelial cells) or green (tumor cells) and the formation of cellular networks determined after 24 hrs. **B,** the formation of cellular networks of the indicated cells was characterized by time-lapse imaging over 24 hours and the results expressed as total length. p-values indicate the difference between network formation of parental and drug-resistant cells by 6, 9 or 24 hours using Student's paired *t*-test. *** $p < 0.001$; NS, non-significant.

C, Summary of the time to peak, max length of the cellular networks and the length at 24 hours as expressed in % of the maximal length for endothelial and CRC cells. Representative VM network formation from one out of 4 experiments are shown.

Figure 7. Influence of VEGF ligands on VM networks

HCT-116/5-FU cells were incubated in serum-containing media in the absence (Control) or presence of VEGF-A (10 ng/ml), VEGF-B (50 ng/ml)

or PlGF (50 ng/ml) and the formation of VM networks characterized by time-lapse imaging over 24 hours. Left panels, length of the networks. Right panels, number of junctions. p-values indicate the difference between VM network formation in the absence or presence of VEGF ligands by 6, 9 or 24 hours using Student's paired *t*-test. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; NS, non-significant. Representative VM networks from one out of 3 experiments are shown.

Figure 8. Influence of aflibercept on VM networks

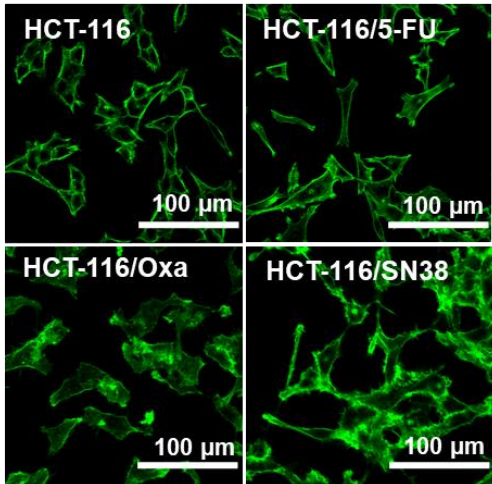
HCT-116/5-FU (upper panels) or HCT-116/Oxa (lower panels) were incubated in serum-containing media in the absence (Control) or presence of aflibercept (50 $\mu\text{g/ml}$) and the formation of VM networks characterized over 24 hours. p-values indicate the difference between network formation of cells in the absence or presence of aflibercept by 6, 9 or 24 hours using Student's paired *t*-test. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; NS, non-significant. Representative VM networks from one out of 3 experiments are shown.

Supplementary figure 1

Influence of aflibercept on the viability of ECs and CRC cells. Cells were incubated in the absence or presence of aflibercept (50 $\mu\text{g/ml}$) for 120 hours and the cellular viability was determined by the MTT assay. The viability of the indicated cell line in the absence of aflibercept corresponds to 100%. All values are averages of at least three independent experiments each done in duplicate. The bars indicate the mean $\pm$ SD for each cell line. p-values indicate the difference between the migration in the absence or presence of serum and were calculated using Student's paired *t*-test. NS, non-significant.

