

Université de Montréal

**LIEN ENTRE L'HÉMOSTASE ET LE DÉVELOPPEMENT
NÉOPLASIQUE
RÔLE SPÉCIFIQUE DU FACTEUR TISSULAIRE ET DE
L'INHIBITEUR DU FACTEUR TISSULAIRE**

par

Mathieu Provençal

Département de physiologie

Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D)
en physiologie

Décembre, 2008

© Mathieu Provençal, 2008

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

**LIEN ENTRE L'HÉMOSTASE ET LE DÉVELOPPEMENT
NÉOPLASIQUE
RÔLE SPÉCIFIQUE DU FACTEUR TISSULAIRE ET DE
L'INHIBITEUR DU FACTEUR TISSULAIRE**

présentée par :
Mathieu Provençal

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dre Josette Noel, président-rapporteur
Dr Richard Béliveau, directeur de recherche
Dr Jean-Louis Schwartz, membre du jury
Dr Luc Vallières, examinateur externe
Dr Réjean Couture, représentant du doyen de la FES

RÉSUMÉ

Il est reconnu, depuis une centaine d'années, que des désordres de la coagulation, regroupés sous le terme de coagulopathies, sont souvent associés au développement néoplasique. Pendant de nombreuses années, ces coagulopathies furent souvent reconnues comme une simple conséquence du développement du cancer. D'ailleurs, pour les cliniciens, l'apparition de ces anomalies sanguines constitue souvent le premier signe clinique d'un cancer occulte. Toutefois, l'étude approfondie du lien existant entre le système hémostatique et le cancer indique que différents facteurs hémostatiques vont interagir avec soit l'environnement tumoral ou soit la tumeur elle-même et influencer le développement du cancer. Au cours de nos travaux, nous avons porté une attention particulière à deux protéines jouant un rôle primordial dans l'hémostase. Le facteur tissulaire (TF) et l'inhibiteur du facteur tissulaire (TFPI) peuvent jouer des rôles pro- ou anti-néoplasique, et ce indépendamment de leurs fonctions hémostatiques normales.

Dans le premier volet de cette thèse, nous avons étudié les propriétés antiangiogéniques de TFPI. L'angiogenèse, soit la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir du réseau pré-existant, est reconnue comme étant une étape clé du développement tumoral. D'après nos travaux, le TFPI peut inhiber la formation de structures de type capillaire des cellules endothéliales (CEs) de la veine ombilicale humaine (HUVEC), et ce à une IC₅₀ de 5 nM, soit la concentration physiologique de l'inhibiteur. De plus, le TFPI bloque la migration des cellules endothéliales lorsque ces dernières sont stimulées par la sphingosine-1-phosphate (S1P), une molécule relâchée lors de l'activation des plaquettes sanguines. Cette inhibition de la migration cellulaire s'explique par l'effet du TFPI sur l'adhésion des CEs. En effet, TFPI inhibe la phosphorylation de deux protéines clés participant à la formation des complexes d'adhésion focales soit FAK (*focal adhesion kinase*) et PAX (*paxilin*). L'inhibition de ces deux protéines suggère qu'il y ait une réorganisation des complexes focaux, pouvant expliquer la perte d'adhérence. Finalement,

des études de microscopie confocale démontrent que les cellules traitées au TFPI changent de morphologie au niveau du cytosquelette d'actine provoquant une désorganisation des structures migratoires (pseudopodes). Les effets du TFPI au niveau de la migration, de l'adhésion et de la morphologie cellulaire sont strictement spécifiques aux cellules endothéliales humaines, puisque aucun effet n'est observé en traitant des cellules cancéreuses de glioblastomes (GB) humains, qui sont normalement des tumeurs hautement vascularisées. En résumé, cette première étude démontre que le TFPI est un inhibiteur de l'angiogenèse.

Dans le second volet de cette thèse, nous nous sommes intéressés aux différents rôles de TF, le principal activateur de la coagulation. Cette protéine est également impliquée dans le développement néoplasique et notamment celui des médulloblastomes (MB) chez l'enfant via des fonctions hémostatiques et non-hémostatiques. Nos travaux démontrent que l'expression de TF est induite par la voie de signalisation de HGF (*hepatocyte growth factor*) et de son récepteur Met. Cet effet de HGF/Met semble spécifique aux MB puisque HGF ne peut stimuler l'expression de TF au niveau des cellules cancéreuses de glioblastomes. TF, exprimé à la surface des cellules médulloblastiques (DAOY), est responsable de l'activité pro-thrombogénique de ces cellules, ainsi qu'un acteur important de la migration de ces cellules en réponse au facteur VIIa (FVIIa). De plus, en étudiant 18 spécimens cliniques de MB, nous avons établi un lien entre l'intensité d'expression de TF et de Met. L'importance de cette corrélation est également suggérée par l'observation que les cellules exprimant les plus forts taux de TF et de Met sont également les plus agressives en termes d'index de prolifération et de dissémination métastatiques. En résumé, ces travaux représentent le point de départ pour la mise au point de TF comme un marqueur diagnostique clinique dans les cas de tumeurs pédiatriques du cerveau. De plus, l'élucidation de la voie de signalisation moléculaire responsable de l'expression de TF permet de mieux comprendre la biologie et le fonctionnement de ces tumeurs et de relier le profil d'expression de TF aux phénotypes agressifs de la maladie.

Il est reconnu que HGF peut également jouer un rôle protecteur contre l'apoptose. Dans le troisième volet de cette thèse, nous avons remarqué que cette protection est corrélée à l'expression de TF. En réduisant à néant l'expression de TF à l'aide de la technologie des ARN silencieux (siRNA), nous démontrons que HGF ne protège plus les cellules contre l'apoptose. Donc, TF médie l'activité anti-apoptotique de HGF. TF assume cette protection en inactivant la phosphorylation de p53 sur la sérine 15, empêchant ainsi la translocation de p53 au noyau. Finalement, l'expression de TF et son interaction avec le FVIIa, au niveau des cellules médulloblastiques favorise la survie de ces dernières et ce même si elles sont soumises à de fortes concentrations de médicaments couramment utilisées en cliniques. Ce troisième et dernier volet démontre l'implication de TF en tant que facteur impliqué dans la survie des cellules cancéreuses, favorisant ainsi le développement de la tumeur.

Dans son ensemble, cette thèse vise à démontrer que les facteurs impliqués normalement dans des fonctions hémostatiques (TFPI et TF) peuvent contribuer à réguler le développement tumoral. Tout système physiologique et pathologique est dépendant d'un équilibre entre activateur et inhibiteur et la participation de TF et de TFPI à la régulation du développement néoplasique illustre bien cette balance délicate. Par sa contribution anti- ou pro-néoplasique le système hémostatique constitue beaucoup plus qu'une simple conséquence du cancer; il fait partie par l'action de TF des stratégies élaborées par les cellules cancéreuses pour assurer leur croissance, leur déplacement et leur survie, alors que TFPI tente de limiter la croissance tumorale en diminuant la vascularisation

Mots-clés : coagulopathies, angiogenèse, TF, TFPI, apoptose.

ABSTRACT

For more than a century now, haemostatic disorders, also referred to as coagulopathies, are recognized to be associated to neoplasia development. At first, these coagulopathies were often seen as the first clinical symptom of an occult malignancy and as such they were foreseen as merely consequence of cancer. However recent studies allowed to determine that a molecular link between haemostasis and cancer exists. Haemostatic proteins were found to interact with the tumor environment or the tumor itself. In this thesis, we look at two important haemostatic proteins involved in anti- or pro-tumoral activities. These proteins we looked at were, tissue factor (TF), which has been identified as the main trigger of blood coagulation and its natural inhibitor which is named tissue factor pathway inhibitor (TFPI). In our investigations we focus on the non-haemostatic function of these proteins. First of all, we studied the effect of TFPI on angiogenesis.

Angiogenesis, the formation of new blood vessels from pre-existing ones, is a critical component of cancer. In this first paper we demonstrate that, in addition to its anticoagulant properties, emerging data show that TFPI may also regulate endothelial cell functions via a non-haemostatic pathway. At physiological concentration, TFPI inhibits both endothelial cell migration and their differentiation into capillary-like structures *in vitro*. These effects were specific to endothelial cells since no inhibitory effect was observed on the migration of tumor (glioblastoma) cells. Inhibition of endothelial cell migration was correlated with a concomitant loss in cell adhesion, suggesting an alteration of focal adhesion complex integrity. Accordingly, we observed that TFPI inhibited the phosphorylation of focal adhesion kinase and paxillin, two key proteins involved in the scaffolding of these complexes and that this effect was specific to endothelial cells. These results suggest that TFPI influences the angiogenic process via a non-haemostatic pathway, by downregulating the migratory mechanisms of endothelial cells.

Met, the only known receptor for hepatocyte growth factor (HGF) is a member of the receptor tyrosine kinases (RTKs) family and recently this RTK emerged as one important contributor to human neoplasia. In physiologic and pathologic conditions, Met trigger various cellular functions related to cell proliferation and migration, inhibition of apoptosis and also regulate a genetic program leading to coagulation. Since medulloblastoma (MB) express high level of tissue factor (TF), the main initiator of blood coagulation, we therefore wanted to know if there was a link between Met and TF expression in these pediatric tumors. In this work we demonstrate that stimulation of MB cells *in vitro* with HGF lead to overt expression of TF. These data correlate with analysis of clinical MB tumors specimens, were tumors expressing high level of Met also express high level of TF. This HGF/Met/TF pathway seems specific to MB only since no effect was observed on glioblastoma cells. TF expression in MB leads to a pro-coagulation state which could initiate thrombosis and the formation of a provisional fibrin matrix. Furthermore, TF can also mediate non-haemostatic function such as cell migration, thus helping cancer cells to form distant metastasis. Taken together these results suggest that HGF/Met pathway is responsible for TF expression in MB and explained how TF participate to tumor aggressiveness.

In the third part of this thesis we look at the effect of TF on cell survival as a huge body of evidence suggest a role for TF and its natural ligand FVIIa on cells death (apoptosis) protection. In this study, we show that HGF-induce anti-apoptotic effect on DAOY MB cells is correlated to TF expression. Using TF siRNA we completely reversed this anti-apoptosis activity. TF is responsible of p53 inactivation, thus allowing DAOY to resist to very high concentrations of the chemotherapeutic drug Etoposide. These finding highlights the importance of understanding the molecular biology of MB, to achieve a better clinical management and also find new therapeutic targets.

Overall, this thesis demonstrates that normal haemostatic protein such as TF and TFPI are also involved in tumor development. The different activities of TF and TFPI on cancer reflected the fact that every physiological or pathological system is dependent of a

balance between activator and inhibitor. Furthermore the molecular link described in this thesis between haemostasis and cancer constitutes an argument against the fact that the haemostatic system is simply a consequence of cancer. Instead we show that TF is part of a strategy designed to improve tumor expansion while TFPI try to restrain the tumor growth by limiting tumor angiogenesis.

Keywords : coagulopathies, angiogenesis, TF, TFPI, apoptosis.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	iii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xii
LISTE DES FIGURES.....	xv
REMERCIEMENTS.....	xix
CHAPITRE 1	
INTRODUCTION.....	1
1.1 Les traits caractéristiques du cancer.....	3
1.1.1 L'instabilité génétique : une condition préalable.....	5
1.1.2 L'autosuffisance en facteur de croissance.....	5
1.1.3 L'insensibilité aux signaux inhibiteurs de la croissance.....	6
1.1.4 La résistance à l'apoptose.....	7
1.1.5 Le potentiel répliatif illimité.....	7
1.1.6 L'angiogenèse tumorale soutenue.....	8
1.1.7 L'invasion tissulaire et la formation de métastase.....	8
1.2 L'angiogenèse tumorale.....	10
1.2.1 Le système vasculaire.....	10
1.2.2 Les étapes morphologiques de l'angiogenèse tumorale.....	13
1.2.3 La place de l'angiogenèse dans l'évolution naturelle des tumeurs.....	16
1.2.4 L'angiogenèse en tant que cible thérapeutique.....	21

1.3 Coagulation et cancer.....	23
1.3.1 Les mécanismes moléculaires de la coagulation sanguine.....	24
1.3.2 Les désordres hémostatiques associés au cancer.....	31
1.3.3 Pathophysiologie du syndrome de Trousseau.....	32
1.3.4 Rôles des protéines hémostatiques dans le développement vasculaire.....	36
1.3.5 Rôles des protéines hémostatiques dans la régulation de l'angiogenèse.....	37
1.4 L'apoptose ou la mort cellulaire programmée.....	40
1.4.1 Le rôle de l'apoptose au cours du développement embryonnaire.....	41
1.4.2 Le rôle de l'apoptose dans l'angiogenèse.....	41
1.4.3 Les mécanismes moléculaires de l'apoptose.....	42
1.4.4 Les caspases.....	42
1.4.5 Les protéines de la famille de Bcl-2.....	46
1.4.6 La protéine p53, le chef d'orchestre.....	47
1.4.7 Mécanismes de résistances à l'apoptose et cancer.....	50
1.5 Les tumeurs du système nerveux central.....	53
1.5.1 Les glioblastomes.....	53
1.5.2 Les anomalies moléculaires des glioblastomes.....	54
1.5.3 Les médulloblastomes.....	58
1.5.4 Les anomalies moléculaires des médulloblastomes.....	59
1.5.5 Structure de Met et son ligand HGF.....	63
1.5.6 Rôles physiologiques et pathologiques de la voie HGF/Met.....	65
1.6 Objectifs du travail expérimental.....	69

CHAPITRE II	
ARTICLES.....	70
2.1 Tissue factor pathway inhibitor (TFPI) interferes with endothelial cell migration by inhibition of both the Erk pathway and focal adhesion proteins.....	71
2.2 C-Met activation in medulloblastoma induces tissue factor expression and activity : effects on coagulation and cell migration.....	107
2.3 Tissue factor mediates the HGF/Met-induced anti-apoptotic pathway in medulloblastoma through inactivation of p53.....	142
CHAPITRE III	
DISCUSSION.....	170
3.1 Rôles de TFPI dans l'angiogenèse tumorale.....	171
3.1.1 Effet de TFPI sur la formation de structures de type capillaire.....	172
3.1.2 Effet de TFPI sur la migration des cellules endothéliales.....	173
3.1.3 Effet de TFPI sur l'adhésion des cellules endothéliales.....	175
3.2 La voie HGF/Met et l'expression de TF dans les médulloblastomes.....	176
3.2.1 Rôle de TF dans l'induction d'un état procoagulant.....	178
3.2.2 Rôle de TF dans la migration des cellules tumorales.....	179
3.2.3 Rôle de TF dans la protection contre l'apoptose.....	179
CHAPITRE IV	
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	183
BIBLIOGRAPHIE.....	187

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	acide désoxyribonucléique
AIF	apoptosis-inducing factor
Ang	angiopoietin
APC	activated protein C
APC	adenomatous polyposis coli
BDNF	brain-derived neurotrophic factor
CARD	caspase recrutement domain
CE	cellule endothéliale
CNS	central nervous system
CP	cancer procoagulant
DED	death effector domain
DIC	disseminated intravascular coagulation
DISC	death-inducing signal complex
DVT	deep vein thrombosis
EDG	endothelial differentiation gene
EGF	epidermal growth factor
EGFR	epidermal growth factor receptor
EPCR	endothelial protein C receptor
ERK	extracellular signal-regulated kinase
eNOS	endothelial nitric oxide synthase
ET	endothelin
FAK	focal adhesion kinase
FADD	Fas-associated protein with death domain
FGF	fibroblast growth factor
GB	glioblastome
HGF	hepatocyte growth factor

HIF	hypoxia inducible factor
HMWK	high molecular weight kininogen
HUVEC	human umbilical vein endothelial cell
ICE	interleukin conversion enzyme
IGFR	insulin-like growth factor receptor
IL	interleukin
MAPK	mitogen activated protein kinase
MB	médulloblastome
MEC	matrice extracellulaire
MMP	matrix metalloprotease
MT1-MMP	métalloprotéase matricelle de type membranaire-1
NGF	nerve growth factor
NO	nitric oxyde
PAF	platelet activating factor
PAI	plasminogen activator inhibitor
PAR	protease-activated receptor
PAX	paxillin
PDGF	platelet-derived growth factor
PDGFR	platelet-derived growth factor receptor
PECAM-1	platelet/endothelial cell adhesion molecule-1
PIGF	placental growth factor
PKC	protein kinase C
PLC	phospholipase C
RTK	receptor tyrosine kinase
SF	scatter factor
SNC	système nerveux central
SPH	serine proteinase homology
S1P	sphingosine 1-phosphate

TAFI	thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor
TAT	thrombin-antithrombin
TF	tissue factor
TFPI	tissue factor pathway inhibitor
Tie	tyrosine kinase with immunoglobulin and EGF homology domain
TM	thrombomoduline
TNF	tumor necrosis factor
TSP	thrombospondine
tPA	tissue-type plasminogen activator
uPA	urokinase-type plasminogen activator
VEGF	vascular endothelial growth factor
VEGFR	vascular endothelial growth factor receptor
VLDL	very low density lipoprotein

LISTE DES FIGURES

Thèse

Figure 1	Les six altérations caractéristiques du cancer.....	4
Figure 2	La balance angiogénique.....	17
Figure 3	La cascade de coagulation sanguine.....	25
Figure 4	Structure de l'inhibiteur du facteur tissulaire (TFPI).....	29
Figure 5	Le rôle central des cellules tumorales dans la pathogenèse de l'état procoagulant des patients cancéreux.....	33

Article 1

Figure 1	Production and purification of human recombinant TFPI.....	100
Figure 2	TFPI inhibits endothelial cell tube formation <i>in vitro</i> and induces no cytotoxicity or inhibitory effects on proliferation.....	101
Figure 3	TFPI specifically inhibits endothelial cell migration.....	102
Figure 4	TFPI specifically inhibits endothelial cell adhesion.....	103
Figure 5	TFPI inhibits the MAP kinase ERK-1/2 pathway in endothelial cells....	104

Figure 6	TFPI inhibits FAK and PAX phosphorylation in vascular endothelial cells.....	105
Figure 7	TFPI treatment prevents morphological changes induced by S1P.....	106
Article 2		
Figure 1	HGF induces TF expression and activity in DAOY cells.....	136
Figure 2	Met is responsible for TF expression in DAOY medulloblastoma cells.....	137
Figure 3	TF expression and activity in DAOY cells is regulated by Met activation and src family kinases.....	138
Figure 4	HGF-stimulated DAOY exhibit a cortical expression of TF colocalizing with reorganized actin-rich structures.....	139
Figure 5	TF expression in DAOY cells enhances cell migration towards Factors VIIa.....	140
Figure 6	Immunohistochemistry of TF and Met proteins in human medulloblastoma surgical specimens.....	141

Article 3

Figure 1 Correlation between HGF-induced apoptosis protection and TF expression in DAOY cells..... 166

Figure 2 TF mediates the HGF-induced apoptosis protection in DAOY cells..... 167

Figure 3 Effect of FVIIa on DAOY signal transduction processes..... 168

Figure 4 FVIIa renders DAOY more resistant to etoposide treatment..... 169

*À ceux qui m'ont supporté : mon épouse,
mes parents, ma sœur*

*À ceux qui m'ont inspiré : Gisèle, Marcel,
Jacqueline et Georges*

REMERCIEMENTS

Je tiens dans un premier temps à remercier mon directeur de thèse, le Dr Richard Béliveau, pour la chance qu'il m'a donnée, la confiance qu'il m'a témoignée et la passion qu'il m'a transmise. À ses côtés, j'ai été en mesure de profiter non seulement de ses nombreux conseils et de ses nombreuses expertises, mais également d'une équipe dynamique extraordinaire et d'un laboratoire à la fine pointe de l'innovation. En parlant de cette équipe je ne peux passer sous silence le rôle primordial de mon superviseur, le Dr Denis Gingras, que je remercie pour sa franche collaboration, ses encouragements constants et ses innombrables conseils. Dans la même voie, je tiens à remercier également les autres membres de cette équipe et particulièrement le Dr Dominique Boivin pour son amitié et ses conseils tout au long de mon doctorat. Finalement, je remercie les Drs Sylvie Lamy et Édith Beaulieu, pour leur support quotidien tout au long de cette aventure.

Je ne saurais oublier également que tout au long de cette thèse plusieurs étudiants qui n'étaient que simples collègues au départ sont devenus des amis très importants. À ce titre, je voudrais remercier sincèrement David Labbé qui me fit le plus beau cadeau qui soit en me redonnant l'espoir et le courage de terminer cette thèse. Merci, David. Je tiens à remercier aussi deux amies très importantes à mes yeux : Marisol Michaud et Valérie Bédard. Marisol d'abord pour ta collaboration en microscopie électronique et ta franche camaraderie, Valérie pour ton amitié et toutes tes délicates attentions, je ne vous oublierai jamais.

Je tiens à remercier mon épouse, Julie Manseau, pour son support indéfectible et ses nombreux encouragements dans les bons comme dans les moins bons moments. Je ne peux passer sous silence le rôle de mes parents, Ginette et Jean-Pierre, et ma sœur Julie qui m'ont toujours supporté tout au long de ces années et qui ont toujours cru en moi. À vous tous, je vous suis reconnaissant et vous reconnaît une part importante de cette thèse.

CHAPITRE I

INTRODUCTION

L'évolution, c'est-à-dire le processus qui a transformé la vie sur terre depuis le tout début jusqu'à la diversité apparemment sans limites d'aujourd'hui, constitue le fil conducteur de l'apparition et du développement des caractéristiques de la vie. Un fait marquant de cette évolution est survenu lors de l'avènement des premiers organismes pluricellulaires : les métazoaires. En effet, l'apparition des premiers métazoaires a favorisé la formation de structures complexes augmentant les probabilités de donner lieu à des variations qui, quant à elles, représentent le véritable moteur des processus évolutifs. L'organisation pluricellulaire repose sur la nécessité, pour ces organismes, d'élaborer un plan de développement basé sur la coopération, la planification et l'harmonie des sociétés cellulaires qui les composent.

Une grande partie de la réussite du plan de développement dépend directement de la plasticité observée dans les formes et dans les structures anatomiques du monde métazoaire. La cellule eucaryote, l'unité de base de ces organismes, est dotée d'une grande autonomie et d'une grande versatilité, qui sont deux caractères responsables de cet éventail de structures biologiques. Plus précisément, cette autonomie et cette versatilité résultent du fait que chacune de nos cellules, exception faite des cellules sexuelles, possède en son noyau un ADN génomique complet comportant toute l'information nécessaire au développement de l'organisme, c'est-à-dire beaucoup plus d'informations que ce dont la plupart d'entre elles auront besoin au cours de leur vie. De plus, plusieurs cellules conservent même la faculté de croître et de se diviser longtemps après le parachèvement du développement de l'organisme, permettant ainsi aux cellules de jouer un rôle de premier plan dans la morphogenèse et la maintenance tissulaire (Weinberg, 2007).

Paradoxalement, cette malléabilité cellulaire qui garantit les succès évolutifs représente aussi une part de risque. En effet, au cours de sa vie, l'organisme et ses cellules

sont constamment soumis aux agressions du monde extérieur. Ces agressions répétées réussissent éventuellement à corrompre le code génétique, par différents mécanismes, redonnant alors aux cellules atteintes un accès privilégié à certaines informations. Dans certains cas, ce nouveau gain d'information favorise l'apparition de phénotypes anormaux. Ces changements parfois importants peuvent ne plus correspondre avec la fonction initialement attribuée à la cellule et font en sorte que cette dernière ne répond plus aux règles strictes régissant le développement de l'organisme.

Le cancer s'inscrit donc dans un contexte de perturbation du plan général de développement des métazoaires et de leurs tissus en tirant avantage de la dérégulation de mécanismes régissant la plasticité cellulaire. Sous cet angle, le cancer ne constitue pas une atteinte propre à l'espèce humaine. Pour le prouver, des études démontrent clairement que différentes espèces appartenant à toutes les classes de vertébrés et d'invertébrés sont sujettes à développer des tumeurs (Schlumberger et Lucke, 1948; Rothshild *et al.*, 1998; Rothshild *et al.*, 1999).

La raison expliquant cette impression du caractère spécifiquement humain du cancer provient sans doute de notre très grande susceptibilité face à la maladie. En effet, la comparaison du taux de cancer chez l'humain, montre qu'il est très supérieur à celui des autres grands mammifères (Greaves, 2007). Cette susceptibilité s'explique en grande partie par notre longévité accrue ainsi que par plusieurs caractéristiques intrinsèques à l'espèce humaine, notamment en ce qui a trait au mode de vie. Les statistiques prévoient qu'au cours d'une vie, nous avons généralement une chance sur trois de recevoir un diagnostic de cancer (Brawley et Berger, 2008). Ces statistiques illustrent parfaitement toute l'ampleur du défi qui attend la recherche du 21^{ème} siècle.

Le premier pas à faire pour élaborer une solution contre le cancer consiste à connaître les causes proximales qui encouragent l'apparition de la maladie. L'identification des facteurs de risques représente en ce sens un pas dans la bonne direction. Dans les cents dernières années, les études épidémiologiques se sont succédées et ont permis

l'identification d'une multitude de causes aux cancers (Peto, 2001). Ainsi le tabagisme, la mauvaise alimentation, l'obésité, les infections pathogènes, l'âge, etc. figurent tous sur la liste grandissante des causes associées au développement du cancer (Peto, 2001). Une découverte marquante de l'épidémiologie a été de démontrer l'existence d'une forte prévalence de certains types de cancers entre différentes populations. De plus, ces études révèlent qu'il y a une convergence chez les populations migrantes vers les taux de cancer locaux (Peto, 2001). Ces observations excluent donc l'hypothèse fataliste d'une explication purement génétique aux cancers. Dès lors, ces résultats ouvrent la porte à l'idée que la grande majorité des cancers peuvent être prévenus en faisant le choix d'un environnement et d'un mode de vie sain.

1.1 Les traits caractéristiques du cancer

Le second volet de la solution au cancer passe donc nécessairement par une compréhension des mécanismes génétiques et moléculaires impliqués dans le développement de la maladie. En termes de génétique et de biologie moléculaire, le cancer est un processus impliquant une succession d'événements complexes qui normalement se déroulent sur plusieurs années. Durant cette lente progression, le génome des cellules cancéreuses acquiert et accumule des mutations affectant les oncogènes, les gènes suppresseurs de tumeurs et aussi une panoplie de gènes contrôlant directement ou indirectement la prolifération cellulaire. À ce jour, plus de 350 gènes ont été identifiés comme étant impliqués dans l'acquisition du phénotype tumoral (Futreal *et al.*, 2004) et, collectivement, ils contribuent à la formation de plus d'une centaine de types de cancers différents observés chez l'humain. Devant l'étendue et la complexité des combinaisons possibles, on peut rationaliser ces événements en un petit nombre de principes biologiques et biochimiques, donnant ainsi lieu à l'énumération des traits caractéristiques biologiques et biochimiques du cancer (Hahn et Weinberg, 2000).

Il est clair que la perturbation des fonctions cellulaires normales par le cancer provient de la multiplication incontrôlée des cellules cancéreuses, causée par la défectuosité

des circuits régulateurs contrôlant la prolifération et l'homéostasie cellulaires. En partant de ce principe fondamental, il fut énoncé que la diversité des génotypes et des phénotypes observés au sein des cellules cancéreuses reflétait la manifestation de six altérations essentielles de la physiologie cellulaire. Ces altérations comprennent : (1) l'autosuffisance en facteurs de croissance, (2) l'insensibilité aux signaux inhibiteurs de la croissance, (3) la résistance à la mort cellulaire programmée (apoptose), (4) le potentiel de réplication illimité, (5) l'angiogenèse tumorale soutenue et (6) l'invasion tissulaire et la formation de métastases (Hanahan et Weinberg, 2000). Il est à noter que certains types de cancers comme les glioblastomes ne nécessitent pas les altérations 5 (angiogenèse) et 6 (formation de métastase), car ces tumeurs se développent en utilisant la vasculature préexistante et ne forment généralement pas de métastase. Les altérations sont résumées à la figure 1.