Fig.1 : Morphology

A



B

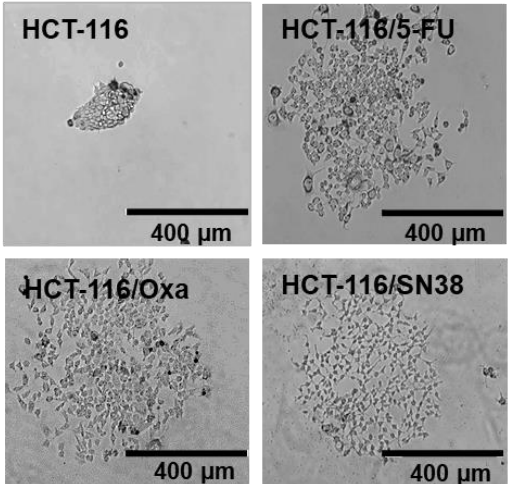


Fig.2 : Migration & Invasion

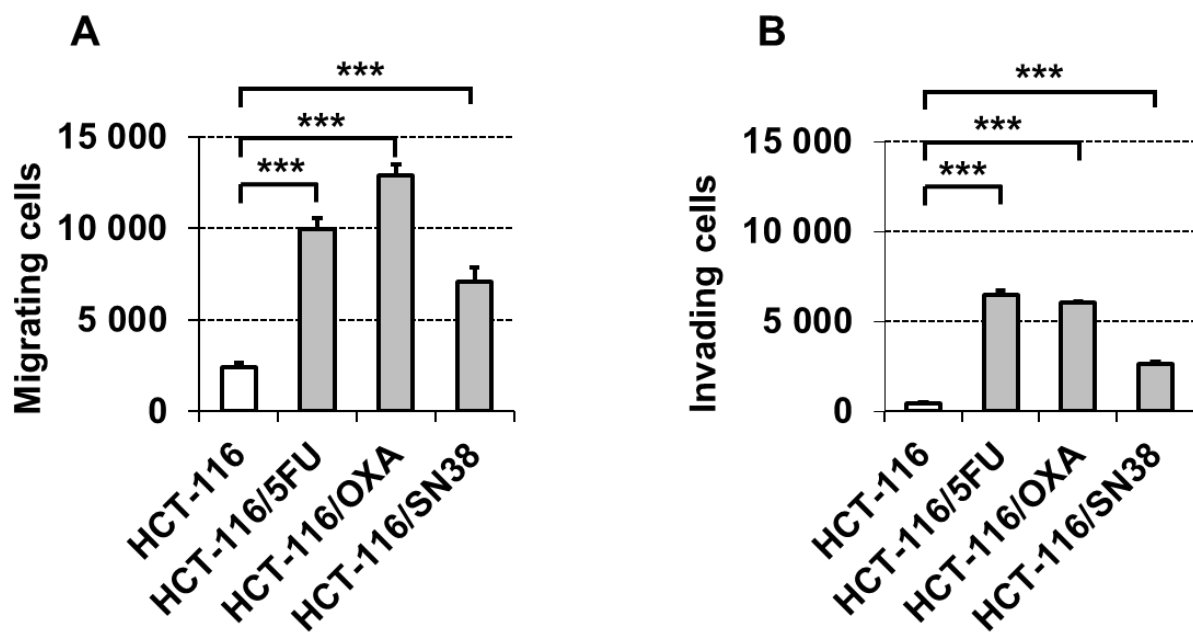


Fig.3 : VEGF ligands and receptors

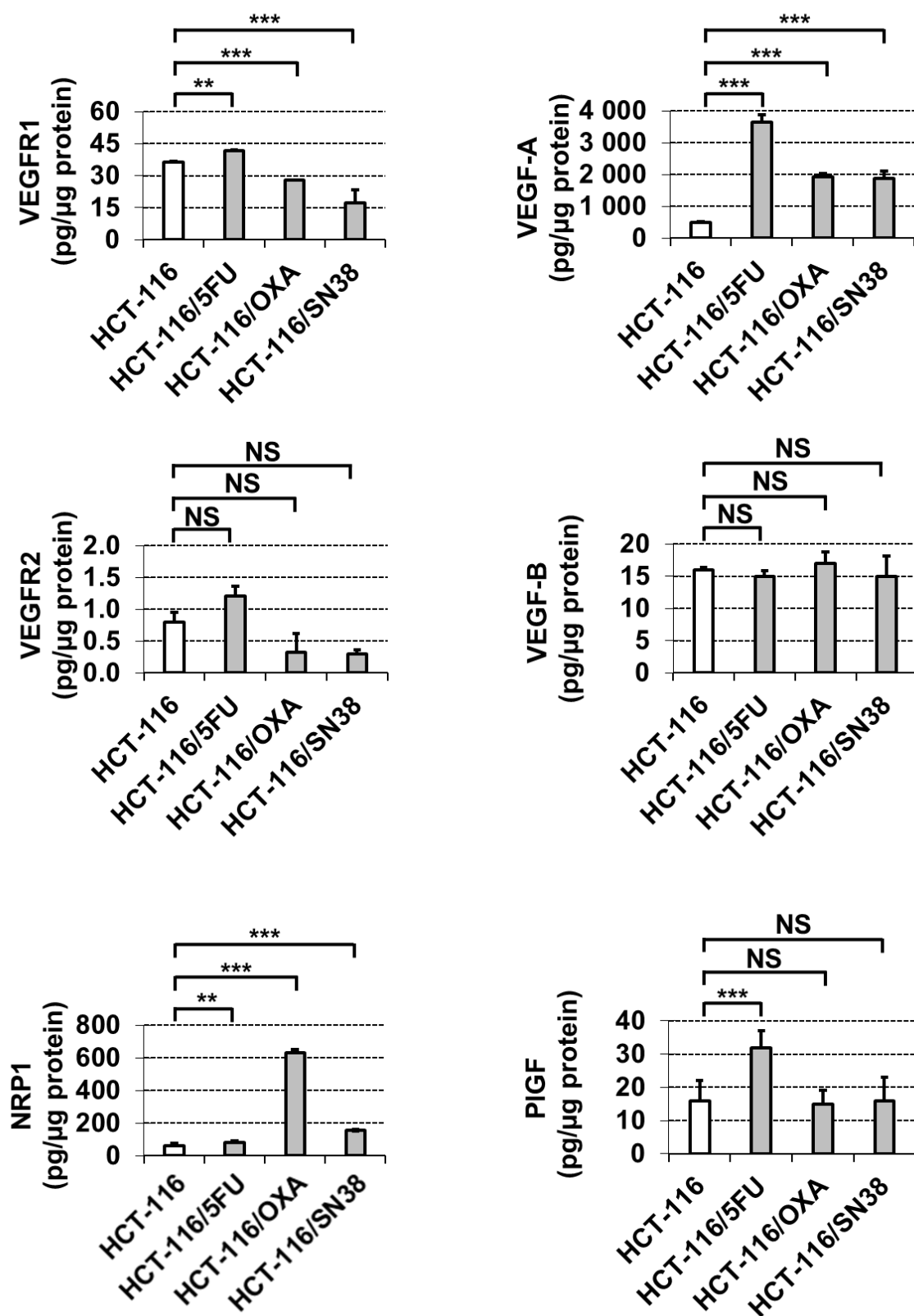


Fig.4 : Influence of Aflibercept on migration and invasion

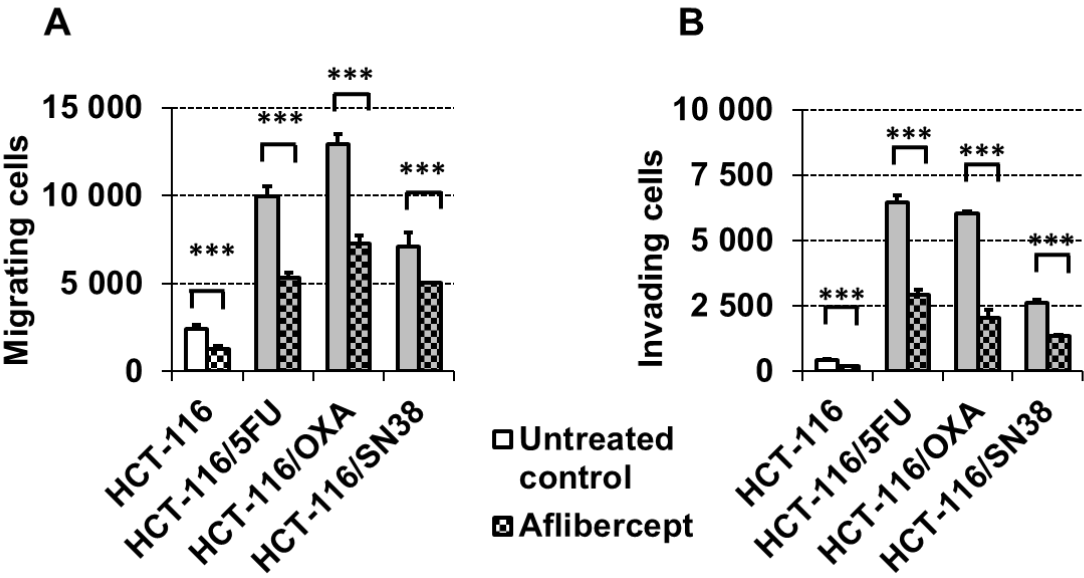


Fig.5: Production of Tissue factor (TF) and Thrombin generation

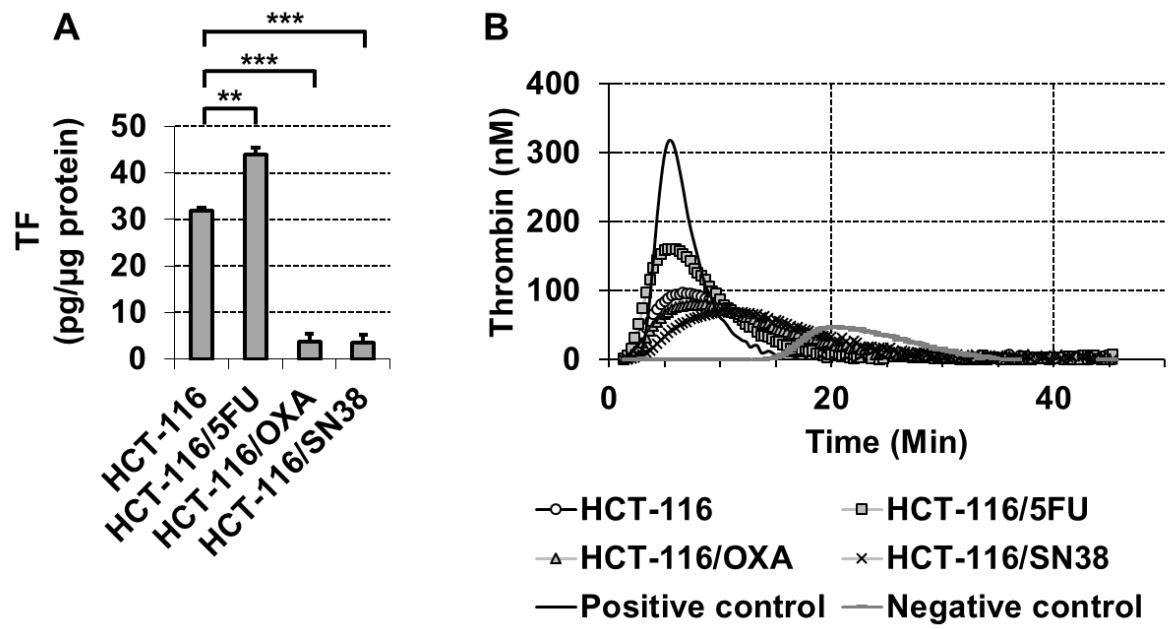


Fig.6 : Network formation by Endothelial and CRC cells

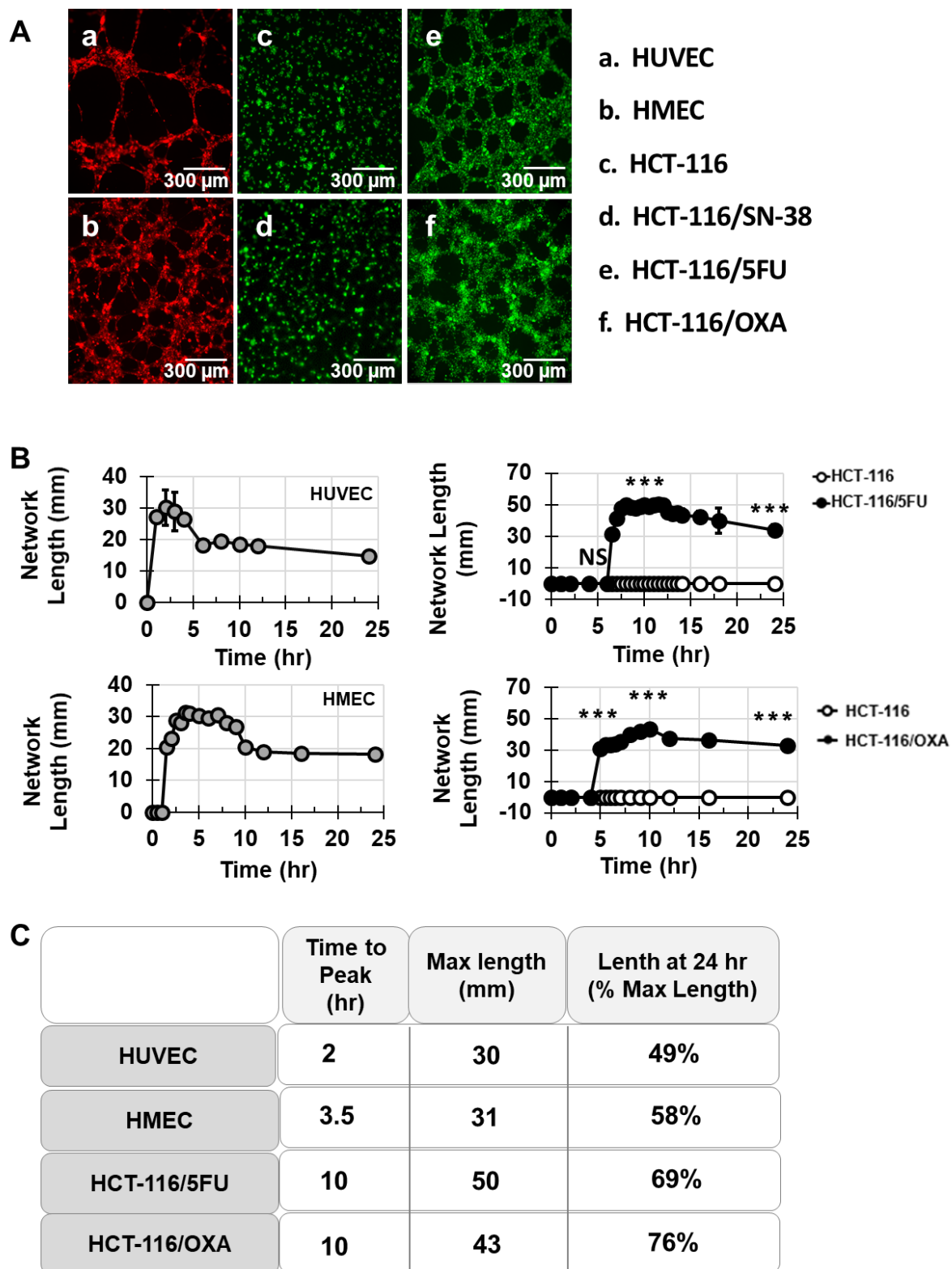


Figure 7

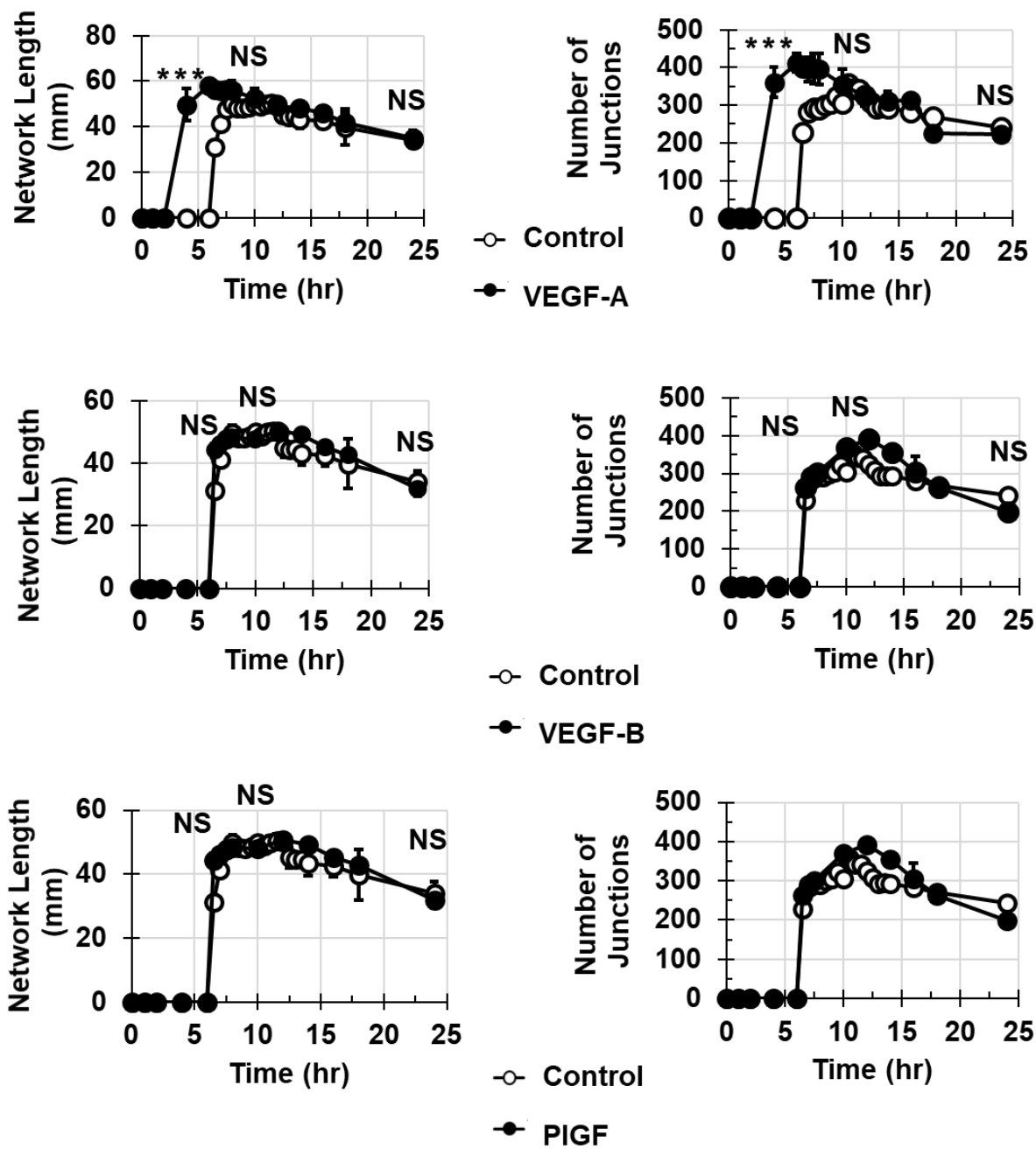
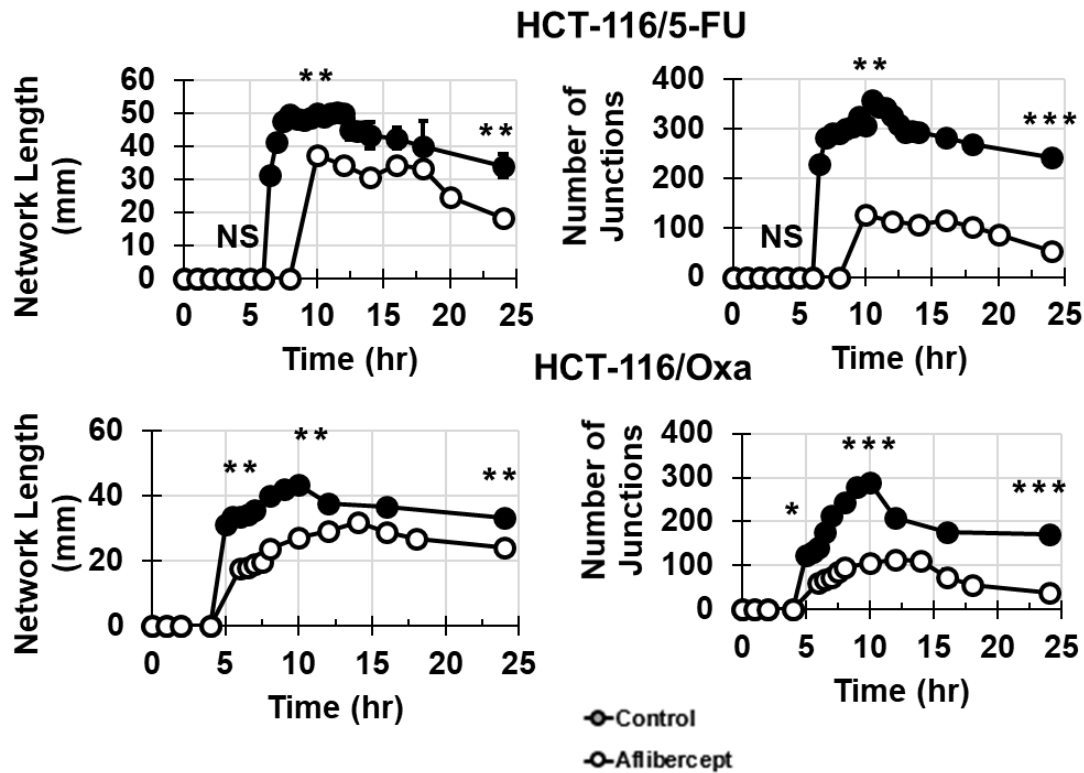
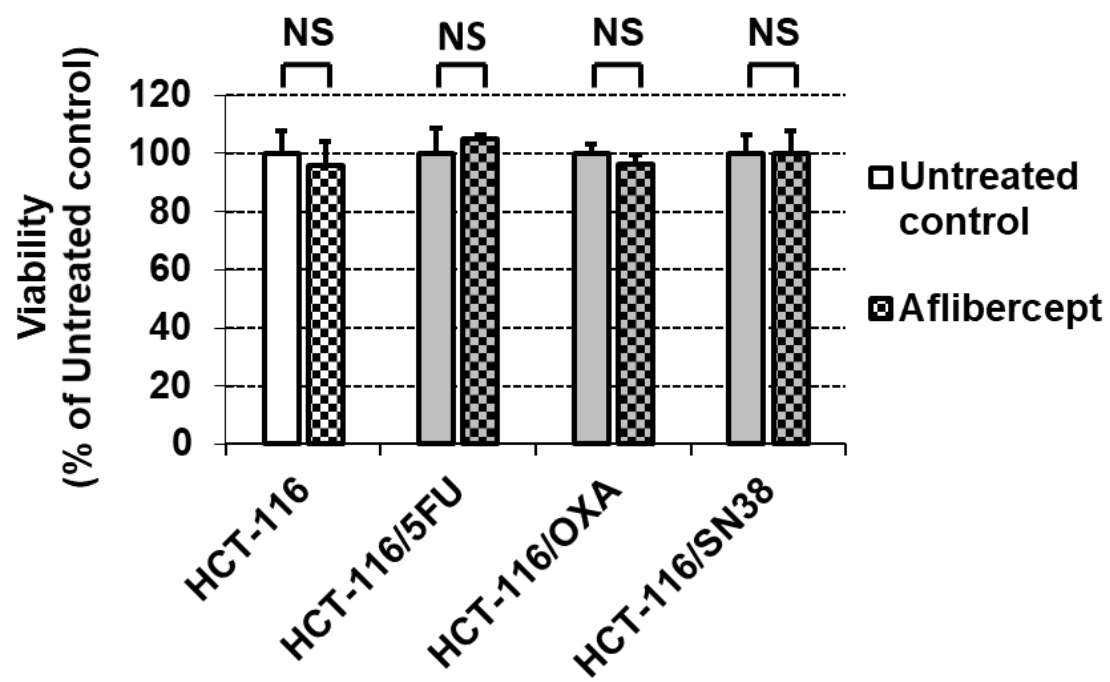


Fig.8 : Influence of Aflibercept on VM networks



Supplementary data. Fig.1. Effect of aflibercept on viability



DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Les premiers traitements chimiothérapeutiques pour le cancer du côlon ont vu le jour en 1947. Depuis la prise en charge des patients a été nettement améliorée notamment avec les protocoles de combinaison d'agents chimiothérapeutiques tels que FOLFOX et FOLFIRI ⁷⁸. La survie des patients augmente encore davantage avec l'approbation en première ligne du bevacizumab (anticorps monoclonal dirigé contre le VEGFR1) en 2004 ⁸⁸, et de l'aflibercept (protéine trap dirigée contre le VEGF-A,-B et PlGF) en seconde ligne en 2013 ⁹². Malgré toutes ces avancées thérapeutiques, la diminution des cas mortels par cancer colorectal n'est pas celle attendue. Ces deux thérapies ciblées dirigées contre la signalisation VEGF montrent la potentielle implication de cette voie dans le cancer colorectal. Cependant, bien que la signalisation VEGF ait été largement caractérisée dans les cellules endothéliales, ce n'est pas le cas dans d'autres types cellulaires comme les cellules tumorales.

Des travaux précédents ont montré que la plupart voire la totalité des patients souffrant d'un CCR ont des tumeurs qui expriment le VEGFR1 et à un moindre degré le VEGFR2^{250,254,255}. Une étude menée au sein de mon équipe de recherche a également montré que ces deux récepteurs étaient retrouvés sous forme active dans des xénogreffes de CCR ^{94,248}. Nous avons donc cherché à caractériser de façon moléculaire et fonctionnelle cette signalisation VEGF dans des cellules colorectales chimionâives et chimiorésistantes afin de déterminer les implications thérapeutiques possibles

Dans notre première étude, il a été question d'étudier l'implication de la signalisation VEGF dans la capacité à migrer des cellules colorectales tumorales.

Nous avons démontré dans un premier temps que le VEGF-A, -B et PlGF sont capables de stimuler la migration cellulaire de 12 lignées tumorales colorectales différentes. Tandis que, le VEGF-C,-D-E n'ont aucun effet sur la migration des cellules du CCR. Or, nous savons que le VEGFR1 lie les ligands suivants : VEGF-A, -B et PlGF, le VEGFR2 lie les ligands VEGF-A, -C, -D et -E, enfin le VEGFR3 lie uniquement les VEGF-C et -D. L'utilisation d'anticorps dirigés contre les VEGFR1 et VEGFR2 nous ont permis de déterminer les interactions récepteurs-ligands impliquées. En effet, lorsque nous avons provoqué le blocage du VEGFR1, la

stimulation de la migration des cellules du CCR par les ligands VEGF-A, -B et PlGF était atténuée. Cela suggère que l'augmentation de la migration observée après stimulation par les ligands VEGF-A, -B et PlGF passe notamment par le VEGFR1. A contrario, lorsque nous avons utilisé un anticorps bloquant le VEGFR2, ce dernier n'a eu aucun effet sur la migration des cellules du CCR après stimulation par le VEGF-A et -B, mais il a eu un effet d'atténuation de la migration des cellules du CCR après stimulation par le PlGF. Cela nous a notamment surpris puisque le PlGF n'est pas un ligand direct du VEGFR2. De plus, lorsque nous avons utilisé à la fois un anticorps anti-VEGFR1 et anti-VEGFR2, la diminution de la migration des cellules du CCR était encore plus importante que celle observée avec un seul anticorps bloquant. Cela suggère qu'en plus de l'implication des homodimères VEGFR1-VEGFR1, il existerait des hétérodimères VEGFR1-VEGFR2 qui seraient capables de médier la migration des cellules du CCR.

En effet, il a été montré dans des études précédentes que le PlGF uniquement était capable de stimuler la formation d'hétérodimères VEGFR1/VEGFR2^{256–258} puisqu'il a été observé chez les cellules endothéliales que des anticorps dirigés à la fois contre le VEGFR1 et le VEGFR2 avaient également une activité inhibitrice sur leur migration²⁵⁶. Cela est donc en accord avec nos résultats obtenus.

Nous nous sommes donc interrogés quant-à la fréquence à laquelle ces hétérodimères VEGFR1-VEGFR2 sont retrouvés. Mac Gabhann et al ont établi, en 2007, un algorithme pour déterminer les fréquences de dimérisation de ces sous unités. Ils en ont conclu qu'une sous unité en excès (10 fois de plus que l'autre) provoquerait une homodimérisation minimale de la sous unité dites en déficit. Ainsi, nous savons que dans le cas du CCR, les cellules présentent une quantité abondante en VEGFR1 comparée à celle en VEGFR2. En suivant l'algorithme, la majorité du VEGFR2 serait donc présente sous forme d'hétérodimères VEGFR1-VEGFR2 et non sous forme d'homodimères VEGFR2-VEGFR2²⁵⁹.

Nous nous sommes ensuite demandés quelle pouvait être leur activité (capacité à lier leurs ligands). Au vue de leur quantité relativement limitée, nous pouvons penser que leur implication est peu importante. Cependant, des études sur les cellules endothéliales ont montré qu'en dépit du fait que le ligand VEGF-A a une meilleure affinité pour le VEGFR1 que le VEGFR2, l'activité du VEGFR1 est toutefois 10 fois plus faible que celle du VEGFR2²⁶⁰. Dans le cas de xénogreffes du CCR humain, bien

que le VEGFR2 est présent en faible quantité, il a été montré que presque la totalité se trouvait sous sa forme active, tandis que malgré la quantité importante de VEGFR1 seulement 5 à 10% de ce dernier était actif. Ainsi, on pourrait finalement s'attendre à une activité plus élevée comparée aux homodimères VEGFR1 puisque ces hétérodimères pourraient tirer les avantages de la sous unité du VEGFR1 en ayant une affinité importante pour les ligands et ceux de la sous unité du VEGFR2 en montrant une activité efficace.

L'aflibercept étant une protéine « TRAP » constituée d'une sous unité du VEGFR1 et du VEGFR2, elle est capable « d'emprisonner » le VEGF-A, -B et le PlGF. Nous nous sommes donc demandés si l'aflibercept pouvait atténuer le phénomène de migration observée dans les cellules du CCR. Les résultats montrent que la migration de onze des douze lignées cellulaires du CCR (soit 92 %) a été inhibée par l'aflibercept à des concentrations utilisées en clinique. L'effet de l'aflibercept sur la migration des cellules du CCR a été observé peu importe la capacité à migrer des lignées (effet obtenu autant sur les SW620 à faible potentiel migratoire que sur les DLD-1 à fort potentiel migratoire). Ainsi, on confirme ici l'implication générale de la signalisation VEGF dans le phénomène de motilité des cellules tumorales colorectales.

La seule lignée faisant exception dans notre étude est la lignée LS174T. En effet, la migration de cette lignée n'est stimulée par aucun des ligands de la signalisation VEGF. Les anticorps dirigés contre le VEGFR1 et le VEGFR2 n'ont également eu aucun effet sur cette même lignée. Elle ne répond également pas au traitement par l'aflibercept. Ainsi, cela nous laisse penser que la mobilité cellulaire de cette lignée ne dépend pas de la signalisation VEGF.

En étudiant l'expression des récepteurs au VEGF, nous avons pu observer une corrélation entre la réponse à l'aflibercept et l'expression du VEGFR1. En effet, les cellules du CCR étudiées expriment le VEGFR1 à des niveaux élevés, mais variables (HCT-116 > SW480 > DLD1 > LS174T), et ce même ordre dans la variabilité est conservé pour les taux d'inhibition de la migration par l'aflibercept.

Nous montrons donc dans cette première étude que la migration des cellules du CCR est, en partie médiée par la signalisation VEGF. Cette migration implique à la fois des homodimères VEGFR1-VEGFR1 mais aussi des hétérodimères VEGFR1-VEGFR2. Sur un panel de 12 lignées cellulaires tumorales colorectales, 11 d'entre

elles répondent au traitement par l'aflibercept en montrant une atténuation de leur capacité à migrer. Ainsi, nous montrons pour la première fois que l'aflibercept possède un effet « anti-migratif » sur les lignées du CCR en plus de son action anti-angiogénique bien connue visant les cellules endothéliales.

Les découvertes concernant cette première étude, nous ont incités à poursuivre dans cette lancée et à comparer le potentiel migratoire des cellules endothéliales (CE) et des cellules du CCR ainsi que leur réponse à l'inhibition de la signalisation du VEGF.

Nous savons qu'il existe un lien étroit entre les cellules endothéliales et les cellules tumorales. Il a notamment été rapporté que la progression de la croissance tumorale était associée à une augmentation de la capacité à se mouvoir des cellules tumorales mais également des cellules endothéliales.

Nous nous sommes intéressés tout d'abord à l'observation de la morphologie de ces deux types cellulaires. En effet, il est connu qu'un phénotype plus fusiforme est souvent associé à un potentiel migratoire plus important. Toutes les cellules endothéliales présentent une morphologie de type mésenchymateuse. Quant aux cellules du CCR, les HCT-116 montrent une morphologie mésenchymateuse alors que les LoVo et les SW480 sont plutôt très jointives.

Nous avons donc étudié le pouvoir de ces cellules à migrer ou envahir les tissus. Nos résultats montrent que les cellules endothéliales et les cellules microvasculaires (HMEC) ont un pouvoir migratif et invasif beaucoup plus élevés que les cellules du CCR (obtention d'une différence de 30 fois plus entre les deux types cellulaires). Les cellules du CCR notamment les HCT-116 et les SW480 présentent un potentiel migratif similaire et non négligeable bien que la morphologie des SW480 ne soit pas propice à une migration cellulaire importante. Cela peut s'expliquer par le fait que les cellules SW480 et LoVo ne se déplaceraient pas comme des cellules individuelles mais plutôt en cohortes cellulaires avec préservation des jonctions cellulaires, on parle alors de migration collective ²⁶¹.

Bien que la migration et l'invasion des cellules endothéliales soient assez importantes, cela est observé uniquement en présence de sérum. Ainsi, ces phénomènes semblent dépendre énormément des facteurs externes, contrairement aux cellules tumorales telles que les SW480 qui semblent quant-à elles plutôt autonomes.

Il est connu que la signalisation VEGF est une signalisation « clé » au sein des cellules endothéliales mais également des cellules tumorales colorectales. Ainsi, nous avons dans un second temps cherché à déterminer l'expression des acteurs de la voie de signalisation VEGF (ligands et récepteurs) puisque nous pensons qu'il est possible que les facteurs externes impliqués dans cette migration et invasion importantes fassent partie de cette même voie.

L'étude de l'expression des récepteurs au VEGF révèle que les cellules endothéliales et microvasculaires expriment de manière similaire le VEGFR1 et le VEGFR2. Le co-récepteur NRP1 est exprimé de manière variable mais élevé dans ce même type cellulaire. Quant-aux cellules tumorales colorectales, ces dernières expriment de manière variable le VEGFR1, comme nous avons pu l'observer déjà lors de notre première étude. Le VEGFR2 et le NRP1 sont également retrouvés de manière assez faibles.