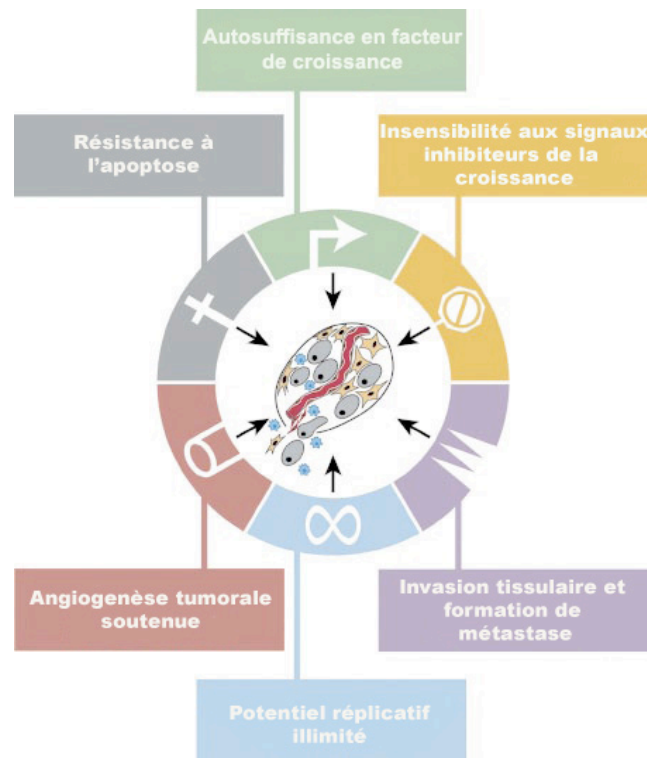


Figure 1 : Les six altérations caractéristiques du cancer

D'après Hanahan et Weinberg (2000)

1.1.1 L'instabilité génétique : une condition préalable

Les indices expérimentaux disponibles jusqu'à présent suggèrent que l'acquisition de ces altérations s'accomplit généralement à la suite de modifications du génome des cellules cancéreuses. Toutefois, la mutation de gènes spécifiques est un processus inefficace qui ne peut expliquer à lui seul la fréquence à laquelle se produisent les transformations phénotypiques associées aux cancers. Cette inefficacité reflète la mise en œuvre des nombreux mécanismes, qui ensemble font en sorte que les mutations génétiques demeurent des événements ponctuels très rares, contribuant ainsi à maintenir l'intégrité du code génétique. Cependant, il est impossible d'ignorer qu'en dépit de cette étroite surveillance, le cancer apparaît néanmoins fréquemment au sein des populations humaines. Dans ce dessein, le génome des cellules cancéreuses doit donc acquérir comme conditions préalables aux traits énoncés ci-haut, un potentiel de mutation supérieur à celui des cellules saines (Jackson et Loeb, 1998). Cette instabilité du génome des cellules malignes peut s'expliquer en partie par la dérégulation de protéines normalement affectées à la défense du patrimoine génétique. À titre indicatif, la perte ou l'inactivation de la protéine p53, identifiée comme la gardienne du génome, est clairement observée dans la majorité pour ne pas dire dans tous les cancers humains (Soussi et Lozano, 2005). En résumé, l'instabilité génomique représente le moyen, ou la condition préalable, qui prédispose une cellule rebelle à acquérir les traits caractéristiques de la malignité.

1.1.2 L'autosuffisance en facteur de croissance

L'autonomie des cellules cancéreuses face aux différents facteurs de croissance découle principalement de l'utilisation de trois stratégies. La première stratégie concerne l'habileté des cellules cancéreuses à synthétiser, elles-mêmes, les facteurs de croissance pour lesquelles elles sont sensibles. Ceci favorise alors une boucle de rétroaction positive (stimulation autocrine), abolissant ainsi la dépendance de cette cellule aux différents signaux émanant de son environnement.

La seconde stratégie implique souvent une dérégulation des récepteurs membranaires à activité tyrosine kinase (RTK) impliqués dans la transmission des signaux entre l'extérieur et l'intérieur de la cellule. À titre d'exemple, une surexpression des récepteurs EGFR/erbB et Met, observée dans plusieurs cancers, notamment ceux affectant le système nerveux central, peut créer une hypersensibilité de ces tumeurs au facteur de croissance épidermique (EGF) et au facteur de croissance hépatocytaire (HGF) respectivement (Zwick *et al.*, 2002). De plus, dans certains cas, cette surexpression membranaire d'un récepteur, tel EGFR ou Met, peut produire une activation indépendante de la liaison avec leurs ligands respectifs (Zwick *et al.*, 2002). Finalement, les récepteurs peuvent subir des modifications structurales de leur domaine extracellulaire, leur conférant une activité constitutive également indépendante de la liaison au ligand (Zwick *et al.*, 2002).

La troisième stratégie est constituée par l'ensemble des altérations touchant les composantes mécanistique de la signalisation intracellulaire, normalement impliquées dans la transformation du signal extracellulaire. La combinaison de ces trois stratégies permet donc la désarticulation complète des mécanismes de signalisations mitogéniques normalement responsables du déclenchement de la prolifération cellulaire.

1.1.3 L'insensibilité aux signaux inhibiteurs de la croissance

Dans tous les tissus normaux, plusieurs signaux anti-prolifératifs sont présents afin de maintenir la quiescence cellulaire et l'homéostasie tissulaire. Ces signaux peuvent provenir de facteurs solubles circulant dans l'environnement cellulaire ou bien émaner de facteurs immobilisés à la surface membranaire des cellules voisines. Quant au traitement de l'information émise par ces facteurs, il est réalisé à l'aide de récepteurs membranaires couplés aux signaux intracellulaires (Hanahan et Weinberg, 2000). Les signaux anti-prolifératifs agissent selon deux mécanismes distincts. D'une part, les cellules peuvent être forcées de quitter le cycle cellulaire prolifératif pour se retrouver dans un état quiescent

(G₀) à partir duquel elles pourront émerger lorsque de nouveaux signaux le permettront. D'autre part, les cellules peuvent être obligées de renoncer à jamais à leur potentiel prolifératif en entamant un processus post-mitotique de différenciation cellulaire. Dans les deux cas, l'insensibilité aux signaux inhibiteurs de la croissance implique une interférence dans la progression du cycle cellulaire.

1.1.4 La résistance à l'apoptose

La dérégulation des mécanismes moléculaires régissant la mort cellulaire programmée représente un moyen souvent exploité par les cellules dans différents contextes pathologiques et particulièrement dans le cancer. Le degré d'expansion d'une tumeur ne correspond pas uniquement au taux de prolifération des cellules cancéreuses, mais dépend plutôt de l'équilibre qui s'établit entre ce taux de renouvellement et le taux de disparition cellulaire (Hanahan et Weinberg, 2000). Il est donc évident que l'acquisition d'un phénotype permettant aux cellules malignes d'échapper aux mécanismes régulateurs de l'apoptose représente un avantage majeur pour toute tumeur qui aspire aux stades supérieurs de développement.

1.1.5 Le potentiel répliatif illimité

La combinaison des trois premières altérations décrites jusqu'à présent, l'autosuffisance en facteurs de croissance, l'insensibilité aux signaux inhibiteurs de la croissance et la résistance à l'apoptose, constituent trois moyens dont s'est dotée la cellule pour être complètement indépendante de son environnement. Normalement, cela devrait suffire pour initier la formation de tumeurs, cependant il n'en est rien car les cellules possèdent un dernier mécanisme régulateur, une véritable horloge moléculaire, qui leur permet de contrôler le nombre de division cellulaire qu'elles doivent accomplir au cours de leur vie. Ainsi, une fois leur potentiel répliatif atteint, les cellules doivent arrêter leur croissance; c'est le processus de la sénescence (Hayflick, 2000).

Cette horloge moléculaire fut identifiée à l'extrémité de chaque chromosome dans une structure nommée télomère, une structure d'ADN hautement répétitive et non codante située à l'extrémité d'un chromosome. L'érosion progressive des télomères qui survient au cours de chaque passage conduit invariablement à une déstabilisation des molécules d'ADN et à la mort cellulaire (Dang et Chang, 2007).

Pour contourner cet écueil, les cellules cancéreuses ont donc élaboré des stratégies leur permettant d'exploiter à leur avantage les mécanismes enzymatiques impliqués dans la maintenance des télomères. La principale stratégie consiste à augmenter l'expression et l'activité d'une enzyme, la télomérase. Dans les cellules somatiques saines, cette enzyme est absente; toutefois les cellules cancéreuses l'expriment fortement et son activité sert à maintenir l'intégrité des télomères, empêchant ainsi la destruction des molécules d'ADN et favorisant le maintien d'un état répliatif perpétuel (DePinho, 2000).

1.1.6 L'angiogenèse tumorale soutenue

Pour être en mesure de croître, chaque organe doit pouvoir compter sur un réseau vasculaire très élaboré dont le rôle est d'assurer un apport suffisant en nutriments et en oxygène et ce, pour l'ensemble des cellules qui le composent. En dépit de son caractère anormal, la tumeur est aussi un tissu dont les cellules sont également dépendantes du flux sanguin. Ainsi dans les stades initiaux de son développement, la tumeur pourra s'alimenter en exploitant le réseau vasculaire du tissu dans lequel elle croît, jusqu'au moment où s'établira un équilibre entre le taux de prolifération et le taux de mortalité cellulaire. À cette étape, la progression future de la tumeur sera dépendante de l'activation ou non des processus angiogéniques, qui seront détaillés à la section suivante (Folkman, 1995).

1.1.7 L'invasion tissulaire et la formation de métastases

Le stade ultime du développement tumoral est atteint lorsque notamment, par épuisement des ressources locales, s'échappent de la tumeur primaire des cellules dont la

finalité est d'établir des sites de colonisation où l'accès aux nutriments et l'espace ne seront plus des facteurs limitant la croissance tumorale (Fidler, 2003). Ce processus d'invasion et de formation de métastases représente l'aspect le plus terrifiant du cancer. Cette crainte est d'ailleurs justifiée, car malgré des avancées significatives dans le domaine diagnostique, chirurgical ou thérapeutique, la formation de métastases est la première cause de décès des patients atteints d'un cancer (Fidler, 2003).

Les mécanismes moléculaires sous-jacents à l'invasion tissulaire et la formation de métastases sont extrêmement complexes et les déterminants génétiques et biochimiques de ces processus demeurent encore peu compris. Cependant, plusieurs classes de protéines semblent importantes dans les processus qui mènent au détachement des cellules de la masse primaire suivi de leur établissement à un site distant. Parmi celles-ci, les protéines impliquées dans l'adhésion cellule-cellule comme la E-cadhérine ont un rôle primordial à jouer dans le détachement des cellules du foyer tumoral primaire. Dans plusieurs cancers épithéliaux, il fut observé que la protéine E-cadhérine était altérée, ouvrant ainsi la porte à l'acquisition du phénotype invasif (Wheelock *et al.*, 2008).

Des changements au niveau du profil d'expression des intégrines α et β , dont le rôle consiste à réguler les interactions cellule-matrice, sont également observés à la surface des cellules invasives et métastatiques. Ces changements sont attribuables au fait qu'au cours de leurs périple, les cellules seront confrontées à de nouveaux composants de la matrice extracellulaire et que, pour réussir à s'y établir, elles devront être en mesure de les reconnaître et de s'y attacher (Ramsay *et al.*, 2007).

Finalement, pour faciliter leur invasion et leur implantation dans un nouvel environnement, les cellules cancéreuses ont recours aux protéases extracellulaires. À titre d'exemple, l'activation des protéines de la famille des métalloprotéases de la matrice extracellulaire (MMP) contribue grandement aux processus invasifs en participant entre

autres à la dégradation des différents composants de la matrice extracellulaire comme le collagène (Deryugina et Quigley, 2006; Itoh, 2006).

1.2 L'angiogenèse tumorale

En dépit des nombreux changements génétiques et épigénétiques qui sont à la base de la transformation cellulaire, décrits lors de l'énumération des altérations essentielles, il n'en demeure pas moins qu'une des caractéristiques principales du cancer repose sur sa capacité à influencer son environnement. Ainsi, les anatomopathologistes savent depuis une centaine d'années que le développement tumoral s'accompagne souvent d'un détournement du système vasculaire de l'hôte au profit de la tumeur (Carmeliet et Jain, 2000). Ce n'est toutefois que depuis une trentaine d'années que les bases des mécanismes cellulaires et moléculaires du dialogue entre les cellules tumorales (parenchyme tumoral) et l'environnement (stroma) ont été décryptées. Ces recherches ont permis de définir la place du processus angiogénique dans l'histoire naturelle des tumeurs et ont rapidement débouché sur des tentatives d'applications cliniques. Aujourd'hui, l'angiogenèse tumorale constitue un des thèmes majeurs de la recherche en oncologie en raison de son énorme potentiel thérapeutique (Folkman, 1995).

1.2.1 Le système vasculaire

Le système vasculaire est constitué d'un immense réseau de vaisseaux sanguins dont le rôle principal est de servir au transport du sang dans l'organisme. Parmi les différents vaisseaux servant au transport du sang, on distingue les veines, les artères et les capillaires. La construction des vaisseaux sanguins est dépendante de deux mécanismes principaux, la vasculogenèse et l'angiogenèse.

1.2.1.1 La vasculogenèse

La formation des vaisseaux sanguins au cours de l'embryogenèse porte le nom de vasculogenèse. Ce processus consiste en une série de phénomènes conduisant à la

différenciation *in situ* des précurseurs mésenchymateux des cellules endothéliales (CE) et leur association pour former sur place les premiers vaisseaux sanguins. Rapidement, la réorganisation des différents feuilletts embryonnaires à l'étape de la gastrulation induite par le bFGF (*basic fibroblast growth factor*) favorise l'apparition d'une structure dénommée sac vitellin. Cette structure embryonnaire représente le point de ralliement des hémangioblastes, les précurseurs des CEs et des cellules hématopoïétiques, dérivés du mésoderme. À l'intérieur du sac vitellin, les hémangioblastes vont se regrouper pour former des amas cellulaires dont l'agencement final donne naissance aux îlots sanguins. C'est à l'intérieur de ces îlots que vont intervenir différents facteurs comme le VEGF (*vascular endothelial growth factor*) et son récepteur VEGFR-1 pour permettre la différenciation cellulaire des hémangioblastes en précurseurs des cellules hématopoïétiques. En ce qui a trait aux cellules situées en périphérie des îlots sanguins, ces dernières vont se différencier en angioblastes pour éventuellement se transformer en CEs. L'ensemble de ces différentes étapes conduiront progressivement à la formation du plexus vasculaire primitif (Risau et Flamme, 1995).

1.2.1.2 L'angiogenèse

La définition classique de l'angiogenèse consiste à décrire ce phénomène comme étant la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux pré-existants (Risau, 1997). L'angiogenèse joue un rôle primordial au cours de l'embryogenèse dans la mise en place initiale du système cardio-vasculaire par extension du plexus vasculaire primitif. L'angiogenèse contribue également à la ramification du réseau vasculaire lors de l'organogenèse. Le processus angiogénique se produit par un effet de bourgeonnement ou par division d'un vaisseau pré-existant. À la suite de son apparition, le vaisseau naissant entame une période d'organisation lui permettant de s'anastomoser aux autres conduits du réseau vasculaire afin d'acquérir une architecture fonctionnelle. Finalement, lors de la période de remodelage, différents facteurs permettant les interactions entre les CEs et leur environnement, notamment avec la membrane basale ou les cellules musculaires lisses et

les péricytes, viendront terminer les processus de maturation des néo-vaisseaux pour leur donner leur aspect final. C'est au cours du processus angiogénique qu'il y a formation d'artères, de veines et de capillaires (Risau, 1997).

1.2.1.3 Rôle des capillaires, de l'endothélium et des cellules endothéliales

Les capillaires sont des structures extrêmement fines constituées par l'enroulement d'une seule cellule endothéliale formant ainsi un conduit dont le diamètre ne mesure que 4 à 9 μm , soit à peine assez large pour laisser passer les globules rouges et autres cellules sanguines. La fonction essentielle de la circulation sanguine est assurée au niveau des capillaires qui permettent, en raison de leur structure, les échanges de nutriments et de déchets cellulaires entre les tissus et le sang en circulation. Ces échanges vitaux étant nécessaires au développement et au maintien des fonctions cellulaires, la majorité de nos cellules ne peuvent survivre à plus de 100 ou 200 μm d'un capillaire, ceci représentant la distance maximale de diffusion de l'oxygène dans un tissu (Guyton et Hall, 2003).

La paroi interne des vaisseaux sanguins est tapissée d'une monocouche de CEs qui ainsi assemblées forment l'endothélium vasculaire. Longtemps considéré comme un tissu passif ne servant qu'au transport du sang, l'endothélium vasculaire est aujourd'hui reconnu comme un véritable organe impliqué dans plusieurs processus physiologiques. D'abord, l'endothélium présente des propriétés anatomiques étonnantes, étant constitué de plus de 10^{12} cellules et couvrant une superficie estimée à 1000 m^2 pour un poids approximatif de 1,5 kg chez un individu de 70 kg. De plus, ce tissu forme une barrière sélective pour le transport des molécules entre le sang et les cellules de l'organisme (Folkman, 1995).

Par ailleurs, l'endothélium possède également des propriétés biologiques lui permettant notamment d'assurer la fluidité sanguine. En effet, la surface des CEs qui sont en contact avec le sang participe au maintien de l'équilibre hémostatique en assurant des fonctions anticoagulantes et anti-thrombotiques (Maruyama, 1998). L'endothélium est également impliqué dans la régulation du tonus vasculaire. Dans ce dessein, l'endothélium

sécrète des facteurs vasodilatateurs comme le monoxyde d'azote (NO) généré par l'action de la eNOS (*endothelial nitric oxide synthase*) (Michiels, 2003). L'endothélium peut également se contracter en réponse à la liaison de trois peptides de 21 acides aminés appartenant à la famille de l'endothéline (ET-1, ET-2 et ET-3). L'action de ces trois peptides est régulée par leur liaison à des récepteurs spécifiques (ET_A et ET_B) couplés aux protéines G et exprimés à la surface des cellules musculaires lisses et des CEs respectivement (Lavallée *et al.*, 2001). Finalement, les CEs de l'endothélium peuvent participer à l'élaboration de la réponse inflammatoire en coordonnant le recrutement des cellules inflammatoires aux sites d'infection par le biais de l'expression de cytokines ou de molécules d'adhésion (Michiels, 2003).

Chez l'adulte, les CEs sont extrêmement stables, voire même quasi quiescentes, mais elles n'ont pas atteint pour autant les stades post-mitotiques de la sénescence. En conditions normales, les CEs ont un temps de renouvellement pouvant excéder 1000 jours. Toutefois, lorsque les conditions l'exigent, ce temps de renouvellement peut être réduit à cinq jours (Folkman, 1995). L'activation des CEs peut alors permettre l'adaptation du réseau vasculaire à différentes situations physiologiques comme c'est le cas dans les fonctions reproductrices, la cicatrisation, la reperméabilisation des thromboses et l'adaptation musculaire à l'exercice physique (Carmeliet, 2003). L'angiogenèse devient pathologique lorsque les mécanismes contrôlant les étapes de la formation des vaisseaux sanguins subissent une dérégulation importante. La néovascularisation anarchique est un phénomène couramment observé dans les cas de rétinopathies diabétiques, les hémangiomes infantiles, l'arthrite rhumatoïde et la progression tumorale (Carmeliet, 2003).

1.2.2 Les étapes morphologiques de l'angiogenèse tumorale

À l'échelle tissulaire, les étapes morphologiques du processus angiogénique sont identiques quel que soit le stimulus physiologique ou pathologique initial. La seule différence pouvant exister provient parfois de la nature des mécanismes cellulaires et moléculaires qui peuvent être mis en oeuvre. D'une façon générale, les mécanismes

cellulaires et moléculaires permettant aux CEs de migrer vers le foyer tumoral sont presque identiques à ceux qui sont mis en jeu par les cellules tumorales lors des processus invasifs métastatiques à la différence près que dans le cas de l'angiogenèse, ces processus sont finement contrôlés (Scoazec, 2000). Les étapes morphologiques du processus angiogénique ont été étudiées en détail à l'aide de divers modèles expérimentaux et on sait maintenant que la néovascularisation tumorale procède à l'élaboration des vaisseaux sanguins en cinq étapes distinctes (Carmeliet et Jain, 2000).

1.2.2.1 L'activation des cellules endothéliales

Lors de son développement, la tumeur sécrète diverses molécules pro-angiogéniques qui transitent de la tumeur en direction des vaisseaux sanguins adjacents. Le VEGF est un exemple de ces molécules qui vont interagir via leurs récepteurs membranaires spécifiques exprimés à la surface des CEs. Le VEGF contribue à l'activation des cellules endothéliales via de nombreux mécanismes, notamment en augmentant la perméabilité vasculaire (Nagy *et al.*, 2008).

1.2.2.2 La prolifération des cellules endothéliales

L'étape de prolifération correspond au bourgeonnement de petites masses de CEs sur la face externe de vaisseaux pré-existants à la suite de l'activation des CEs. Les sites privilégiés de formation de ces bourgeons sont les capillaires et, à un moindre degré, les veinules. Les bourgeons endothéliaux néoformés font saillie sur la face profonde des vaisseaux, mais leur progression en direction de la tumeur est limitée par la membrane basale soutenant le capillaire (Scoazec, 2000).

1.2.2.3 Dégradation de la matrice extracellulaire

Les signaux mitogéniques induits par le VEGF stimulent également la production de collagénases (de la famille des MMP) et de protéases tels les activateurs du plasminogène de type urokinase et tissulaire (u-PA et t-PA). Ces enzymes influencent l'angiogenèse en

dégradant les composantes de la membrane basale sous-jacente aux CE des capillaires ou en libérant d'autres molécules angiogéniques séquestrées à l'intérieur de cette matrice extracellulaire, comme c'est le cas pour le bFGF (Carmeliet, 2000).

1.2.2.4 Migration des cellules endothéliales

L'augmentation de la perméabilité vasculaire permet l'extravasation d'une quantité de protéines plasmatiques qui forment dans l'espace interstitiel une matrice provisoire permettant d'offrir un support à la migration des CE. De plus, la membrane basale étant dégradée par l'action protéolytique des protéases cellulaires, plus rien ne fait obstacle à la migration des CE en direction de la source du stimulus angiogénique. Pour s'adapter à leur nouvel environnement et notamment à la nouvelle membrane basale provisoire sur laquelle les cellules se déplacent, ces dernières vont exprimer de nouveaux récepteurs de la matrice extracellulaire dont les plus courants sont ceux de la famille des intégrines ($\alpha V\beta 3$ et $\alpha V\beta 5$ en particulier) (Stupack et Cheresh, 2004).

1.2.2.5 Le remodelage et la stabilisation

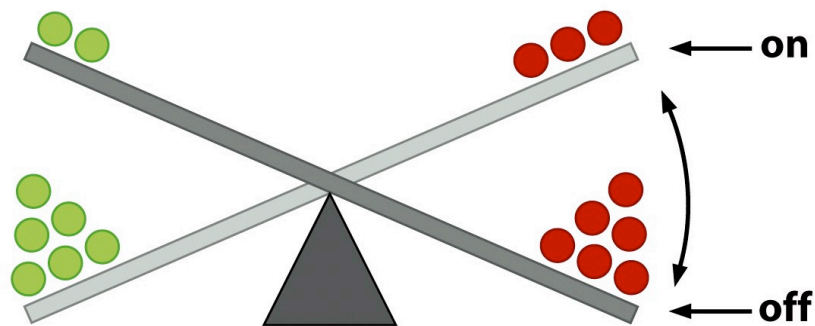
Lorsque les CE terminent leur migration, les capillaires néoformés entrent dans une phase de stabilisation. Cette portion importante du processus implique la perte des propriétés caractéristiques du phénotype angiogénique et la reconstruction de rapports stables entre les CE et leur environnement. La première étape consiste donc à la réorganisation de la paroi vasculaire, qui se caractérise par la sécrétion endothéliale d'une lame basale riche en laminine et en collagène IV (Davis et Senger, 2005). De plus, des facteurs de croissances comme le PDGF favorisent l'accolement des cellules musculaires lisses permettant la stabilisation des néo-capillaires alors que les péricytes permettent de mettre un terme à la prolifération des cellules endothéliales (Armulik *et al.*, 2005).

1.2.3 La place de l'angiogenèse dans l'évolution naturelle des tumeurs

La croissance tumorale peut être divisée en deux phases. La première phase est caractérisée par l'absence d'un réseau vasculaire et pour cette raison est dite avasculaire et la seconde correspond à la phase de croissance vasculaire. En absence de néovascularisation, la plupart des tumeurs humaines persistent *in situ* sous forme latente durant de longs mois, voire même des années. Ces tumeurs ne peuvent excéder un volume de 2 à 3 mm³ et contiennent approximativement un million de cellules. En raison de leur taille, ces tumeurs, en phase initiale de développement, sont souvent asymptomatiques et cliniquement indétectables sauf dans certains cas de cancers de la peau (Folkman, 1995). Les tumeurs avasculaires subsistent grâce à l'apport de la circulation sanguine irrigant l'organe où elles se trouvent et les cellules qui les composent peuvent proliférer aussi rapidement que celles d'une tumeur vascularisée. Toutefois, en absence d'une perfusion adéquate, le taux de prolifération cellulaire est contrebalancé par le taux de disparition cellulaire (Holmgren *et al.*, 1995).

La phase vasculaire survient lorsqu'une sous-population de cellules cancéreuses subit un stress et que ces dernières émettent des signaux favorisant l'acquisition du phénotype angiogénique. Plusieurs signaux peuvent induire l'acquisition du phénotype angiogénique; parmi ceux-ci l'hypoxie est le déclencheur le mieux connu. En raison du développement anarchique des cellules cancéreuses, certaines d'entre elles se retrouvent à plus de 100 µm du réseau vasculaire et cet éloignement crée un environnement où la tension en oxygène est trop faible; les cellules sont alors en hypoxie (Helmlinger *et al.*, 1997). Ces cellules expriment alors les facteurs inductibles de l'hypoxie, HIF-1 α et HIF-1 β , qui en leur qualité de facteurs de transcription activent les gènes codant pour le VEGF, Ang-2 (*angiopoietin-2*) et le bFGF et dont l'activité principale est de déclencher l'activation de l'angiogenèse (Carmeliet et Jain, 2000).

L'événement qui sépare la phase avasculaire de la phase vasculaire est donc la conversion ou le « switch » angiogénique (Figure 2). Il est à noter que l'augmentation de l'expression des facteurs pro-angiogéniques n'est pas une étape suffisante en soi pour permettre l'acquisition par la tumeur du phénotype angiogénique. En effet, de façon concomitante à cette augmentation des activateurs de l'angiogenèse, il doit se produire une diminution marquée des facteurs anti-angiogéniques (Bergers et Benjamin, 2003).



●	Activateurs	●	Inhibiteurs
	VEGF-A		Thrombospondine-1,-2
	VEGF-B, -C		Angiostatine
	FGF-1 (aFGF)		Endostatine
	FGF-2 (bFGF)		etc.
	etc.		

Figure 2 : La balance angiogénique

L'acquisition du phénotype angiogénique par une masse tumorale ne dépend pas uniquement de la surproduction de facteurs activateurs, mais plutôt d'un déséquilibre entre les forces pro- et anti-angiogénique.