Il est connu dans le cas du CCR, que le VEGFR2 bien qu'étant très peu exprimé, quasiment la totalité des récepteurs sont sous forme active. C'est pourquoi, il est considéré comme un acteur important pour le développement tumoral. Cependant, ce paradigme est aujourd'hui remis en question puisqu'il est établi que le VEGFR1 est retrouvé dans de nombreuses tumeurs de patients souffrant de divers cancers (estomac, poumons, sein, myélome etc...) ^{247,260-263}. Dans le cas du CCR, plus de 90% des patients aux stade II et III de la maladie présentent des tumeurs avec une expression élevée de VEGFR1. Ce dernier est connu pour favoriser la migration cellulaire, aider à la survie cellulaire en cas de stress cellulaire. Il est ainsi associé à un mauvais pronostic vital ²⁶⁵.

Dans les cellules endothéliales, les rôles respectifs du VEGFR1 et du VEGFR2 pourraient être eux aussi remis en question. En effet, le VEGFR2 est de base considéré comme un régulateur positif de l'angiogenèse tandis que le VEGFR1 serait plutôt un régulateur négatif de l'angiogenèse. Toutefois, dans le cas complexe du cancer, l'expression élevée du VEGFR1 dans les cellules endothéliales associées aux tumeurs de patients atteints de CCR a été associée également à un mauvais pronostic vital ²⁶⁶.

De plus, Une étude récente montre qu'une expression élevée de VEGFR1 et une faible expression de VEGFR2 constituent un marqueur de pronostic néfaste pour la survie

sans métastase et la survie globale ²⁶⁷. Ces données cliniques sont clairement en contradiction avec le rôle suggéré de VEGFR1 en tant que régulateur négatif de l'angiogenèse et suggèrent que l'expression de VEGFR1 dans les cellules endothéliales associées aux tumeurs sert de régulateur positif de l'angiogenèse.

Au vue de l'implication potentiellement importante du VEGFR1 dans ces phénomènes cellulaires agressifs, nous avons étudié la sécrétion de ses deux principaux ligands : le VEGF-A et le PlGF. Les cellules endothéliales montrent une sécrétion faible de VEGF-A par rapport aux cellules du CCR qui en sécrètent de manière abondante, comme l'illustrent les cellules LoVo (jusqu'à 100 fois plus). Le PlGF est quant-à lui sécrété de manière variable dans les deux types cellulaires.

Une nouvelle fois, nous nous sommes demandé si l'aflibercept pouvait avoir une action sur la motilité de ces deux types cellulaires et s'il existait une différence d'efficacité entre le type endothélial et le type tumoral. Nos résultats révèlent que l'aflibercept montre un pouvoir inhibiteur de la migration et de l'invasion plus important sur les cellules du CCR que sur les cellules endothéliales (2 fois plus efficace environ).

Ainsi, nous avons montré que les cellules endothéliales ont une capacité à se mouvoir et envahir les tissus beaucoup plus importants que les cellules du CCR. Cependant, ces potentiels semblent être dépendant de facteurs externes pour les cellules endothéliales, ce qui les rendraient plus fragiles en conditions in vivo puisque le cœur d'une tumeur est hypoxique et pauvre en nutriments. Nous confirmons l'effet « anti-migratif » de l'aflibercept et montrons l'effet « anti-invasif » de ce dernier à la fois sur les cellules endothéliales mais également sur les cellules du CCR.

Maintenant que nous en savons un peu plus sur l'implication de la signalisation VEGF dans la motilité des cellules endothéliales et des cellules tumorales chimionaires, nous avons voulu étudier son implication cette fois ci sur des cellules tumorales dites chimiorésistantes. C'est donc le sujet de la dernière étude.

Premièrement, nous rappelons que les agents chimiothérapeutiques utilisés systématiquement pour le traitement des patients atteints de CCR sont le 5-FU, l'oxaliplatine (OXA) et l'irinotécan (SN38). Dans cette étude nous avons tout d'abord établi notre modèle. En effet, suite à l'exposition progressive et prolongée des HCT-116 (lignée parentale) aux trois agents de chimiothérapies nous avons pu obtenir des lignées dites chimiorésistantes (acquisition d'une résistance au traitement) : les HCT-

116/5FU, les HCT-116/OXA et les HCT-116/SN38 respectivement résistantes au 5FU, à l'oxaliplatine et au SN38.

Il a été rapporté que ces trois agents de chimiothérapie influencent la signalisation VEGF lorsqu'ils sont injectés en uni-dose. Nous avons cherché à voir si l'exposition prolongée aux agents de chimiothérapie (ou l'acquisition de la chimiorésistance) influence aussi la signalisation VEGF.

Nos résultats montrent que l'acquisition d'une chimiorésistance provoque un changement morphologique chez les trois lignées « filles » comparé à la lignée parentale. En effet, ces dernières acquièrent un phénotype plutôt mésenchymateux typique de cellules présentant des caractères plutôt agressifs.

Suite à cela, nous avons regardé si l'acquisition de la chimiorésistance provoque réellement un changement au niveau des processus cellulaires tels que la migration l'invasion et la capacité à « mimer » une structure vasculaire plus ou moins similaire à celle formée par les cellules endothéliales, c'est ce que l'on appelle la VM.

L'exposition prolongée au 5FU, à l'oxaliplatine ou au SN38 confère une augmentation de la motilité cellulaire à la fois en terme de migration et d'invasion. Cependant, seules les cellules ayant été exposées de manière prolongée au 5FU ou à l'oxaliplatine ont acquis la capacité à faire du mimétisme vasculaire. Cependant, une différence existe entre un réseau vasculaire « classique » et ce VM. En effet, le temps de latence (apparition du début du réseau vasculaire) est plus court pour les cellules endothéliales comparées aux cellules du CCR. Mais, la longueur maximale ainsi que la stabilité générale du réseau sont plus importantes et meilleure pour les cellules du CCR comparées aux cellules endothéliales. Les HCT-116/SN38 sont quant-à elle incapables de réaliser de la VM.

Nous avons cherché à montrer si la signalisation VEGF jouait un rôle dans cela étant donné que nous savons que les cellules du CCR possèdent une signalisation autocrine et paracrine au VEGF et que cette dernière est fortement impliquée dans la motilité des cellules comme nous avons pu le voir dans les deux études précédentes.

Il est connu dans la littérature que l'exposition prolongée à l'irinotécan (SN38) est associée à une diminution des niveaux de HIF1 dans les cellules, les animaux et les patients ²⁶⁸⁻²⁷⁰. Or HIF-1 joue le rôle de facteur de transcription pour le VEGF-A,

nous nous attendions donc à voir une diminution du VEGF-A. Cependant, nos résultats montrent que le VEGF-A a augmenté dans les cellules HCT-116/SN38 comparé à la lignée parentale. Du côté de l'expression des récepteurs, celle du VEGFR1 a été régulée à la baisse. L'hypothèse est donc que la signalisation VEGF semble avoir lieu malgré les niveaux bas de HIF-1 (régulation possible par un autre facteur)²⁷¹⁻²⁷³. Cette dernière est suffisante pour influencer la migration ou l'invasion cellulaire mais insuffisante pour que les cellules puissent faire du VM. La diminution du niveau d'expression du VEGFR1 en serait peut-être la cause.

Il est connu dans la littérature qu'une exposition aiguë à l'oxaliplatine est associée à une expression accrue du VEGF-A, du PlGF, du VEGFR1 et de la neuropiline 1⁷⁰. Nos résultats montrent quant-à eux qu'une exposition prolongée à l'oxaliplatine est accompagnée d'une forte augmentation de la sécrétion du VEGF-A (7 fois plus que la lignée parentale) et de l'expression du NRP1 (10 fois plus que la lignée parentale). En revanche, l'expression du VEGFR1 n'a été que légèrement augmentée alors qu'aucun changement détectable n'a été observé pour le PlGF.

Pour le 5-FU, cela est plus complexe car aucun changement dans la signalisation du VEGF n'a été observé après une exposition en bolus au 5-FU alors qu'une exposition continue s'est accompagnée d'une régulation à la hausse du VEGF-A^{66,70,274}. Les deux observations sont cliniquement pertinentes, puisque le 5-FU peut être administré soit sous forme de bolus, soit en perfusion continue. Nous observons que l'exposition prolongée au 5FU provoque une augmentation forte de la sécrétion en VEGF-A (4 fois) mais également en PlGF (2 fois plus). L'expression du VEGFR1 et du corécepteur NRP1 sont augmentées de manière significative.

Ainsi, l'exposition prolongée au 5-FU mais également à l'oxaliplatine s'est accompagnée de changements importants et persistants de la voie de signalisation VEGF. Ces observations semblent être assez similaires à celles obtenues après une exposition unique au médicament. L'exposition prolongée au SN-38 provoque une réaction différente qui s'expliquerait notamment par l'existence d'une voie de régulation alternative du VEGF-A (autre que celle impliquant HIF-1).

Le mimétisme vasculaire étant un concept plus ou moins novateur, il se révèle être très délétère pour les patients. En effet, le VM est associé à un mauvais pronostic vital avec un taux de survie à 5 ans très faible^{168,169}. Bien que le VM soit

probablement un processus multifactoriel, on pense que la signalisation du VEGF est une nouvelle fois impliquée à la fois au CCR et à d'autres types de tumeurs^{170,275,276}. Nos résultats montrent que le VM est uniquement stimulé par l'ajout de VEGF-A, mais pas de VEGF-B et PlGF.

Nous savons par nos études précédentes que la signalisation VEGF est donc impliquée dans le développement de ces phénomènes cellulaires agressifs que sont la migration, l'invasion, l'angiogenèse et le VM. Nous avons montré également que l'aflibercept, inhibiteur « TRAP » liant le VEGF-A, -B et le PlGF pouvait contrer partiellement quelques un de ces processus dans le cas des cellules chimionaires tumorales et endothéliales. Nous avons donc voulu tester son efficacité cette fois sur des cellules présentant une chimiorésistance acquise mais également sur ce nouveau processus de vascularisation qu'est le VM. Nos résultats révèlent que l'aflibercept permet une diminution d'environ 50% de la migration et de l'invasion cellulaire autant chez la lignée parentale que chez les trois lignées résistantes dérivées. On montre également ici que l'aflibercept a en effet « anti-vasculaire » sur ce réseau « sanguin » atypique que forme les lignées HCT-116/5FU et HCT-116/OXA.

Il est connu que le facteur tissulaire (facteur de coagulation III, thromboplastine) est exprimé par de nombreuses cellules tumorales, y compris les cellules du CCR²⁰⁵. Il existe même un lien étroit entre le VEGF et le TF, puisqu'il a été montré que le TF régulerait à la hausse le VEGF²⁷⁷. Nous avons donc déterminé les niveaux de TF sécrétés pour établir si l'augmentation des niveaux de VEGF-A sécrétés par les cellules résistantes aux médicaments pourrait être corrélée avec une augmentation de l'expression du TF.

Nos résultats montrent que les cellules HCT-116/5FU résistantes au 5FU sécrètent davantage de TF par rapport aux cellules parentales HCT-116. Tandis que, les cellules HCT-116/OXA et HCT-116/SN38 sécrètent un niveau beaucoup plus faible comparé à la lignée parentale (8 à 11 fois moins). Ainsi, nous en concluons que l'augmentation de la sécrétion de TF n'est pas corrélée à l'augmentation de la sécrétion du VEGF.

Cependant, il est intéressant d'étudier les conséquences sur le potentiel pro-thrombotique au vue des sécrétions différentielles du TF puisqu'il est connu que le cancer est souvent associé à des risques thrombotiques pouvant causer le décès du

patient. Or ici, nous avons noté déjà l'acquisition d'une certaine agressivité des cellules suite au développement de cette chimiorésistance ayant causée des changements permanents dans la signalisation VEGF.

Nous remarquons clairement que le potentiel pro-coagulant des cellules est fortement corrélé à l'expression du TF. En effet, les HCT-116/5FU qui présentaient le taux de sécrétion le plus élevé en TF, possède le statut procoagulant le plus important. Tandis que les HCT-116/SN38 ont le profil procoagulant le plus faible.

Ainsi nos résultats montrent qu'une exposition prolongée à des agents chimiothérapeutiques utilisés cliniquement interfère avec la signalisation VEGF et peut favoriser la progression de la tumeur, comme en témoignent l'augmentation de la motilité des cellules tumorales et la formation de réseaux cellulaires de type VM. Nous révélons également que l'aflibercept possède une activité anti-migrative, anti-invasive mais également anti-vasculaire directes sur les cellules du CCR en plus de son activité inhibitrice connue sur les cellules endothéliales

Enfin, nous pouvons conclure que mes travaux de thèse nous aurons permis de caractériser davantage la signalisation VEGF dans le cas du cancer colorectal en étudiant à la fois les cellules tumorales chimionaïves, les cellules endothéliales potentiellement associées aux cellules tumorales, ainsi que les cellules tumorales chimiorésistantes.

Nous avons pu montrer que les cellules tumorales colorectales chimionaïves ou non présentent un pouvoir migratif ou invasif variable, souvent associé à un changement morphologique avec l'acquisition d'un phénotype fusiforme dit « mésenchymateux ». Les cellules endothéliales possèdent quant-à elle une migration et une invasion cellulaires beaucoup plus importantes que les cellules tumorales colorectales, ce qui se révèlent surement être un avantage lorsqu'elles s'associent aux cellules cancéreuses pour promouvoir la croissance et la dissémination tumorales.

La voie de signalisation VEGF connue pour être une signalisation fortement impliquée dans l'angiogenèse, se révèle aujourd'hui jouer un rôle dans le développement de phénotype agressif mettant en jeu notamment les phénomènes cellulaires tels que la

migration, l'invasion, l'angiogenèse ou encore plus récemment le mimétisme vasculaire. Mes travaux de thèse montrent que le VEGF-A (et dans certains cas le PlGF) semble promouvoir la migration, l'invasion, l'angiogenèse endothéliale ou tumorale (mimétisme vasculaire) à la fois dans les cellules tumorales colorectales mais également dans les cellules endothéliales potentiellement associées. Nous avons prouvé que ce dernier agissait notamment via le VEGFR1 qui peut être présent soit sous sa forme d'homodimères soit sous sa forme d'hétérodimères associée au VEGFR2.

L'aflibercept, inhibiteur angiogénique approuvé en deuxième intention dans le cancer colorectal montre pour la première fois au sein de mes travaux, qu'en plus de son activité anti-angiogénique établie sur les cellules endothéliales associées aux cellules tumorales, ce dernier présente un pouvoir « anti-migratif », « anti-invasif » sur les cellules du CCR et sur les cellules endothéliales associées. De plus, il aurait également une action inhibitrice sur ce phénomène de vascularisation particulier qu'est le mimétisme vasculaire (Vasculogenèse formée uniquement par des cellules tumorales).

En perspective de ces travaux, il aurait été intéressant de trouver un ou plusieurs autres acteurs impliqués dans l'un de ces phénomènes cellulaires dits agressifs puisque nous voyons ici que l'aflibercept n'a qu'un effet partiel sur tous ces processus. Cela signifie donc que d'autres voies de signalisation sont surement impliquées. Cependant l'étude des cytokines impliquées notamment dans l'angiogenèse n'a permis d'isoler aucun autre acteur potentiel. Ainsi, cela nous prive d'une potentielle seconde option thérapeutique qui aurait peut-être pu rentrer en combinaison avec l'aflibercept.

Sachant qu'au sein d'une tumeur, il y a souvent collaboration des cellules tumorales colorectales et des cellules endothéliales, il serait intéressant d'étudier l'impact des cellules endothéliales sur la migration et l'invasion des cellules colorectales, ou inversement, en réalisant des expériences de co-cultures directes ou indirectes.

Enfin concernant cette vascularisation tumorale, les cellules endothéliales étant les cellules spécialisées dans l'angiogenèse, il serait intéressant de voir le comportement de ces cellules en présence de cellules tumorales colorectales capables de faire du

mimétisme vasculaire. En effet, si nous mettons en contact des cellules endothéliales et des cellules tumorales, la question suivante se poserait :

Est-ce que le réseau vasculaire endothélial et le réseau vasculaire tumorale seraient liés mais totalement distincts ou si au contraire il y aurait une parfaite collaboration des cellules tumorales et des cellules endothéliales à tel point que le réseau vasculaire obtenu serait un réseau hybride formé des deux types cellulaires « mélangés » ?

Modelization of Blood-Borne Hypercoagulability in Myeloma: A Tissue-Factor-Bearing Microparticle-Driven Process

Loula Papageorgiou^{1,2} Kutaiba Alhaj Hussen^{2,3} Sandrine Thouroude¹ Elisabeth Mbemba¹
Hélène Cost⁴ Laurent Garderet⁵ Ismail Elalamy^{1,2} Annette Larsen¹ Patrick Van Dreden⁴
Meletios A. Dimopoulos⁶ Mohamad Mohty⁷ Grigoris T. Gerotziafas^{1,2}



Modelization of Blood-Borne Hypercoagulability in Myeloma: A Tissue-Factor-Bearing Microparticle-Driven Process

Loula Papageorgiou^{1,2} Kutaiba Alhaj Hussien^{2,3} Sandrine Thouroude¹ Elisabeth Mbemba¹
Hélène Cost⁴ Laurent Garderet⁵ Ismail Elalamy^{1,2} Annette Larsen¹ Patrick Van Dreden⁴
Meletios A. Dimopoulos⁶ Mohamad Mohty⁷ Grigoris T. Gerotziafas^{1,2}

¹Research Group "Cancer, Haemostasis and Angiogenesis," INSERM UMR_S 938, Centre de Recherche Saint-Antoine, Faculty of Medicine, Institut Universitaire de Cancérologie, Sorbonne Universités, Paris, France

²Service d'Hématologie Biologique Hôpital Tenon, Hôpitaux Universitaires de l'Est Parisien, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Paris, France

³INSERM U976, Université Paris-Diderot, École Pratique des Hautes Études/PSL Research University, Institut de recherche Saint-Louis, Hôpital Saint-Louis, Paris, France

⁴Clinical Research, Diagnostica Stago, Conzeville, France

⁵Research Group "Proliferation and Differentiation of Stem Cells" INSERM UMR_S 938, Centre de Recherche Saint-Antoine, Faculty of Medicine, Institut Universitaire de Cancérologie, Sorbonne Universités, Paris, France

Address for correspondence: Grigoris T. Gerotziolas, MD, PhD, Research Group "Cancer, Haemostasis and Angiogenesis," INSERM U938, Centre de Recherche Saint-Antoine, Paris, Cedex 20, France (e-mail: otgiorgos.gerotziolas@aphp.fr).

⁶Department of Clinical Therapeutics, School of Medicine, National and Kapodistrian University of Athens, Athens, Greece

⁷Department of Hematology and Cell Therapy, Saint Antoine Hospital, Hôpitaux Universitaires de l'Est Parisien, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Sorbonne University, Paris, France

TH Open 2019:3:e340-e347

Abstract

Introduction Hypercoagulability is a common blood alteration in newly diagnosed chemotherapy naïve patients with multiple myeloma. The identification of the procoagulant potential of cancer cells, which is principally related to tissue factor (TF) expression, attracts particular interest. The mechanisms by which myeloma plasma cells (MPCs) activate blood coagulation have been poorly investigated.

Aim To identify the principal actors related with MPCs that boost thrombin generation (TG).

Methods TF and annexin V expression by MPCs and MPC-derived microparticles (MPC-dMPs) was analyzed by flow cytometry. TF activity (TFa) and TF gene expression were also determined. TG in the presence of MPCs or MPC-dMPs was assessed with the calibrated automated thrombogram assay (CAT) in normal human PPP and in plasma depleted of factor VII or XII. TG was also assessed in plasma spiked with MPCs and MPC-dMPs.