D'après Weinberg (2007)

1.2.3.1 Les régulateurs positifs de l'angiogenèse

Lors de l'implantation d'une tumeur sur une surface avasculaire comme la cornée, ou sur une région très bien vascularisée comme la membrane chorio-allantoïde du poulet, il y a apparition, dans les deux cas, de nouveaux vaisseaux sanguins. À la suite de ces observations, il fut supposé que les tumeurs libèrent dans leur milieu des facteurs solubles, dont la fonction est de stimuler le système vasculaire quiescent à former de nouveaux capillaires, soit *de novo* dans le cas de l'expérience utilisant la cornée ou soit par réarrangement du réseau préexistant dans le cas utilisant la membrane chorio-allantoïde (Hanahan et Folkman, 1996). Les principaux régulateurs positifs sont le FGF-1, -2, le VEGF et les angiopoïétines.

Le bFGF (FGF-2) et son homologue acide le aFGF (FGF-1) furent les deux premiers facteurs angiogéniques à être découverts en 1982 (Javerzat *et al.*, 2002). Ces deux protéines appartiennent à une famille de facteurs de croissance caractérisés par le fait qu'ils possèdent une grande affinité de liaison à l'héparine présente à la surface de la matrice extracellulaire (MEC) (Nugent et Iozzo, 2000). Cette propriété du bFGF et du aFGF leur permet de constituer une réserve de facteurs angiogéniques facilement accessibles lors du déclenchement de la néo-vascularisation. Ces facteurs peuvent également se lier à une famille de quatre récepteurs FGFR-1-4, exprimés de façon ubiquitaire sur les CEs et les cellules environnantes comme les fibroblastes. *In vitro*, le bFGF stimule la prolifération et la migration des CEs, en plus d'être un puissant stimulateur des intégrines αV , également nécessaires aux processus migratoires des CEs (Javerzat *et al.*, 2002). Bien que le FGF-1 et le FGF-2 soient de puissants facteurs pro-angiogéniques *in vitro*, il semblerait que ces deux protéines ne jouent qu'un rôle secondaire dans les processus de néo-vascularisation, puisqu'il fut démontré que des corps embryonnaires déficients en FGFR1 démontrent un développement vasculaire normal (Murakami et Simons, 2008).

Le VEGF a été rapidement reconnu comme un régulateur essentiel des processus angiogéniques. La famille du VEGF comprend six membres dont le VEGF-A, -B, -C, -D, -E et le PlGF (facteur de croissance du placenta). Ces ligands sont des molécules très importantes dans la formation du système vasculaire et régulent, via la liaison à leurs récepteurs VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (KDR/Flk-1) et VEGFR-3 (Flt-4), différentes étapes de la vasculogenèse, de l'angiogenèse et de la lymphangiogenèse (Shibuya et Claesson-Welsh, 2006). Ainsi, le récepteur VEGFR-1 joue un double rôle dans l'angiogenèse. Tout d'abord, lors du développement embryonnaire, il fut démontré que des souris déficientes en VEGFR-1 meurent *in utero* en raison d'une croissance excessive des CE, provoquant une désorganisation des vaisseaux sanguins. Ces résultats suggèrent donc que VEGFR-1 agit en tant que régulateur négatif durant l'embryogenèse en séquestrant le VEGF-A. En revanche, chez l'adulte, le VEGFR-1 contribue aux processus angiogéniques par l'induction d'une faible signalisation intracellulaire nécessaire à la croissance des CE et des péricytes, en plus de permettre la survie cellulaire (Shibuya et Claesson-Welsh, 2006). Le récepteur VEGFR-2 joue un rôle critique dans l'angiogenèse physiologique et pathologique en favorisant la prolifération, la perméabilisation et la migration des CE. Pour y parvenir, VEGFR-2 activé par VEGF-A et VEGF-E induit la voie de signalisation PLC/PKC, aboutissant à l'activation du facteur de transcription nucléaire Ets-1, permettant ainsi l'expression d'u-PA (*urokinase-plasminogen activator*) et de différentes MMP nécessaires à la perméabilisation et la dégradation de la MEC (Shibuya, 2006). Le récepteur VEGFR-3 est, quant à lui, exprimé à la surface des CE lymphatiques et constitue le récepteur spécifique au VEGF-C et VEGF-D, responsable de l'expansion du système lymphatique, selon des mécanismes ressemblant à ceux mis en jeu dans l'angiogenèse (Shibuya et Claesson-Welsh, 2006).

Les angiopoïétines (Ang) constituent enfin une autre classe importante de régulateurs positifs de l'angiogenèse. Cette famille de protéines comprend quatre membres, l'Ang-1, l'Ang-2, l'Ang-3 et l'Ang-4, mais seuls les rôles de l'Ang-1 et -2 sont

particulièrement bien compris dans les phénomènes de néovascularisation. L'Ang-1 et -2 se lient au même récepteur membranaire Tie-2 (*tyrosine kinase with immunoglobulin and EGF homology domain*) exprimé à la surface des CE. L'Ang-1, via sa liaison à Tie-2, semble favoriser les étapes finales de l'angiogenèse en permettant la stabilisation des vaisseaux sanguins nouvellement formés (Shim *et al.*, 2007). L'Ang-2 est un antagoniste de l'Ang-1 et est en compétition avec cette dernière pour la liaison au récepteur Tie-2. L'activité pro-angiogénique de l'Ang-2 consiste à déstabiliser les interactions entre les cellules endothéliales et leur environnement, particulièrement en modifiant les profils d'expression des intégrines (Shim *et al.*, 2007). De plus, une forte concentration d'Ang-2 permet d'induire la survie des CE, notamment en activant la voie de signalisation intracellulaire de la PI3K/AKT (Shim *et al.*, 2007). Les angiopoïétines modulent donc deux moments différents dans la formation des vaisseaux sanguins : l'Ang-2 et ses actions sont nécessaires au moment de l'activation des CE, alors que l'Ang-1 est nécessaire lors de l'étape finale de la maturation des vaisseaux sanguins.

1.2.3.2 Les régulateurs négatifs de l'angiogenèse

Chez l'adulte, en conditions physiologiques normales, la grande stabilité du réseau vasculaire soulève l'hypothèse, qu'outre la quiescence des CE, d'autres facteurs contribuent à prévenir le déclenchement de la néo-vascularisation. Parmi ces facteurs, la thrombospondine-1 (TSP-1) fut la première protéine découverte pour son rôle d'inhibiteur de l'angiogenèse. La TSP-1, à l'instar de ses quatre autres homologues, est une glycoprotéine associée à la MEC (Lawler, 2002). Au niveau des cellules tumorales, l'expression de la TSP-1 est grandement diminuée par l'action des oncogènes *Myc* et *Ras*. Toutefois, au niveau des CE, des fibroblastes et des cellules immunitaires, la TSP-1 est fortement exprimée via l'activité transcriptionnelle de p53 (Ren *et al.*, 2006). La TSP-1 inhibe l'angiogenèse selon deux mécanismes. D'abord, elle agit directement en inhibant les processus de migration et de prolifération des CE, tout en interférant avec les voies de survie des CE stimulées par les signaux tumoraux. Finalement, la TSP-1 agit de manière

indirecte en séquestrant les facteurs de croissance présents dans l'environnement tumoral (Kazerounian *et al.*, 2008).

D'autres inhibiteurs ne sont pas directement exprimés à la surface des CEs mais sont plutôt produits par le clivage de protéines extracellulaires. C'est le cas particulier de l'angiostatine et de l'endostatine. L'angiostatine est un peptide provenant du clivage enzymatique du plasminogène (O'Reilly, 1994) alors que l'endostatine est un fragment dérivé du collagène XVIII (O'Reilly, 1997). L'inactivation des gènes codant pour le plasminogène et le collagène XVIII n'entraîne aucun effet sur la morphogenèse vasculaire, ce qui suggère que ces molécules n'interviennent pas dans le contrôle de l'angiogenèse physiologique (Scoazec, 2000). Toutefois, ces deux peptides se révèlent être des inhibiteurs puissants de l'angiogenèse tumorale en interférant avec plusieurs fonctions endothéliales, notamment la migration des CEs (Eriksson *et al.*, 2003).

1.2.4 L'angiogenèse tumorale en tant que cible thérapeutique

La reconnaissance et la compréhension des mécanismes de l'angiogenèse tumorale en tant que composante essentielle à la progression néoplasique et de la formation de métastases a permis la mise au point de nouvelles stratégies anti-cancéreuses fondées sur l'inhibition du processus angiogénique (Folkman, 2003). La validation de l'utilisation des thérapies anti-angiogéniques dans le traitement du cancer est survenue en février 2004, lorsque le FDA (*Food and Drug Administration*) américain a approuvé la mise en marché du bevacizumab (Avastin, de Genentech). L'Avastin est un anticorps monoclonal humanisé dirigé contre le VEGF-A et qui est utilisé dans le traitement du cancer colorectal en combinaison avec une chimiothérapie à base de 5-fluoroacil (5-FU) (Ferrara et Kerbel, 2005). Aujourd'hui, près d'une quarantaine d'agents anti-angiogéniques sont présentement en essai clinique (Folkman, 2007).

Historiquement, presque toutes les étapes du processus angiogénique ont servi de cibles pour la mise au point des stratégies anti-angiogéniques. Ainsi, on distingue

l'émergence de quatre classes d'agents anti-angiogéniques. Le premier groupe comprend les molécules visant l'inhibition de la liaison des facteurs angiogéniques aux récepteurs présents à la surface des CEs (Shepherd et Sridhar, 2003). Le second groupe correspond aux molécules visant l'inhibition de la réponse des CEs aux facteurs angiogéniques en interférant avec les voies de signalisation intracellulaire. Plusieurs membres de ce groupe sont des inhibiteurs endogènes de l'angiogenèse comme l'angiostatine et l'endostatine (Cao, 2001). Le troisième groupe est constitué des molécules naturelles ou synthétiques impliquées dans l'inhibition des MMP responsables de la dégradation de la MEC (Shepherd et Sridhar, 2003). Finalement, les agents thérapeutiques du quatrième groupe visent la destruction des vaisseaux sanguins nouvellement formés. Cette classe d'agents anti-angiogéniques mise sur le fait que les vaisseaux tumoraux expriment des marqueurs de surfaces différents de ceux que l'on retrouve à la surface de l'endothélium normal. À titre d'exemple, l'intégrine $\alpha V\beta 3$ est un de ces marqueurs spécifiques aux CEs tumorales et la neutralisation de cette intégrine amène une diminution de la vascularisation intra-tumorale subséquente à la mort des CEs (Shepherd et Srihard, 2003). Cependant, depuis l'ajout de l'Avastin à l'arsenal thérapeutique, très peu de molécules aux propriétés anti-angiogéniques ont passé avec succès les phases cliniques de développement.

Il y a de nombreuses raisons expliquant ces insuccès, notamment l'inefficacité des modèles animaux (xénogreffes) utilisés pour mesurer le potentiel thérapeutique dans les phases pré-cliniques. Pour pallier cette lacune, il fut proposé que l'utilisation de modèles, dans lesquels la tumeur peut se développer dans un micro-environnement approprié chez l'hôte, est préférable car il fut démontré que l'endothélium est phénotypiquement distinct d'un organe à l'autre (Ribatti *et al.*, 2002). Ainsi, les méthodes favorisant l'implantation des tumeurs à des sites orthotopiques ou l'utilisation de souris transgéniques développant des tumeurs spontanées au niveau de certains organes sont préférables au modèle d'implantation sous-cutanée. Ceci démontre donc que le micro-environnement tumoral est un déterminant important de l'efficacité des thérapies anti-angiogéniques (McCarty *et al.*, 2003). En plus des différences phénotypiques, il est de plus en plus évident que les CEs

associées aux tumeurs ne sont pas aussi génétiquement stables que l'on pouvait le croire dans les années 1990. En effet, des analyses cytogénétiques démontrent l'existence d'anomalies comme l'aneuploïdie et la formation de centrosomes anormaux observés à l'intérieur du noyau des CEs associées aux tumeurs (Hida *et al.*, 2004). Par ailleurs, des anomalies chromosomales furent également démontrées au niveau des CEs dans les lymphomes humains (Streubel *et al.*, 2004).

Finalement, certains problèmes de résistance peuvent survenir. Par exemple, en ciblant une seule molécule angiogénique comme le VEGF-A, les cellules cancéreuses peuvent éventuellement contourner cette inhibition en utilisant d'autres molécules angiogéniques comme le VEGF-C et le VEGF-D qui possèdent la faculté de se lier au récepteur VEGFR-2 à la suite d'un clivage protéolytique (Ferrara et Kerbel, 2005). Les cellules cancéreuses peuvent également acquérir un phénotype de résistance à l'hypoxie, les rendant moins dépendantes de l'angiogenèse (Kerbel *et al.*, 2001). En conclusion, les progrès réalisés au cours des deux dernières décennies concernant la compréhension du rôle de l'angiogenèse tumorale et de ses mécanismes moléculaires débouchent aujourd'hui sur des espoirs thérapeutiques qui doivent maintenant être concrétisés.

1.3 Coagulation et cancer

Le terme *hémostase* sert à désigner l'ensemble des mécanismes permettant la prévention de la perte de sang à la suite d'un dommage subi au niveau de l'endothélium. En situation physiologique, l'activation des processus hémostatiques se reflète par la mise en œuvre de quatre principaux mécanismes permettant d'enrayer l'hémorragie. Ces mécanismes sont : (1) le déclenchement d'une vasoconstriction sous le contrôle du système nerveux et l'influence de certains facteurs plaquettaires, (2) l'agglutination des plaquettes activées pour former le clou plaquettaire primaire, (3) l'initiation de la formation d'un caillot de fibrine résultant de l'enclenchement des réactions de la coagulation sanguine et (4) la dégradation du caillot ou, selon le cas, la formation d'un tissu fibreux à l'intérieur du caillot sanguin, afin d'obturer définitivement la brèche dans la paroi vasculaire (Guyton et

Hall, 2003). Chez l'humain et les vertébrés supérieurs, le système de la coagulation sanguine représente donc la première ligne de défense contre les traumatismes vasculaires.

Ce n'est que depuis une quarantaine d'années que les bases moléculaires de la coagulation sanguine sont mieux comprises. C'est en effet en 1964 que le concept de la cascade enzymatique de la coagulation fut décrit pour la première fois (Macfarlane, 1964; Davie et Rotnoff, 1964). Dans cette cascade, il y a un minimum de 10 protéines plasmatiques parmi lesquelles figurent la prothrombine, les facteurs V, VII, VIIa, VIII, IX, X, XI, XIII, le fibrinogène et un facteur tissulaire (TF) qui contribue à la formation d'un caillot solide de fibrine. La plupart de ces facteurs de coagulation sont synthétisés, sous une forme zymogène inactive, par les hépatocytes au niveau du foie. Pour contrer la réaction de formation du caillot de fibrine, les processus anticoagulants de la machinerie hémostatique comprennent quant à eux au moins quatre protéines plasmatiques (antithrombine III, protéine C, protéine S, TFPI) et une protéine membranaire (TM, thrombomoduline) (Butenas et Mann, 2002; Spronk *et al.*, 2003). L'activation de la coagulation sanguine dépend donc d'un équilibre entre les forces procoagulantes et les forces anticoagulantes. Le moindre déséquilibre causé par une situation pathologique peut entraîner deux effets : d'une part la réduction du pouvoir hémostatique prédispose aux hémorragies fréquentes comme cela se produit dans les cas d'hémophilie, et d'autre part une augmentation de la sensibilité du système hémostatique peut mener à la formation excessive de thromboses, un phénomène couramment observé chez les patients cancéreux (Furie *et al.*, 2008).

1.3.1 Les mécanismes moléculaires de la coagulation sanguine

La coagulation sanguine s'articule autour de deux voies principales : la voie intrinsèque ou la voie de contact et la voie extrinsèque ou la voie de TF (Fig. 3). Même si à l'origine les voies extrinsèque et intrinsèque semblaient jouer un rôle équivalent et exclusif dans l'activation de la coagulation sanguine, il est aujourd'hui assez clair que la voie extrinsèque joue un rôle majeur dans le déclenchement de l'hémostase et que la voie

intrinsèque joue par conséquent plutôt un rôle d'amplification du processus hémostatique (Norris, 2003).

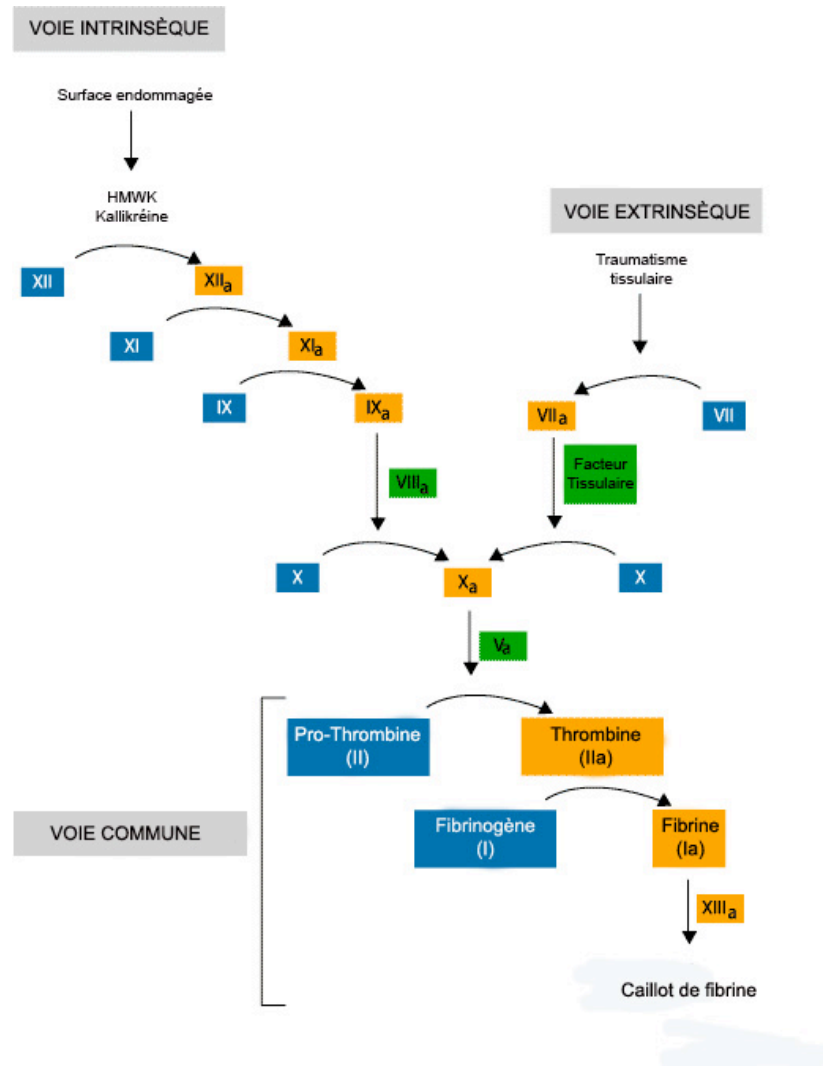


Figure 3 : La cascade de coagulation sanguine

La génération du caillot de fibrine implique une série d'activation de protéases en série selon un mécanisme complexe, dans lequel des protéines inactives (zymogènes) sont activées à la suite de clivages protéolytiques. La coagulation regroupe trois voies : la voie extrinsèque, intrinsèque et commune qui ensemble aboutissent à la formation des monomères de fibrines et ultimement à la réparation cellulaire.

Modifiée d'AnaesthesiaUK

1.3.1.1 La voie extrinsèque et le rôle de TF

Le gène *TF* est présent sur le chromosome 1. TF appartient à la famille des récepteurs de cytokines de classe II, partageant un degré significatif d'homologie avec la classe des récepteurs aux interférons. La protéine TF mature, une glycoprotéine de 47 kDa, consiste en une chaîne de 263 acides aminés constituée de trois domaines : un large domaine extracellulaire (résidus 1 à 219), un domaine transmembranaire (résidus 220 à 242) et une courte queue cytoplasmique de 21 acides aminés (résidus 243 à 263). Le domaine extracellulaire est important pour concrétiser l'activité hémostatique de la protéine. Le domaine transmembranaire est impliqué dans la stabilisation de la molécule et le positionnement favorable nécessaire à son action protéolytique. La portion cytoplasmique, quant à elle, semble importante pour induire la signalisation intracellulaire (Price *et al.*, 2004). TF est exprimé principalement à la surface des cellules extravasculaires comme les cellules musculaires lisses et les fibroblastes. Toutefois, il est maintenant reconnu que TF est également exprimé dans l'environnement tumoral par les macrophages, les monocytes, les plaquettes activées ainsi que des microparticules en suspension dans la circulation sanguine (Price *et al.*, 2004).

Traditionnellement, la voie extrinsèque est initiée lorsque TF, normalement exprimé à la surface des cellules subendothéliales, est exposé à la circulation sanguine à la suite d'un dommage ou de l'activation de l'endothélium. Dans la première phase dite d'initiation, le FVII ou le FVIIa, une protéase à sérine circulant dans le plasma, s'associe à TF pour former le complexe membranaire TF:FVIIa. Ce premier complexe est le grand responsable de la cascade enzymatique décrite à la figure 3. Au niveau de la circulation sanguine, le FVII se retrouve à 99% sous sa forme zymogène inactive et environ 1% se retrouve sous sa forme active (FVIIa). Toutefois, en absence de son cofacteur (TF), le FVIIa circulant démontre une très faible activité enzymatique. La formation du complexe TF:FVIIa est donc essentielle à l'activation des deux principaux substrats du FVIIa : les FIX en FIXa et FX en FXa (McVey, 1999). À cette étape, qui caractérise la fin de la phase

d'initiation, le FXa en absence de son cofacteur (FVa) ne génère que des traces de thrombine (de l'ordre du femto- ou du picomolaire), ce qui est nettement insuffisant pour déclencher la formation d'un caillot de fibrine. Cependant, la thrombine produite va plutôt participer par des boucles de rétroactivation à la conversion des FV, FVIII et FIX en leurs formes actives (Brummel *et al.*, 2002).

1.3.1.2 La voie intrinsèque

De façon alternative, les facteurs de la voie intrinsèque peuvent aussi activer le FIX. Cette voie est déclenchée lorsque le FXII (facteur de Hageman) se lie à une surface chargée négativement, comme le collagène sub-endothélial, ce qui produit une augmentation locale de la concentration du FXII et permet son activation en FXIIa. Le FXIIa active à son tour la prékallikréine en kallikréine et le FIX en FIXa (Norris, 2003). En dépit du fait que la voie intrinsèque puisse effectivement activer le FIX, des études tendent à démontrer que cette voie est plutôt secondaire dans le processus hémostatique. En effet, des déficiences en FXII devraient normalement causer l'apparition de troubles hémorragiques; cependant il n'en est rien et l'absence de FXII est même associée à des événements thrombotiques (Gailani et Renné, 2007). Finalement, cette voie semble être plus impliquée dans le clivage des molécules de kininogène de haut poids moléculaire (*high-molecular-weight kininogen*) (HMWK), dont les actions biologiques, combinées avec celle de la kallikréine, sont très diverses dans le système vasculaire (Moreau *et al.*, 2005).

1.3.1.3 La voie commune : formation des complexes d'activation du FX et de la prothrombine

Avec l'activation du FIX, débute alors la phase de propagation qui permet une production explosive de thrombine. Une fois que le FIXa est activé, soit par la voie extrinsèque ou intrinsèque, ce dernier forme un complexe avec le FVIIIa, du calcium et des phospholipides. Ce deuxième complexe moléculaire a pour rôle d'accélérer la vitesse de

conversion du FX en FXa et joue en ce sens un rôle essentiel dans l'hémostase (Norris, 2003).

L'étape finale nécessaire à la production de la thrombine requiert la formation d'un dernier complexe moléculaire. Le complexe de la prothrombinase est constitué du FXa lié au FVa ainsi qu'à du calcium sur une surface membranaire de phospholipides. Comme son nom l'indique, ce complexe permet la conversion de la prothrombine en sa forme active la thrombine. La thrombine ainsi générée, cette fois en quantité suffisante, va enclencher le clivage des molécules solubles de fibrinogène, afin de produire des monomères insolubles de fibrine nommés fibrinopeptides A et B. Ces fibrinopeptides vont ensuite interagir de façon non-covalente pour former un réseau plus ou moins solide permettant de colmater la brèche vasculaire. Ce réseau de fibrine va par la suite être solidifié par l'action du FXIIIa (transglutaminase), activé par la thrombine (Griffin *et al.*, 2002).

1.3.1.4 Régulation de la coagulation sanguine et le rôle de TFPI

La première protéine impliquée dans les phénomènes de régulation de la coagulation sanguine est l'inhibiteur du facteur tissulaire (*tissue factor pathway inhibitor*) (TFPI). Le TFPI est synthétisé par différents types de cellules, notamment les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses, les monocytes, les fibroblastes et les cardiomyocytes (Bajaj, 2001; Lwaleed et Bass, 2006). Le gène du TFPI est localisé sur le chromosome 2 et code pour une protéine de 35 kDa constituée de trois domaines multivalents de type Kunitz, une région N-terminale acide et une région C-terminale basique (Fig. 4). La fonction régulatrice de TFPI consiste à inactiver très rapidement les actions du complexe TF:FVIIa en séquestrant le FVIIa et le FXa pour former un complexe quaternaire. Des études de la structure de TFPI ont permis de démontrer que le premier domaine (Kunitz-1) se lie préférentiellement au FVIIa alors que le second domaine (Kunitz-2) se lie au FXa. Il est à noter que TFPI doit dans un premier temps se lier au FXa afin de pouvoir finalement se lier au FVIIa et TF. Le troisième domaine (Kunitz-3), quant à lui, ne présente aucune activité anti-hémostatique connue (Lwaleed et Bass, 2006). Pour sa

part, la région C-terminale de TFPI est nécessaire à la liaison de TFPI à la surface cellulaire et ainsi permettre l'internalisation du complexe quaternaire TF:FVIIa:FXa:TFPI (Ettelaie *et al.*, 1999; Lwaleed et Bass, 2006).