Results MPC-dMPs expressed approximately twofold higher levels of TF as compared with MPCs. The TFA expressed by MPC-dMPs was significantly higher compared with that expressed by MPCs. MPCs and MPC-dMPs enhanced TG of human plasma. TG was significantly higher with MPC-dMPs compared with MPCs.

Conclusion MPCs indirectly induce blood-borne hypercoagulability through the release of MPC-dMPs rich in TF. Since MPCs, expressing low TFa, represent a weak procoagulant stimulus, the hypercoagulability at the microenvironment could be the resultant of MPCdMPs rich in TF.

Keywords

- multiple myeloma
- thrombin generation
- tissue factor
- microparticles
- hypercoagulability

received
April 16, 2019
accepted after revision
September 9, 2019

DOI: <https://doi.org/10.1055/s-0039-1700885>
ISSN: 2512-9465

© 2019 Georg Thieme Verlag KG
Stuttgart · New York

License terms



Introduction

Multiple myeloma is a plasma cell malignancy characterized by bone marrow infiltration leading to multiple lytic bone lesions, renal failure, anemia, and increased risk of venous thromboembolism.¹ Newly diagnosed, chemotherapy naïve patients with multiple myeloma present high levels of procoagulant phospholipids in plasma along with an increased concentration of biomarkers which indicate activation of blood coagulation and endothelial cells.²

The identification of the procoagulant potential of cancer cells, principally mediated from tissue factor (TF), attracts particular interest since it is closely related with cancer aggressiveness, proangiogenic properties, resistance to anticancer treatment, and metastatic potential.³ Enhanced fibrin formation as well as dots with low permeability and resistant to lysis have been observed in patients with multiple myeloma.⁴ Myeloma plasma cells (MPCs) are potential initiators of the process leading to hypercoagulability. Fibrin together with activated platelets may either act as a shield of cancer cells against the access of anticancer drugs or alter the efficiency of the immunosurveillance system.⁵⁻⁹

The crosstalk between cancer cells, plasma clotting mechanism, platelets, and endothelial cells enhances hypercoagulability.¹⁰ Previous studies showed that mediators in this process vary according to the histological type of cancer cells.^{11,12} Cancer cells from solid tumors induce thrombin generation by the expression of TF and the induction of factor XII (FXII) activation.¹² However, the intensity of the procoagulant potential varies according to the histological cancer cell type.¹¹⁻¹³ Cancer cells release procoagulant microparticles which have a major role in the amplification of their procoagulant potential and thrombin generation enhancement.¹⁴ Recently, attention is being drawn on circulating extracellular vesicles released by cancer cells which are believed to mediate cell-to-cell communication.¹⁵ From a conceptual point of view, MPCs would enhance hypercoagulability in their microenvironment. However, the interactions of MPCs with their microenvironment leading to blood coagulation activation have been poorly investigated. In the present study, we set up an experimental model that allows the identification of the procoagulant fingerprint of MPCs and MPC-derived microparticles (MPC-dMPs). In addition, this experimental model allows simulation of their impact on thrombin generation and elucidation of some aspects of the mechanisms by which MPCs induce hypercoagulability.

Materials and Methods

Human Plasma

Samples of fresh frozen normal platelet poor plasma (PPP; Ref 00539) and immunodepleted lyophilized plasma deficient of clotting factor VII (FVII) or FXII were purchased from Stago (Gennevilliers, France).

MPCs and MPC-dMPs

Preparation of MPCs

Human MPCs (RPMI 8226 and U266) obtained from American Type Culture Collection (ATCC; Rockville, Maryland, United States) were used. Human MPC lines grow in suspension. Cells were cultured in an RPMI 1640 medium (ATCC) supplemented with 10% (v/v) FBS and 1% (v/v) penicillin/streptomycin. Cell viability was assessed before each assay by trypan blue exclusion and cells with at least 90% viability were used. Experiments were conducted once a count of 1,000 cells/ μ L in the condition media was reached. At this point, 25 mL of MPCs suspension was centrifuged at 1,500 $\times$ g for 10 minutes at 25°C. Pellets of the MPCs were suspended at 1 mL of PPP yielding a MPC count of 25,000 cells/mL of PPP. Subsequently, serial dilutions of MPCs in PPP were performed and used in thrombin generation experiments. In preliminary experiments the procoagulant potential of the two MPC lines (RPMI 8226 and U266) was compared. Both cell lines showed similar procoagulant properties (– Fig. 1). For the sake of simplicity, we present herein the data from experiments performed on the RPMI8226 cell line. The count of MPCs which produce a plateau effect on thrombin generation parameters was determined by constructing a “concentration–response” curve. The concentration of MPCs in PPP employed in most of the experiments (1,000 cells/mL) was situated at the plateau.

Preparation of MPC-dMPs

MPC-dMPs were isolated from the conditioned media of the MPC cultures by differential centrifugation. In brief, when the number of MPC in the conditioned media was 1,000 cells/ μ L and centrifugation for cell separation was performed as described above, 25 mL of supernatant was collected and was centrifuged at 1,500g for 10 minutes at 25°C. The supernatant was collected and centrifuged at 20,000g for 20 minutes at 4°C to pellet the MPC-dMPs. The pellets with MPC-dMPs were suspended in 1 mL of PPP. In preliminary experiments, “concentration–response” curves on thrombin

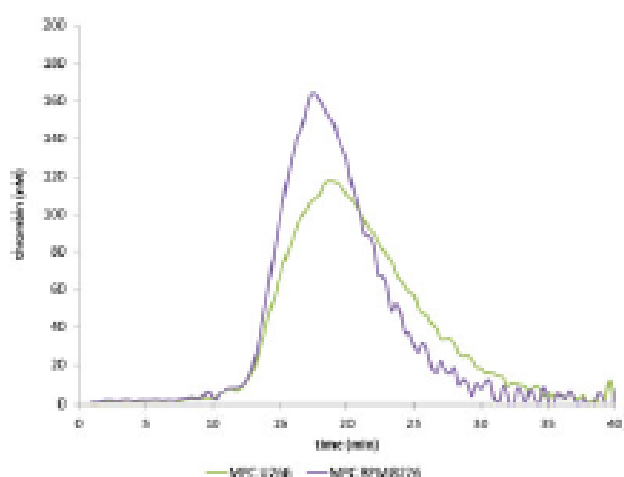


Fig. 1 Representative thrombograms comparing thrombin generation triggered in the presence of MPCs ($10^4/\mu$ L) RPMI 8226 or U266. Data are representative of five experiments. MPCs, myeloma plasma cells.

generation assay were obtained to determine the count of MPC-dMPs which produced a plateau effect on thrombogram parameters. This procedure led to a sample preparation of a standardized MPC-dMP number, used for the experiments.

The procoagulant fingerprint of MPCs and MPC-dMPs was compared on the basis of the respective counts which were situated at the plateau of their effect on thrombin generation.

Counting of MPC-dMPs

Microparticles were counted with the commercially available Zymuphen MP Activity assay purchased from Hyphen Biomed (Neuville sur Oise, France). The assay, performed according to manufacturer instructions, measured the procoagulant activity related to the concentration of phosphatidylserine (PS) and was performed using a microtiter plate sensitized with streptavidin and biotinylated annexin V, and then stabilized. Based on a functional assay, the concentration of microparticles was expressed at nM of PS. All experiments were performed with a standardized number of MPC-dMPs that corresponds to 26.2 nM of PS equivalent, derived from a MPC concentration of 1,000 cells/ μ L and situated at the plateau effect of the MPC-dMPs on thrombin generation. The employed concentration of MPC-dMPs (26 nM) was situated at the linear part of the plateau at the concentration-response curves obtained in the thrombin generation assay.

Molecular Analysis of the Procoagulant Fingerprint of MPCs and MPC-dMPs

Specific TF activity

Cell suspensions (20 μ L) of MPCs and MPC-dMPs were used at counts which produced a plateau effect on thrombin generation (1,000 cells/ μ L and 26.2 nM, respectively) were washed three times with phosphate-buffered saline (PBS), suspended in PBS and incubated at 4°C for 30 minutes. Subsequently, samples were centrifuged for 30 minutes at 1,000 g and supernatants were collected and kept frozen at -80°C until measurement of TF activity (TFa) as previously described.¹⁶ TFa was also measured in normal plasma, the same used for thrombin generation experiments in which plasma cells or MPC-dMPs were suspended.

Flow Cytometry

Cell suspensions (20 μ L) of MPCs and MPC-dMPs were used at counts which produced a plateau effect on thrombin generation (1,000 cells/ μ L and 26.2 nM, respectively). MPCs were suspended in PBS, and centrifuged at 1,500 g for 10 minutes at 25°C. For TF assessment, cells resuspended in PBS were incubated with 10 μ L of a control mouse immunoglobulin IgG1 FITC (BD Pharmingen, 555748) and with IgG1 PE (Beckman Coulter, A07796, France) or with a mouse monoclonal antibody against human TF FITC (Sekisui Diagnostics, United States, 4507CG) and with an anti-CD138 PE (Beckman Coulter, Ref A54190, France) for 30 minutes at room temperature in the dark. After incubation, cells were washed once with PBS and then suspended in PBS for TF assessment. Sample data were acquired, collected, and analyzed using an FC 500 flow cytometer (Beckman Coulter, Villepinte, France) with CXP Acquisition

(Beckman Coulter, Miami, Florida, United States) and Flow JO Analysis software (TreeStar Inc.). For the standardization of microparticles by flow cytometry, an initial microparticle-size gate was set with the help of Megamix (Biocytex, Marseille, France, 7801), a mixture of microbeads of three different sizes (3.0, 0.5, and 0.9 μ m) which was developed to confirm microparticles' size. To separate true events from background noise and unspecific binding of antibodies to debris, we defined microparticles as particles that were between 0.5 and 0.9 μ m in diameter and we explored whether they presented positive staining for TF and/or annexin V. For annexin V staining, the microparticle suspension was incubated for 30 minutes with 10 μ L PE-annexin V (kit, BD Pharmingen, 559763). Annexin V-PE with PBS without calcium was used as control. TF staining was done as in cells. Analyses were performed on a flow cytometer (Navios) using a Megamix bead-calibrated protocol (BioCytex).

Polymerase Chain Reaction

Total RNA was extracted from MPCs and reversely transcribed according to a standardized procedure; briefly, 1 μ g cDNA was amplified using the GoTaq 180 qPCR Master mix (Promega) and the Mx3000P qPCR system according to the manufacturer's protocol. Annealing temperature was 60°C. Quantitative reverse transcriptase PCR (RT-PCR) was used to measure the relative mRNA levels using TaqMan assays for TF (Sigma Aldrich). The following primers were used: TF L5' AGG GTC TTC ATG CTC CGA AA 3', TF IL5' TGT ACA AAG GCAGG ACTG CG 3'. The reaction was inhibited after 40 cycles. Ct values were normalized against the endogenous control B-actin (from Sigma Aldrich). Relative mRNA expression was calculated using the comparative threshold method ($2^{-\Delta\Delta C_t}$).

Calibrated Automated Thrombogram Assay

In each well of a 96-well microplate, a volume of 80 μ L PPP was spiked with 20 μ L of PPP containing MPCs or MPC-dMP suspension prepared and counted as described in the previous paragraphs. Counts of MPCs and MPC-dMPs in the PPP at the wells of the microplate are fivefold lower than the initial counts. Thrombin generation was initiated by adding a 20 μ L triggering solution containing CaCl_2 (16.7 mM final concentration) and a fluorogenic substrate (Z-Gly-Gly-Arg-AMC, 417 μ M final concentration). Thrombin generation was assessed with the Calibrated Automated Thrombogram according to the manufacturer instruction. Among all thrombogram parameters, we analyzed lag time, peak of thrombin, and the mean rate index (MRI). The last one reflects the rate of the propagation phase of thrombin generation [calculated by the formula: $\text{MRI} = \text{peak}/(\text{ttPeak} - \text{lag time})$]. The acquisition time of thrombogram parameters was defined at 40 minutes.

In separate experiments, thrombin generation in 80 μ L of normal PPP (without any exogenous addition of MPCs or MPC-dMPs) was performed using 20 μ L of MP-reagent (4 μ M procoagulant phospholipids), or PPP-reagent Low (1 pM TF and 4 μ M procoagulant phospholipids), or PPP-reagent (5 pM TF and 4 μ M procoagulant phospholipids). Thrombin generation was performed according to manufacturer instructions as described above.

All reagents were from Stago (Gennevilliers, France). The control consisted of a mixture of 80 μ L PPP and 20 μ L NaCl. All counts of MPCs and MPC-dMPs mentioned in thrombin generation experiments refer to the mother suspensions.

Thrombin Generation in the Presence of an Anti-TF Antibody

In separate experiments, 50 μ L of a working suspension of MPCs (500 cells/ μ L) in normal PPP was mixed with an equal volume of PPP containing an anti-TF mouse monoclonal antibody 4509 (American Diagnostica, Neuville-sur-Oise, France). Mouse IgG1 isotype (100 μ g/mL) or NaCl was used in control experiments. Cells were incubated with the anti-TF antibody or the isotype IgG1 for 15 minutes at 37°C. The experimental conditions were defined after conducting preliminary experiments on thrombin generation, with variable concentrations of the cells and the anti-TF monoclonal antibody. Cells were used at the lower active concentration in plasma and the antibody was used at a concentration of 25 μ g/mL. At this concentration the anti-TF antibody completely inhibited the effect of the PPP-reagent (5 pM TF and 4 μ M procoagulant phospholipids) on thrombin generation.

Statistical Analysis

All experiments were performed for at least five times. Results are shown as mean $\pm$ standard deviation. Data were normally distributed, and a paired sample *t*-test was applied to compare parameter differences in all methods. The level of statistical significance was set at 0.05. Two-sided values of $p < 0.05$ were considered as statistically significant. The SPSS statistical package (version 21.0 IBM) was used for statistical analysis.

Results

Tissue Factor and Procoagulant Phospholipid Expression by MPCs and MPC-dMPs

Flow cytometry analysis showed that MPC-dMPs expressed approximately twofold higher levels of TF as compared with MPCs ($p < 0.05$) (–Fig. 2, frames A and B). MPC-dMPs were positive for the expression of procoagulant phospholipids, whereas this was not the case for the MPCs (–Fig. 2, frame B). MPCs and MPC-dMPs possessed specific TFa. The TFa expressed by MPC-dMPs (26.2 nM) was significantly higher as compared with that expressed by MPCs at the count of 1,000 cells/ μ L (11.95 ± 1.9 and 6.07 ± 0.4 ng/mL, respectively; $p < 0.05$; –Fig. 3). The PCR analysis showed an expression of TF gene by MPCs (relative expression of 0.178).

Procoagulant Potential of Plasma Cells and MPC-dMPs

Impact of Plasma Cells on Thrombin Generation

MPCs induced a significant decrease of the lag time and a significant increase of the MRI and peak as compared with the control experiment (PPP without any cell addition; –Table 1). MPCs at counts equal or higher than 250 cells/ μ L had a significant impact in lag-time reduction. A plateau effect was

observed at MPCs counts equal or higher than 500 cells/ μ L (data not shown).

In order to explore which pathway of blood coagulation is activated by MPCs, experiments were done in plasma depleted of FVII or FXII. In the control experiment (PPP + CaCl_2), no detectable thrombin generation was observed in the absence of any of the two clotting factors. The MPCs (1,000 cells/ μ L) suspended in FVII-deficient plasma did not induce any detectable thrombin generation. In contrast, MPCs suspended in FXII-deficient plasma induced thrombin generation (–Table 1).

Impact of MPC-dMPs on Thrombin Generation

MPC-dMPs induced a significant decrease of the lag time and a significant increase of the MRI and peak, as compared with the control experiment (PPP without any MPCs or MPC-dMP addition). MPC-dMPs at counts equal or higher than 20 nM had a plateau effect on thrombin generation.

In order to explore which pathway of blood coagulation is activated by MPC-dMPs (26.2 nM), experiments were done in plasma depleted of FVII or FXII. MPC-dMPs suspended in FVII-deficient plasma did not induce any detectable thrombin generation. Suspension of MPC-dMPs in FXII-deficient plasma led to thrombin generation. Data are summarized in –Table 1.

Comparison of the Procoagulant Activities of MPCs and MPC-dMPs to Standard Concentration of TF and Phospholipids

In the presence of MPCs (1,000 cells/ μ L), the lag time was significantly longer, and the peak and MRI were significantly lower as compared with those observed in the presence of standard preparations of TF (5 or 1 pM) and procoagulant phospholipids (4 μ M, respectively). MPC-dMPs (26.2 nM) induced a higher peak and MRI as compared with the standard preparations of TF and procoagulant phospholipids. Representative thrombograms are shown in –Fig. 4.

Both MPCs and MPC-dMPs significantly enhanced thrombin generation as compared either with that induced by 1 pM of TF without any additional phospholipids or with that induced by procoagulant phospholipids (4 μ M) in the absence of TF (–Table 1).

Impact of Anti-TF Monoclonal Antibodies on Thrombin Generation Induced by MPCs and MPC-dMPs

The addition of anti-TF monoclonal antibodies to PPP with MPCs and MPC-dMPs significantly prolonged the lag time and *ttPeak* and decreased the MRI and the peak of thrombin generation compared with control experiments without anti-TF antibodies. Interestingly, the relative inhibition of thrombin generation was higher for MPCs compared with MPC-dMPs (–Table 2).