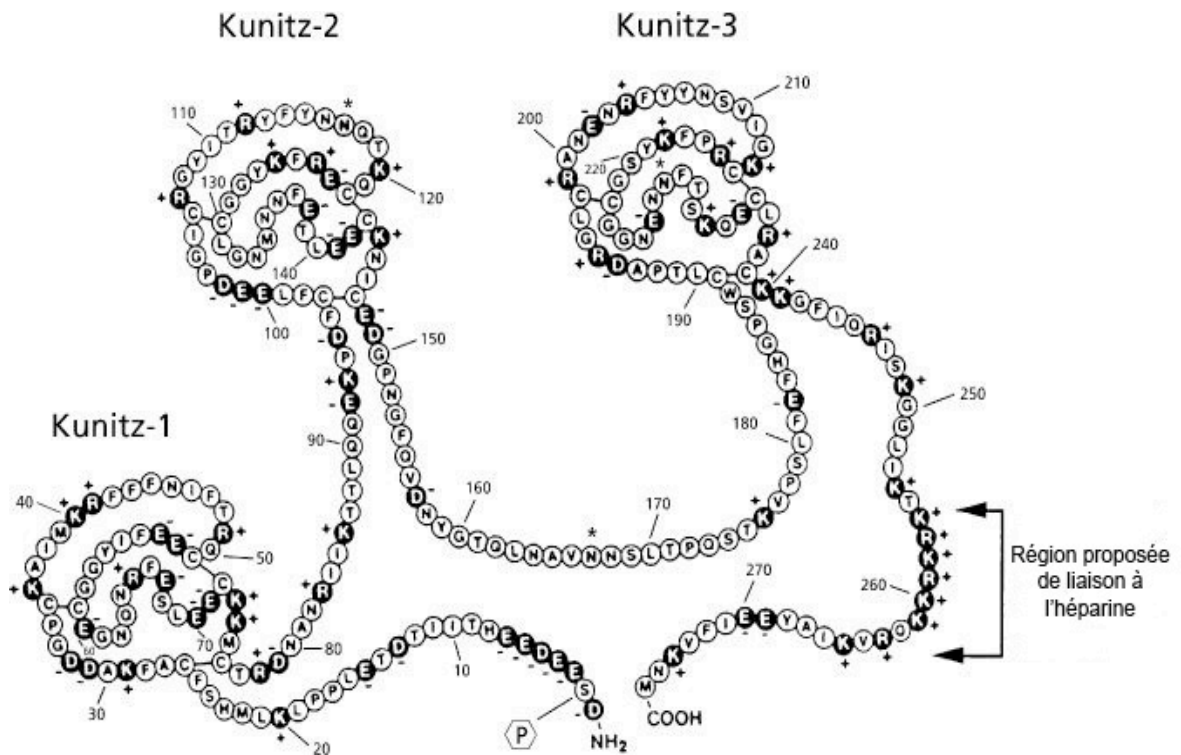


Figure 4 : Structure de l'inhibiteur du facteur tissulaire (TFPI)

Le TFPI contient trois domaines de types Kunitz, qui comprennent chacun des séquences très conservées de 50 à 60 acides aminés. Ces domaines se caractérisent également par la présence à l'intérieur de chacun d'eux de trois ponts disulfures formés entre les résidus cystéines. Chacun de ces domaines possède une fonction particulière; ainsi le domaine Kunitz-1 sert à capter le FVIIa, le domaine Kunitz-2 sert à capter le FXa, alors que le domaine Kunitz-3 sert plutôt à stabiliser le complexe quaternaire formé entre TF:FVIIa:FXa en se liant à des lipoprotéines de surfaces.

D'après Lwaleed et Bass (2006)

La seconde protéine possédant une activité anticoagulante est l'antithrombine III, un inhibiteur général des protéases à sérine, pouvant inactiver un grand nombre d'enzymes de la coagulation. Ainsi, les FIXa, FXa et la thrombine sont rapidement inactivés par l'action de l'antithrombine. Toutefois, contrairement au TFPI qui inhibe spécifiquement le complexe TF:FVIIa:FXa, l'antithrombine séquestre les formes libres de la thrombine, du FIXa et du FXa, ce qui a pour effet de confiner l'action de ces protéines au site de la formation du caillot sanguin. La thrombine liée à l'antithrombine forme un complexe thrombine-antithrombine (TAT) qui est rapidement éliminé de la circulation (Norris, 2003).

Finalement, la voie de la protéine C est un autre mécanisme anticoagulant important. La protéine C est une protéine dépendante de la vitamine K et circule librement dans le plasma. Pour devenir active, la protéine C doit dans un premier temps se lier au récepteur transmembranaire exprimé à la surface des cellules endothéliales (*endothelial protein C receptor*) (EPCR). L'activation de la protéine C requiert également la liaison de la thrombine, qui elle se lie à un autre récepteur membranaire TM, afin de cliver la protéine C. Finalement, la protéine C doit, pour devenir complètement active (APC), se dissocier de son récepteur EPCR et se lier à son cofacteur la protéine S. Le complexe S:APC peut alors inactiver les FVa et FVIIIa, inhibant par le fait même l'activité des complexes favorisant la formation du FXa et de la thrombine (Esmon, 2003).

1.3.1.5 La fibrinolyse

L'objectif ultime des réactions hémostatiques est la formation d'un caillot de fibrine et, dans la majorité des cas, ce caillot est dégradé lorsque l'intégrité vasculaire est rétablie. La fibrinolyse consiste donc en la dissolution des caillots intravasculaires par la plasmine. Cette enzyme de 560 acides aminés, comme plusieurs autres facteurs de coagulation, circule dans le sang sous la forme d'un zymogène, le plasminogène. Le plasminogène peut se lier à la fibrine via ses sites de liaisons spécifiques à la lysine située sur la chaîne lourde de la molécule. La liaison subséquente d'activateur du plasminogène comme l'activateur

tissulaire (tPA) ou l'activateur du type urokinase (uPA) permettent l'hydrolyse du plasminogène en plasmine (Norris, 2003). Cette plasmine, une fois libérée, commence alors son travail de digestion du caillot de fibrine.

Ces réactions fibrinolytiques sont étroitement contrôlées par plusieurs inhibiteurs. D'abord l'antiplasmine, une glycoprotéine de 452 acides aminés, neutralise la plasmine circulante en formant avec elle un complexe inactif. Ensuite, l'activation du plasminogène peut être évitée par l'action d'inhibiteurs des activateurs du plasminogène. Cette famille de protéines comprend trois membres PAI-1, PAI-2 et PAI-3. PAI-1 semble être le principal facteur responsable de cette inhibition. Finalement, la fibrinolyse peut également être inhibée par TAFI (*thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor*), le plus récent inhibiteur découvert (Norris, 2003).

1.3.2 Les désordres hémostatiques associés au cancer

Les patients atteints de cancer démontrent par rapport à la population générale une plus grande susceptibilité à développer des événements thrombotiques, suggérant ainsi que ces désordres de la coagulation sont des phénomènes communs au cancer. Cette association entre l'hypercoagulabilité et le développement néoplasique est reconnue en clinique sous le terme de syndrome de Trousseau, nommé ainsi en l'honneur du médecin français Armand Trousseau, qui fut le premier à publier ses observations concernant le haut taux d'incidence des thromboses veineuses chez des patients souffrant de cancer de l'appareil digestif (Trousseau, 1865). Aujourd'hui, le dépistage en laboratoire indique que près de 50% des patients aux prises avec une tumeur primaire et près de 90% des patients ayant des métastases démontrent des altérations d'un ou de plusieurs paramètres de la coagulation. Les anomalies les plus fréquemment observées concernent une augmentation des facteurs de coagulation V, VIII, IX et XI, du fibrinogène, des produits de dégradation du fibrinogène et des comptes plaquettaires (Loreto *et al.*, 2000). Ces anomalies produisent généralement des événements thrombotiques veineux du type DVT (*deep vein thrombosis*) qui sont typiquement associés à la croissance d'une tumeur primaire et mènent souvent à la

formation d'embolies pulmonaires (Sakuma *et al.*, 2006) ou des DIC (*disseminated intravascular coagulation*) observés couramment chez les patients atteints de leucémies et ceux ayant des lésions métastatiques (Rickles et Falanga, 2001). Dans l'ensemble, ces manifestations cliniques constituent souvent les premiers symptômes menant à la découverte d'un cancer occulte. En dépit du fait que le lien entre le cancer et la coagulation constitue une observation plus que centenaire, ce n'est que tout récemment que des avancées en biochimie, en biologie cellulaire et moléculaire ont permis une meilleure compréhension des interactions complexes survenant entre les cellules cancéreuses et les facteurs hémostatiques (Lee, 2002).

1.3.3 Pathophysiologie du syndrome de Trousseau

L'existence d'un lien moléculaire entre l'activation de la coagulation et le cancer est appuyée sur de nombreuses études histologiques utilisant des méthodes d'immunohistochimie et de microscopie électronique démontrant la présence de dépôt de fibrine à l'intérieur et autour du foyer tumoral. L'induction de l'état procoagulant par une tumeur est un phénomène qui nécessite des interactions parfois encore mal comprises entre les cellules cancéreuses et les différentes composantes du système hémostatique, provoquant un déséquilibre entre les facteurs procoagulants et les facteurs anticoagulants (De Cicco, 2004). Ces interactions font intervenir des mécanismes intrinsèques et extrinsèques à la tumeur qui sont résumés à la Figure 5.

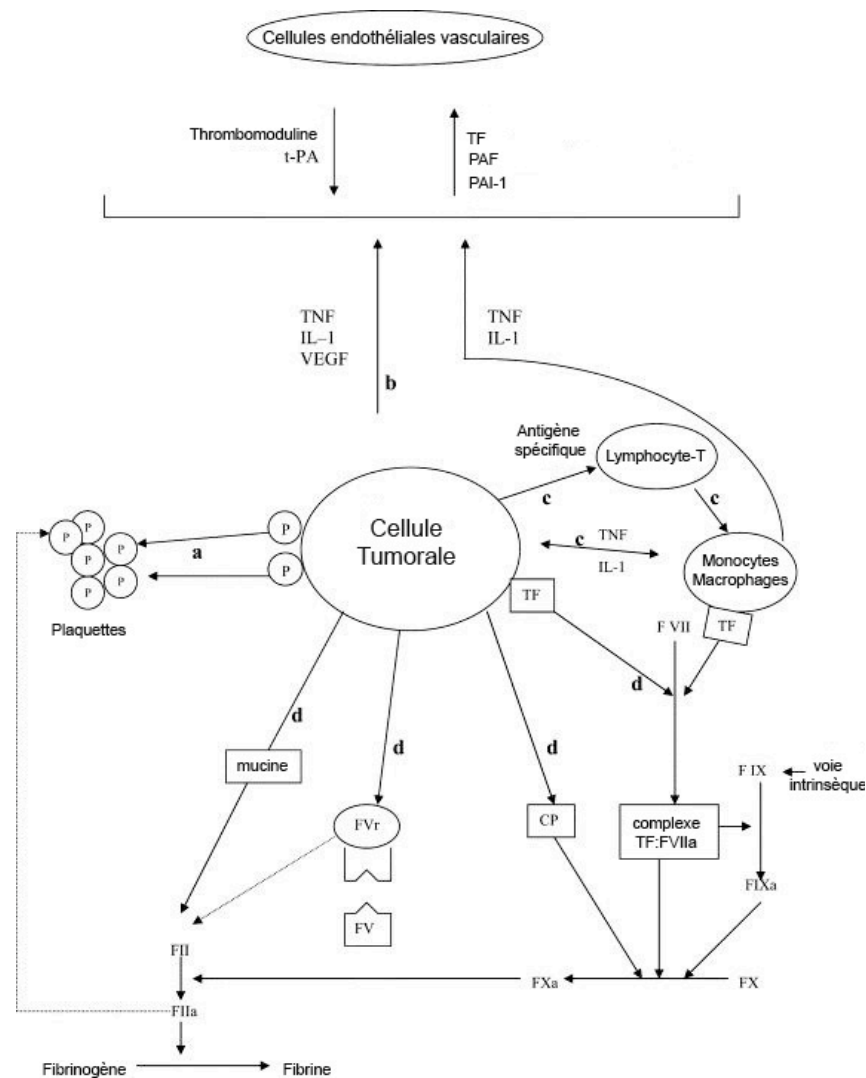


Figure 5 : Le rôle central des cellules tumorales dans la pathogenèse de l'état pro-coagulant des patients cancéreux

(a) interaction directe avec les plaquettes qui induisent l'agrégation; (b) interaction avec les CEs par le biais des protéines **TNF** (*tumour necrosis factor*), **IL-1** (*interleukin-1*), **VEGF** qui induisent l'expression endothéliale de **TF**, le relargage de **PAF** (*platelet activating factor*) et de **PAI-1** en plus de diminuer l'expression de la thrombomoduline et de **tPA**; (c) stimulation des leucocytes à produire **TF** et des cytokines (**TNF**, **IL-1**); (d) expression directe de molécules procoagulantes telles que : **TF**, **CP**, le récepteur du facteur **V** et la **mucine**.

Modifiée de De Cicco (2004)

1.3.3.1 Mécanisme intrinsèque : activités procoagulantes de la tumeur

La tumeur peut influencer directement l'état procoagulant de son environnement en augmentant la synthèse de protéines procoagulantes comme TF, qui est anormalement exprimé à la surface de plusieurs types de cellules cancéreuses (Loreto *et al.*, 2000). En plus de TF, les cellules cancéreuses peuvent également exprimer le procoagulant du cancer (CP). Cette protéase à cystéine dont la synthèse est dépendante de la vitamine K est reconnue pour activer directement le FX, indépendamment du FVIIa. Chez l'adulte sain, CP n'est pas exprimé. Cette protéine est surtout présente au niveau des tissus néoplasiques incluant les sarcomes, les neuroblastomes, les mélanomes, les carcinomes du poumon, le cancer du sein, le cancer du rein et les leucémies (Loreto *et al.*, 2000; De Cicco, 2004). Outre TF et CP dont le rôle est d'activer le FX en FXa, les cellules cancéreuses de plusieurs tumeurs peuvent également produire de la mucine et le récepteur du FV (FVr). Ces deux protéines contribuent à l'établissement d'un état procoagulant en convertissant la prothrombine en thrombine soit de manière directe dans le cas de la mucine ou de manière indirecte via l'activation du FV en FVa dans le cas du FVr (Loreto *et al.*, 2000).

1.3.3.2 Mécanisme intrinsèque : activités fibrinolytiques de la tumeur

La tumeur peut également influencer directement l'activité fibrinolytique en augmentant la synthèse des deux activateurs du plasminogène (tPA et uPA). L'expression d'uPA est corrélée à l'agressivité ainsi qu'au grade histologique de différents carcinomes. Conséquemment, l'uPA est utilisé comme marqueur diagnostique de la progression du cancer de la prostate (Loreto *et al.*, 2000). De plus, la tumeur peut moduler l'expression de l'inhibiteur PAI-1, ce qui provoque une diminution marquée de la fibrinolyse au profit de la coagulation (De Cicco, 2004).

1.3.3.3 Mécanisme intrinsèque : activités pro-inflammatoires de la tumeur

Finale­ment, la tumeur relâche dans son environnement certaines cytokines favorisant l'établissement d'un état inflammatoire. Ces cytokines, entre autres, le TNF- α et l'interleukine-1 β (IL-1 β) induisent l'expression de TF et de PAI-1 en plus de diminuer l'expression de la thrombomoduline au niveau des CEs. Cette diminution d'expression de la thrombomoduline provoque une diminution d'activation de la protéine C (Esmon *et al.*, 1999). De surcroît, la présence de ces cytokines au site d'inflammation provoque une accumulation de neutrophiles et de macrophages qui une fois activés produisent une quantité de protéines, dont les MMPs. Certaines de ces protéases, notamment les MMP-1, -7, -8, -9 et -12, sont capables de cliver le TFPI et ainsi diminuer l'efficacité de l'inhibiteur (Belaouaj *et al.*, 2000). L'activité pro-inflammatoire des tumeurs contribue donc grandement à réduire les défenses anticoagulantes.

1.3.3.4 Mécanisme intrinsèque : interactions entre les cellules cancéreuses et les plaquettes

L'agrégation plaquettaire est un processus essentiel nécessaire à la formation d'un thrombus. Il fut démontré que plus de 30% des patients atteints de cancer possèdent un nombre élevé de plaquettes (De Cicco, 2004). Les cellules cancéreuses peuvent également contribuer à l'activation du système de coagulation en interagissant avec les plaquettes. En effet, les cellules tumorales ont la capacité d'exprimer la glycoprotéine Ib α (GPIb α), qui joue un rôle important dans l'activation et l'agrégation des plaquettes sanguines (Rickles et Falanga, 2001). Une fois que ces dernières sont activées, elles participent non seulement à la formation du clou plaquettaire, mais elles vont aussi libérer dans l'environnement une multitude de facteurs nécessaires à la réaction hémostatique, à la stimulation de l'angiogenèse et à la survie des CEs (Rickles et Falanga, 2001).

1.3.3.5 Mécanisme extrinsèque : la chimiothérapie

Les traitements de chimiothérapie peuvent également contribuer à l'induction de l'état prothrombotique. Les cas les mieux étudiés se rapportent aux patients recevant la thérapie combinée CMF (cyclophosphamide, méthothrexate, 5-fluoro-uracile) utilisée dans le traitement du cancer du sein. Ces agents thérapeutiques sont reconnus pour interférer avec la synthèse des facteurs de coagulation dépendant de la vitamine K, comme c'est le cas pour la protéine C. Le tamoxifène est un autre agent thérapeutique couramment utilisé dans le traitement du cancer du sein. Cet agent aux propriétés estrogéniques peut influencer le système hémostatique en diminuant lui aussi les niveaux d'expression des protéines anticoagulantes. Selon les mécanismes reconnus pour l'estrogène, le tamoxifène inhibe l'expression de la protéine C et de l'antithrombine III (De Cicco, 2004). De plus, le tamoxifène favorise l'activation de la coagulation induite par TF en inactivant TFPI (Erman, 2004). Donc la chimiothérapie peut favoriser l'établissement d'un état procoagulant, principalement en diminuant l'expression des protéines anticoagulantes.

1.3.4 Rôles des protéines hémostatiques dans le développement vasculaire

Le système hémostatique est anatomiquement et fonctionnellement inséparable du système vasculaire. À titre d'exemple, chez des souris dont le gène *TFPI* est inactivé, 60% des embryons sont non viables et meurent vers le neuvième jour de la gestation en raison d'hémorragie sévère. Parmi les embryons survivant au neuvième jour, aucun ne réussit à atteindre la période néonatale, car ces derniers développent d'importantes déficiences dans l'organisation du réseau vasculaire au niveau du sac vitellin (Huang *et al.*, 1997). Des études similaires décrivent des effets semblables chez des souris *TF*^{-/-} (Carmeliet *et al.*, 1996). Les embryons déficients pour TF meurent tous au dixième jour de gestation, à la suite de la fragilisation des vaisseaux sanguins du sac vitellin qui sont essentiels aux échanges foetomaternels. Ces vaisseaux sont déficients au niveau des cellules mésenchymateuses (cellules musculaires lisses et les péricytes) en α -actine qui est

nécessaire à l'organisation de la paroi vasculaire (Mackman, 2004). L'observation des défauts au niveau des vaisseaux du sac vitellin indique que les facteurs de coagulation sont importants pour maintenir l'intégrité des parois vasculaires et éviter les hémorragies, non seulement au cours de la vie adulte mais également lors de la construction des vaisseaux sanguins chez l'embryon (Carmeliet, 2001; Brodsky, 2002).

1.3.5 Rôles des protéines hémostatiques dans la régulation de l'angiogenèse

Il y a maintenant plusieurs indices démontrant que le système de coagulation n'est pas seulement impliqué dans les événements thrombotiques associés au cancer. En effet, le système hémostatique joue aussi un rôle important dans la biologie des tumeurs. Les cellules cancéreuses interagissent avec les protéines de la coagulation et de la fibrinolyse pour favoriser leur croissance, pour stimuler l'angiogenèse tumorale et permettre leur dissémination à travers tout le corps pour former des métastases. La stratégie des tumeurs consiste donc à détourner à leur avantage les systèmes hémostatiques et vasculaires (Nijziel *et al.*, 2006). Elles parviennent à détourner le système vasculaire en mettant à profit les fonctions non hémostatiques des protéines de la coagulation.

1.3.5.1 Rôles pro-angiogéniques de TF, de la thrombine, de la fibrine et de la sphingosine 1-phosphate

TF, en sa qualité de récepteur membranaire du FVIIa, est en mesure d'induire une signalisation intracellulaire qui permet une régulation de l'angiogenèse et ce indépendamment de ses fonctions hémostatiques normales (López-Pedraza *et al.*, 2006). D'abord, une augmentation d'expression de TF est observée dans plusieurs types de cellules cancéreuses incluant les carcinomes à petites cellules, carcinome bronchioalvéolaire, les carcinomes pulmonaires à grosses cellules, les adénocarcinomes du colon, le cancer de la tête et du cou, les gliomes, les cancers du sein et de la prostate (Wojtukiewicz *et al.*, 2001). Les cellules tumorales de ces différents cancers expriment TF de façon constitutive et, dans certains cas, l'expression de TF est initiée par l'interaction

avec des cellules adjacentes de l'hôte comme les CEs et les monocytes. TF peut stimuler la migration des CEs en direction d'un stimulus angiogénique en induisant une signalisation à partir de sa portion cytoplasmique (Ott *et al.*, 2004; Belting *et al.*, 2004). Le complexe TF:FVIIa peut également stimuler la migration des cellules du cancer du sein *in vitro* en induisant une signalisation activant le récepteur de la thrombine PAR-2 (*protease activated receptor*), ce qui résulte en une augmentation de l'expression de l'interleukine-8 (IL-8) (Hjortoe *et al.*, 2008). TF peut également stimuler la production de VEGF par les cellules tumorales, stimulant ainsi la néovascularisation (Abe *et al.*, 1999). Le lien entre ces deux protéines est par ailleurs évident dans l'angiogenèse puisque l'expression de TF et de VEGF est contrôlée par l'hypoxie (Wojtukiewicz *et al.*, 2001).

L'activation de la coagulation par TF mène éventuellement à la génération de thrombine. Cette enzyme a été détectée dans de nombreuses tumeurs dont le carcinome du poumon à petites cellules, le cancer du rein, les mélanomes, le cancer de l'ovaire, le cancer du larynx et les cancers gastriques (Wojtukiewicz *et al.*, 2001). La thrombine influence la biologie tumorale en augmentant la synthèse de TF, favorisant ainsi l'activation de la coagulation sanguine dans l'environnement tumoral. La thrombine inhibe aussi la fibrinolyse en activant les inhibiteurs PAI-1 et TAFI. En tant que facteur pro-angiogénique, la thrombine permet d'augmenter la perméabilité vasculaire. De plus, la thrombine peut induire la migration des CEs en induisant une signalisation résultant du clivage protéolytique de ses récepteurs PAR (Wojtukiewicz *et al.*, 2004). Finalement, la thrombine peut exercer son effet pro-angiogénique en augmentant l'expression de VEGF dans les fibroblastes et en augmentant l'expression des récepteurs VEGFR1 et VEGFR2 au niveau des CEs (Wojtukiewicz *et al.*, 2004).

Une des conséquences les plus importantes de l'activation de la thrombine est le clivage du fibrinogène en fibrine. L'étape de formation du caillot de fibrine est très importante dans le processus angiogénique. Dans un premier temps, la fibrine forme une matrice provisoire essentielle pour fournir un support à l'adhésion et à la migration des

CEs. Cette matrice constitue également une réserve de facteurs pro-angiogéniques comme le VEGF et le bFGF qui sont libérés par l'action des protéases fibrinolytiques telles que la plasmine et certaines MMP. Il fut rapporté que certains produits de dégradation, de la fibrine, générés par les protéases lors du déplacement des CEs sont d'importants régulateurs de la survie de ces cellules. D'ailleurs, la fibrine forme un environnement favorable à la croissance des tumeurs et permet aux cellules cancéreuses d'échapper aux mécanismes de défense de l'hôte (Fernandez *et al.*, 2004).

Les sphingolipides représentent une famille de lipides membranaires qui possèdent des rôles structurels dans la régulation de la fluidité des membranes bilipidiques. De façon plus spécifique, il existe une catégorie de sphingolipides bioactifs comme la sphingosine-1-phosphate (S1P) et ceux-ci agissent également en tant que molécules biologiques effectrices, jouant ainsi plusieurs rôles dans divers aspects du cancer, notamment dans l'angiogenèse tumorale. Entreposée dans les plaquettes sanguines, la S1P en est expulsée à la suite de leur activation. Plusieurs études démontrent aujourd'hui le rôle de la S1P dans la régulation de l'angiogenèse et ses effets sont médiés par la liaison de celle-ci à ses récepteurs membranaires spécifiques S1P-1, S1P-2 et S1P-3, autrefois nommés EDG-1, -2, et -3 (*endothelial differentiation gene*) (Takuwa, 2002). D'abord, des études *in vitro* démontrent que la S1P stimule la synthèse d'ADN et la motilité des CEs en partie par l'induction des voies des MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) tels que ERK (*extracellular signal-regulated kinases*) et p38. *In vivo*, la S1P stimule la néovascularisation dans une matrice de Matrigel® (Lee *et al.*, 1999). Il fut également démontré que la S1P était nécessaire à l'expression de TF induite par la thrombine (Takeya, 2003). Finalement, la S1P favorise la survie des CEs en protégeant ces dernières de l'apoptose (Ogretmen, 2006).

1.3.5.2 Rôles anti-angiogéniques de TFPI de l'antithrombine III et de l'angiostatine

La fonction anti-angiogénique du TFPI semble être liée à la capacité de la protéine à bloquer la prolifération des CEs en réponse au bFGF. Des études structurelles ont montré

que la forme tronquée de TFPI, ne contenant que les domaines Kunitz 1 et 2, possède une activité anti-proliférative très faible. Cette observation suggère que l'activité anti-proliférative est donc associée à la portion C-terminale de la protéine dont fait partie le domaine 3 (Pirie-Shepherd, 2003). Le TFPI dans sa forme complète pourrait se lier au récepteur des lipoprotéines de très basse densité (VLDL) afin de médier son activité anti-proliférative (Hembrough *et al.*, 2001).

Plusieurs des inhibiteurs de l'angiogenèse, provenant des protéines hémostatiques, sont produits à la suite de clivage enzymatique. Par exemple, l'élastase des neutrophiles peut cliver l'antithrombine III. Une fois générés, les fragments de l'antithrombine III deviennent des inhibiteurs efficaces de la prolifération des CEs *in vitro* et de l'angiogenèse *in vivo* (Browder, 2000).

Un autre exemple d'inhibiteurs produits à la suite d'un clivage enzymatique est illustré par la génération de l'angiostatine à partir des boucles (Kringle) 1-4 du plasminogène. Plusieurs mécanismes furent démontrés comme étant responsables de la production de l'angiostatine et ceux-ci impliquent trois sortes de clivage : (1) le clivage par les MMP-2, -3, -7 et -9, (2) le clivage par la plasmine et (3) le clivage du plasminogène à la surface des macrophages par la MMP-12 (Browder, 2000). Une fois produite, l'angiostatine est un inhibiteur spécifique de la prolifération des CEs *in vitro* et de l'angiogenèse *in vivo*. Le mécanisme d'action de l'angiostatine implique que cette dernière est en mesure de se lier à la sous-unité α/β de l'ATP synthétase, ce qui provoque une cytolysse suite à l'accumulation d'ions H^+ au niveau du cytosol des CEs (Browder, 2000).

1.4 L'apoptose ou la mort cellulaire programmée

En dépit de notre apparente complexité architecturale, nos tissus sont élaborés en suivant les mêmes trois principes généraux que nous retrouvons chez tous les métazoaires : la prolifération cellulaire, la différenciation et l'élimination des cellules excédentaires. L'apoptose ou la mort cellulaire programmée fait référence à l'ensemble des processus par

lesquels, en réponse à des signaux divers, des cellules déclenchent leur auto-destruction. Cette mort physiologique, génétiquement programmée, est essentielle à l'homéostasie de tous les organismes pluricellulaires et elle participe au développement et à la maintenance des tissus (Meier *et al.*, 2000).

1.4.1 Le rôle de l'apoptose au cours du développement embryonnaire

À l'instar d'un vieux programme informatique truffé d'anciens codes rendant certaines opérations désuètes, notre plan de développement comprend des structures ancestrales qui témoignent du lent processus évolutif duquel nous sommes issus. Ces structures primitives doivent, après avoir été créées, être éliminées pour laisser place aux nouvelles formes sélectionnées par l'évolution. C'est ainsi, par exemple, que lors de l'embryogenèse, l'apoptose assure l'élimination des cellules formant la membrane interdigitale, qui donne à la main embryonnaire la forme d'une palme. Les mêmes phénomènes apoptotiques sont également responsables de la disparition de l'appendice caudal pour laisser place au coccyx (Jacobsen, 1997). Mis à part la participation à l'élimination de structures primitives, l'apoptose participe également à la formation des tissus.

1.4.2 Le rôle de l'apoptose dans l'angiogenèse

En plus de notre complexité organisationnelle, notre longévité et notre taille contribuent à faire en sorte que nos tissus doivent, au cours de notre vie adulte, subir constamment des réparations et être convenablement entretenus pour compenser les dommages causés par certaines blessures, la maladie ou le vieillissement normal des cellules. Un exemple de ces processus homéostatiques est le phénomène de mort cellulaire impliqué dans le remodelage constant du réseau vasculaire, et ce particulièrement lors du processus d'angiogenèse. La régulation des mécanismes de survie des CEs apparaît comme étant un des facteurs majeurs contribuant aux réponses angiogéniques survenant durant le développement embryonnaire et qui se poursuit en conditions physiologiques et

pathologiques chez l'adulte (Jacobson, 1997; Meier *et al.*, 2000). Par ailleurs, des études suggèrent que l'apoptose est essentielle pour la réparation des vaisseaux sanguins endommagés ainsi que pour le bourgeonnement et l'embranchement précis des capillaires durant l'angiogenèse (Segura *et al.*, 2002). D'autres études démontrent que l'apoptose est nécessaire pour la formation de la lumière des nouveaux capillaires sanguins *in vitro* (Peters *et al.*, 2002). Finalement, l'apoptose des CEs est aussi impliquée dans la régression vasculaire de microvaisseaux (Risau, 1997). En considérant le rôle primordial de l'apoptose, il devient évident que cette mort cellulaire doit, pour être efficace, reposer sur des mécanismes moléculaires bien définis et contrôlés.

1.4.3 Les mécanismes moléculaires de l'apoptose

L'auto-destruction est finement régulée par deux mécanismes principaux d'activation. La première voie est dite extrinsèque et elle implique des récepteurs appartenant à la superfamille des récepteurs du TNF. La seconde voie est intrinsèque et met en jeu la mitochondrie et les protéines de la superfamille de Bcl-2. Ces deux voies sont en grande majorité influencées par l'action de la protéine p53 dont la finalité est de faire en sorte qu'il y ait convergence vers l'activation de protéases effectrices de l'apoptose : les caspases (Meier *et al.*, 2000; Hengartner, 2000).

1.4.4 Les caspases

Les caspases sont des protéases hautement conservées au cours de l'évolution et qui sont responsables de l'apparition des phénomènes morphologiques et biochimiques caractéristiques de l'apoptose. Leur découverte découle de l'étude génétique des composantes moléculaires des mécanismes apoptotique du nématode *C. elegans*. De façon remarquable, l'appareil apoptotique fut hautement conservé à travers l'évolution et c'est ainsi que CED-3, une protéase apoptotique du nématode, fut identifiée comme étant l'homologue de l'enzyme de conversion de l'interleukine-1 β (ou ICE selon l'abréviation anglaise) chez l'humain (Yuan *et al.*, 1993). À la suite d'analyse d'hybridation croisée, il

fut déterminé que le génome humain code pour une douzaine de protéines homologues à ICE impliquées dans l'association et la dégradation de divers substrats (Nakata *et al.*, 1997).

Des études biochimiques démontrent que le site actif de ces enzymes reconnaît spécifiquement les liens Asp-Xxx permettant ainsi le clivage du substrat après les résidus d'acide aspartique. C'est en raison de cette spécificité catalytique que ces protéases reçurent le nom définitif de caspases (*cysteine aspartate protease*) (Alnemri *et al.*, 1996). Dans la famille des caspases, la fonction est déterminée par la spécificité de l'enzyme envers le substrat. Ainsi les caspase-1, -4, -5, -11, -12 et -14 sont impliquées dans la maturation des cytokines alors que les caspases-3, -6, -7, -8, -9 et -10, jouent divers rôles dans l'apoptose. La spécificité des caspases provient de courtes séquences conservées de quatre acides aminés jouxtant le site de clivage, favorisant la reconnaissance et la liaison aux substrats (Thornberry *et al.*, 1997).

Cependant, comme c'est le cas de la plupart des protéases cellulaires, les caspases sont initialement synthétisées sous une forme inactive (zymogène), comprenant trois domaines distincts : un pro-domaine suivi des domaines p20 et p10. Sous leurs formes actives, les caspases sont constituées en hétérotétramères, contenant deux sous-unités hétérodimériques construites à partir de l'assemblage des domaines p20 et p10. Sur la base de résultats obtenus lors d'études d'analyse conformationnelle, il existe trois mécanismes expliquant l'activation des caspases : (1) l'activation protéolytique, (2) l'activation induite par effet de proximité et (3) l'activation par association de sous-unités régulatrices (Hengartner, 2000; Kaufmann et Hengartner, 2001).

1.4.4.1 Activation protéolytique des caspases

Ce premier mécanisme concerne principalement le mode d'activation des caspase-3, -6 et -7 qui se distinguent par le fait qu'elles possèdent un petit prodomaine. Ces caspases sont considérées comme les véritables effectrices, étant responsables de la majeure partie

des effets découlant du processus apoptotique. Pour cette raison, elles sont également plus abondantes que leurs homologues pourvus d'un long prodomaine, soit les caspases-2, -8, -9 et -10, aussi désignées sous le terme de caspases initiateuses (Hengartner, 2000).

Les caspases effectrices sont activées par clivage protéolytique survenant entre les domaines p20 et p10 et aussi entre le domaine p20 et le prodomaine. Il est également intéressant de remarquer que ces différents clivages se produisent tous sur un site Asp-Xxx, qui est le site de clivage spécifique des caspases, ce qui suggère la possibilité de l'existence d'un mécanisme d'activation autocatalytique (Thornberry *et al.*, 1997). Ce mécanisme d'activation en cascade est utilisé abondamment par les cellules apoptotiques puisque, en effet, rien n'est plus simple que d'activer une caspase au moyen de l'action catalytique d'une autre caspase. Il constitue aussi un moyen favorisant l'amplification et l'intégration du signal apoptotique. Cependant en dépit de sa grande simplicité, ce mécanisme ne permet pas d'expliquer comment sont activées les caspases responsables de l'initiation du signal.

1.4.4.2 Activation par effet de proximité : la voie extrinsèque

L'activation de la procaspase-8, une des protéases initiateuses jouant un rôle clé du processus apoptotique, nécessite l'activation des récepteurs de la mort cellulaire tel CD95 (Apo-1/Fas) de la famille du TNF. À la suite de la liaison de FasL sur son récepteur Fas, ce dernier se trimérise, provoquant au niveau de la queue cytoplasmique le recrutement des molécules adaptatrices telles FADD (*Fas-associated protein with death domain*) et MORT1, qui expriment des domaines effecteurs de mort DED (*death effector domain*) (Boldin *et al.*, 1995; Chinnaiyan *et al.*, 1995). Ces domaines sont reconnus par des modules d'interactions protéine-protéine (DED) identiques à ceux de FADD, présents à l'intérieur du long prodomaine de la procaspase-8, permettant ainsi l'association de FADD/MORT1 et la procaspase-8, via des interactions DED/DED (Hengartner, 2000). Ce recrutement crée donc un effet localisé de proximité provoqué par le rapprochement de plusieurs molécules de procaspase-8 à l'intérieur d'un domaine nommé DISC (*death-inducing signal complex*). Dans ces conditions de promiscuité, le modèle suggère que la faible activité auto-

catalytique associée aux zymogènes est suffisante pour permettre l'activation des premières molécules de procaspase-8 en protéase active (Muzio *et al.*, 1998). À partir du moment où la caspase-8 est active, elle entame l'activation accélérée de la procaspase-3 et dans certains cas, elle procède aussi à l'activation de Bid, un membre de la superfamille de Bcl-2, qui influencera l'activité pro-apoptotique de la mitochondrie.

1.4.4.3 Activation par association de sous-unités régulatrices : la voie intrinsèque

La mitochondrie n'est pas seulement la centrale énergétique de la cellule, elle est aussi un véritable arsenal. En effet, lors de l'enclenchement du processus apoptotique, les mitochondries subissent des changements de perméabilité membranaire qui causeront le relargage de plusieurs protéines pro-apoptotiques comme AIF (*apoptosis-inducing factor*) (Susin *et al.*, 1999), Smac/Diablo (Du *et al.*, 2000; Verhagen *et al.*, 2000), et Apaf-1 (Green, 2005). De plus, d'autres protéines comme le cytochrome c, dont la fonction première est de transporter les électrons dans la chaîne respiratoire, seront également libérées dans le cytosol pour prendre part à la destruction de la cellule (Ow *et al.*, 2008). Plusieurs de ces protéines seront requises pour permettre l'activation de la procaspase-9 dans le cytosol de la cellule.

Contrairement aux autres mécanismes activateurs décrits ci-haut, l'activation de la procaspase-9 par les voies de la protéolyse est peu efficace (Rodriguez *et al.*, 1999; Stennicke *et al.*, 1999) et pour atteindre un état d'activation complet, la procaspase-9 a plutôt recours à l'association avec deux cofacteurs. Le premier cofacteur découvert fut Apaf-1 et le second est le cytochrome c (Ow *et al.*, 2008). L'association de ces trois protéines forme un immense complexe oligomérique, nommé apoptosome qui, dans sa forme complète, contient sept molécules Apaf-1, liées à sept protéines de cytochrome c et sept molécules de procaspases-9, formant une structure symétrique circulaire. Chaque molécule Apaf-1 contient dans son domaine N-terminal un domaine CARD (*caspase recruitment domain*) servant à l'interaction avec le même domaine CARD présent dans le long prodomaine de la procaspase-9. Le cytochrome c, pour sa part, effectue sa liaison sur

la portion C-terminale d'Apaf-1, qui est riche en répétition des acides aminés tryptophane et acide aspartique (Ow *et al.*, 2008). En dernière analyse, la caspase-9 activée constitue une holoenzyme et représente un énorme complexe qui participe à l'activation de la procaspase-3 (Rodriguez *et al.*, 1999).

1.4.5 Les protéines de la famille de Bcl-2

La protéine Bcl-2 (B cell lymphoma) fut initialement reconnue pour son rôle dans la croissance tumorale, non pas en stimulant la prolifération cellulaire, mais en inhibant l'apoptose (Hockenbery *et al.*, 1990). En se basant sur des études d'analyses structurales, on remarqua que la protéine Bcl-x_L, proche parente de Bcl-2 en termes de structure, était également très similaire à la sous-unité de la toxine diphtérique, dont le rôle est de former des pores dans la membrane plasmique (Muchmore, 1996). En se basant sur cette observation, on constata par la suite que les protéines de la famille de Bcl-2 participaient au processus apoptotique en s'insérant dans la membrane mitochondriale externe, permettant ainsi d'influencer la perméabilité membranaire mitochondriale.

À ce jour, la famille de Bcl-2 contient plus de 20 membres séparés en deux groupes déterminés en fonction de leur activité pro- ou anti-apoptotique, en plus d'être subdivisée en trois sous-groupes, en fonction de leur domaine d'homologie par rapport à Bcl-2.

1.4.5.1 Les protéines anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2

Les protéines anti-apoptotiques constituant le groupe I de la famille de Bcl-2 sont : Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w, Mcl-1 et Bcl-B. Ces protéines partagent entre elles quatre domaines d'homologie à Bcl-2 (BH1-BH4) correspondant à des régions α -hélicales hautement conservées. Le domaine C-terminal (BH1) est très hydrophobe et permet l'insertion de ces protéines dans la membrane externe des mitochondries. Ces protéines veillent sur le maintien de l'intégrité membranaire des mitochondries en séquestrant les protéines pro-

apoptotiques et en régulant l'activité des canaux anioniques voltage-dépendants (VDAC) (Mayer et Oberbauer, 2003).

1.4.5.2 Les protéines pro-apoptotiques de la famille de Bcl-2

Les membres pro-apoptotiques sont divisés en deux groupes (II et III) en fonction des différents domaines d'homologie qu'ils expriment. D'abord, tous les membres pro-apoptotiques se caractérisent par la perte du domaine N-terminal BH4. Par la suite, il y a une subdivision supplémentaire selon la présence des domaines BH1-BH3 (groupe II) ou BH3 seulement (groupe III). Le groupe II comprend plusieurs protéines dont Bax et Bak, alors que le groupe III est constitué de protéines telles que Noxa, Puma, Bim, Bid, Bad, etc. Contrairement aux protéines anti-apoptotiques, les protéines pro-apoptotiques sont généralement localisées dans le cytoplasme, mais elles peuvent s'insérer dans la membrane mitochondriale externe en réponse aux stimuli apoptotiques. Dans une cellule saine, les protéines Bax et Bak se retrouvent dans le cytosol sous formes de monomères inactifs. Toutefois en réponse à un stimulus apoptotique, ces deux protéines sont relocalisées à la membrane externe mitochondriale pour former des canaux constitués d'unités homo-oligomériques impliqués dans la sortie des protéines pro-apoptotiques mitochondriales. Les protéines du groupe III, quant à elles, peuvent influencer l'activité pro-apoptotique de la mitochondrie en activant directement Bax et Bak ou en antagonisant l'activité de Bcl-2 et Bcl-x_L (Mayer et Oberbauer, 2003).

1.4.6 La protéine p53

En conditions normales, l'activité de p53 doit être maintenue au minimum afin de ne pas perturber le développement et la prolifération cellulaire. Un moyen permettant de contrôler l'activité de p53 consiste à réguler la stabilité de la protéine. Dans ce dessein MDM2, une ligase E3, s'associe en permanence à p53. Ce complexe p53/MDM2 favorise la translocation de p53 du noyau vers le cytoplasme où le complexe est alors dégradé par la voie du protéasome (Vousden, 2000).

Par opposition, p53 doit être activée en condition de stress cellulaire causé par des dommages à l'ADN, l'activation d'oncogène, l'érosion télomérique, l'hypoxie, etc. Dans ces conditions particulières, la protéine subit des modifications post-traductionnelles comme la phosphorylation, notamment sur la sérine 15 dont la résultante est la dissociation du complexe p53/MDM2, évitant ainsi à p53 d'être dégradée. Il fut également démontré que les oncogènes *Myc*, *Ras* et *E2F1* contribuaient à la stabilisation de p53 en favorisant l'expression et l'activité de la protéine ARF, dont la fonction est de lier et d'inhiber MDM2 (Vousden, 2000). Une fois stabilisée et selon le degré des dommages cellulaires, p53 pourra enclencher l'apoptose et influencer aussi bien la voie extrinsèque que la voie intrinsèque.

1.4.6.1 Rôle de p53 dans la voie apoptotique extrinsèque

En tant que facteur de transcription, p53 participe à la voie extrinsèque en induisant l'expression du gène codant pour CD95 (APO-1/Fas) en réponse à des dommages induits à l'ADN par des médicaments de chimiothérapie (Muller *et al.*, 1998). Dans le cas particulier de Fas, cette induction d'expression survient principalement en réponse à l'irradiation causant des dommages à l'ADN et semble être un phénomène spécifique à certains tissus (Bouvard *et al.*, 2000). En plus de promouvoir l'expression de Fas, p53 semble aussi faciliter l'acheminement de Fas à partir de l'appareil de Golgi vers la membrane pour ainsi augmenter rapidement le nombre de récepteur à la surface (Bennett *et al.*, 1998).

1.4.6.2 Rôle de p53 dans la voie apoptotique intrinsèque

Il est démontré que p53 peut réguler l'expression des protéines Noxa et Bax, deux membres pro-apoptotiques de la famille de Bcl-2. Une fois exprimée, la protéine Bax forme des pores facilitant le relargage du cocktail de protéines mitochondriales nécessaires à l'activation des caspases effectrices. Noxa, quant à elle, appartient au groupe III de la famille de Bcl-2 et son rôle consiste à se lier à Bcl-2 par le biais de son unique domaine BH3 et ainsi interférer avec l'activité anti-apoptotique de Bcl-2 (Haupt *et al.*, 2003). Finalement, l'activité transcriptionnelle de p53 instaure un déséquilibre au niveau de

l'expression des protéines de la famille de Bcl-2, qui penche alors en faveur des membres pro-apoptotiques.

La protéine p53 participe activement à la formation de l'apoptosome. Dans un premier temps, tel que décrit au paragraphe précédent, p53 permet de modifier la perméabilité membranaire des mitochondries en favorisant l'expression de Bax et Noxa. Par ailleurs, dans un second temps, p53, par le biais de son activité transcriptionnelle, induit l'expression d'Apaf-1 (Kannan *et al.*, 2001).

En définitive, p53 peut influencer la voie intrinsèque selon un dernier mécanisme qui est de surcroît indépendant de son activité transcriptionnelle. En effet, p53 peut modifier la perméabilité membranaire mitochondriale en interagissant directement, via son domaine de liaison à l'ADN, avec les protéines membranaires Bcl-x_L et Bcl-2, diminuant par le fait même leurs activités anti-apoptotiques.

1.4.6.3 Rôle de p53 dans l'abolition des voies de survie

En plus d'intervenir dans les voies extrinsèques et intrinsèques de l'apoptose, p53 intervient également dans la dérégulation des voies qui régissent la survie cellulaire. En conditions physiologiques, la liaison de plusieurs mitogènes à leurs récepteurs tels les RTK (exemple PDGFR, EGFR et Met) active la voie de signalisation intracellulaire impliquant PI3K. Une fois cette cascade de signalisation déclenchée, la PI3K active AKT, une kinase sérine/thréonine, par phosphorylation au niveau de sa sérine 473 de cette dernière (Haupt *et al.*, 2003). À son tour, AKT procède par phosphorylation à l'activation de plusieurs protéines dont les rôles consistent à stimuler la survie de la cellule. Parmi ces protéines, AKT favorise la stimulation de MDM2, l'inhibiteur de p53. Par cette signalisation, la cellule se retrouve donc protégée de l'action de p53.

Toutefois, en condition de stress, la cellule endommagée doit être éliminée et, par conséquent, p53 parvient à inhiber cette cascade de signalisation selon trois moyens

distincts. Premièrement, p53 régule la dégradation d'AKT selon un mécanisme faisant intervenir les caspases (Gotlieb *et al.*, 2002). Deuxièmement, p53, via son activité transcriptionnelle, induit l'expression de PTEN, une phosphatase, dont le rôle consiste à déphosphoryler la PI3K, empêchant ainsi l'activation d'AKT (Mayo et Donner, 2002). Troisièmement, p53 induit l'expression de la cycline G, qui recrute la phosphatase PP2AB' au complexe p53/MDM2 et réussit à déphosphoryler MDM2, permettant ainsi la libération de p53 (Haupt *et al.*, 2003).

1.4.7 Mécanismes de résistance à l'apoptose et cancer

Afin d'assurer sa croissance, le cancer procède à une dérégulation complète de l'ensemble des mécanismes régissant l'apoptose. Cette dérégulation explique d'ailleurs en partie les phénomènes de résistance des cellules cancéreuses face aux médicaments de chimiothérapie, qui agissent selon des mécanismes peu spécifiques en tentant d'induire la mort de cellules qui se sont affranchies des processus régulant leur auto-destruction (Igney et Krammer, 2002). Parfois, la mise en œuvre des mécanismes de résistance à l'apoptose peut être attribuable à l'activité non hémostatique de certains facteurs de coagulation exprimés par les cellules cancéreuses (Sorensen *et al.*, 2003; Versteeg *et al.*, 2004).

1.4.7.1 Altération de p53

L'altération de la fonction de p53 est probablement l'événement le plus commun à tous les cancers. La perte de p53 entraîne des modifications importantes dans le comportement de la cellule qui modifie drastiquement sa relation par rapport à la mort programmée. Puisque p53 influence autant les mécanismes de la voie intrinsèque que ceux de la voie extrinsèque, la perte de régulation normalement exercée par p53 se révèle très avantageuse pour la croissance tumorale (Haupt *et al.*, 2003).

1.4.7.2 Expression de protéines anti-apoptotiques

Pour échapper à la mort, les cellules cancéreuses vont d'abord élaborer différents moyens d'augmenter l'expression des protéines dont le rôle est d'inhiber l'apoptose. À titre d'exemple, des études démontrent l'existence d'un lien entre le niveau d'expression de Bcl-2 et la sévérité de plusieurs tumeurs humaines (Campos *et al.*, 1993; Hermine *et al.*, 1996). Très récemment, il fut démontré que l'expression de Bcl-2 était activée par la signalisation induite par le complexe TF:VIIa au niveau des cellules de neuroblastomes (Fang *et al.*, 2008). Dans d'autres tumeurs comme les leucémies, la protéine Bcl-xL démontre aussi un profil d'expression anormalement élevé en réponse à l'activation constitutive d'EGFR (Igney et Krammer, 2002). En plus d'affecter l'expression des protéines de la voie intrinsèque, les cellules cancéreuses ont développé des moyens d'interférer avec la mort cellulaire induite par la voie extrinsèque. Par exemple, les cellules malignes sont capables d'induire l'expression de récepteurs solubles comme sCD95 et DcR3 dont la fonction n'est pas de transmettre le signal entre l'extérieur et l'intérieur de la cellule, mais de servir d'appât pour séquestrer les ligands du type FasL. Il fut démontré que ces récepteurs « appâts » (*decoy receptors*) sont d'ailleurs responsables de l'inhibition complète de la réponse apoptotique normalement régulée par le récepteur Fas (Igney et Krammer, 2002). Finalement, les cellules cancéreuses vont favoriser l'augmentation de l'expression de certaines autres protéines notamment la survivine, appartenant à la famille de protéines IAP. L'expression de la survivine est une caractéristique propre des tissus cancéreux, puisqu'elle est pratiquement indétectable dans les tissus sains (Ambrosini *et al.*, 1997).

1.4.7.3 Inactivation des gènes pro-apoptotiques

En plus d'acquérir un phénotype de résistance à l'apoptose via la surexpression de protéines anti-apoptotiques, les cellules cancéreuses vont diminuer l'expression des protéines pro-apoptotiques. À titre d'exemple, dans certains types de cancers, le gène codant pour la protéine pro-apoptotique Bax subit souvent des mutations. Dans un premier

cas, il survient des mutations causant une erreur du cadre de lecture empêchant l'expression de Bax. D'autres mutations, ponctuelles celles-là, sont souvent remarquées à l'intérieur des exons codant pour chacun des trois domaines BH de la protéine. Ces mutations provoquent alors une perte marquée de l'activité de Bax (Igney et Krammer, 2002). Les mélanomes métastatiques ont, quant à eux, mis au point une autre stratégie pour échapper à la voie intrinsèque de l'apoptose. En effet, ces tumeurs hautement résistantes à la chimiothérapie sont souvent déficientes dans l'expression de la protéine Apaf-1 (Soengas, *et al.*, 2001). Les tumeurs pédiatriques tels les neuroblastomes utilisent une stratégie visant particulièrement la voie extrinsèque. En effet, ces tumeurs sont déficientes en procaspase-8 rendant impossible l'activation des caspases effectrices à la suite de l'activation des récepteurs de la mort (Teitz *et al.*, 2000). Le récepteur Fas est également très souvent sous-exprimé ou même complètement absent dans plusieurs autres types de cancers (Igney et Krammer, 2002).

1.4.7.4 Altération des voies de survie

Dans la plupart des tumeurs humaines, les voies de survie, dont celles induites par la signalisation de PI3K/AKT, sont altérées afin de permettre une activation constitutive de ces voies. Cette activation permanente provoque une insensibilité des cellules cancéreuses par rapport aux différents stimuli apoptotiques. Un premier mécanisme déployé par les cellules malignes consiste en la perte d'expression de PTEN, dont la fonction est justement de mettre fin à la signalisation induite par PI3K. D'autres tumeurs démontrent un profil d'expression d'AKT excessivement élevé (Igney et Krammer, 2002). Les facteurs de coagulation TF:FVIIa:FXa, via l'activation du récepteur PAR-2 de la thrombine, sont aussi d'importants activateurs de ses voies de survie (Sorensen *et al.*, 2003; Versteeg *et al.*, 2004).

1.5 Les tumeurs du système nerveux central

Les tumeurs du système nerveux central (SNC) sont souvent dévastatrices parce qu'elles affectent dans une large proportion une population essentiellement pédiatrique; elles sont généralement difficiles à éradiquer et elles causent fréquemment des séquelles cognitives importantes, voire même la mort dans la plupart des cas. Au cours des dernières années, la recherche a réussi à établir l'existence d'une relation étroite entre l'apparition de ces tumeurs et des défauts dans les voies de signalisation impliquées dans le développement du SNC. C'est ainsi, par exemple, qu'il fut démontré que plusieurs produits d'oncogènes et de gènes suppresseurs de tumeurs sont impliqués en tant que régulateurs de la croissance et de la différenciation cellulaire durant le développement. Dans le contexte du SNC, l'interface permettant de relier la biologie du développement et le cancer provient de l'étude spécifique des tumeurs cérébrales (Wechsler-Reya et Scott, 2001). Dans le cadre de cette thèse, nous restreindrons notre étude aux cas particuliers des glioblastomes (GB) chez l'adulte et des médulloblastomes (MB) chez l'enfant.

1.5.1 Les glioblastomes

Les astrocytes exercent diverses fonctions dans le SNC, incluant la régulation de la croissance et de la survie neuronale : ils guident la migration cellulaire et la croissance axonale durant le développement; ils participent à la formation des synapses; finalement ils orchestrent les réponses inflammatoire et immunitaire lors des infections et des blessures cérébrales (Wechsler-Reya et Scott, 2001). Les astrocytes ou leurs précurseurs conservent la capacité de se diviser tout au cours de leur vie. Ceci les rend particulièrement susceptibles à subir des transformations et il est possible que ce soit en raison de cette caractéristique que les tumeurs astrocytiques figurent parmi les tumeurs cérébrales les plus fréquentes. Les astrocytes sont issus de cellules souches neuronales multipotentes (CSN), qui ont la capacité de s'auto-renouveler et de produire une variété de neurones, d'astrocytes et d'oligodendrocytes. Les CSN isolées de différentes régions du SNC démontrent une forte

activité de différenciation lorsqu'elles sont exposées principalement à deux facteurs de croissances soit le FGF et EGF (Wechsler-Reya et Scott, 2001).

Les GB représentent les tumeurs du cerveau les plus fréquentes chez l'adulte. Ces tumeurs sont hautement malignes. L'hétérogénéité qui caractérise les diverses présentations cliniques de ces tumeurs rend difficile toute hypothèse concernant l'origine cellulaire exacte des GB; toutefois il est fort probable que les astrocytes ou leurs précurseurs soient les grands responsables de la formation des GB (Wen et Kesari, 2008).

1.5.2 Les anomalies moléculaires des glioblastomes

L'étiologie des GB est complexe et comprend presque toujours des mutations causant la perte ou la surexpression de plusieurs gènes importants. Sur cette base, les GB peuvent être séparés en deux grands groupes. Dans le premier groupe, les GB primaires surviennent généralement chez des patients âgés de plus de 50 ans et ces tumeurs se caractérisent souvent par plusieurs mécanismes génétiques. Pour notre part, nous décrivons les anomalies les plus communes, notamment les phénomènes d'amplifications et de mutations du gène codant pour EGFR et la perte d'expression de la protéine PTEN. Dans le second groupe, les GB secondaires, moins fréquents, surviennent chez des patients généralement plus jeunes. Les GB secondaires sont surtout caractérisés par des mutations inactivant la voie apoptotique de p53 (Wen et Kesari, 2008).