Discussion

It is well established that cancer cells express TF, the major trigger of blood coagulation.³ The levels of TF expressed by cancer cells enhance thrombin generation principally via the

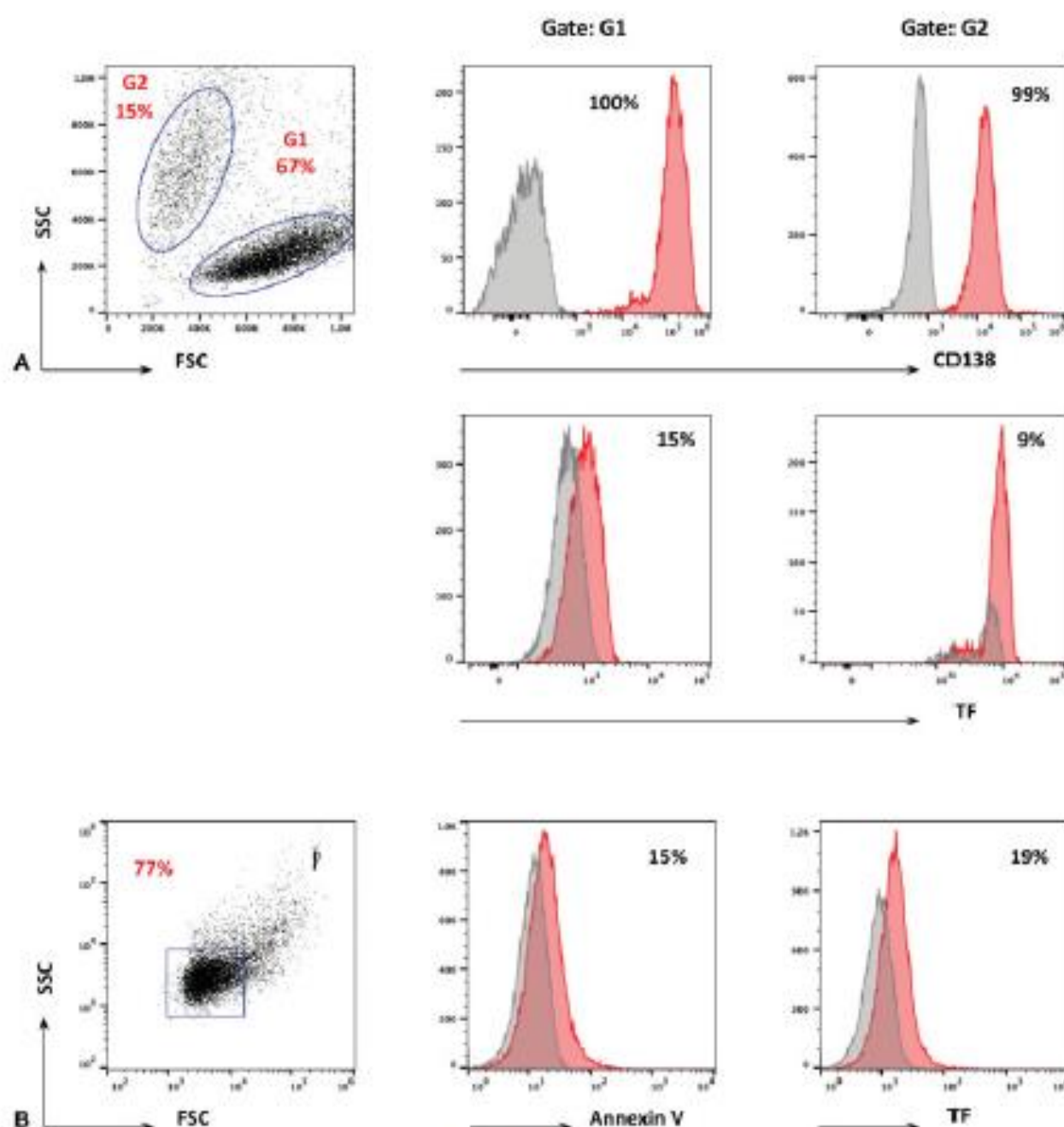


Fig. 2 Tissue factor (TF) expression in myeloma plasma cells (MPCs). RPMI 8226 cell lines of MPCs were cultured in RPMI medium, 10% FBS, and 1% penicillin-streptomycin, and flow cytometry analysis for TF expression was performed as described in Materials and Methods in MPCs (frame A) or in MPCdMPs (frame B) using the following antibodies: PE CD138, FITC TF, and PE annexin V. Data are representative of three experiments. MPCdMPs, myeloma plasma cell-derived microparticles.

TF pathway, whereas their procoagulant potency varies according to their histological type.^{11–13} The present study investigates the interactions of MPCs with the blood coagulation process and particularly with the thrombin generation process. Two issues related to the procoagulant fingerprint of MPCs were investigated: (1) the intensity of the procoagulant potential expressed by MPCs and MPCdMPs and (2) the evaluation of the relative roles of the TF pathway and the intrinsic pathway of blood coagulation activation initiated by MPCs and MPCdMPs.

In MPCs, the expression of TF gene, the presence of TF protein on cell membrane, and the procoagulant activity of TF are detectable. Comparison with data previously published by our group using the same experimental model^{11–13} confirms that MPCs express significantly lower TF as compared with cancer cells from solid tumors such as breast cancer cells MCF7 and pancreatic cancer cells BXP3.

MPCs release microparticles into their microenvironment which show marked procoagulant activity. Indeed, the MPCdMPs express approximately twofold higher levels of TF as

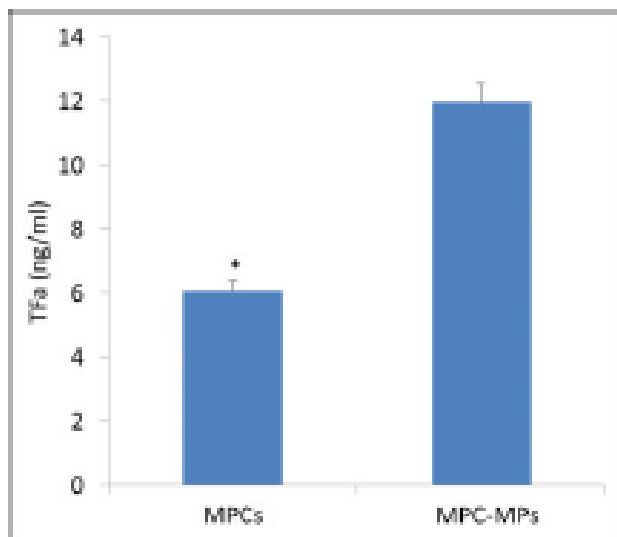


Fig. 3 TFa expression by MPC-dMPs was significantly higher compared with that by myeloma plasma cells (* $p < 0.05$). Values are means $\pm$ SD of three experiments. MPC-dMPs, myeloma plasma cell-derived microparticles; SD, standard deviation; TFa, tissue factor activity.

compared to their origin cells. Accordingly, the activity of TF expressed by MPC-dMPs is about twice higher as compared with that of MPCs. In addition, MPC-dMPs show significant expression of procoagulant phospholipids.

MPCs accelerated the initiation phase (lag-time decrease) and amplified the propagation phase (MRI increase) of thrombin generation. This resulted in a higher thrombin peak compared with the basic thrombin generation potential of normal plasma. However, the potency of MPCs to generate thrombin was significantly lower as compared with that induced by concentrations of 5 pM TF and 4 μ M of procoagulant phospholipids, which are considered to be the concentration of TF and procoagulant phospholipids estimated to be exposed during normal hemostasis following vascular injury.¹⁷ Thus, the procoagulant potential of MPCs appears to be lower than that attained from the normal function of blood coagulation system. In contrast, MPC-dMPs showed a more potent effect on thrombin generation as compared with their cells of origin. Assessment of thrombin generation in FVII- or FXII-deficient plasma allowed the evaluation of which clotting pathway is activated by MPCs and MPC-dMPs. The complete abrogation of thrombin generation in plasma depleted of FVII reveals that the contact system and FXII activation have a very limited role—if any—on thrombin generation induced by MPCs. The persistence of thrombin generation in plasma depleted in FXII further demonstrates the importance of the TF/FVIIa pathway activation by MPCs. The experiments with the specific anti-TF antibody showed that both MPCs and MPC-dMPs induced thrombin generation in a TF-dependent manner. However, taking into consideration that the antibody used selectively inhibits the procoagulant activity of TF, we could not exclude that some of the procoagulant properties of the MPCs and MPC-dMP are due to the signalization function of TF.

Table 1 Effect of MPCs (1,000 cells/ μ L) or MPC-dMPs on thrombin generation in normal PPP and in PPP depleted of FVII or FXII

Thrombogram parameters	Normal PPP						FVII deficient		FXII deficient		
	4 μ M procoagulant phospholipids						No procoagulant phospholipids		No procoagulant phospholipids		
	5 pM TF	1 pM TF	No TF	1 pM TF	No TF	MPCs	No TF	MPCs	No TF	MPCs	MPC-dMPs
Lag time (min)	3 $\pm$ 1.2	4.7 $\pm$ 0.9	13.8 $\pm$ 3.1	9.2 $\pm$ 0.6	17 $\pm$ 0.6	8 $\pm$ 1.7 ^{ab}	> 44	> 44	> 44	17 $\pm$ 2.1 ^c	13 $\pm$ 1.8 ^c
Peak (nM)	186 $\pm$ 5.6	89.1 $\pm$ 12.1	81.4 $\pm$ 2.1	46.9 $\pm$ 11.5	73 $\pm$ 5.6	120 $\pm$ 30 ^{ab}	0	0	0	28 $\pm$ 1.7 ^c	84 $\pm$ 3.2 ^c
MRI (nM/min)	53 $\pm$ 1.6	52.4 $\pm$ 45.7	47.6 $\pm$ 3.2	5.8 $\pm$ 3.1	15 $\pm$ 2.4	34 $\pm$ 15 ^{ab}	0	0	0	28 $\pm$ 2.6 ^c	19 $\pm$ 0.6 ^c

Abbreviations: FVII, factor VII; FXII, factor XII; MPCs, myeloma plasma cell-derived microparticles; MRI, mean rate index; PPP, platelet poor plasma.

Note: PPP-reagent, 5 pM of TF, and 4 μ M procoagulant phospholipids. Comparison with thrombin generation triggered in the presence of standard concentrations of TF and procoagulant phospholipids. Values are the mean $\pm$ SD of five experiments.

^a $p < 0.05$ versus PPP + CaCl₂.

^b $p < 0.05$ versus PPP + PPP-reagent.

^c $p < 0.05$ versus def-FXII + CaCl₂.

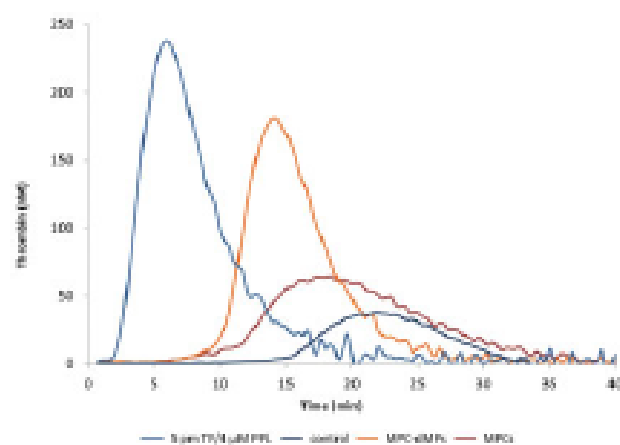


Fig. 4 Comparison of thrombin generation triggered in the presence of MPCs or MPC-dMPs in normal human PPP versus that triggered by 5 pM TF and 4 µM procoagulant phospholipids. Thrombin generation in recalcified PPP without any exogenous addition of procoagulant trigger is also depicted. Representative thrombograms of one out of five experiments. MPCs, myeloma plasma cells; PPP, platelet poor plasma.

Based on data presented herein, we conclude that MPCs and MPC-dMPs activate blood coagulation principally via the TF pathway activation. The contact system activation has a secondary role in this process.

These data lead to the concept that myeloma-related hypercoagulability is the resultant of the MPCs procoagulant properties combined with the procoagulant elements of the microenvironment. Following this concept, we assume that MPC-dMPs released by MPCs into the microenvironment enhance the weak procoagulant activity of MPCs. This weak procoagulant stimulus of MPCs and the stronger one expressed by the MPC-dMPs have an impact on the formation of a local fibrin network and could have a protector effect from both the immunosurveillance system and the access of antimyeloma treatment. All the above are issues that merit further investigation.

Extrapolation of the findings of this study in patients should be cautious. The present study provides evidence for the modelization of the procoagulant interactions between the MPCs and their plasma microenvironment and shows that the MPC-dMP is the principal vector of hypercoagulability.

To the best of our knowledge, the present study reports for the first time that MPCs function as a weak stimulus of thrombin generation but amplify the procoagulant stimulus by releasing MPC-dMPs. The MPC-dMPs, which express about a twofold higher amount of TF as compared with MPCs as well as procoagulant phospholipids, induce a TF-dependent activation of blood coagulation and are the principal vectors of the procoagulant stimulus in the plasma microenvironment. Due to their critical role in hypercoagulability, procoagulant MPC-dMPs could be a potential target for the evaluation of both the biological activity of MPCs and the assessment of the thrombogenic potential.

Table 2 Impact of TF inhibition by a specific anti-TF antibody on thrombin generation in normal PPP induced by MPC or MPC-dMPs

	NaCL + anti-TF	NaCL + IgG	MPCs + IgG	MPC-dMPs + IgG	MPCs + anti-TF	MPC-dMPs + anti-TF
Lag time (min)	> 44	> 44	7.9 ± 1.5	6.5 ± 1.3	> 44 ^a	20 ± 3.2 ^a
Peak (nM)	0	0	118 ± 33	186 ± 25	0 ^a	40 ± 12 ^a
MRI (nM/min)	0	0	32 ± 13	68.2 ± 19	0 ^a	12 ± 1 ^a

Abbreviations: IgG, immunoglobulin G; MPC, myeloma plasma cell; MPC-dMPs, myeloma plasma cell-derived microparticles; MRI, mean rate index; PPP, platelet poor plasma; TF, tissue factor.
Note: Values are the mean ± SD of three experiments.
^ap < 0.001 versus the control experiments (MPC + IgG and MPC-dMPs + IgG, respectively).

Authors' Contributions

L.P. did the experiments, has made substantial contributions to study design and organization, acquisition, analysis, and interpretation of data, and has been involved in drafting the manuscript. K.A.H. had substantial contribution in analysis and interpretation of the data from flow cytometry measurements. S.T. did the PCR experiments and interpreted the corresponding results. E.M. did the cultures of the cancer cells and prepared the samples with microparticles. H.C. was involved in the cultures of the cancer cells and thrombin generation experiments. L.G. contributed to the design of the study and the acquisition of the MPC cultures. I.E. was involved in the critical revision of the manuscript. A.L. critically revised the manuscript. P.V.D. has made substantial contribution to the design of the study, the interpretation of the data, and the writing and editing of the manuscript. M.A.D. critically revised the manuscript. M.M. contributed to critical revision of the manuscript. G.T.G. as the principal investigator has made substantial contributions to conception and design of the study, analysis, and interpretation of data, was involved in drafting the manuscript, gave the final approval of the version to be published, and agreed to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

Conflict of Interest

None declared.

Acknowledgments

The authors wish to acknowledge Ms. Hayat Mokrani and Mr. Matthieu Grusse for their skillful technical assistance. The study was supported by an unrestricted grant from Stago France and by the "Association de Recherche sur la Thrombose et l'Evaluation de son Risque."

References

1. Fotiou D, Gerotziolas G, Kastritis E, Dimopoulos MA, Terpos E. A review of the venous thrombotic issues associated with multiple myeloma. *Expert Rev Hematol* 2016;9(07):695–706
2. Fotiou D, Sergentanis TN, Papageorgiou I, et al. Longer procoagulant phospholipid-dependent clotting time, lower endogenous thrombin potential and higher tissue factor pathway inhibitor concentrations are associated with increased VTE occurrence in patients with newly diagnosed multiple myeloma: results of the prospective RQADMAP-MM-CAT study. *Blood Cancer J* 2018;8(11):102
3. Van Dreden P, Elalamy I, Gerotziolas GT. The role of tissue factor in cancer-related hypercoagulability, tumor growth, angiogenesis and metastasis and future therapeutic strategies. *Crit Rev Oncol* 2017;22(3–4):219–248
4. Undas A, Zubikiewicz-Uznarska L, Helbig G, et al. Induction therapy alters plasma fibrin clot properties in multiple myeloma patients: association with thromboembolic complications. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2015;26(06):621–627
5. Egyud LG, Lipinski B. Significance of fibrin formation and dissolution in the pathogenesis and treatment of cancer. *Med Hypotheses* 1991;36(04):336–340
6. Palumbo JS, Talmage KE, Massari JV, et al. Platelets and fibrin (ogen) increase metastatic potential by impeding natural killer cell-mediated elimination of tumor cells. *Blood* 2005;105(01):178–185
7. Gay LJ, Felding-Habermann B. Contribution of platelets to tumour metastasis. *Nat Rev Cancer* 2011;11(02):123–134
8. Egan K, Cooke N, Kenny D. Living in shear: platelets protect cancer cells from shear induced damage. *Clin Exp Metastasis* 2014;31(06):697–704
9. Wojtukiewicz MZ, Hempel D, Sierko E, Tucker SC, Honn KV. Thrombin-unique coagulation system protein with multifaceted impacts on cancer and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 2016;35(02):213–233
10. Falanga A, Schieppati F, Russo D. Cancer tissue procoagulant mechanisms and the hypercoagulable state of patients with cancer. *Semin Thromb Hemost* 2015;41(07):756–764
11. Gerotziolas GT, Galea V, Mbemba E, et al. Tissue factor overexpression by human pancreatic cancer cells BXPc3 is related to higher prothrombotic potential as compared to breast cancer cells MCF7. *Thromb Res* 2012;129(06):779–786
12. Rousseau A, Larsen AK, Van Dreden P, Sabbah M, Elalamy I, Gerotziolas GT. Differential contribution of tissue factor and factor XII to thrombin generation triggered by breast and pancreatic cancer cells. *Int J Oncol* 2017;51(06):1747–1756
13. Marchetti M, Dianz U, ten Cate H, Falanga A. Characterization of the thrombin generation potential of leukemic and solid tumor cells by calibrated automated thrombography. *Haematologica* 2012;97(08):1173–1180
14. Rousseau A, Van Dreden P, Khatechi A, Larsen AK, Elalamy I, Gerotziolas GT. Procoagulant microparticles derived from cancer cells have determinant role in the hypercoagulable state associated with cancer. *Int J Oncol* 2017;51(06):1793–1800
15. Maacha S, Bhat AA, Jimenez I, et al. Extracellular vesicles-mediated intercellular communication: roles in the tumor microenvironment and anti-cancer drug resistance. *Mol Cancer* 2019;18(01):55
16. Van Dreden P, Rousseau A, Savoure A, Lenormand B, Fontaine S, Vasse M. Plasma thrombomodulin activity, tissue factor activity and high levels of circulating procoagulant phospholipid as prognostic factors for acute myocardial infarction. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2009;20(08):635–641
17. Butenas S, van't Veer C, Mann KG. "Normal" thrombin generation. *Blood* 1999;94(07):2169–2178

ANNEXE 2 : Liste d'abstracts

S Thouroude, P Van Dreden, GT Gerotziafas, AK Larsen.

Acquired chemoresistance of colorectal cancer (CRC) cells is accompanied by pro-invasive VEGF-signaling.

13th annual seminar of St Antoine Research Center (CRSA). Gouvieux, France. November 2017.

➤ **Poster presentation**

A Bouygues, L Louadi, S Thouroude, B Chibaudel, JP Thierry, A de Gramont, AK Larsen.
The mesenchymal phenotype and the response to VEGF-targeted agents in colorectal cancer.

13th annual seminar of St Antoine Research Center (CRSA). Gouvieux, France. November 2017.

➤ **Poster presentation**

AK Larsen, C Trindade, A Bouygues, L Louadi, S Thouroude, S Klinz, A Kalra, JAP Henriques, AE Escargueil, B Chibaudel, A de Gramont, P Mésange.
Influence of liposomal irinotecan (nal-IRI) and non-liposomal irinotecan alone and in combination, on tumor growth and angiogenesis in colorectal cancer (CRC) models.
ASCO GI (Gastrointestinal Cancers Symposium organized by the American Society for Clinical Oncology). San Francisco, USA. January 2018.

➤ **Poster presentation**

S Thouroude, M Kolski, P Van Dreden, GT Gerotziafas, AK Larsen.

Acquired drug resistance is accompanied by pro-invasive signaling networks in colorectal cancer models.

EORTC PAMM group (Pharmacology and Molecular Mechanisms group of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer). Rome, Italy. February 2018.

➤ **Poster presentation**

S Thouroude, P Van Dreden, GT Gerotziafas, AK Larsen.

Prolonged chemotherapeutics stress is accompanied by pro-invasive signaling in colorectal cancer models.

19th Doctoral School Days. Cordeliers Research Center, Paris, France. May 2018.

➤ **Poster presentation**

S Thouroude, P Van Dreden, GT Gerotziafas, AK Larsen.

Chemoresistant colorectal cancer (CRC) cells show increased invasive potential which is part is mediated by VEGF-signaling and can be attenuated by VEGF-directed agents.