1.5.2.1 L'amplification du gène EGFR

En 1985, l'amplification du gène codant pour le récepteur à tyrosine kinase (RTK) EGFR fut l'une des premières anomalies génétiques découvertes et associées à la pathogenèse des GB (Libermann *et al.*, 1985). L'amplification du récepteur EGFR survient presque qu'exclusivement dans les GB primaires dans une proportion atteignant près de 40 à 50% des cas (Wen et Kesari, 2008). Le fait que les GB possèdent souvent au moins un des ligands capables d'activer le récepteur – EGF, TGF- α , l'amphiréguline, l'héparine liée

à EGF et l'épiréguline – suggère que dans certains cas la croissance tumorale doit être régulée par des stimulations autocrines ou paracrines de la voie de signalisation induite par EGFR (Wechsler-Reya et Scott, 2001). Une étude plus approfondie de la séquence d'amplification d'EGFR révèle que l'activation du récepteur est parfois totalement indépendante de la liaison du ligand. En effet, la séquence des gènes démontre des mutations ou des réarrangements qui génèrent une protéine mutante pour laquelle une portion du domaine extracellulaire est absente. Ces protéines EGFR mutantes ne peuvent alors recevoir leurs ligands, mais elles sont dotées en revanche d'une activité tyrosine kinase constitutive (Wechsler-Reya et Scott, 2001). Récemment, il fut démontré que certaines mutations peuvent se produire dans le domaine extracellulaire afin de produire un mutant constitutivement actif (Zwick *et al.*, 2002). Donc, en résumé, la signalisation induite par EGFR dans les GB peut se faire selon un schéma dépendant du ligand ou non.

L'activation d'EGFR dans une grande proportion de GB suggère donc un rôle important de ce récepteur dans le développement des astrocytes. Cette hypothèse est d'ailleurs appuyée par des études chez des souris déficientes pour l'expression d'EGFR qui présentent plusieurs anomalies, notamment une dégénération importante des neurones du cortex frontal, du bulbe olfactif et du thalamus (Kornblum *et al.*, 1998). D'autres études *in vitro* démontrent que l'activation d'EGFR régule la prolifération des astrocytes en culture (Kornblum *et al.*, 1999). Donc dans un premier temps, l'amplification du récepteur EGFR peut contribuer à la progression tumorale des GB en induisant la prolifération des astrocytes. En plus de son rôle dans la prolifération, EGFR induit également la migration à la fois des astrocytes normaux et des astrocytes tumoraux (Wechsler-Reya et Scott, 2001). Finalement, EGFR contribue aussi à la malignité des GB.

1.5.2.2 La perte d'expression de PTEN : effet sur la survie, l'angiogenèse et l'hémostase

La découverte de l'importance du gène suppresseur de tumeur *PTEN* contribua à améliorer considérablement l'état de nos connaissances sur l'étiologie des GB. Ce gène code pour une protéine de 55 kDa partageant des séquences d'homologie avec les protéines à activité tyrosine phosphatase. Toutefois, contrairement à ses homologues, *PTEN* possède une double fonction en tant que phosphatase. *PTEN* peut déphosphoryler des substrats protéiques aussi bien que des substrats lipidiques; cependant son activité phosphatase est beaucoup plus efficace avec des substrats de nature lipidique. L'activité de phosphatase protéique de *PTEN* est médiée par la voie de signalisation des MAPK p42/p44 ou p38, alors que l'activité de phosphatase lipidique est médiée par la voie de la PI3-kinase/AKT. Ainsi en situation physiologique normale, la réaction la plus importante de cette phosphatase est de convertir le phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphosphate (PIP3), un second messenger qui, une fois produit, active les voies de survie médiées par AKT, en phosphatidylinositol (4,5)-biphosphate (PIP2). Dans ce schéma, la réduction du niveau de PIP3 cellulaire par *PTEN* réduit donc l'activation de AKT et contribue à rendre les cellules plus sensibles à l'apoptose. En ce sens, *PTEN* est un acteur important impliqué dans le développement normal en régulant la prolifération des astrocytes. Dans la tumorigenèse et particulièrement dans les GB, la perte d'expression de *PTEN* est fréquente et a plusieurs effets importants, notamment sur la résistance des cellules cancéreuses à l'apoptose (Koul, 2008).

PTEN semble également jouer un rôle important dans le phénotype angiogénique des GB. En effet, les GB représentent les tumeurs humaines les mieux vascularisées. Il fut constaté que la perte d'expression de *PTEN* constitue un élément important permettant le développement du réseau vasculaire de ces tumeurs. La modification génétique des cellules cancéreuses de GB démontre que la reconstitution de l'expression et de l'activité de *PTEN* produit une diminution de l'activation d'AKT, une augmentation de l'expression de l'inhibiteur de l'angiogenèse TSP-1, le tout résultant en une activité et une vascularisation

tumorale fortement réduite (Wen *et al.*, 2001). De plus, l'inactivation de PTEN produit une augmentation d'expression de VEGF dans les cellules de GB, *in vitro*, suggérant ainsi que l'absence de PTEN contribue activement à l'établissement du phénotype angiogénique en favorisant l'expression de facteurs pro-angiogéniques et en réduisant l'expression de facteurs anti-angiogéniques comme TSP-1 (Gomez-Manzano, 2003). En présence de PTEN, VEGF est normalement réprimée par l'activité de phosphatase lipidique de PTEN (Gomez-Manzano, 2003).

Finalement, le dépôt de fibrine extravasculaire dans l'environnement tumoral immédiat est un phénomène fréquemment observé dans les GB (Bardos *et al.*, 1996). Plusieurs études indiquent également que l'expression de TF est corrélée avec le grade histologique des GB (Hamada *et al.*, 1996; Guan *et al.*, 2002). Les mécanismes moléculaires régulant l'expression de TF sont relativement peu connus. Il fut toutefois démontré récemment que la perte d'expression de PTEN, combinée aux conditions hypoxiques prévalentes au sein de la masse tumorale, pouvait contribuer à augmenter l'expression de TF en conditions *in vitro* (Rong *et al.*, 2005). Contrairement à VEGF, PTEN contrôle négativement l'expression de TF via son activité de phosphatase protéique (Rong *et al.*, 2005). De plus, l'expression de TF dans les GB influence également le phénotype angiogénique, car l'expression de TF corrèle avec la densité du réseau vasculaire tel qu'observé dans différentes coupes histologiques de tumeurs cliniques (Guan *et al.*, 2002).

1.5.2.3 La dérégulation de p53 et résistance à l'apoptose

La progression tumorale nécessite à un moment ou un autre la dérégulation des mécanismes apoptotique des cellules cancéreuses. Dans les GB, comme dans plusieurs autres types de tumeurs, ceci s'accomplit par une dérégulation importante de plusieurs gènes importants régulant l'activité de p53. Dans un premier temps, près de 25% des GB présentent des mutations ou des délétions du gène codant pour la protéine p53 elle-même. D'autres anomalies surviennent dans 5 à 12% des cas, causant une amplification de

l'expression de la protéine MDM2, responsable de l'inactivation et la dégradation de p53. Finalement, dans 30 à 40% des cas une mutation empêche l'inhibiteur de MDM2, ARF, d'être transcrit, ce qui favorise la dégradation de p53 par MDM2. Globalement, près de 75% des GB présentent une habilité réduite à induire la voie apoptotique régulée par p53 (Wechsler-Reya et Scott, 2001).

1.5.3 Les médulloblastomes

Les MB sont les tumeurs cérébrales les plus communes du SNC chez la population pédiatrique. Ce sont des tumeurs neuroépithéliales qui se développent à partir du cervelet et elles représentent environ 20% de toutes les tumeurs intracrâniennes chez les enfants et 40% de toutes les tumeurs de la fosse postérieure. La courbe d'incidence des MB présente deux pics le premier chez les enfants âgés entre trois et quatre ans et le second chez les enfants âgés de huit à neuf ans (Rossi *et al.*, 2008; Crawford *et al.*, 2007). Même si les MB sont principalement rencontrés chez les enfants, ces tumeurs peuvent également être détectées au sein de la population adulte (Ang *et al.*, 2008). L'origine cellulaire exacte des MB est encore incertaine, mais il est généralement admis que ceux-ci se développent à partir d'une cellule primitive localisée dans la couche germinale externe du cervelet (Gilbertson et Ellison, 2008). Historiquement, afin de simplifier la complexité de forme et de variante à l'origine des différents types de MB, une classification tenant compte des différentes caractéristiques histologiques de ces tumeurs fut établie. Ainsi l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) définit cinq variantes histologiques : (1) les MB classiques, (2) les MB desmoplasiques, (3) les MB anaplasiques à grosse cellules, (4) les MB mélanotiques et (5) les médullomyoblastomes. Toutefois, les MB de types mélanotiques et médullomyoblastiques sont très rares et, pour cette raison, en clinique, les MB sont souvent identifiés au sein des trois premiers groupes histologiques (Ellison, 2002).

1.5.4 Les anomalies moléculaires des médulloblastomes

L'étude des mécanismes moléculaires régulant la prolifération, la différenciation et la migration des cellules progénitrices de neurones, ont permis une meilleure compréhension des phénomènes liés au développement de ces tumeurs (Gilbertson et Ellison, 2008). C'est ainsi que les voies de signalisation de Sonic-Hedgehog, de Wnt et de nombreux RTK furent identifiés.

1.5.4.1 La voie de Sonic-Hedgehog/patched 1

En situation physiologique, la voie de Sonic-Hedgehog (Shh)/patched 1 (Ptch1) joue un rôle primordial dans le développement embryonnaire, étant un régulateur mitogénique majeur des cellules progénitrices de la couche germinale externe (Wechsler-Reya et Scott, 2001). Shh est une glycoprotéine sécrétée par les neurones de Purkinje, qui normalement se lie à son récepteur membranaire Ptch1. En absence de la protéine Shh, Ptch1 inhibe la signalisation induite par la protéine à sept domaines transmembranaires Smoothed (Smo). En revanche, lorsque Shh se lie à Ptch1, l'inhibition de Smo est levée ce qui permet l'activation des facteurs de transcriptions Gli-1, -2 et -3. Une fois activés, ces facteurs de transcriptions influencent la transcription de gènes spécifiques comme Ptch1 permettant ainsi un contrôle rétroactif de la voie de signalisation (Guessous *et al.*, 2008).

Les premières indications sur l'implication de cette voie de signalisation dans la pathophysiologie des MB sont venues de l'étude des mutations affectant le gène *PATCHED 1* chez l'humain. Ce gène est fréquemment muté chez des patients atteints du syndrome de Gorlin, une maladie qui se caractérise par la formation de tumeurs de la peau, des anomalies crâniofaciales et squelettiques et une incidence accrue pour le développement de MB. Parmi les MB survenant de façon sporadique, près de 10 à 20% de ceux-ci contiennent des mutations du gène codant pour Ptch1 (Pietsch *et al.*, 1997; Raffel *et al.*, 1997). D'autres mutations activant constitutivement Smo ont été détectées dans près de 5% des MB sporadiques. Finalement, des mutations au niveau des cellules germinales ou

somatiques du gène *SUFU*, codant pour un agoniste des facteurs de transcription Gli, sont également rapportées dans environ 10% des cas de MB (Carlotti *et al.*, 2007).

Les liens fonctionnels reliant la voie Shh/Ptch1 au développement des MB sont encore en investigation. Toutefois, puisque Shh et Ptch1 sont des antagonistes dans cette voie, il devient évident que la perte de Ptch1 dans 10 à 20% des MB est équivalente à une surexpression de Shh. À propos, le traitement des précurseurs neuronaux avec Shh *in vitro* favorise l'expression des cyclines de la phase G1 du cycle cellulaire et contribue à maintenir un état prolifératif de ces cellules (Kenney et Rowitch, 2000). De plus, des modèles animaux murins ayant des délétions d'une copie du gène *Ptch1* (*Ptch1*^{+/-}) démontrent les mêmes symptômes que les patients souffrant du syndrome de Gorlin et près de 15% des souris développent des MB (Carlotti *et al.*, 2007).

1.5.4.2 La voie de signalisation de Wnt/Frizzled

En conditions normales, les protéines sécrétées de la famille de Wnt (*Wingless*) agissent en se liant au récepteur à sept domaines transmembranaires Frizzled et en régulant le niveau intracellulaire de bêta-caténine (β -cat). Chez les vertébrés, les protéines de la famille de Wnt sont importantes pour la croissance cellulaire et le développement du système nerveux. En absence de la liaison de Wnt, la β -cat est phosphorylée et étiquetée en vue d'être dégradée par un complexe protéique, nommé le complexe de destruction, comprenant la sérine-thréonine kinase glyco-gène synthase kinase 3 β (GSK3 β), la protéine d'échafaudage axine et la protéine APC (*adenomatous polyposis coli*). Lorsque Wnt se lie à Frizzled, il se produit une inactivation de la GSK3 β , réduisant ainsi la phosphorylation et la dégradation de la β -cat, permettant à cette dernière de s'accumuler dans la cellule. La β -cat se déplace alors vers le noyau et se lie aux facteurs de transcriptions inactifs de la famille de Lef/TCF afin de les convertir en leurs formes actives. Le complexe β -cat-Lef/TCF induit l'expression de plusieurs gènes, notamment *c-myc* et *cyclin D1*, ce qui permet la progression du cycle cellulaire (Wechsler-Reya et Scott, 2001; Guessous *et al.*, 2008).

La découverte de l'implication de cette voie de signalisation dans la pathologie des MB provient des études réalisées sur des patients souffrant d'une maladie héréditaire, le syndrome de Turcot. Ce syndrome se caractérise par une incidence accrue à développer des cancers colorectaux ainsi que des cancers du cerveau, principalement des MB. À l'origine de cette découverte, l'association entre la voie de signalisation de Wnt et les MB fut initialement suggérée par l'identification de mutations de la protéine APC chez des patients atteints du syndrome de Turcot. Cependant, ces mutations ne sont retrouvées que dans 3 à 4% des MB sporadiques (Huang *et al.*, 2000). Il fut démontré par la suite que la forme nucléaire de la β -cat, preuve de l'activation de la voie de Wnt, était présente dans 18% des cas sporadiques de MB (Eberhart *et al.*, 2000). Toutefois, une étude récente démontre que les patients dont la tumeur présente un phénotype de localisation nucléaire de la β -cat, sont généralement ceux ayant les meilleures chances de survie sans événement. Ceci suggère donc que l'accumulation de la β -cat est un marqueur pronostique favorable dans les MB (Ellison, 2005). En résumé, l'importance de l'activation de la voie de Wnt dans les MB demeure encore aujourd'hui incertaine car aucun mécanisme d'action ou lien fonctionnel ne fut démontré entre l'activation de cette voie et la formation des MB. Il est donc possible que l'activation de cette voie, qui survient principalement dans la forme classique des MB, puisse servir en tant qu'indicateur de pronostic favorable (Guessous *et al.*, 2008).

1.5.4.3 Les récepteurs tyrosines kinases

Les RTK représentent une grande famille de récepteurs membranaires qui sont dotés d'une activité de protéine tyrosine kinase intrinsèque au niveau de leur domaine intracellulaire. Ces récepteurs sont activés par une grande variété de ligands et jouent plusieurs rôles importants dans le contrôle des processus cellulaires fondamentaux, incluant la migration cellulaire, le cycle cellulaire, le métabolisme et la survie cellulaire ainsi que la prolifération et la différenciation cellulaires. Leurs fonctions sont réalisées via l'activation de plusieurs circuits complexes de signalisation intracellulaires (Guessous *et al.*, 2008).

La dérégulation de plusieurs RTK est associée au développement des MB (Guessous *et al.*, 2008). Il existe plusieurs mécanismes responsables de la dérégulation des RTK (Zwick *et al.*, 2002). Le premier consiste en une amplification génique résultant en une surexpression du récepteur. Cette production accrue de RTK à la surface des cellules cancéreuses peut causer une augmentation de la sensibilité des cellules au niveau normal de facteurs de croissance présents dans l'environnement tumoral. De plus, la surproduction d'un type spécifique de RTK augmente considérablement les chances pour que survienne une dimérisation activatrice du récepteur et ce, même en absence du ligand. Le second mécanisme par lequel peut survenir une dérégulation du fonctionnement des RTK implique une mutation altérant le site de reconnaissance du ligand au niveau du domaine extracellulaire. Ces mutations rendent les récepteurs constitutivement actifs et complètement indépendants de la présence de leur ligand naturel. Finalement le troisième et dernier mécanisme implique la production par les cellules cancéreuses de boucles autocrines-paracrines d'activation, puisque ces dernières produisent à la fois le ligand et le récepteur (Zwick *et al.*, 2002).

Dans le but de raffiner les diagnostics cliniques, qui s'effectuent encore de nos jours en considérant les critères histopathologiques, la découverte de marqueurs diagnostics revêt une importance cruciale. Le niveau d'expression de plusieurs RTK est utilisé en clinique en tant qu'indicateurs pronostics (Goumnevera, 1996). C'est ainsi que furent dans un premier temps identifiés les RTK associés à un pronostic favorable. Le premier de ces récepteurs à avoir été découvert fut TrkC. TrkC appartient à une famille de RTK (TrkA, TrkB, TrkC) activés par la famille des neurotrophines comprenant le NGF (*nerve growth factor*), le BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*) et les neurotrophines (NT-3, -4, -5 et -6). Les patients dont la tumeur exprime TrkC en faible quantité démontrent généralement un risque cinq fois plus élevé de mourir que les patients ayant un haut niveau d'expression de TrkC (Grotzer *et al.*, 2000). De plus, l'expression de TrkA est associée à un niveau élevé d'apoptose dans les MB classiques (Chou *et al.*, 2000; Ohta *et al.*, 2006). En plus de la

famille des TrK, le récepteur au FGF (FGFR) est un autre RTK associé à un bon pronostic au niveau des MB. En effet, en se liant à son récepteur, FGF peut inhiber la progression des MB en induisant la différenciation neuronale, en ralentissant la croissance et déclenchant le processus apoptotique des cellules de MB (Duplan *et al.*, 2002). En conclusion, les RTK dont l'expression corrèle avec les meilleures chances de survie sont surtout associés au déclenchement du processus apoptotique.

D'autre part, le récepteur erbB2 (HER2/neu) est un membre de la famille des récepteurs EGFR dont l'expression fut associée à un mauvais pronostic (Gilbertson *et al.*, 1998). L'activation de ce récepteur favorise une augmentation de la migration cellulaire ainsi que l'expression de gènes prométastatiques (Gilbertson, 2001). Par ailleurs, afin de démontrer un rôle potentiel de certains RTK dans le pouvoir de dissémination des MB, il fut découvert que le récepteur PDGFRB semble être exprimé différemment dans les MB métastatiques (Gilbertson et Clifford, 2003). Outre l'implication des RTK dans le processus de formation de métastases, d'autres études suggèrent que le récepteur IGFR (*insulin-like growth factor receptor*) coopère avec la voie de Shh afin de promouvoir la croissance tumorale via une augmentation de la prolifération cellulaire (Hartmann *et al.*, 2005). Finalement, les cellules médulloblastiques sont en mesure de synthétiser, en condition *in vitro*, trois isoformes du VEGF ainsi que les récepteurs VEGFR1 et VEGFR2, suggérant un mécanisme d'activation autocrine et paracrine au niveau des tumeurs (Slongo *et al.*, 2007). En résumé, dans le cas des RTK associés à un mauvais pronostic, ces derniers jouent pour la plupart un rôle important dans la progression tumorale en favorisant la dissémination métastatique.

1.5.5 Structure de Met et son ligand HGF

C'est en 1980 que fut découvert l'oncogène Met. À l'aide de la cartographie du génome, le gène codant pour Met fut situé sur le chromosome 7q21-q31. Ce gène code pour un précurseur glycosylé de 170 kDa, qui subit un clivage à un site furine situé entre les

résidus 307 et 308 de la séquence du précurseur pour générer une chaîne α de 50 kDa et une chaîne β de 140 kDa. Ces deux chaînes sont ensuite reliées entre elles par un lien disulfure. La chaîne α est extracellulaire ainsi que les 212 premiers résidus de la chaîne β et, ensemble, cette portion de Met constitue le site de liaison du ligand HGF. Le restant de la chaîne β traverse la membrane plasmique pour former la portion cytoplasmique du récepteur contenant le domaine tyrosine kinase et le domaine C-terminal, qui sont nécessaires à l'induction de la signalisation intracellulaire (Birchmeier *et al.*, 2003). Pour être en mesure de lier le HGF, le récepteur doit former un hétérodimère.

Alors que Met était un récepteur orphelin depuis sa découverte, deux ligands potentiels furent identifiés en 1987 et 1989. D'abord en 1987, un puissant facteur de motilité des cellules épithéliales fut identifié et nommé SF (*scatter factor*). Ensuite, un facteur mitogénique des hépatocytes fut également découvert et nommé HGF. En étudiant de plus près la structure moléculaire de ces deux protéines, il fut déduit qu'elles étaient identiques, si bien qu'aujourd'hui encore SF/HGF est le seul ligand connu du récepteur Met. Le gène codant pour cette protéine est situé sur le chromosome 7q21.1 et code pour un précurseur inactif pro-HGF. La forme mature de HGF contient six domaines dont : un domaine N-terminal, quatre domaines d'environ 80 acides aminés contenant trois ponts disulfures (*kringle domain K1-K4*) et un domaine d'homologie aux protéases à sérine (SPH, *serine proteinase homology*). Les cinq premiers domaines forment la chaîne α de 34 kDa alors que la chaîne β de 69 kDa est constituée du domaine SPH uniquement. La forme active de HGF est composée d'un hétérodimère entre la chaîne α et la chaîne β , reliées entre elles par un lien disulfure. L'activation de HGF se produit par clivage protéolytique à un site cryptique situé après le domaine K4. Plusieurs protéases à sérine peuvent activer le HGF, notamment les activateurs du plasminogène uPA et tPA ainsi que les facteurs de coagulations X, XI et XII (Birchmeier *et al.*, 2003).

1.5.6 Rôles physiologiques et pathologiques de la voie HGF/Met

HGF et Met jouent des rôles cruciaux lors de l'embryogenèse et de l'organogenèse. Par exemple, des souris déficientes en HGF développent d'importantes anomalies au niveau du placenta et du foie, provoquant leur mort intra-utérine (Birchmeier et Gherardi, 1998). Il est également reconnu que par des mécanismes régulant l'échange de signaux entre les compartiments cellulaires mésenchymaux et épithéliaux, HGF et Met représentent des médiateurs importants nécessaires à la croissance, la morphogenèse et la différenciation des cellules épithéliales. À titre d'exemple, HGF et Met sont en mesure de réguler différents processus du développement en participant aux interactions entre cellules épithéliales et mésenchymales puisque Met est exprimé à la surface des cellules épithéliales et que HGF est produit par les cellules mésenchymales adjacentes (Sonnenberg *et al.*, 1993). Finalement, chez l'adulte, HGF et Met sont normalement impliqués dans la réparation et la régénération des tissus. Il fut observé que les transcrits d'ARNm de HGF et de Met ainsi que les niveaux d'expression de ces deux protéines étaient augmentés aux sites d'organes ayant subi des dommages comme le foie, les reins et le cœur. L'activation subséquente de Met favorise alors la prolifération et la migration cellulaire en plus d'inhiber l'apoptose via la stimulation des voies de survie cellulaire (Michalopoulos et DeFrances, 1997). La survie cellulaire est principalement médiée par la liaison des molécules PI3K et Gab1 (*Grb2-associated binder*) au domaine C-terminal intracellulaire du récepteur qui à leur tour activeront AKT et les voies de survie en aval. La prolifération et la migration sont des processus médiés par l'activation des MAPK. Cette activation des MAPK peut se produire de trois façons différentes : d'abord par le système Gab1-Grb2, ensuite par la liaison de Gab1 seulement sur la portion C-terminal du récepteur ou encore par l'association du complexe formé des protéines adaptatrices Shc-Grb2-Sos qui mène à l'activation de la voie de la protéine Ras et finalement des MAPK (Bolanos-Garcia, 2005).

Récemment, HGF et Met ont émergé comme étant des acteurs importants dans le développement tumoral. Même si les effets de la voie HGF/Met sont très complexes et

peuvent varier considérablement en fonction des différents types tissulaires, ils correspondent toujours à une augmentation du phénotype agressif de la tumeur. Conséquemment, HGF et Met sont exprimés dans une grande variété de tumeurs humaines et leur présence est souvent un indicateur de mauvais pronostic (Birchmeier *et al.*, 2003). À titre d'exemple, la découverte récente de ces deux protéines dans les MB a permis de mieux comprendre les mécanismes moléculaires responsables de l'agressivité de ces tumeurs pédiatriques (Li *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2006). L'implication de Met dans le développement tumoral touche à plusieurs des traits caractéristiques essentiels décrits au début de l'introduction. Ainsi, l'expression accrue et la dérégulation de la voie de HGF et de son récepteur au niveau des cellules tumorales favorisent l'établissement d'un phénotype angiogénique. Comme c'est le cas pour la plupart des RTK associés à un mauvais pronostic, l'activation de Met permet de favoriser les processus d'invasion et de formation de métastases. Finalement cette voie de signalisation contribue à la survie des cellules cancéreuses en interférant avec les mécanismes naturels de l'apoptose.

1.5.6.1 Rôle de la voie HGF/Met dans l'angiogenèse et la survie des cellules endothéliales

Tel que nous l'avons précédemment décrit dans la section traitant de l'angiogenèse, la formation de nouveaux réseaux sanguins tumoraux requiert une série d'étapes comprenant la dégradation de la MEC, la prolifération, la migration et la survie des CEs. Le HGF qui est produit par les cellules tumorales aussi bien que par les cellules vasculaires lisses, les péricytes et les fibroblastes, est responsable de la régulation d'une majorité de ces effets lorsqu'il active son récepteur Met.

Les premières indications du rôle de HGF/Met dans les processus angiogéniques découlent d'observations signalant que le niveau d'expression de Met au niveau des cellules vasculaires et tumorales corrèle avec la densité vasculaire de la tumeur (Kuhnen *et al.*, 2003). De plus, il a également été rapporté que cette densité vasculaire tumorale accrue correspond aussi au niveau, plus élevé que la normale, de HGF circulant dans le sang systémique des patient cancéreux (Alexandrakis *et al.*, 2004).

De par sa nature même, HGF est un puissant facteur de motilité responsable de la migration des cellules endothéliales neuromicrovasculaires en direction d'un stimulus angiogénique (Lamszus *et al.*, 1998). Cependant, outre ses activités sur la motilité, le HGF peut aussi favoriser l'expression et la synthèse de plusieurs protéines. Ainsi des études démontrent que le HGF régule les activités de dégradation de la MEC, notamment en stimulant la production au niveau des CEs de plusieurs MMP (Wang et Keiser, 2000). Le HGF peut affecter le processus angiogénique en régulant le niveau d'expression de plusieurs régulateurs pro-angiogéniques ou anti-angiogéniques. À titre d'exemple, le HGF est un important régulateur de l'expression de l'activateur angiogénique VEGF (Moriyama *et al.*, 1998) ainsi que de l'inhibiteur de l'angiogenèse la thrombospondine-1 (Abounader et Laterra, 2005). Finalement, HGF et le VEGF agissent en synergie pour contribuer à la survie des CEs. En effet, les deux facteurs de croissance (VEGF et HGF) contribuent à réguler l'augmentation de la synthèse de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 (Xin *et al.*, 2001).

1.5.6.2 Rôle de la voie HGF/Met dans le processus métastatique

D'une façon générale, les mécanismes permettant aux CEs de migrer vers le foyer tumoral (ou, de façon plus générale, vers la source du stimulus angiogénique) sont très comparables à ceux mis en jeu par les cellules tumorales lors des processus invasifs. Toutefois, dans le cadre de l'invasion tumorale, la principale différence provient du fait que ces étapes ne sont pas régulées. La dérégulation de l'expression et de l'activité de Met est donc associée au phénotype invasif de plusieurs types de tumeurs (Birchmeier *et al.*, 2003, Benvenuti et Comoglio, 2007). L'activation de Met par HGF conduit à la synthèse par les cellules tumorales de MMP, notamment de la MMP-2 et de la MT1-MMP qui sont particulièrement importantes pour la dégradation de la membrane basale et pour la migration cellulaire (Hamasuna *et al.*, 1999). Le rôle essentiel de Met dans les processus invasifs suggère que la voie HGF/Met constitue une cible intéressante afin de bloquer la croissance et la dissémination tumorale (Wang *et al.*, 2003; Migliore et Giordano, 2005).