The International Society on Thrombosis and Haemostasis, ISTH. Dublin, Ireland. July 2018.

➤ **Poster presentation**

S Thouroude, P Van Dreden, B Chibaudel, A de Gramont, GT Gerotziafas, AK Larsen.

Acquired chemoresistance of colorectal cancer (CRC) cells is accompanied by pro-invasive VEGF-signaling that can be attenuated by aflibercept.

ESMO (European Society for Medical Oncology). Munich, Germany. October 2018.

- **Poster presentation**
- ***This is a major Conference in Clinical Oncology with around 24,000 participants***

S Thouroude, P Van Dreden, GT Gerotziafas, AK Larsen.
Acquired chemoresistance of colorectal cancer (CRC) cells is accompanied by pro-invasive VEGF-signaling. 20th Doctoral School Days. Cordeliers Research Center, Paris, France. March 2019.

- **Poster presentation**

S Thouroude, P Van Dreden, GT Gerotziafas, AK Larsen.
Prolonged chemotherapeutic stress is accompanied by pro-invasive signaling in colorectal cancer models.

The XXVII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis and 65th Annual Scientific and Standardization Committee, ISTH. Melbourne, Australia. July 2019.

- **Poster presentation**

S Thouroude, P Van Dreden, GT Gerotziafas, AK Larsen.
Chemotherapeutic stress is accompanied by pro-invasive signaling in colorectal cancer.

24th World Congress on Advances in Oncology and 24th International Symposium on Molecular Medicine. Sparta, Greece. October 2019.

- ***Selected for oral presentation.***

S Thouroude, P Van Dreden, GT Gerotziafas, AK Larsen.
Acquired chemoresistance of colorectal cancer (CRC) cells is accompanied by pro-invasive VEGF-signaling. 15th annual seminar of St Antoine Research Center (CRSA). Lieusaint, France. November 2019.

- **Poster presentation**
- ***Price for poster teasing.***

S Thouroude, P Van Dreden, GT Gerotziafas, AK Larsen.
Chemotherapeutic stress is accompanied by an aggressive vascularization process with a high thrombogenic potential in colorectal cancer models.

The International Society on Thrombosis and Haemostasis, ISTH. Virtual Congress. July 2020.

- ***E-Poster presentation***

S Thouroude, P Van Dreden, GT Gerotziafas, AK Larsen.
Prolonged chemotherapeutic stress is accompanied by an aggressive and singular vascularization process with a high thrombogenic potential in Colorectal Cancer.

Society of Thrombosis and Hemostasis Research, Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung, GTH. Virtual Congress. February 2021.

- ***E-Poster presentation***



BIBLIOGRAPHIE



1. Finlay A Macrae et al. Colorectal cancer: Epidemiology, risk factors, and protective factors. (2019).
2. Gautier Defossez, Sandra Le Guyader-Peyrou, & Zoé Uhry. Estimations nationales de l'incidence et de la mortalité par cancer en France métropolitaine entre 1990 et 2018. *Synthèse. Saint-Maurice : Santé publique France* **20**, (2019).
3. Amersi, F., Agustin, M. & Ko, C. Y. Colorectal Cancer: Epidemiology, Risk Factors, and Health Services. *Clin. Colon Rectal Surg.* **18**, 133–140 (2005).
4. Willett, W. C. Diet and Cancer: An Evolving Picture. *JAMA* **293**, (2005).
5. Hagggar, F. & Boushey, R. Colorectal Cancer Epidemiology: Incidence, Mortality, Survival, and Risk Factors. *Clin. Colon Rectal Surg.* **22**, 191–197 (2009).
6. Shaukat, A., Dostal, A., Menk, J. & Church, T. R. BMI Is a Risk Factor for Colorectal Cancer Mortality. *Dig. Dis. Sci.* **62**, 2511–2517 (2017).
7. Oruç, Z. & Kaplan, M. A. Effect of exercise on colorectal cancer prevention and treatment. *World J. Gastrointest. Oncol.* **11**, 348–366 (2019).
8. Wilkins, T., McMechan, D. & Talukder, A. Colorectal Cancer Screening and Prevention. *Colorectal CANCER* **97**, 11 (2018).
9. Farrukh, A. & Mayberry, J. F. Surveillance for colorectal cancer and chemoprevention in ulcerative and Crohn's colitis: The need for clinical strategies to increase effectiveness. *JGH Open* **3**, 370–373 (2019).
10. Eaden, J. A., Abrams, K. R. & Mayberry, J. F. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. 10.
11. Canavan et al. - 2006 - Meta-analysis colorectal and small bowel cancer r.pdf.
12. Lu, Y. et al. Increased risk of colorectal cancer in patients diagnosed with breast cancer in women. *Cancer Epidemiol.* **41**, 57–62 (2016).
13. Medina Pabón, M. A. & Babiker, H. M. A Review Of Hereditary Colorectal Cancers. in *StatPearls* (StatPearls Publishing, 2019).

14. Société Nationale Française de Gastro-Entérologie. Oncogénétique digestive. *Fondam. Pathol. Dig.* **14**, 1–8 (2014).
15. Ferron, M., Praz, F. & Pocard, M. Génétique du cancer colorectal. *Ann. Chir.* **130**, 602–607 (2005).
16. Karoui, M., Tresallet, C., Brouquet, A., Radvanyi, H. & Penna, C. Carcinogénèse colorectale. *Mise Au Point* 8 (2007).
17. Kuipers, E. J. *et al.* Colorectal cancer. *Nat. Rev. Dis. Primer* **1**, 15065 (2015).
18. Douillard, J.-Y. *et al.* Panitumumab–FOLFOX4 Treatment and RAS Mutations in Colorectal Cancer. *N. Engl. J. Med.* **369**, 1023–1034 (2013).
19. Testa, U., Pelosi, E. & Castelli, G. Colorectal Cancer: Genetic Abnormalities, Tumor Progression, Tumor Heterogeneity, Clonal Evolution and Tumor-Initiating Cells. *Med. Sci.* **6**, 31 (2018).
20. Zhao, Y. *et al.* P53-R273H mutation enhances colorectal cancer stemness through regulating specific lncRNAs. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **38**, 379 (2019).
21. Li, X.-L. p53 mutations in colorectal cancer- molecular pathogenesis and pharmacological reactivation. *World J. Gastroenterol.* **21**, 84 (2015).
22. Laurenty, A.-P., Selves, J. & Guimbaud, R. Biomarqueurs des cancers colorectaux utiles en pratique clinique. *Assoc. Fr. Form. Médicale Contin. En Hépatogastro-Entérologie POST'U*, 9 (2014).
23. Boland, C. R. & Goel, A. Microsatellite Instability in Colorectal Cancer. *Gastroenterology* **138**, 2073–2087.e3 (2010).
24. Collura, A. *et al.* Instabilité des microsatellites et cancer: De l'instabilité du génome à la médecine personnalisée. *médecine/sciences* **35**, 535–543 (2019).
25. Yurgelun, M. B., Goel, A., Boland, C. R., Stoffel, E. M., & Investigators of the Great Lakes-New England Early Detection Research Network (GLNE-EDRN). Microsatellite instability in colorectal adenomas and hyperplastic polyps in Lynch syndrome. *Hered. Cancer Clin. Pract.* **9**, O4 (2011).

26. Kim, T.-M., Laird, P. W. & Park, P. J. The Landscape of Microsatellite Instability in Colorectal and Endometrial Cancer Genomes. *Cell* **155**, 858–868 (2013).
27. Mojarad, E. N. *et al.* Low Level of Microsatellite Instability Correlates with Poor Clinical Prognosis in Stage II Colorectal Cancer Patients. *J. Oncol.* **2016**, 1–9 (2016).
28. Curtin, K., Slattery, M. L. & Samowitz, W. S. CpG Island Methylation in Colorectal Cancer: Past, Present and Future. *Pathol. Res. Int.* **2011**, 1–8 (2011).
29. Ashktorab, H. & Brim, H. DNA Methylation and Colorectal Cancer. *Curr. Colorectal Cancer Rep.* **10**, 425–430 (2014).
30. Abdelmaksoud-Dammak, R. *et al.* METHYLATION DES PROMOTEURS DE GENES ASSOCIES A LA CANCEROGENESE COLORECTALE : IMPACT CLINIQUE ET PRONOSTIC POUR DES PATIENTS TUNISIENS. 8–16 (2015).
31. Lopez-Serra, P. & Esteller, M. DNA methylation-associated silencing of tumor-suppressor microRNAs in cancer. *Oncogene* **31**, 1609–1622 (2012).
32. van Rijnsoever, M., Elsaleh, H., Joseph, D., McCaul, K. & Iacopetta, B. CpG Island Methylator Phenotype Is an Independent Predictor of Survival Benefit from 5-Fluorouracil in Stage III Colorectal Cancer. **9**, 7 (2003).
33. Freeman, H. J. Early stage colon cancer. *World J. Gastroenterol.* **19**, 8468 (2013).
34. Brouwer, N. P. M. *et al.* The Impact of Primary Tumor Location in Synchronous Metastatic Colorectal Cancer: Differences in Metastatic Sites and Survival. *Ann. Surg. Oncol.* (2019) doi:10.1245/s10434-019-08100-5.
35. Colorectal Cancer - Statistics. *Cancer.Net* <https://www.cancer.net/cancer-types/colorectal-cancer/statistics> (2020).
36. Weiser, M. R. AJCC 8th Edition: Colorectal Cancer. *Ann. Surg. Oncol.* **25**, 1454–1455 (2018).
37. ONCOLOR, ONCOLIE & CAROL. Référentiel «Côlon». <http://oncologik.fr/referentiels/interregion/colon> (2017).

38. Phelip, J.-M. Cancer du côlon : classification moléculaire et anatomique nécessaire à la décision thérapeutique. **POST'U**, 8 (2018).
39. Guinney, J. *et al.* The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat. Med.* **21**, 1350–1356 (2015).
40. Stintzing, S. *et al.* Consensus molecular subgroups (CMS) of colorectal cancer (CRC) and first-line efficacy of FOLFIRI plus cetuximab or bevacizumab in the FIRE3 (AIO KRK-0306) trial. *Ann. Oncol.* **30**, 1796–1803 (2019).
41. Lenz, H.-J. *et al.* Impact of Consensus Molecular Subtype on Survival in Patients With Metastatic Colorectal Cancer: Results From CALGB/SWOG 80405 (Alliance). *J. Clin. Oncol.* **37**, 1876–1885 (2019).
42. Mooi, J. K. *et al.* The prognostic impact of Consensus Molecular Subtypes (CMS) and its predictive effects for bevacizumab benefit in metastatic colorectal cancer: molecular analysis of the AGITG MAX clinical trial. *Ann. Oncol.* (2018).
43. INCA. Les traitements du cancer du côlon. *Collection guides patients Cancer info* (2010).
44. Buccafusca, G., Proserpio, I., Tralongo, A. C., Rametta Giuliano, S. & Tralongo, P. Early colorectal cancer: diagnosis, treatment and survivorship care. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **136**, 20–30 (2019).
45. Andrade, J. P., Warner, S. G. & Fong, Y. Treatment of metastatic colorectal cancer: innovations in surgical techniques. *J. Surg. Oncol.* **119**, 653–659 (2019).
46. Karoui, M. Métastases hépatiques synchrones dans le CCR : conduite à tenir vis-à-vis du primitif. *POST'U* 6 (2017).
47. Kuipers, E. J. *et al.* Colorectal cancer. *Nat. Rev. Dis. Primer* **1**, 15065 (2015).
48. Aparicio, T., Ducreux, M. & Chaussade, S. 5-fluorouracile : données sur le métabolisme et place actuelle dans le traitement des cancers digestifs. 10 (2019).

49. Lemaitre, F. *et al.* Suivi thérapeutique pharmacologique du 5-fluorouracile : mise au point et recommandations du groupe STP-PT de la SFPT et du GPCO-Unicancer. *Bull. Cancer (Paris)* **105**, 790–803 (2018).
50. Vodenkova, S. *et al.* 5-fluorouracil and other fluoropyrimidines in colorectal cancer: Past, present and future. *Pharmacol. Ther.* **206**, 107447 (2020).
51. Barin-Le Guellec, C. *et al.* Toxicities associated with chemotherapy regimens containing a fluoropyrimidine: A real-life evaluation in France. *Eur. J. Cancer* **124**, 37–46 (2020).
52. Umemura, M. *The Japanese Pharmaceutical Industry: Its Evolution and Current Challenges*. (Taylor & Francis, 2011).
53. Tournigand, C. & Faivre, S. Oxaliplatin (1R,2R-diaminocyclohexane) - Mécanisme d'action, activité préclinique et clinique. **6** (1999).
54. Jerremalm, E. *et al.* Alkaline Hydrolysis of Oxaliplatin—Isolation and Identification of the Oxalato Monodentate Intermediate. *J. Pharm. Sci.* **91**, 2116–2121 (2002).
55. Alcindor, T. & Beauger, N. Oxaliplatin: a review in the era of molecularly targeted therapy. *Curr. Oncol.* **18**, 18–25 (2011).
56. Riddell, I. A. & Lippard, S. J. 1. CISPLATIN AND OXALIPLATIN: OUR CURRENT UNDERSTANDING OF THEIR ACTIONS. in *Metallo-Drugs: Development and Action of Anticancer Agents* (eds. Sigel, A., Sigel, H., Freisinger, E. & Sigel, R. K. O.) 1–42 (De Gruyter, 2018). doi:10.1515/9783110470734-001.
57. Faivre, S., Chan, D., Salinas, R., Woynarowska, B. & Woynarowski, J. M. DNA strand breaks and apoptosis induced by oxaliplatin in cancer cells. *Biochem. Pharmacol.* **66**, 225–237 (2003).
58. Raymond, E., Faivre, S., Chaney, S., Woynarowski, J. & Cvitkovic, E. Cellular and Molecular Pharmacology of Oxaliplatin. *Mol. Cancer Ther.* **1**, 10 (2002).
59. David Khayat, M. D. The Role of Irinotecan and Oxaliplatin in the Treatment of Advanced Colorectal Cancer. *Cancer Network* <https://www.cancernetwork.com/review-article/role-irinotecan-and-oxaliplatin-treatment-advanced-colorectal-cancer> (2001).

60. Robert, J. & Rivory, L. Pharmacology of irinotecan. *Drugs Today Barc. Spain* 1998 **34**, 777–803 (1998).
61. Rothenberg, M. L. Irinotecan (CPT-11): Recent Developments and Future Directions—Colorectal Cancer and Beyond. *The Oncologist* **6**, 66–80 (2001).
62. Fuchs, C., Mitchell, E. P. & Hoff, P. M. Irinotecan in the treatment of colorectal cancer. *Cancer Treat. Rev.* **32**, 491–503 (2006).
63. Pfizer. Monographie de produit : IRINOTECAN. *Pfizer Can. SRI* (2019).
64. Ramesh, M., Ahlawat, P. & Srinivas, N. R. Irinotecan and its active metabolite, SN-38: review of bioanalytical methods and recent update from clinical pharmacology perspectives. *Biomed. Chromatogr.* **24**, 104–123 (2010).
65. Bala, V. *et al.* Enabling Oral SN38-Based Chemotherapy with a Combined Lipophilic Prodrug and Self-Microemulsifying Drug Delivery System. *Mol. Pharm.* **13**, 3518–3525 (2016).
66. Albertsson, P., Lennernäs, B. & Norrby, K. Low-dose continuous 5-fluorouracil infusion stimulates VEGF-A-mediated angiogenesis. *Acta Oncol.* **48**, 418–425 (2009).
67. Albertsson, P., LENNERNÄS, B. & Norrby, K. Low-dosage metronomic chemotherapy and angiogenesis: topoisomerase inhibitors irinotecan and mitoxantrone stimulate VEGF-A-mediated angiogenesis. *APMIS* **120**, 147–156 (2012).
68. Weekes, J., Lam, A. K.-Y., Sebesan, S. & Ho, Y.-H. Irinotecan therapy and molecular targets in colorectal cancer: A systemic review. *World J. Gastroenterol.* **15**, 3597 (2009).
69. Paré-Brunet, L. *et al.* Genetic variations in the VEGF pathway as prognostic factors in metastatic colorectal cancer patients treated with oxaliplatin-based chemotherapy. *Pharmacogenomics J.* **15**, 397–404 (2015).
70. Fan, F. *et al.* Effect of chemotherapeutic stress on induction of vascular endothelial growth factor family members and receptors in human colorectal cancer cells. *Mol. Cancer Ther.* **7**, 3064–3070 (2008).

71. Pullarkat, S. T. *et al.* Thymidylate synthase gene polymorphism determines response and toxicity of 5-FU chemotherapy. *Pharmacogenomics J.* **1**, 65–70 (2001).
72. Muro, K. *et al.* Irinotecan plus S-1 (IRIS) versus fluorouracil and folinic acid plus irinotecan (FOLFIRI) as second-line chemotherapy for metastatic colorectal cancer: a randomised phase 2/3 non-inferiority study (FIRIS study). *Lancet Oncol.* **11**, 853–860 (2010).
73. Díaz-Rubio, E. *et al.* Oxaliplatin as single agent in previously untreated colorectal carcinoma patients: A phase II multicentric study. *Ann. Oncol.* **9**, 105–108 (1998).
74. Cunningham, D. *et al.* Randomised trial of irinotecan plus supportive care versus supportive care alone after fluorouracil failure for patients with metastatic colorectal cancer. *The Lancet* **352**, 1413–1418 (1998).
75. de Gramont, A. *et al.* Leucovorin and Fluorouracil With or Without Oxaliplatin as First-Line Treatment in Advanced Colorectal Cancer. *J. Clin. Oncol.* **18**, 2938–2947 (2000).
76. Tournigand, C. *et al.* FOLFIRI Followed by FOLFOX6 or the Reverse Sequence in Advanced Colorectal Cancer: A Randomized GERCOR Study. *J. Clin. Oncol.* **22**, 229–237 (2004).
77. Colucci, G. *et al.* Phase III Randomized Trial of FOLFIRI Versus FOLFOX4 in the Treatment of Advanced Colorectal Cancer: A Multicenter Study of the Gruppo Oncologico Dell'Italia Meridionale. *J. Clin. Oncol.* **23**, 4866–4875 (2005).
78. Programme de gestion thérapeutique des médicaments. Les schémas FOLFIRI, FOLFOX et XELOX en traitement de première intention du cancer colorectal métastatique. (2010).
79. Thérapies ciblées - Cancer du côlon. <https://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Les-cancers/Cancer-du-colon/Therapies-ciblees>.
80. Di Fiore, F., Oden-Gangloff, A. & Michel, P. Cancer colorectal métastatique et thérapies ciblées. *Côlon Rectum* **3**, 230–238 (2009).
81. Cunningham, D. *et al.* Cetuximab Monotherapy and Cetuximab plus Irinotecan in Irinotecan-Refractory Metastatic Colorectal Cancer. *N. Engl. J. Med.* **351**, 337–345 (2004).