1.5.6.3 Rôle de la voie HGF/Met dans la coagulation sanguine

En plus des rôles de Met précédemment décrits, il fut démontré que Met est également impliqué dans la régulation d'un programme génétique reliant le développement tumoral à l'hémostase. En effet, lorsque des souris modifiées génétiquement sont produites afin d'exprimer l'oncogène *MET* activé au niveau du foie, celles-ci développent alors un processus tumorigénique, accompagné d'un désordre hémostatique très similaire au syndrome de Trousseau (Boccaccio et Comoglio, 2005). De plus, dans la même étude, il fut démontré que l'expression de Met au niveau du foie favorise l'apparition de l'anomalie hémostatique en deux phases. D'abord, il y a une phase thrombotique, qui se caractérise par l'apparition de thromboses veineuses et par une hyperactivation du système de coagulation dans son ensemble. La seconde phase, quant à elle, est caractérisée par une perturbation générale du processus de coagulation, évoluant vers différents troubles hémorragiques pouvant causer la mort des souris (Boccaccio et Medico, 2005). Afin d'investiguer le lien fonctionnel existant entre l'activation de l'oncogène et les désordres hémostatiques, le profil d'expression génétique de cellules transduites avec l'oncogène activé fut étudié. Cette étude révéla que sur les 12 000 gènes considérés, près de 71 gènes étaient associés à l'expression de protéines hémostatiques. Parmi ces 71 gènes, deux étaient particulièrement surexprimés, soit les gènes codant pour les protéines PAI-1 et COX-2. Ces deux protéines jouent des rôles importants dans l'hémostase puisque PAI-1 inhibe la dégradation des caillots et COX-2 est une molécule importante dans l'activation des plaquettes (Boccaccio *et al.*, 2005). Globalement, ces résultats démontrent que les lésions génétiques responsables de la progression tumorale (l'activation de l'oncogène *Met*) contrôlent aussi les gènes codant pour les protéines hémostatiques et inversement ces protéines favorisent la propagation tumorale, créant ainsi un cercle vicieux fatal pour l'organisme.

1.6 Objectifs du travail expérimental

Nous avons étudié les rôles des protéines de la coagulation –TFPI et TF – dans le développement tumoral. L'un des objectifs du travail expérimental consistait à démontrer les fonctions non hémostatiques de TFPI dans la régulation des processus angiogéniques. La première partie de ces travaux met en évidence l'effet de faibles concentrations de TFPI sur le potentiel migratoire et les propriétés adhésives des CEs. Pour les deuxième et troisième objectifs de cette thèse, nous avons porté notre attention sur la protéine TF. De manière plus spécifique, notre second objectif était de démontrer que l'expression de TF dans les cellules DAOY était régulée par la voie de HGF/Met. Puisqu'il fut récemment démontré que l'expression de Met est corrélée, dans les MB, avec le phénotype agressif de ces tumeurs, nous avons également cherché à établir une corrélation entre le niveau d'expression de Met et de TF en lien avec l'agressivité de 18 spécimens tumoraux obtenus à l'hôpital Sainte-Justine. De plus, nous avons constaté que l'expression de TF et le phénotype agressif correspondaient à l'induction d'un état procoagulant et un potentiel migratoire des cellules tumorales accrues. Finalement, notre troisième objectif consistait à démontrer que TF, exprimé dans les cellules DAOY en réponse à la stimulation par HGF, est impliqué dans l'effet anti-apoptotique médié par la signalisation induite par Met.

CHAPITRE II

ARTICLES

- 2.1 Tissue factor pathway inhibitor (TFPI) interferes with endothelial cell migration by inhibition of both the Erk pathway and focal adhesion proteins.**
Thromb. Haemost. 99 (3) : 576-585, 2008.

- 2.2 C-Met activation in medulloblastoma induces tissue factor expression and activity : effect on coagulation and cell migration.** *Carcinogenesis.* *Sous presse.*
avril 2009.

- 2.3 Tissue factor mediates the HGF/Met-induced anti-apoptotic pathway in medulloblastoma through inactivation of p53** (En révision *Journal of Neurooncology* depuis le 24 avril 2009).

2.1 Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI) interferes with endothelial cell migration by inhibition of both the Erk pathway and focal adhesion proteins*

Mathieu Provençal¹, Marisol Michaud¹, Édith Beaulieu¹, David Ratel¹, Georges-Étienne Rivard², Denis Gingras¹ and Richard Béliveau^{1,2} ¶

¹ *Laboratoire de médecine moléculaire, Hôpital Ste-Justine-UQAM, Centre de cancérologie Charles-Bruneau, Centre de Recherche de l'Hôpital Sainte-Justine, 3175, Chemin Côte-Sainte-Catherine, Montréal, Québec (Canada) H3T 1C5.*

² *Service d'Hématologie-Oncologie, Hôpital Ste-Justine, Montréal, Québec, Canada H3T 1C5*

¶ To whom correspondence should be addressed : Laboratoire de médecine moléculaire Sainte-Justine-UQAM, Centre de cancérologie Charles-Bruneau, 3175, Chemin Côte-Sainte-Catherine, Montréal, Québec (Canada) H3T 1C5

Phone: (514) 345-2366

FAX: (514) 345-2359

E-mail: molmed@recherche-ste-justine.qc.ca

Key words: angiogenesis; TFPI; endothelial cell migration, focal adhesion complexes, extracellular signal-regulated kinases

Running title: *Antiangiogenic properties of TFPI*

Abbreviations used: TFPI; Tissue Factor Pathway Inhibitor, HUVEC; Human umbilical vein endothelial cells, S1P; sphingosine-1-phosphate, FAK; Focal Adhesion Kinase, PAX; Paxillin

* This work was supported by a grant from the Canadian Institutes for Health Research to R.B. and D.G.

Summary

Tissue factor pathway inhibitor (TFPI) is a plasma Kunitz-type serine protease inhibitor that is mainly known for its inhibition of tissue factor-mediated coagulation. In addition to its anticoagulant properties, emerging data show that TFPI may also regulate endothelial cell functions via a non-haemostatic pathway. In this work we demonstrate that, at physiological doses, TFPI inhibits both endothelial cell migration and their differentiation into capillary-like structures *in vitro*. These effects were specific to endothelial cells since no inhibitory effect was observed on the migration of tumor (glioblastoma) cells. Inhibition of endothelial cell migration was correlated with a concomitant loss in cell adhesion, suggesting an alteration of focal adhesion complex integrity. Accordingly, we observed that TFPI inhibited the phosphorylation of focal adhesion kinase and paxillin, two key proteins involved in the scaffolding of these complexes, and that this effect was specific to endothelial cells. These results suggest that TFPI influences the angiogenic process via a non-haemostatic pathway, by downregulating the migratory mechanisms of endothelial cells.

Introduction

Angiogenesis, the formation of new blood vessels from pre-existing ones, is a critical component of a large number of pathological states such as rheumatoid arthritis, diabetic retinopathies, inflammation, atherosclerosis, tumor growth and metastasis (1). Formation of the new vessel network is a multi-step process that requires endothelial cell activation by growth factor or cytokines, cell detachment and migration towards a chemotactic stimulus accompanied by degradation of the surrounding extracellular matrix (ECM) (2). Further elucidation of the basic mechanisms regulating of each of the steps involved in the angiogenic process is of crucial importance for the development of efficient antiangiogenic therapies (3).

Many reports have shown that several proteins involved in the coagulation cascade also modulate tumor angiogenesis (4). In most cases, these haemostatic proteins, as well as cryptic domains released from them by proteolysis, can influence their environment by their classical haemostatic function as well as by less studied, non-haemostatic activities (5). Indeed, it has been shown that tissue factor (TF), the main initiator of the blood coagulation cascade, is able to regulate angiogenesis via signalling by the cytoplasmic domain of the protein (6). Also, it has been reported that aberrant expression of TF in tumors contributes to the angiogenic phenotype (7). Sphingosine-1-phosphate (S1P), which is a bioactive sphingolipid metabolite stored in platelets and released upon their activation during the coagulation process, is another coagulation-related molecule that regulates the tumoral angiogenic phenotype. S1P is a potent activator of endothelial cell migration (8-10), further supporting a strong link between cancer and coagulation processes. The link

between angiogenesis and components of the haemostatic pathway is consistent with the fact that coagulopathies and neovascularization are among the most relevant host responses associated with cancer (11). Recent studies showed that 50% of all cancer patients and up to 90% of those with metastatic lesions demonstrate clinically observable abnormalities in haemostatic parameters (11) even in the early stages of the disease (12). Therefore, tumour-induced coagulation is intrinsically involved with tumour growth, angiogenesis and metastasis.

Tissue factor pathway inhibitor is a plasma Kunitz-type serine protease inhibitor that acts as a specific inhibitor of TF-mediated coagulation. TFPI, a 35-kDa protein, consists of three Kunitz-type domains with an acidic N-terminal and a basic carboxyl-terminal end. The first Kunitz-type domain binds to FVIIa and the second domain binds to Factor Xa (FXa). The third domain has no known function but may bind to plasma lipoproteins such as low-density lipoprotein (LDL) (13). TFPI is mainly produced by vascular endothelial cells under normal physiological conditions and, to a lesser extent, by monocytes, macrophages, lung fibroblasts and vascular endothelial cells, laryngeal squamous epithelial cells, astrocytes and mesothelial cells (14). In the body, the physiological concentrations of TFPI vary between 2.5 and 5 nM (14) and the half-life of the protein is rather short, between 60 and 120 min (13). TFPI is distributed in three distinct pools; 80-85% is associated with endothelial cell-surface proteins, mostly glycosaminoglycans and proteoglycans, 10% circulates in plasma (principally bound to the lipoproteins) and 3% is found in platelets (14).

Besides its normal functions in coagulation, TFPI is important for the development of new blood vessels during embryogenesis (15). Inactivation of the TFPI gene results in

complete intrauterine lethality and histologic analysis of TFPI^{-/-} embryos revealed abnormalities in yolk sac and placental vasculature development. Furthermore, signs of fibrin deposition in the liver, intravascular thrombosis and hemorrhages in these embryos suggested that unregulated TF/VIIa activity leads to overt coagulopathy (15). These coagulation disorders are similar to those observed clinically in cancer patients, thus suggesting a role for TFPI in cancer. Moreover, relevant to an involvement in cancer, TFPI also exhibits antitumor and antimetastatic properties in rodent models (16, 17).

In this work, we demonstrate that TFPI is able to regulate angiogenesis at physiological concentrations via a non-haemostatic mechanism, through regulation of endothelial cell migratory and adhesion properties.

Materials and methods

Materials

All materials used in the production of TFPI (bacteria and plasmids) were obtained from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). Isopropyl- β -D-thiogalactoside (IPTG) was from Roche (Laval, Québec, Canada). Chromozym-X was purchased from Roche and FXa was from Calbiochem (La Jolla, CA, USA). Cell culture media were obtained from Life Technologies (Burlington, Ontario, Canada) and serum was purchased from Hyclone Laboratories (Logan, UT). Anti-p-ERK, anti-ERK, anti-p-p38, anti-p38, anti-p-p70 and p-70 polyclonal antibodies were all obtained from Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA). Anti-pTyr (pY99) was from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Anti-FAK was from Upstate Cell Signalling (Lake Placid, NY, USA) and anti-PAX was from BD Transduction Laboratories (Mississauga, Ontario, Canada). Anti-mouse and anti-rabbit horseradish peroxidase (HRP)-linked secondary antibodies were purchased from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA, USA). Electrophoresis apparatus and reagents were purchased from Bio-Rad (Mississauga, ON, Canada). Polyvinylidene difluoride transfer membranes (PVDF) and Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus were obtained from PerkinElmer Life Sciences (Boston, MA, USA).

Production of a human recombinant TFPI expression vector

Recombinant human TFPI was obtained by cloning the full-length human TFPI cDNA for subsequent expression in *Escherichia coli* as described previously (18). Briefly, the *TFPI* gene was amplified from HUVEC mRNA by reverse-transcription-PCR using primers annealing to TFPI (sense, 5'-CATCAGAGATTTTACTTAGATGA-3' and

antisense, 5'-CATTGCTATAACAAATTCACA-3') and the PCR product was then ligated in pTrcHis B (Invitrogen) and used to transform in *E. coli* BL-21 strain.

Purification of TFPI

Freshly grown colonies of bacteria were incubated overnight in 100 ml of LB-media and transferred to a 1 L flask. Bacteria were then incubated for 4 h and log-phase cultures were stimulated with 0.1 mM IPTG. Bacteria were then pelleted by centrifugation (6500 rpm, 15 min, 4°C), subjected to lysis and TFPI was purified as described previously (18). For renaturation, the protein concentration was adjusted to 0.3 mg/ml in buffer (6 M urea, 0.5 M NaCl, 0.05 M NaHPO₄, pH 10.5); L-cysteine was added to 0.1 mM and the pH was adjusted to 10.5 if necessary. After mixing for 10 min, the solution was incubated without stirring at 10°C for 42 h.

TFPI activity

TFPI activity was monitored by its inhibitory effect on FXa activity. Briefly, different concentrations of TFPI were preincubated with FXa (50 nM) for 5 min at 37°C and the reaction was initiated by addition of the chromogenic substrate Chromozym-X. The cleavage of Chromozym-X by active FXa was quantified by spectrophotometry at 405 nm.

Cell culture

Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were obtained from Clonetics and human glioblastoma cells (U-87) were obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA). All cells were cultured at 37°C under a humidified atmosphere containing 5% CO₂. HUVECs were maintained in the endothelial cell growth medium BulletKit (EGM-2) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), human EGF (hEGF), hydrocortisone, VEGF, human basic-FGF (hFGF-B), IGF-1, ascorbic acid, heparin,

gentamycin, and amphotericin-B. U-87 were grown in minimum essential medium (MEM) supplemented with 10% FBS and 1 mM pyruvate. For experimental purposes, cells were plated in 0.15% gelatin-PBS coated 100-mm plastic dishes at 12 000 cells/cm² and were grown to confluence before overnight serum starvation. Cells were treated with TFPI diluted in serum-free medium and stimulated with 1 μ M S1P, as described below.

Matrigel endothelial cell tube formation assays

Matrigel™ from BD Biosciences (Mississauga, Ontario, Canada) (12.5 mg/ml) was thawed at 4°C and aliquots of 50 μ l were quickly added to each well of a 96-well plate and allowed to solidify for 30 min at 37°C. Cells (HUVEC 20 000 cells/well) pre-treated with TFPI (1 to 20 nM) were added on top of the Matrigel™ and incubated for 6 h at 37°C. The formation of capillary-like structures was examined microscopically and pictures (50X magnification) were taken using a Retiga 1300 camera and a Zeiss Axiovert S100 microscope. The extent to which capillary-like structures formed in the gel was quantified by analysis of digitized images to determine the thread length of the capillary-like network, using a commercially available image analysis program (Northern Eclipse), as previously described (19).

Migration assays

Transwells inserts (8 μ m pore size; Costar, Cambridge, MA, USA) were pre-coated with 0.15% gelatin–PBS by adding 600/100 μ l in the lower/upper chambers for 24 h at 4°C. The Transwells were then washed with PBS and assembled in 24-well plates. The upper chamber of each Transwell was filled with 50 μ l of cells (100 000 cells/chamber) and the cells were allowed to adhere for 30 minutes. Cells were then treated for 2 h by adding 50 μ l of 2-fold concentrated TFPI solution prepared in serum-free medium into the upper

chamber and 600 μ l of the TFPI solution into the lower chamber. Migration was initiated by adding S1P (1 μ M) to the lower chamber (HUVEC and U-87). The plate was placed at 37°C in 5% CO₂ – 95% air for 3 h. Cells that had migrated to the lower surface of the filters were fixed with 10% formalin phosphate and stained with 0.1% Crystal Violet–20% methanol (v/v). The migration was quantified using computer-assisted imaging and data are expressed as the average density of migrated cells per four fields (50X magnification).

Adhesion assays

96-well plates were pre-coated with gelatin (0.15%) overnight. Wells were saturated with 0.5% BSA/PBS for 1 h at room temperature and then washed with 100 μ l of adhesion buffer EBM-2 (Bullectkit) serum-free media (0.2% BSA, 15 mM HEPES and 0.12% NaHCO₃). Meanwhile, HUVEC and U-87 were pre-treated with TFPI (20 nM) for 0 to 60 min and cells were harvested by incubation with EDTA (0.53 mM) for 10-15 min at 37°C. EDTA was neutralized by the addition of adhesion buffer and cells were centrifuged for 3 min at 1000 g. 5×10^4 cells were added per well and allowed to adhere on gelatin or plastic for 30 min at 37°C. Cells were then fixed with 3.7% formaldehyde for 10 min at 4°C, washed twice with 100 μ l water and stained with 0.1% Crystal Violet–20% methanol (v/v) for 30 min at room temperature as previously described (20). Results were quantified by spectrophotometry at 600 nm.

TFPI treatment and stimulation of HUVEC and U-87 with S1P

HUVECs and U-87 cells grown to 90% confluence were serum-starved overnight in medium containing 1% serum. Cells were then pre-incubated for 30 min at 37°C with TFPI (1 nM to 20 nM), followed by incubation for 5 min with 1 μ M S1P. Cells were then washed with PBS containing 1 mM sodium orthovanadate and 1 mM sodium fluoride. Cells were

solubilized in SDS lysis buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 1% SDS, 1 mM sodium orthovanadate, 1 mM sodium fluoride), followed by boiling for 5 min at 100°C and homogenization using a 26-gauge needle. Protein concentrations were determined by the bicinchoninic acid method (Pierce).

Immunoprecipitation and Western Blotting

For the immunoprecipitation studies, identical amounts of proteins from each sample were incubated in SDS lysis buffer overnight at 4°C in the presence of 1 µg of a specific antibody. The immune complexes were collected by incubating the mixtures with 20 µl of a 50% suspension of protein A (rabbit primary antibody) or protein G (mouse primary antibody)-Sepharose beads. Nonspecifically bound proteins were removed by washing the beads three times in 1 ml of lysis buffer, and bound material was solubilized in 20 µl of 2-fold concentrated Laemmli sample buffer, boiled for 5 min and resolved by SDS-PAGE. The proteins were transferred onto polyvinylidene difluoride membranes (PVDF) and blocked overnight at 4°C with TBST buffer (147 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.1% Tween 20) containing 3% bovine serum albumin (BSA). Membranes were incubated with the specific primary antibody for 1 h at room temperature. Immunoreactive bands were revealed following 1 h incubation with horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse or anti-rabbit antibodies, and the signals were visualized using an ECL detection system.

Immunofluorescence and Confocal Microscopy

HUVECs or U-87 seeded onto coverslips coated with 0.15% gelatin-PBS in a 24-well plate were serum-starved overnight in media containing 1% FBS. The cells were then treated for 2 h with TFPI at the indicated concentrations. After this treatment, HUVECs

were stimulated with or without 1 μ M S1P for 5 min. Cells were fixed in 3.7% formaldehyde for 15 min, permeabilized with 0.2% Triton X-100 for 5 min and stained with a 1/2500 dilution of Texas Red phalloidin (Sigma) for 30 min. Non-specific sites were blocked with 1% BSA in buffered Saline containing 0.1% Tween 20 for 30 min and cells were stained with primary antibodies against Focal Adhesion Kinase (FAK) or Paxillin (PAX) (1/100 dilution) for 30 min. Cells were then incubated with Alexa488-conjugated secondary antibody and slides were mounted with ImmunoFluor Mounting Medium (MP Biomedicals). Immunostaining was visualized and photographed using a Zeiss LSM 510 Meta confocal microscope.

Results

Purification of human recombinant TFPI

In order to examine the inhibitory action of TFPI on angiogenesis, a cDNA encoding the protein was obtained by RT-PCR and the protein was purified following its overexpression in bacteria (Fig. 1A and 1B). As shown in Fig. 1C and 1D, purified TFPI was present as a major band at 38 kDa as revealed by Coomassie blue staining and by immunoblotting with an anti-histidine tag antibody. A minor degradation product of 36 kDa was also observed, possibly originating from the harsh steps necessary for the extraction of the protein from the inclusion bodies. At physiological concentrations, the purified protein inhibited FXa activity by 70%, suggesting some loss of activity during the purification (Fig. 1E). Since TFPI is a complex protein, requiring 9 disulfide bonds in order to obtain full activity, this loss of activity is likely due to the denaturation-renaturation steps performed during purification.

TFPI inhibits endothelial cell tube formation

Previous reports have suggested that the antiangiogenic activity of low molecular weight heparin (LMWH) may be associated with the release of endothelial TFPI in the vascular milieu (21, 22). To explore this possibility, we examined the effect of TFPI on the ability of HUVEC to spontaneously form capillary-like structures on Matrigel™. As shown in Fig. 2, pre-treatment of HUVECs with increasing concentrations of TFPI disrupted the capillary-like structure network in a dose-dependent manner (Fig 2A-B). TFPI inhibits endothelial cell tube formation by 50% at 5 nM, which represents its normal physiologic concentration in blood, and this inhibitory effect was maximal at 20 nM. Under these

conditions (20 nM TFPI, 6 h), HUVECs showed no signs of cytotoxicity (Fig. 2C). In addition, TFPI used at physiologic concentrations did not influence cell proliferation over a 48 h period (Fig. 2D). Overall, these data suggest that TFPI, at normal physiologic concentrations, is an inhibitor of endothelial cell tube formation *in vitro*.

TFPI specifically inhibits endothelial cell migration

One of the critical steps occurring during the angiogenic process is endothelial cell migration (2) induced by tumor or host-derived chemoattractants. Among these chemoattractants, the release of S1P into the tumor environment upon activation of platelets during the coagulation process has been shown to be a very potent inducer of endothelial cell migration (23). As shown in Fig 3, the addition of increasing concentrations of TFPI (0.25 to 20 nM) induced a dose-dependent inhibition of S1P-dependent endothelial cell migration. Interestingly, this inhibitory effect was restricted to the migration of endothelial cells, as it was observed for HUVECs and BAECs (Bovine Aortic Endothelial Cell) (data not shown), whereas TFPI failed to inhibit glioblastoma cell migration stimulated by S1P.

Treatment of HUVECs with TFPI inhibits cell adhesion

Because dynamic integrin activation is required during cell migration (24, 25), we hypothesized that TFPI could interfere with cell adhesion. Both cell lines tested (HUVEC and U-87) adhere efficiently to gelatin-coated wells after 30 min incubation at 37°C compared to cells plated onto non-coated wells (Fig. 4 A-B). Vascular endothelial cells pre-treated with 20 nM TFPI for 0 to 60 min showed a 50% reduction in cell adhesion to gelatin. However, the same treatment applied to glioblastoma cells did not modify the

extent of adhesion (Fig. 4 *A-B*). These results suggest that the activity of molecules involved in cell adhesion, such as components of focal adhesion complexes, may be affected by TFPI.

TFPI specifically inhibits ERK-1/2 phosphorylation in vascular endothelial cells

In order to determine how TFPI could influence endothelial cell migration and adhesion, we analyzed the phosphorylation pattern of different pathways of MAP kinases involved in cell migratory processes (26). Cells were treated with various concentrations of TFPI (1 to 20 nM) for 30 min at 37°C and cell lysates were analysed for phospho-ERK, phospho-p-38 and phospho-p-70 levels. As shown in Fig. 5, TFPI-treated HUVECs showed a dose-dependent inhibition of ERK-1/2 phosphorylation, while phospho-p-38 and phospho-p-70 remained unaffected. TFPI had no specific effect on MAP kinase phosphorylation in U-87. Other pathways, such as phospho-AKT and phospho-JNK were also unaffected by TFPI (data not shown), suggesting that ERK-1/2 kinase activity may represent a key pathway by which TFPI interfere with endothelial cell migration.

TFPI inhibits FAK and PAX phosphorylation in vascular endothelial cells

Cell migration is a coordinated process that involves rapid changes in the dynamics of actin filaments as well as the formation and disassembly of cell adhesion sites, better known as focal adhesion complexes (27). We hypothesized that TFPI could modulate focal adhesion proteins phosphorylation and thereby affect the migratory mechanics of these complexes, as shown for other endogenous angiogenesis inhibitors (28). In order to examine the possible involvement of focal adhesion proteins, HUVECs and U-87 cells

were treated with different concentrations of TFPI and the phosphorylation of two primary focal adhesion proteins, focal adhesion kinase and paxillin, was monitored. As shown in Fig. 6 *A-B*, TFPI dose-dependently inhibited the phosphorylation of immunoprecipitated FAK and PAX in HUVECs but had no effect on FAK and PAX phosphorylation in U-87 cells (Fig. 6 *C-D*), again suggesting that TFPI's effect is specific to endothelial cells. In order to determine whether the effect of TFPI on ERK phosphorylation occurs upstream or downstream from FAK, we used the MEK1 inhibitor PD98059 to inhibit the phosphorylation of ERK. As shown in Fig. 6 *E-F*, the phosphorylation level of immunoprecipitated FAK was reduced in both PD98059 and TFPI-treated cells, strongly suggesting that the inhibition of phospho-ERK by TFPI is essential to the inhibitory effect of the protein on FAK and PAX phosphorylation.

TFPI prevents morphological changes in endothelial cells induced by S1P

We sought to corroborate our results obtained by immunoprecipitation by monitoring the effect of TFPI on cell morphology using confocal microscopy and immunofluorescent staining. HUVECs grown on gelatin-coated coverslips showed a relatively round shape with a low expression of focal adhesion proteins FAK and PAX, as visualized by both anti-FAK and anti-PAX antibodies (Fig. 7 *A*). Stimulation of HUVECs with 1 μ M S1P for 5 min caused the appearance of migratory structures containing FAK and PAX, but the formation of these structures was completely absent in endothelial cells treated with TFPI (20 nM). In general, TFPI-treated HUVECs showed a round shape, similar to non-treated control cells. The same treatment and staining were performed on U-87 cells and, as shown in Fig. 7 *B*, TFPI influenced neither the cell shape nor the

localisation of the focal adhesion proteins in these cells. These data clearly demonstrate that TFPI prevents the morphological changes induced by S1P in the endothelial cell migratory process, and that this effect may be responsible for the inhibitory effect of the protein on vascular endothelial cell migration and adhesion.

Discussion

The inhibitory effect of TFPI on TF-dependent activation of coagulation cascade has been extensively studied (29, 30). However, in addition to its anticoagulation properties, new TF-independent roles for TFPI have been reported in the last few years (17, 22, 31), indicating a possible non-haemostatic function for TFPI in normal and pathological physiology.

In this work, we observed that addition of physiological concentrations of TFPI to vascular endothelial cells led to the inhibition of endothelial cell tube formation and migration, two hallmarks of angiogenesis. Interestingly, these effects were not related to cytotoxicity or to inhibition of endothelial cell proliferation. TFPI was previously reported to inhibit proliferation of HUVEC but this effect was observed only at high concentrations of the protein (350 nM) (31). At physiological concentrations, however, our results suggest that the inhibition of angiogenesis by TFPI involve distinct mechanisms.