82. Jerzak, K. J., Berry, S., Ko, Y.-J., Earle, C. & Chan, K. K. W. Cetuximab plus irinotecan versus panitumumab in patients with refractory metastatic colorectal cancer in Ontario, Canada: Cmab + I versus Pmab in patients with refractory mCRC. *Int. J. Cancer* **140**, 2162–2167 (2017).
83. Fayette, J. & Blay, J. Thérapies ciblées et immunomodulation dans les tumeurs solides. *Réanimation* **15**, 297–302 (2006).
84. Van Cutsem, E. *et al.* Open-Label Phase III Trial of Panitumumab Plus Best Supportive Care Compared With Best Supportive Care Alone in Patients With Chemotherapy-Refractory Metastatic Colorectal Cancer. *J. Clin. Oncol.* **25**, 1658–1664 (2007).
85. Lièvre, A. & Laurent-Puig, P. Facteurs prédictifs de réponse aux traitements anti-REGF dans le cancer colorectal. *Bull Cancer* **95**, 8 (2008).
86. Amram, M.-L., Benamran, A. & Roth, D. Thérapie ciblées en oncologie digestive. **7**, 5 (2011).
87. Cacheux, W., Tourneau, C. L., Baranger, B., Mignot, L. & Mariani, P. Targeted biotherapy in metastatic colorectal carcinoma: Current practice. *J. Visc. Surg.* **148**, 12–18 (2011).
88. Rossi, A. *et al.* The potential role of nintedanib in treating colorectal cancer. *Expert Opin. Pharmacother.* **18**, 1153–1162 (2017).
89. Fuchs, C. S., Marshall, J. & Barrueco, J. Randomized, Controlled Trial of Irinotecan Plus Infusional, Bolus, or Oral Fluoropyrimidines in First-Line Treatment of Metastatic Colorectal Cancer: Updated Results From the BICC-C Study. *J. Clin. Oncol.* **26**, 689–690 (2008).
90. Noguerido, A. *et al.* The safety of ramucirumab for the treatment of colorectal cancer. *Expert Opin. Drug Saf.* **17**, 945–951 (2018).
91. Mechanism of Action | ZALTRAP® (ziv-aflibercept).
<http://www.zaltrap.com/hcp/about/mechanism-of-action>.
92. Van Cutsem, E. *et al.* Addition of Aflibercept to Fluorouracil, Leucovorin, and Irinotecan Improves Survival in a Phase III Randomized Trial in Patients With Metastatic Colorectal Cancer Previously Treated With an Oxaliplatin-Based Regimen. *J. Clin. Oncol.* **30**, 3499–3506 (2012).

93. Martchenko, K. *et al.* Last line therapy with sorafenib in colorectal cancer: A retrospective analysis. *World J. Gastroenterol.* **22**, 5400–5405 (2016).
94. Mésange, P. *et al.* Combinations of Bevacizumab and Erlotinib Show Activity in Colorectal Cancer Independent of RAS Status. *Clin. Cancer Res.* **24**, 2548–2558 (2018).
95. Riesco-Martinez, M. C., Sanchez-Torre, A. & Garcia-Carbonero, R. Safety and efficacy of nintedanib for the treatment of metastatic colorectal cancer. *Expert Opin. Investig. Drugs* **26**, 1295–1305 (2017).
96. Colorectal Cancer - Types of Treatment. *Cancer.Net* <https://www.cancer.net/cancer-types/colorectal-cancer/types-treatment> (2012).
97. Le, D. T. *et al.* Phase II Open-Label Study of Pembrolizumab in Treatment-Refractory, Microsatellite Instability–High/Mismatch Repair–Deficient Metastatic Colorectal Cancer: KEYNOTE-164. *J. Clin. Oncol.* **38**, 11–19 (2020).
98. Ganesh, K. *et al.* Immunotherapy in colorectal cancer: rationale, challenges and potential. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **16**, 361–375 (2019).
99. Siegel, R. L. *et al.* Colorectal cancer statistics, 2017: Colorectal Cancer Statistics, 2017. *CA. Cancer J. Clin.* **67**, 177–193 (2017).
100. Béliveau, R. Une bactérie qui fait obstacle à la chimiothérapie. *Journal de la santé de Montréal* (2017).
101. Krishna, R. & Mayer, L. D. Multidrug resistance (MDR) in cancer Mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs. *Eur. J. Pharm. Sci.* **19** (2000).
102. Keogh, J. P. Membrane Transporters in Drug Development. in *Advances in Pharmacology* vol. 63 1–42 (Elsevier, 2012).
103. Mourez, M., Jéhanho, M., Hofnung, M. & Dassa, E. Rôle, fonctionnement et structure des transporteurs à ATP binding cassette (ABC). *médecine/sciences* **16**, 386 (2000).

104. Hu, T., Li, Z., Gao, C.-Y. & Cho, C. H. Mechanisms of drug resistance in colon cancer and its therapeutic strategies. *World J. Gastroenterol.* **22**, 6876 (2016).
105. Liu, Z. *et al.* Establishment and biological characteristics of oxaliplatin-resistant human colon cancer cell lines. *Chin. J. Cancer* **29**, 661–667 (2010).
106. Ekblad, L., Kjellström, J. & Johnsson, A. Reduced drug accumulation is more important in acquired resistance against oxaliplatin than against cisplatin in isogenic colon cancer cells. *Anticancer. Drugs* **21**, 523–531 (2010).
107. Fu, D. & Arias, I. M. Intracellular trafficking of P-glycoprotein. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **44**, 461–464 (2012).
108. Meijer, G. A. *et al.* Increased expression of multidrug resistance related proteins Pgp, MRP1, and LRP/MVP occurs early in colorectal carcinogenesis. *J. Clin. Pathol.* **52**, 450–454 (1999).
109. Burger, H. *et al.* Chronic imatinib mesylate exposure leads to reduced intracellular drug accumulation by induction of the ABCG2 (BCRP) and ABCB1 (MDR1) drug transport pumps. *Cancer Biol. Ther.* **4**, 747–752 (2005).
110. Klappe, K., Hinrichs, J. W. J., Kroesen, B.-J., Sietsma, H. & Kok, J. W. MRP1 and glucosylceramide are coordinately over expressed and enriched in rafts during multidrug resistance acquisition in colon cancer cells. *Int. J. Cancer* **110**, 511–522 (2004).
111. Crowley, E., McDevitt, C. A. & Callaghan, R. Generating inhibitors of P-glycoprotein: where to, now? *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **596**, 405–432 (2010).
112. Bidet, M. *et al.* The Hedgehog receptor patched functions in multidrug transport and chemotherapy resistance. *Mol. Cancer Res. MCR* **10**, 1496–1508 (2012).
113. Hasanovic, A. & Mus-Veteau, I. Targeting the Multidrug Transporter Ptch1 Potentiates Chemotherapy Efficiency. *Cells* **7**, (2018).
114. Senioractu.com. Méthiothépine : une molécule qui améliore l'efficacité des chimio. *Senior Actu : toute l'actualité des seniors* https://www.senioractu.com/Methiothepine-une-molecule-qui-ameliore-l-efficacite-des-chimio_a21044.html.

115. Fernald, K. & Kurokawa, M. Evading apoptosis in cancer. *Trends Cell Biol.* **23**, 620–633 (2013).
116. Matsuura, K., Canfield, K., Feng, W. & Kurokawa, M. Metabolic Regulation of Apoptosis in Cancer. in *International Review of Cell and Molecular Biology* vol. 327 43–87 (Elsevier, 2016).
117. Pistritto, G., Trisciuglio, D., Ceci, C., Garufi, A. & D'Orazi, G. Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging* **8**, 603–619 (2016).
118. Zheng, J. H., Viacava Follis, A., Kriwacki, R. W. & Moldoveanu, T. Discoveries and controversies in BCL-2 protein-mediated apoptosis. *FEBS J.* **283**, 2690–2700 (2016).
119. Lanz, M. C., Dibitetto, D. & Smolka, M. B. DNA damage kinase signaling: checkpoint and repair at 30 years. *EMBO J.* **38**, e101801 (2019).
120. Hemann, M. T. & Lowe, S. W. The p53-Bcl-2 connection. *Cell Death Differ.* **13**, 1256–1259 (2006).
121. Li, X.-L., Zhou, J., Chen, Z.-R. & Chng, W.-J. P53 mutations in colorectal cancer - molecular pathogenesis and pharmacological reactivation. *World J. Gastroenterol.* **21**, 84–93 (2015).
122. Yasumatsu, R., Nakashima, T. & Komune, S. Overexpression of the Orotate Phosphoribosyl-Transferase Gene Enhances the Effect of 5-Fluorouracil in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma In Vitro. *J. Oncol.* **2012**, (2012).
123. Furukawa, T. *et al.* Thymidine phosphorylase in cancer aggressiveness and chemoresistance. *Pharmacol. Res.* **132**, 15–20 (2018).
124. Renck, D. *et al.* Design of novel potent inhibitors of human uridine phosphorylase-1: synthesis, inhibition studies, thermodynamics, and in vitro influence on 5-fluorouracil cytotoxicity. *J. Med. Chem.* **56**, 8892–8902 (2013).
125. Fidai, S. S., Sharma, A. E., Johnson, D. N., Segal, J. P. & Lastra, R. R. Dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency as a cause of fatal 5-Fluorouracil toxicity. *Autopsy Case Rep.* **8**, e2018049 (2018).

126. Jeught, K. V. der, Xu, H.-C., Li, Y.-J., Lu, X.-B. & Ji, G. Drug resistance and new therapies in colorectal cancer. *World J. Gastroenterol.* **24**, 3834–3848 (2018).
127. Dai, Q. *et al.* XRCC1 and ERCC1 polymorphisms are related to susceptibility and survival of colorectal cancer in the Chinese population. *Mutagenesis* **30**, 441–449 (2015).
128. Meisenberg, C. *et al.* Clinical and cellular roles for TDP1 and TOP1 in modulating colorectal cancer response to irinotecan. *Mol. Cancer Ther.* **14**, 575–585 (2015).
129. de Man, F. M., Goey, A. K. L., van Schaik, R. H. N., Mathijssen, R. H. J. & Bins, S. Individualization of Irinotecan Treatment: A Review of Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, and Pharmacogenetics. *Clin. Pharmacokinet.* **57**, 1229–1254 (2018).
130. Abou-Zeid, N., David-Basei, C., Bourougaa, K., Atger, V. & Calvo, F. Rôle du microenvironnement dans la tumorigénèse et la progression tumorale. *Rapp. Sur Avancées Fond. ARC INCA* 96 (2013).
131. Nieto, M. A., Huang, R. Y.-J., Jackson, R. A. & Thiery, J. P. EMT: 2016. *Cell* **166**, 21–45 (2016).
132. Puisieux, A. & Caramel, J. La transition épithélio-mésenchymateuse, un processus d'adaptation des cellules cancéreuses. *Corresp. En Onco-Théranostic II*, 7 (2013).
133. Ieda, T. *et al.* Visualization of epithelial-mesenchymal transition in an inflammatory microenvironment–colorectal cancer network. *Sci. Rep.* **9**, 16378 (2019).
134. Micalizzi, D. S., Farabaugh, S. M. & Ford, H. L. Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer: Parallels Between Normal Development and Tumor Progression. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **15**, 117–134 (2010).
135. Rôle de la transition épithélio-mésenchymateuse au cours de la progression tumorale. *Académie nationale de médecine | Une institution dans son temps* <http://www.academie-medecine.fr/role-de-la-transition-epithelio-mesenchymateuse-au-cours-de-la-progression-tumorale/> (2009).
136. Wehrle-Haller, B. Assembly and disassembly of cell matrix adhesions. *Curr. Opin. Cell Biol.* **24**, 569–581 (2012).

137. Ridley, A. J. Life at the leading edge. *Cell* **145**, 1012–1022 (2011).
138. Theveneau, É. & David, N. Migrations cellulaires collectives. *médecine/sciences* **30**, 751–757 (2014).
139. Clark, A. G. & Vignjevic, D. M. Modes of cancer cell invasion and the role of the microenvironment. *Curr. Opin. Cell Biol.* **36**, 13–22 (2015).
140. Nabeshima, K., Inoue, T., Shimao, Y., Kataoka, H. & Kono, M. Cohort migration of carcinoma cells: differentiated colorectal carcinoma cells move as coherent cell clusters or sheets. *Histol. Histopathol.* **14**, 1183–1197 (1999).
141. Friedl, P. & Wolf, K. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 362–374 (2003).
142. Poltavets, V., Kochetkova, M., Pitson, S. M. & Samuel, M. S. The Role of the Extracellular Matrix and Its Molecular and Cellular Regulators in Cancer Cell Plasticity. *Front. Oncol.* **8**, 431 (2018).
143. Almholt, K. & Johnsen, M. Stromal cell involvement in cancer. *Recent Results Cancer Res. Fortschritte Krebsforsch. Progres Dans Rech. Sur Cancer* **162**, 31–42 (2003).
144. Falk, P., Jonsson, A., Swartling, T., Asplund, D. & Ivarsson, M.-L. Role of matrix metalloproteinases in tumour invasion: immunohistochemistry of peritoneum from peritoneal carcinomatosis. *Med. Oncol. Northwood Lond. Engl.* **35**, 64 (2018).
145. Matsuyama, Y., Takao, S. & Aikou, T. Comparison of matrix metalloproteinase expression between primary tumors with or without liver metastasis in pancreatic and colorectal carcinomas. *J. Surg. Oncol.* **80**, 105–110 (2002).
146. Zinzindohoué, F., Lecomte, T. & Laurent-Puig, P. Métalloprotéases de la matrice extracellulaire et cancers du tractus digestif. */data/revues/03998320/00290004/434/* (2008).
147. Corvol, P. Mécanismes généraux de l'angiogenèse. */data/revues/03980499/00290HS1/1S12/* (2008).

148. Lavoie, S. S. La synthèse de NETs par les angiopoïétines -1 et -2 contribue à des activités pro-inflammatoires et pro-angiogéniques. <https://www.semanticscholar.org/paper/La-synth%C3%A8se-de-NETs-par-les-angiopo%C3%AF%C3%A9tines-1-et-2-%C3%A0-Lavoie/ab3184a3dea5ec862dd9713e002beb9850fab122#related-papers> (2018).
149. Viallard, C. & Larrivée, B. Tumor angiogenesis and vascular normalization: alternative therapeutic targets. *Angiogenesis* **20**, 409–426 (2017).
150. Bikfalvi, A. History and conceptual developments in vascular biology and angiogenesis research: a personal view. *Angiogenesis* **20**, 463–478 (2017).
151. Bensimon, J. Le switch angiogénique ou comment réveiller les cellules tumorales dormantes. *médecine/sciences* **28**, 1069–1071 (2012).
152. Nielsen, M., Thomsen, J., Primdahl, S., Dyreborg, U. & Andersen, J. Breast cancer and atypia among young and middle-aged women: a study of 110 medicolegal autopsies. *Br. J. Cancer* **56**, 814–819 (1987).
153. Baeriswyl, V. & Christofori, G. The angiogenic switch in carcinogenesis. *Semin. Cancer Biol.* **19**, 329–337 (2009).
154. Bergers, G. & Benjamin, L. E. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 401–410 (2003).
155. Ja, N. & Hf, D. Heterogeneity of the Tumor Vasculature: The Need for New Tumor Blood Vessel Type-Specific Targets. *Clinical & experimental metastasis* vol. 29 https://pubmed-ncbi-nlm-nih.gov.proxy.insermbiblio.inist.fr/22692562/?from_term=Heterogeneity+of+the+tumor+vasculature. (2012).
156. Carmeliet, P. & Jain, R. K. Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* **10**, 417–427 (2011).
157. Ravaud, A. Le mécanisme de l'angiogénèse tumorale. *Assoc. Fr. Urol.* **17**, 144–147 (2007).

158. Maniotis, A. J. *et al.* Vascular Channel Formation by Human Melanoma Cells in Vivo and in Vitro: Vasculogenic Mimicry. *Am. J. Pathol.* **155**, 739–752 (1999).
159. Folberg, R., Hendrix, M. J. C. & Maniotis, A. J. Vasculogenic Mimicry and Tumor Angiogenesis. *Am. J. Pathol.* **156**, 361–381 (2000).
160. Leslie, M. Tumors' do-it-yourself blood vessels. *Science* **352**, 1381–1383 (2016).
161. Sabbah, M., Mésange, P. & Larsen, A. K. Le mimétisme vasculaire. *Corresp. En Onco-Théragnostique* **IV**, (2015).
162. Chrosinski, D., Sampey, D., Maherali, N., Reproducibility Project: Cancer Biology, & Reproducibility Project Cancer Biology. Registered report: tumour vascularization via endothelial differentiation of glioblastoma stem-like cells. *eLife* **4**, (2015).
163. Upile, T. *et al.* Vascular mimicry in cultured head and neck tumour cell lines. *Head Neck Oncol.* **3**, 55 (2011).
164. Wagenblast, E. *et al.* A model of breast cancer heterogeneity reveals vascular mimicry as a driver of metastasis. *Nature* **520**, 358–362 (2015).
165. Williamson, S. C. *et al.* Vasculogenic mimicry in small cell lung cancer. *Nat. Commun.* **7**, 13322 (2016).
166. Li, W. *et al.* Hypoxia-induced vasculogenic mimicry formation in human colorectal cancer cells: Involvement of HIF-1 α , Claudin-4, and E-cadherin and Vimentin. *Sci. Rep.* **6**, 37534 (2016).
167. Luo, F. *et al.* Formation of vasculogenic mimicry in bone metastasis of prostate cancer: correlation with cell apoptosis and senescence regulation pathways. *Pathol. Res. Pract.* **210**, 291–295 (2014).
168. Cao, Z. *et al.* Tumour vasculogenic mimicry is associated with poor prognosis of human cancer patients: A systemic review and meta-analysis. *Eur. J. Cancer* **49**, 3914–3923 (2013).
169. Baeten, C. I. M., Hillen, F., Pauwels, P., de Bruine, A. P. & Baeten, C. G. M. I. Prognostic Role of Vasculogenic Mimicry in Colorectal Cancer: *Dis. Colon Rectum* **52**, 2028–2035 (2009).

170. Luo, Q. *et al.* Vasculogenic mimicry in carcinogenesis and clinical applications. *J. Hematol. Oncol.* **13**, 19 (2020).
171. Hendrix, M. J. C. *et al.* Tumor cell vascular mimicry: Novel targeting opportunity in melanoma. *Pharmacol. Ther.* **159**, 83–92 (2016).
172. Ruf, W. *et al.* Differential Role of Tissue Factor Pathway Inhibitors 1 and 2 in Melanoma Vasculogenic Mimicry. *Cancer Res.* **63**, 5381–5389 (2003).
173. Kakkar, A. K., Lemoine, N. R., Scully, M. F., Tebbutt, S. & Williamson, R. C. N. Tissue factor expression correlates with histological grade in human pancreatic cancer. *Br. J. Surg.* **82**, 1101–1104 (1995).
174. Vrana, J. A., Stang, M. T., Grande, J. P. & Ge, M. J. Expression of Tissue Factor in Tumor Stroma Correlates with Progression to Invasive Human Breast Cancer: Paracrine Regulation by Carcinoma Cell derived Members of the Transforming Growth Factor Family. *Cancer Res.* **56**, 9 (1996).
175. Khorana, A. A. *et al.* Tissue Factor Expression, Angiogenesis, and Thrombosis in Pancreatic Cancer. *Clin. Cancer Res.* **13**, 2870–2875 (2007).
176. Riddel, J. P., Aouizerat, B. E., Miaskowski, C. & Lillicrap, D. P. Theories of Blood Coagulation. *J. Pediatr. Oncol. Nurs.* **24**, 123–131 (2007).
177. Davila, M. *et al.* Tissue factor-bearing microparticles derived from tumor cells: impact on coagulation activation. *J. Thromb. Haemost.* **6**, 1517–1524 (2008).
178. Roberts, H., Hoffman, M. & Monroe, D. A Cell-Based Model of Thrombin Generation. *Semin. Thromb. Hemost.* **32**, 032–038 (2006).
179. Hemker, H. C. & Béguin, S. Phenotyping the Clotting System. *Thromb Haemost* **84**, 5 (2000).
180. Bauer, K., Kass, B., ten Cate, H., Hawiger, J. & Rosenberg, R. Factor IX is activated in vivo by the tissue factor mechanism. *Blood* **76**, 731–736 (1990).
181. Lawson, J. H. & Mann, K. G. Cooperative activation of human factor IX by the human extrinsic pathway of blood coagulation. *J. Biol. Chem.* **266**, 11317–11327 (1991).

182. Butenas, S., Orfeo, T. & Mann, K. G. Tissue factor activity and function in blood coagulation. *Thromb. Res.* **122**, S42–S46 (2008).
183. Thomassen, M. C. L. G. D. *et al.* Tissue factor-independent inhibition of thrombin generation by tissue factor pathway inhibitor- α . *J. Thromb. Haemost.* **13**, 92–100 (2015).
184. Mutch, N. J. Emerging roles for factor XII in vivo: Emerging roles for FXII. *J. Thromb. Haemost.* **9**, 1355–1358 (2011).
185. Sassi, M. *et al.* The Antithrombotic Potential of Tinzaparin and Enoxaparin Upon Thrombin Generation Triggered In Vitro by Human Ovarian Cancer Cells IGROV1. *Clin. Appl. Thromb.* **23**, 155–163 (2017).
186. Gerotziafas, G. T. *et al.* Tissue factor over-expression by human pancreatic cancer cells BXPC3 is related to higher prothrombotic potential as compared to breast cancer cells MCF7. *Thromb. Res.* **129**, 779–786 (2012).
187. Rousseau, A. *et al.* Differential contribution of tissue factor and Factor XII to thrombin generation triggered by breast and pancreatic cancer cells. *Int. J. Oncol.* **51**, 1747–1756 (2017).
188. Rousseau, A. *et al.* Procoagulant microparticles derived from cancer cells have determinant role in the hypercoagulable state associated with cancer. *Int. J. Oncol.* **51**, 1793–1800 (2017).
189. Nadir, Y. & Brenner, B. Heparanase procoagulant activity in cancer progression. *Thromb. Res.* **140**, S44–S48 (2016).
190. Carmeliet, P. *et al.* Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* **380**, 435–439 (1996).
191. Toomey, J. R. Targeted Disruption of the Murine Tissue Factor Gene Results in Embryonic Lethality. *Blood* **88**, 1583–1587 (1998).
192. Nacman, M. A systems approach to the provision of social work services in health settings: part 2. *Soc. Work Health Care* **1**, 133–143 (1975).
193. Zhang, Y. *et al.* Tissue factor controls the balance of angiogenic and antiangiogenic properties of tumor cells in mice. *J. Clin. Invest.* **94**, 1320–1327 (1994).

194. Shoji, M. *et al.* Activation of Coagulation and Angiogenesis in Cancer. *Am. J. Pathol.* **152**, 13 (1998).
195. Contrino, J., Hair, G., Kreutzer, D. L. & Rickles, F. R. In situ detection of tissue factor in vascular endothelial cells: Correlation with the malignant phenotype of human breast disease. *Nat. Med.* **2**, 209–215 (1996).
196. Takano, S., Tsuboi, K., Tomono, Y., Mitsui, Y. & Nose, T. Tissue factor, osteopontin, alphavbeta3 integrin expression in microvasculature of gliomas associated with vascular endothelial growth factor expression. *Br. J. Cancer* **82**, 1967–1973 (2000).
197. Bluff, J. E., Brown, N. J., Reed, M. W. & Staton, C. A. Tissue factor, angiogenesis and tumour progression. *Breast Cancer Res.* **10**, 204 (2008).
198. Even-Ram, S. *et al.* Thrombin receptor overexpression in malignant and physiological invasion processes. *Nat. Med.* **4**, 909–914 (1998).
199. Qi, J. & Kreutzer, D. L. Fibrin activation of vascular endothelial cells. Induction of IL-8 expression. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **155**, 867–876 (1995).
200. Verheul, H. M. W., Jorna, A. S., Hoekman, K. & Broxterman, H. J. Vascular endothelial growth factor–stimulated endothelial cells promote adhesion and activation of platelets. *Blood* **96**, 6 (2000).
201. Hembrough, T. A. *et al.* Tissue Factor/Factor VIIa Inhibitors Block Angiogenesis and Tumor Growth Through a Nonhemostatic Mechanism. *Cancer Res.* **63**, 5 (2003).
202. Albrechtsen, T. *et al.* Transcriptional program induced by factor VIIa-tissue factor, PAR1 and PAR2 in MDA-MB-231 cells. *J. Thromb. Haemost.* **5**, 1588–1597 (2007).
203. Liu, Y. & Mueller, B. M. Protease-activated receptor-2 regulates vascular endothelial growth factor expression in MDA-MB-231 cells via MAPK pathways. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **344**, 1263–1270 (2006).
204. Camerer, E., Huang, W. & Coughlin, S. R. Tissue factor- and factor X-dependent activation of protease-activated receptor 2 by factor VIIa. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**, 5255–5260 (2000).

205. Van Dreden, P., Elalamy, I. & Gerotziafas, G. T. The Role of Tissue Factor in Cancer-Related Hypercoagulability, Tumor Growth, Angiogenesis and Metastasis and Future Therapeutic Strategies. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **22**, 1–30 (2018).
206. Drouet, L. Voies d activation de l agrégation plaquettaire et mode d action des antiagrégants anti-IIb/IIIa (α IIb/ β 3). **12**, 7 (1998).
207. Labelle, M., Begum, S. & Hynes, R. O. Direct Signaling between Platelets and Cancer Cells Induces an Epithelial-Mesenchymal-Like Transition and Promotes Metastasis. *Cancer Cell* **20**, 576–590 (2011).
208. Labelle, M. & Hynes, R. O. The Initial Hours of Metastasis: The Importance of Cooperative Host–Tumor Cell Interactions during Hematogenous Dissemination. *Cancer Discov.* **2**, 1091–1099 (2012).
209. Lakka Klement, G. *et al.* Platelets actively sequester angiogenesis regulators. *Blood* **113**, 2835–2842 (2009).
210. Battinelli, E. M., Markens, B. A. & Italiano, J. E. Release of angiogenesis regulatory proteins from platelet alpha granules: modulation of physiologic and pathologic angiogenesis. *Blood* **118**, 1359–1369 (2011).
211. Battinelli, E. M. *et al.* Anticoagulation inhibits tumor cell–mediated release of platelet angiogenic proteins and diminishes platelet angiogenic response. *Blood* **123**, 101–112 (2014).
212. Bottsford-Miller, J. *et al.* Differential Platelet Levels Affect Response to Taxane-Based Therapy in Ovarian Cancer. *Clin. Cancer Res.* **21**, 602–610 (2015).
213. Radziwon-Balicka, A. *et al.* Platelets increase survival of adenocarcinoma cells challenged with anticancer drugs: mechanisms and implications for chemoresistance: Platelets increase survival of cancer cells. *Br. J. Pharmacol.* **167**, 787–804 (2012).
214. Ferrara, N. VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 795–803 (2002).

215. Ferrara, N. Vascular Endothelial Growth Factor: Basic Science and Clinical Progress. *Endocr. Rev.* **25**, 581–611 (2004).
216. Ng, Y.-S., Krilleke, D. & Shima, D. T. VEGF function in vascular pathogenesis. *Exp. Cell Res.* **312**, 527–537 (2006).
217. Arondéguy, T., Lacazette, E., Millevoi, S., Prats, H. & Touriol, C. VEGF-A mRNA processing, stability and translation: a paradigm for intricate regulation of gene expression at the post-transcriptional level. *Nucleic Acids Res.* **41**, 7997–8010 (2013).
218. Melincovici, C. S. *et al.* Vascular endothelial growth factor (VEGF) - key factor in normal and pathological angiogenesis. *Romanian J. Morphol. Embryol. Rev. Roum. Morphol. Embryol.* **59**, 455–467 (2018).
219. Li, X. *et al.* VEGF-B. *Cell Adhes. Migr.* **3**, 322–327 (2009).
220. Aase Karin *et al.* Vascular Endothelial Growth Factor-B–Deficient Mice Display an Atrial Conduction Defect. *Circulation* **104**, 358–364 (2001).
221. Joukov, V. *et al.* A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. *EMBO J.* **15**, 290–298 (1996).
222. George, M. L. *et al.* VEGF-A, VEGF-C, and VEGF-D in Colorectal Cancer Progression. *Neoplasia N. Y. N* **3**, 420–427 (2001).
223. Koltowska, K., Betterman, K. L., Harvey, N. L. & Hogan, B. M. Getting out and about: the emergence and morphogenesis of the vertebrate lymphatic vasculature. *Development* **140**, 1857–1870 (2013).
224. Miao, H., Ruan, S. & Shen, M. VEGF-C in rectal cancer tissues promotes tumor invasion and metastasis. *JBUON* **23**, 6 (2018).
225. Nurmi, H. *et al.* VEGF-C is required for intestinal lymphatic vessel maintenance and lipid absorption. *EMBO Mol. Med.* **7**, 1418–1425 (2015).
226. Alitalo, K. & Carmeliet, P. Molecular mechanisms of lymphangiogenesis in health and disease. *Cancer Cell* **1**, 219–227 (2002).

227. Ribatti, D. The discovery of the placental growth factor and its role in angiogenesis: a historical review. *Angiogenesis* **11**, 215–221 (2008).
228. De Falco, S. The discovery of placenta growth factor and its biological activity. *Exp. Mol. Med.* **44**, 1 (2012).
229. Shibuya, M. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR) Signaling in Angiogenesis. *Genes Cancer* **2**, 1097–1105 (2011).
230. Simons, M., Gordon, E. & Claesson-Welsh, L. Mechanisms and regulation of endothelial VEGF receptor signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **17**, 611–625 (2016).
231. Claesson-Welsh, L. VEGF receptor signal transduction – A brief update. *Vascul. Pharmacol.* **86**, 14–17 (2016).
232. Meadows, K. N., Bryant, P. & Pumiglia, K. Vascular Endothelial Growth Factor Induction of the Angiogenic Phenotype Requires Ras Activation. *J. Biol. Chem.* **276**, 49289–49298 (2001).
233. Huang, X. *et al.* Editing VEGFR2 Blocks VEGF-Induced Activation of Akt and Tube Formation. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **58**, 1228–1236 (2017).
234. Lacal, P. M. & Graziani, G. Therapeutic implication of vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1) targeting in cancer cells and tumor microenvironment by competitive and non-competitive inhibitors. *Pharmacol. Res.* **136**, 97–107 (2018).
235. Stevens, M. & Oltean, S. Modulation of Receptor Tyrosine Kinase Activity through Alternative Splicing of Ligands and Receptors in the VEGF-A/VEGFR Axis. *Cells* **8**, (2019).
236. Bhattacharya, R. *et al.* Intracrine VEGF signalling mediates colorectal cancer cell migration and invasion. *Br. J. Cancer* **117**, 848–855 (2017).
237. Tammela, T. & Alitalo, K. Lymphangiogenesis: Molecular Mechanisms and Future Promise. *Cell* **140**, 460–476 (2010).
238. Tammela, T. *et al.* VEGFR-3 controls tip to stalk conversion at vessel fusion sites by reinforcing Notch signalling. *Nat. Cell Biol.* **13**, 1202–1213 (2011).

239. Dumont, D. J. *et al.* Cardiovascular failure in mouse embryos deficient in VEGF receptor-3. *Science* **282**, 946–949 (1998).
240. Ge, H., Yan, Y., Guo, L., He, X. & Yang, X. Prognostic and clinical significance of VEGFR-3 in gastric cancer: A meta-analysis. *Clin. Chim. Acta* **474**, 114–119 (2017).
241. Tacconi, C. *et al.* Activation of the VEGFC/VEGFR3 Pathway Induces Tumor Immune Escape in Colorectal Cancer. *Cancer Res.* **79**, 4196–4210 (2019).
242. Cai, M., Wang, K., Murdoch, C. E., Gu, Y. & Ahmed, A. Heterodimerisation between VEGFR-1 and VEGFR-2 and not the homodimers of VEGFR-1 inhibit VEGFR-2 activity. *Vascul. Pharmacol.* **88**, 11–20 (2017).
243. Durré, T. *et al.* uPARAP/Endo180 receptor is a gatekeeper of VEGFR-2/VEGFR-3 heterodimerisation during pathological lymphangiogenesis. *Nat. Commun.* **9**, 5178 (2018).
244. Gelfand, M. V. *et al.* Neuropilin-1 functions as a VEGFR2 co-receptor to guide developmental angiogenesis independent of ligand binding. *eLife* **3**, e03720 (2014).
245. Klagsbrun, M., Takashima, S. & Mamluk, R. *The Role of Neuropilin in Vascular and Tumor Biology. Madame Curie Bioscience Database [Internet]* (Landes Bioscience, 2013).
246. Latil, A. *et al.* VEGF overexpression in clinically localized prostate tumors and neuropilin-1 overexpression in metastatic forms. *Int. J. Cancer* **89**, 167–171 (2000).
247. Gagnon, M. L. *et al.* Identification of a natural soluble neuropilin-1 that binds vascular endothelial growth factor: In vivo expression and antitumor activity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**, 2573–2578 (2000).
248. Larsen, A. K. *et al.* Functions and Clinical Implications of Autocrine VEGF Signaling in Colorectal Cancer. *Curr. Colorectal Cancer Rep.* **9**, 270–277 (2013).
249. Koch, S. & Claesson-Welsh, L. Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2**, a006502 (2012).
250. Fan, F. *et al.* Expression and function of vascular endothelial growth factor receptor-1 on human colorectal cancer cells. *Oncogene* **24**, 2647–2653 (2005).

251. Coelho, P., Almeida, J., Prudêncio, C., Fernandes, R. & Soares, R. Effect of Adipocyte Secretome in Melanoma Progression and Vasculogenic Mimicry. *J. Cell. Biochem.* **117**, 1697–1706 (2016).
252. Lv, J. *et al.* Significance of Vasculogenic Mimicry Formation in Gastric Carcinoma. *Oncol. Res. Treat.* **40**, 35–41 (2017).
253. Ayadi, M. *et al.* 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* **6**, 18518–18533 (2015).
254. Poindessous, V. *et al.* EGFR- and VEGF(R)-Targeted Small Molecules Show Synergistic Activity in Colorectal Cancer Models Refractory to Combinations of Monoclonal Antibodies. *Clin. Cancer Res.* **17**, 6522–6530 (2011).
255. Yeh, C.-C. *et al.* Synchronous vascular endothelial growth factor protein profiles in both tissue and serum identify metastasis and poor survival in colorectal cancer. *Sci. Rep.* **9**, 4228 (2019).
256. Autiero, M. *et al.* Role of PlGF in the intra- and intermolecular cross talk between the VEGF receptors Flt1 and Flk1. *Nat. Med.* **9**, 936–943 (2003).
257. Cudmore, M. J. *et al.* The role of heterodimerization between VEGFR-1 and VEGFR-2 in the regulation of endothelial cell homeostasis. *Nat. Commun.* **3**, 972 (2012).
258. Falk, T., Gonzalez, R. T. & Sherman, S. J. The Yin and Yang of VEGF and PEDF: Multifaceted Neurotrophic Factors and Their Potential in the Treatment of Parkinson's Disease. *Int. J. Mol. Sci.* **11**, 2875–2900 (2010).
259. Mac Gabhann, F. & Popel, A. S. Dimerization of VEGF receptors and implications for signal transduction: A computational study. *Biophys. Chem.* **128**, 125–139 (2007).
260. Sawano, A., Takahashi, T., Yamaguchi, S., Aonuma, M. & Shibuya, M. Flt-1 but not KDR/Flk-1 tyrosine kinase is a receptor for placenta growth factor, which is related to vascular endothelial growth factor. *Cell Growth Differ. Mol. Biol. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **7**, 213–221 (1996).
261. Kramer, N. *et al.* In vitro cell migration and invasion assays. *Mutat. Res.* **752**, 10–24 (2013).

262. Bates, R. C. *et al.* Flt-1-Dependent Survival Characterizes the Epithelial-Mesenchymal Transition of Colonic Organoids. *Curr. Biol.* **13**, 1721–1727 (2003).
263. Roybal, J. D. *et al.* miR-200 Inhibits Lung Adenocarcinoma Cell Invasion and Metastasis by Targeting *Flt1/VEGFR1*. *Mol. Cancer Res.* **9**, 25–35 (2011).
264. Kaplan, R. N. *et al.* VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature* **438**, 820–827 (2005).
265. Weddell, J. C., Chen, S. & Imoukhuede, P. I. VEGFR1 promotes cell migration and proliferation through PLC γ and PI3K pathways. *NPJ Syst. Biol. Appl.* **4**, 1 (2018).
266. Okita, N. T. *et al.* Vascular Endothelial Growth Factor Receptor Expression as a Prognostic Marker for Survival in Colorectal Cancer. *Jpn J Clin Oncol* **6**.
267. D’Haene, N. *et al.* The Prognostic Value of the Combination of Low VEGFR-1 and High VEGFR-2 Expression in Endothelial Cells of Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci* **13** (2018).
268. Rapisarda, A. *et al.* Identification of Small Molecule Inhibitors of Hypoxia-inducible Factor 1 Transcriptional Activation Pathway. **10**.
269. Guérin, E. *et al.* In Vivo Topoisomerase I Inhibition Attenuates the Expression of Hypoxia-Inducible Factor 1 α Target Genes and Decreases Tumor Angiogenesis. *Mol. Med.* **18**, 83–94 (2012).
270. Kummar, S. *et al.* Multihistology, Target-Driven Pilot Trial of Oral Topotecan as an Inhibitor of Hypoxia-Inducible Factor-1 α (HIF-1 α) in Advanced Solid Tumors. **17** (2012).
271. Masuda, K. *et al.* A Novel Tumor-Promoting Function Residing in the 5’ Non-coding Region of vascular endothelial growth factor mRNA. *PLoS Med.* **5**, (2008).
272. Yin, Y. *et al.* Blocking effects of siRNA on VEGF expression in human colorectal cancer cells. *World J. Gastroenterol.* **16**, 1086–1092 (2010).
273. Goel, H. L. & Mercurio, A. M. VEGF targets the tumour cell. *Nat. Rev. Cancer* **13**, 871–882 (2013).

274. Hoyama, E. *et al.* Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in macrophages, fibroblasts, and endothelial cells in pterygium treated with 5-Fluorouracil. *Semin. Ophthalmol.* **30**, 171–176 (2015).
275. Jinjun, W. *et al.* sFLT-1 inhibits proliferation, migration, and invasion of colorectal cancer SW480 cells through vascular mimicry formation suppression. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* **39**, 1010428317698339 (2017).
276. Xu, S. *et al.* EBV-LMP1 is involved in vasculogenic mimicry formation via VEGFA/VEGFR1 signaling in nasopharyngeal carcinoma. *Oncol. Rep.* **40**, 377–384 (2018).
277. Abe, K. *et al.* Regulation of vascular endothelial growth factor production and angiogenesis by the cytoplasmic tail of tissue factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 8663–8668 (1999).