The endothelial specificity of TFPI remains to be established. In resting conditions, HUVEC do not express TF (31), thereby suggesting that TFPI interacts with endothelial cell in a TF-fVIIa-independent manner. This TF-fVIIa-independent interaction is also supported by the fact that TFPI-treated HUVEC showed no effect on either TF mRNA or protein expression patterns (data not shown). Previous findings reported that TFPI binds to the VLDL receptor that is highly expressed at the endothelial cell surface (31), suggesting that this receptor may play a critical role in mediating the observed inhibitory effect of the protein. Such a TF-independent interaction would also explain why glioblastoma, in which TF is highly expressed (32, 33), were unaffected by TFPI. The specificity of the TFPI

inhibitory action towards endothelial cells could also be explained by the localization of TFPI to endothelial cell caveolae which regulate its cell surface exposure and activity (34). However, such a mechanism is unlikely to play a role in the antimigratory effect of TFPI, since the migration of glioblastoma cells is not inhibited by TFPI in spite of the presence of caveolae in these cells. Moreover, it was previously shown that exogenously added TFPI does not localize to caveolae (35).

We observed that TFPI specifically inhibits endothelial cell migration and that inhibitory effect is likely to play an essential role in its antiangiogenic properties. During cell adhesion, spreading and migration processes, focal contacts are formed at ECM-integrin junctions, bringing together cytoskeletal and signaling proteins (27). Treatment of endothelial cells with TFPI resulted in inhibition of the phosphorylation of two proteins (FAK and PAX) which are crucial components for focal adhesion complex assembly (27). This suggests that the complex interplay between the actin cytoskeleton and cell adhesion sites is lost in endothelial cells and explains the absence of the membrane protrusions normally observed by confocal microscopy with cells stimulated with the chemoattractant S1P.

It is interesting to note that other antiangiogenic molecules, such as endostatin, are also known to modulate focal adhesion complexes (28). In fact, endostatin treatment of endothelial cells induced redistribution of focal adhesion proteins and actin. These reversible effects of endostatin could conceivably affect the adhesive, migratory and apoptotic behavior of endothelial cells. These effects are somewhat similar to the effects obtained in this work with TFPI.

The inhibitory effect of TFPI on FAK and PAX involved inhibition of the ERK-1/2 pathway in endothelial cells, while other pathways such as p-38, p-70, phospho-AKT and phospho-JNK were unaffected by TFPI. MAP kinases are considerably involved in the process of focal adhesion complex formation by modulating different phosphorylation patterns on FAK and PAX (26). By using the specific inhibitor of MEK1 (PD98059), we determined that this inhibition of ERK-1/2 phosphorylation occurs upstream from the effect of TFPI on FAK phosphorylation in endothelial cells. Conversely, glioblastoma cell intracellular pathways remained unaffected by TFPI, supporting the endothelial cell specificity of TFPI's effects.

While the role of FAK in cancer cells has been widely studied (36), antiangiogenic molecules such as TFPI and endostatin specifically target endothelial cell focal adhesion proteins, which could result in new therapeutic opportunities. The fact that TFPI can precisely target specific properties of endothelial cells may significantly contribute to the antiangiogenic activity of the protein. These particular new and interesting roles for TFPI open the door to more complete and efficient antiangiogenic therapies.

Acknowledgements

This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research. We also thank Mr. Ryan Veitch and Mr. David Labbé for their careful reading of the manuscript.

References

- 1- Cavallaro U, Christofori G. Molecular mechanism of tumor angiogenesis and tumor progression. *J Neurooncol.* 2000; 50: 63-70.
- 2- Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer.* 2003; 3: 401-410.
- 3- Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat. Med.* 2003; 9: 653-660.
- 4- Nijziel MR, van Oerle R, Hillen HFP et al. From Trousseau to angiogenesis: the link between haemostatic system and cancer. *Neth J Med.* 2006; 64: 403-410.
- 5- Wojtukiewicz MZ, Sierko E, Rak J. Contribution of the hemostatic system to angiogenesis in cancer. *Semin Thromb Hemost.* 2004; 30: 5-20.
- 6- Belting M, Dorrell MI, Sandgren S, et al. Regulation of angiogenesis by tissue factor cytoplasmic domain signaling. *Nat. Med.* 2004; 10: 502-509.
- 7- Lopez-Pedrara C, Barbarroja N, Dorado G, et al. Tissue factor as an effector of angiogenesis and tumor progression in haematological malignancies. *Leukemia.* 2006; 20: 1331-1340.
- 8- Lee OH, Kim YM, Lee MY. Sphingosine-1-phosphate induces angiogenesis: its angiogenic action and signaling mechanism in human umbilical vein endothelial cell. *Biochem Biophys Res. Commun.* 1999; 264: 743-750.
- 9- Ozaki H, Hla T, Lee MJ. Sphingosine-1-phosphate signaling in endothelial activation. *J Atheroscler Thromb.* 2003; 10: 125-131.
- 10- Hla T. Signaling and biological actions of sphingosine-1-phosphate. *Pharmacol Res.* 2003; 47: 401-407.

- 11- Wojtukiewicz MZ, Sierko E, Klement P, et al. The hemostatic system and angiogenesis in malignancy. *Neoplasia*. 2001; 3: 371-384.
- 12- Boccacio C, Medico E. Cancer and blood coagulation. *Cell Mol Life Sci*. 2006; 63: 1024-1027.
- 13- Lwaleed B, Bass PS. Tissue factor pathway inhibitor: structure biology and involvement in disease. *J Pathol*. 2006; 208: 327-339.
- 14- Bajaj MS, Birktoft JJ, Steer SA, et al. Structure and biology of tissue factor pathway inhibitor. *Thromb Haemost*. 2001; 86: 959-972.
- 15- Pedersen B, Holscher T, Sato Y. A balance between tissue factor and tissue factor pathway inhibitor is required for embryonic development and hemostasis in adult mice. *Blood*. 2005; 105: 2777-2782.
- 16- Amirhosravi A, Meyer T, Chang JY et al. Tissue factor pathway inhibitor reduces experimental lung metastasis of B16 melanoma. *Thromb Haemost*. 2002; 87: 930-936.
- 17- Hembrough TA, Ruiz JF, Swerdlow BM, et al. Identification and characterization of a very low density lipoprotein receptor-binding peptide from tissue factor pathway inhibitor that has antitumor and antiangiogenic activity. *Blood*. 2004; 103: 3374-3380.
- 18- Gustafson ME, Junger KD, Wun TC, et al. Renaturation and purification of human tissue factor pathway inhibitor expressed in recombinant *E. coli*. *Protein Expr Purif*. 1994; 5: 233-241.

- 19- Langlois S, Gingras D, Beliveau R. Membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) cooperates with sphingosine 1-phosphate to induce endothelial cell migration and morphogenic differentiation. *Blood*. 2004; 103: 3020-3028.
- 20- Pilorget A, Berthet V, Luis J, et al. Medulloblastoma cell invasion is inhibited by green tea (-)epigallocatechin-3-gallate. *J Cell Biochem*. 2003; 90: 745-755.
- 21- Mousa SA. Anticoagulants in thrombosis and cancer: the missing link. *Sem Thromb Hemost*. 2002; 28: 45-52.
- 22- Mousa SA, Mohamed S. Inhibition of endothelial cell tube formation by the low molecular weight heparin, tinzaparin, is mediated by tissue factor pathway inhibitor. *Thromb Haemost*. 2004; 92: 627-633.
- 23- Paik JH, Chae SS, Lee MJ, et al. Sphingosine-1-phosphate-induced endothelial cell migration requires the expression of Edg-1 and Edg-3 receptors and Rho-dependent activation of $\alpha_v\alpha_3$ and α_1 -containing integrins. *J Biol Chem*. 2001; 276: 11830-11837.
- 24- Huttenlocher A, Ginsberg MH, Horwitz AF. Modulation of cell migration by integrin-mediated cytoskeletal linkages and ligand-binding affinity. *J Cell Biol*. 1996; 134: 1551-1562.
- 25- Palacek SP, Loftus JC, Ginsberg MH, et al. Integrin-ligand binding properties govern cell migration speed through cell-substratum adhesiveness. *Nature*. 1997; 385: 537-540.
- 26- Huang C, Jacobson K, Schaller D. Map kinases and cell migration. *J Cell Science*. 2004; 117: 4619-4628.

- 27- Mitra SK, Hanson DA, Schaefer DD. Focal adhesion kinase in command and control of cell motility. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005; 6: 56-68.
- 28- Wickström SA, Veikola T, Rehn M, et al. Endostatin-induced modulation of plasminogen activation with concomitant loss of focal adhesions and actin stress fibers in cultured human endothelial cells. *Cancer Res.* 2001; 61: 6511-6516.
- 29- Rapaport SI, Inhibition of factor VIIa/tissue factor-induced coagulation: with particular emphasis upon a factor Xa-dependent mechanism. *Blood.* 1989; 73: 359-365.
- 30- Rapaport SI, Rao LV. The tissue factor pathway: how it has become a "prima ballerina". *Thromb Haemost.* 1995; 74: 7-17.
- 31- Hembrough TA, Ruiz JF, Papathanassiou AE. Tissue factor pathway inhibitor inhibits endothelial cell proliferation via association with the very low density lipoprotein receptor. *J Biol Chem.* 2001; 276: 12241-12248.
- 32- Guan M, Jin J, Su B, et al. Tissue factor expression and angiogenesis in human glioma. *Clin Biochem.* 2002; 35: 321-325.
- 33- Hamada K, Kuratsu J, Saitoh Y, et al. Expression of tissue factor correlates with grade of malignancy in human glioma. *Cancer.* 1996; 77: 1877-1883.
- 34- Lupu C, Goodwin CA, Westmuckett AD, et al. Tissue factor pathway inhibitor in endothelial cells colocalizes with glycolipid microdomains/caveolae. Regulatory mechanism(s) of the anticoagulant properties of the endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997; 17: 2964-2974.

- 35- Sevinski JR, Rao Mohan Vijay L, Ruf W. Ligand-induced protease receptor translocation into caveolae: a mechanism for regulating cell surface proteolysis of tissue factor-dependent coagulation pathway. *J Cell Bio.* 1996; 133: 293-304.
- 36- McLean GW, Carragher NO, Avizienyte E, et al. The role of focal adhesion kinase in cancer-A new therapeutic opportunity. *Nat Rev Cancer.* 2005; 5: 505-515.

Figure legends

Fig.1. **Production and purification of human recombinant TFPI.** (A) HUVEC mRNA was extracted and amplified by semi-quantitative Reverse-Transcriptase PCR. Addition of Mg^{2+} (0.8 mM) to the reaction mix was necessary to obtain an amplification of TFPI mRNA. Actin was used as control. (B) The expression vector (pTrc-His B) containing the TFPI sequence was introduced into *E. coli*. BL 21 bacteria. A one liter flask was incubated 4 h at 35°C and then bacteria were stimulated with IPTG (0.1 mM) for 4 h at 35°C. An empty vector was used as control; lysates were analysed by 10% SDS-PAGE and protein was visualized by Coomassie blue staining. (C) TFPI was purified from bacteria and inclusion bodies. (D) The protein (2 µg) was then applied onto 10% SDS-PAGE gels and visualized with Coomassie blue staining or anti-His tag antibody. (E) TFPI activity was validated by the inhibition of FXa's ability to cleave a chromogenic substrate (Chromozym-X). Means ± S.D. are given for three separate experiments.

Fig.2. **TFPI inhibits endothelial cell tube formation *in vitro* and induced no cytotoxicity or inhibitory effects on proliferation.** Confluent HUVECs seeded on gelatin-coated (0.15% gelatin) 60 mm dishes were serum-starved overnight in media containing 1% FBS. Cells were pre-treated with various TFPI concentrations (1 nM to 20 nM) for 2 h at 37°C. HUVECs (2×10^4 cells) were subjected to tube formation assays as described in the *Materials and methods* section, using a 96-well Matrigel™ coated plate. (A) Capillary-like structures were photographed (50X) with Retiga 1300 camera and a Zeiss Axiovert S100 microscope. (B) Results were quantified by analysis of digitized images using a

commercially available image analysis program (Northern Eclipse). To further confirm that TFPI induces no cytotoxicity, confluent HUVEC plated on gelatin-coated (0.15% gelatin) 60 mm dishes were serum-starved overnight in media containing 1% FBS. **(C)** Cells were then treated with 20 nM TFPI for 0 to 6 h at 37°C and the cytotoxicity of the treatment was measured by cleavage of WST-1 by spectrophotometry. **(D)** HUVECs (8000 cells/well) were plated on a 96-well plate and incubated overnight at 37°C. Different concentrations of TFPI (0 to 20 nM) were added for 48 h at 37°C. The effect on cell proliferation was quantified by cleavage of WST-1 in formazan by spectrophotometry. Means \pm S.D. are given for three separate experiments ($p = 0.03$ and $p = 0.02$ for 5 and 20 nM respectively).

Fig.3. TFPI specifically inhibits endothelial cell migration. HUVECs and U-87 cells (1×10^5 cells) were subjected to migration assays as described in the *Materials and methods* section, using Transwells pre-coated with 0.15% gelatin and 1 μ M sphingosine-1-phosphate (S1P) as chemoattractant. Values are expressed relative to untreated control cells ($n=3$ for U-87 and $n=4$ for HUVEC).

Fig.4. TFPI specifically inhibits endothelial cell adhesion. Confluent HUVECs and U-87 cells were serum-starved overnight in media containing 1% FBS, then pre-treated with 20 nM TFPI for 0 to 60 min at 37°C. Cells (5×10^4 cells) were subjected to adhesion assays as described in the *Materials and methods* section. Values are expressed as *X*-fold compared to cell adhesion on plastic. Results are means \pm S.D. of three distinct experiments ($p = 0.005$ and $p = 0.003$ for 30 and 60 min respectively).

Fig.5. TFPI inhibits the MAP kinase ERK-1/2 pathway in endothelial cells.

Confluent HUVECs (*A*) or U-87 (*B*) were seeded on gelatin-coated 100 mm dishes, serum-starved overnight in media containing 1% FBS and treated with 1 μ M S1P. Equal amounts of protein from cell lysates were subjected to electrophoresis and Western blotting. Levels of phospho-ERK, phospho-p38 and phospho-p70 were detected using specific polyclonal antibodies. Total levels of protein in whole lysates were also detected as a control.

Fig.6. TFPI inhibits FAK and PAX phosphorylation in vascular endothelial cells. Confluent HUVECs (*A*) or U-87 cells (*B*) were seeded on gelatin-coated 100 mm dishes and serum-starved overnight in media containing 1% FBS. Cells were treated for 30 min with different concentrations of TFPI at 37°C, and stimulated with 1 μ M S1P for 5 min. Equal amount of protein from cell lysates were immunoprecipitated with a polyclonal antibody raised against Focal Adhesion Kinase (FAK) and the phosphorylation level of FAK was detected with anti-phosphotyrosine (pY99) antibody and monitored by Western blotting. The level of total FAK and pY99 was detected in lysates as a control. HUVECs (*C*) or U-87 (*D*) lysates were immunoprecipitated with polyclonal antibodies raised against phosphotyrosine (pY99) or PAX and the associated paxillin or pY99 was detected with a specific polyclonal antibody for the PAX protein or pY99, respectively. HUVEC were treated with PD98059 (*E*) or TFPI (*F*) and equal amount of proteins from cell lysates were immunoprecipitated with a polyclonal antibody raised against Focal Adhesion Kinase (FAK); the phosphorylation level of FAK was detected with anti-phosphotyrosine (pY99) antibody and monitored by Western blotting. Also, equal amounts of proteins from cell lysates were subjected to electrophoresis and Western blotting. Levels of phospho-ERK

were detected using specific polyclonal antibodies. Total levels of protein in whole lysates were also detected as a control. These results are representative of three distinct experiments.

Fig.7. TFPI treatment prevents morphological changes induced by S1P. HUVECs (3×10^4 cells/well) (**A**) or U-87 cells (**B**) were seeded onto gelatin-coated coverslips in a 24-well plate. Cells were serum-starved overnight in media containing 1% FBS. HUVECs were treated for 2 h with 20 nM TFPI at 37°C and stimulated with 1 μ M S1P for 5 min. Cells were fixed and double stained with Texas Red-conjugated phalloidin for actin and with specific antibodies against FAK and PAX, followed by incubation with Alexa488-secondary antibody. Representative cell images were collected by confocal microscopy as described in the *Materials and methods* section. White arrows indicate staining of focal adhesion kinase or paxillin present in membrane protrusion

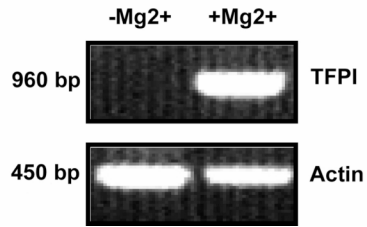
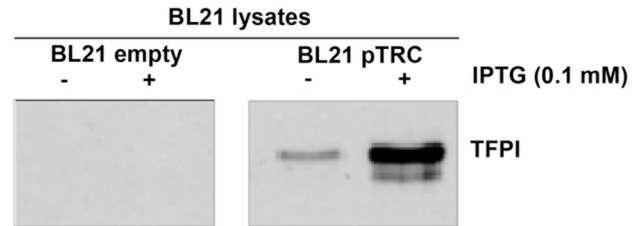
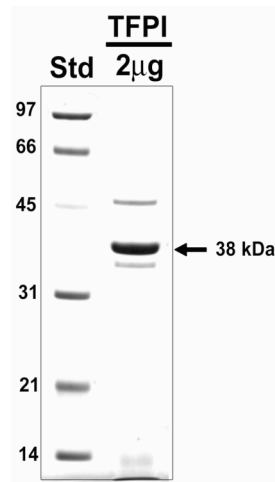
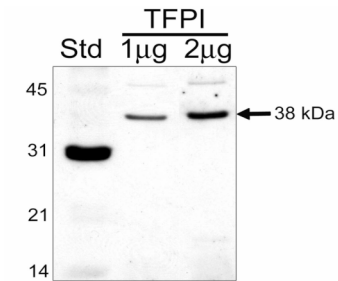
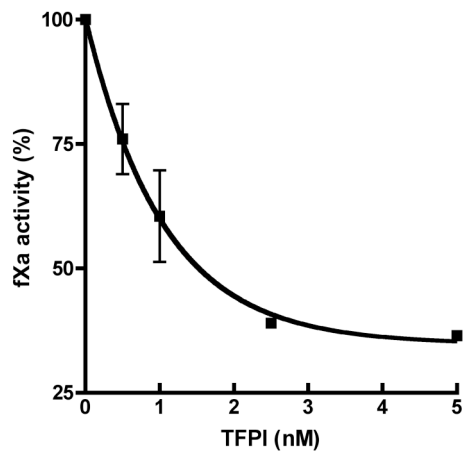
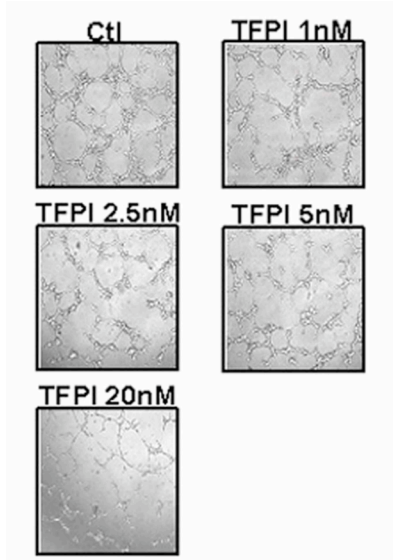
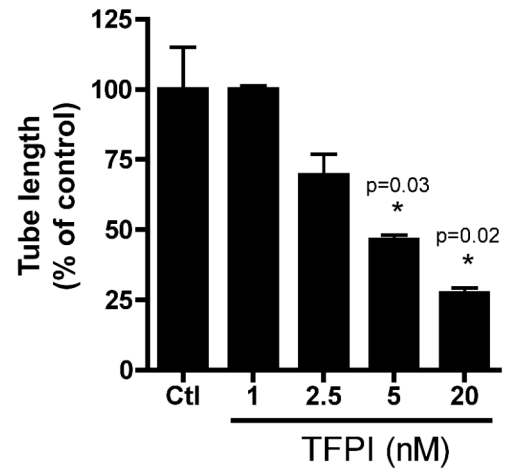
Fig. 1 Provençal *et al.***A****B****C****D****E**

Fig. 2 Provençal *et al.*

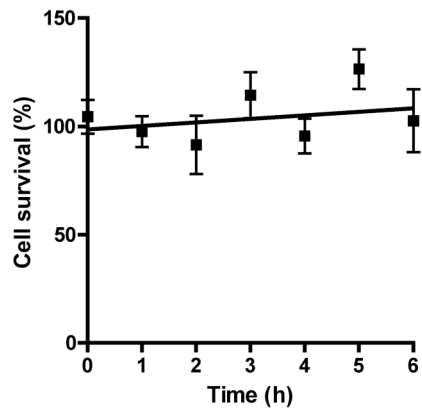
A



B



C



D

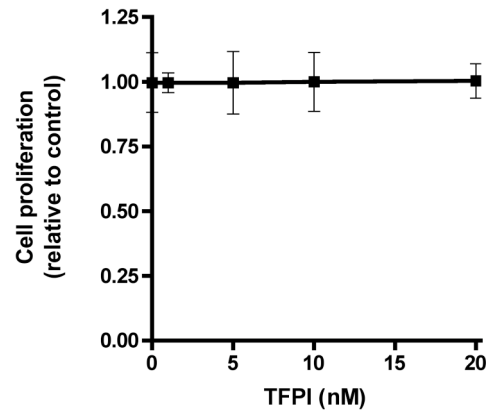


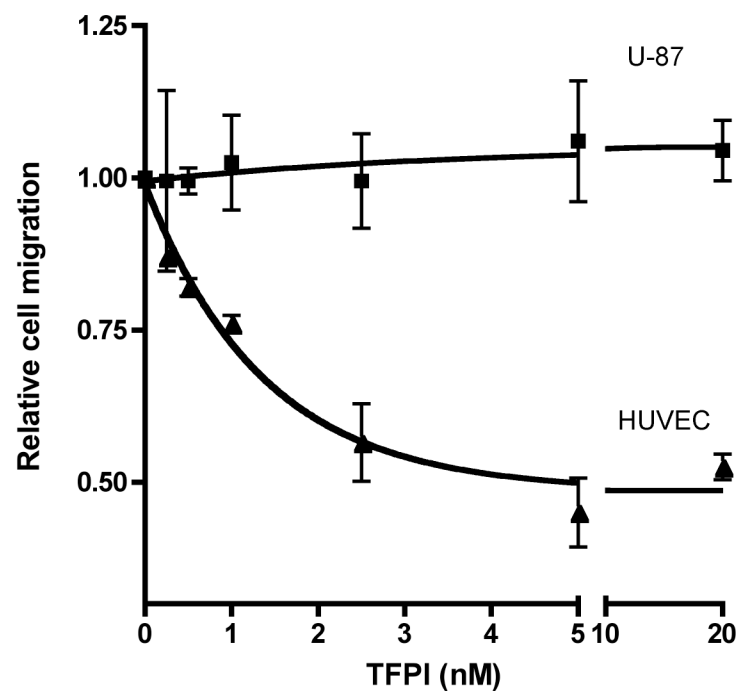
Fig. 3 Provençal *et al.*

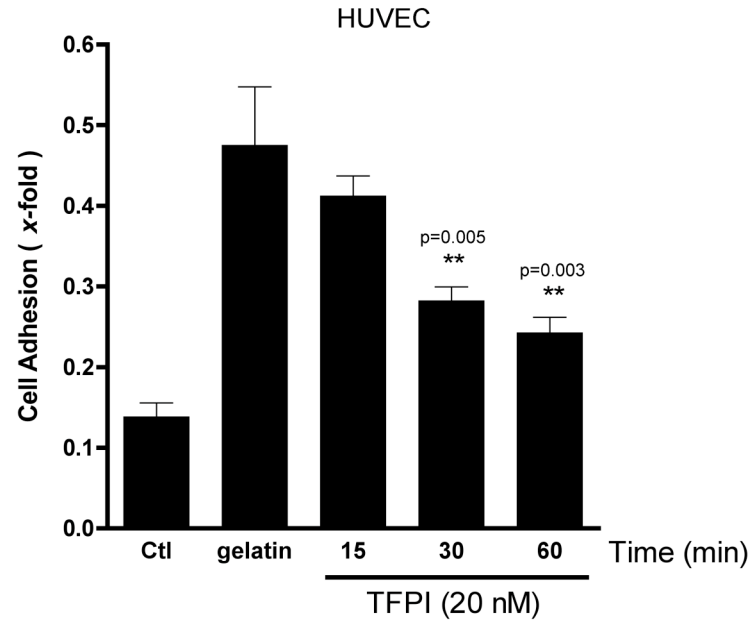
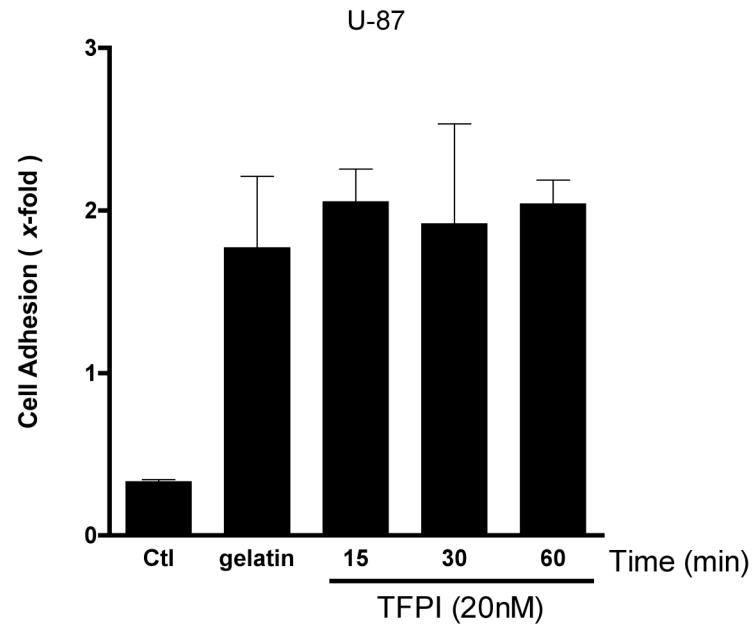
Fig. 4 Provençal *et al.***A****B**

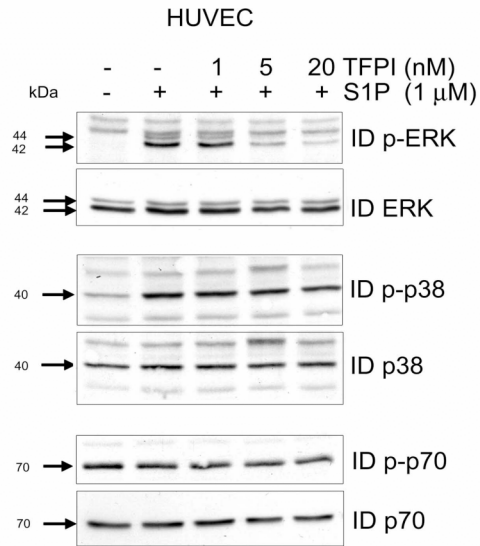
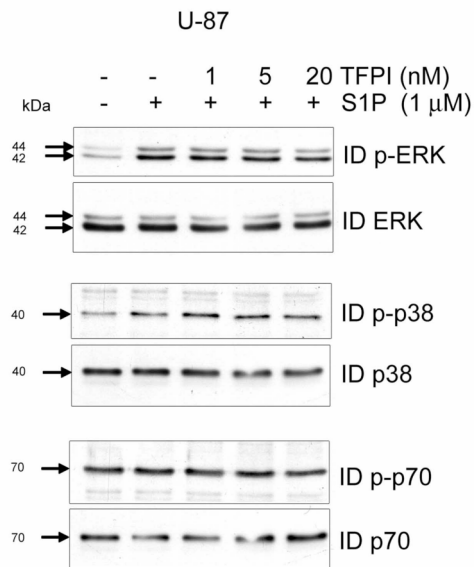
Fig. 5 Provençal *et al.***A****B**

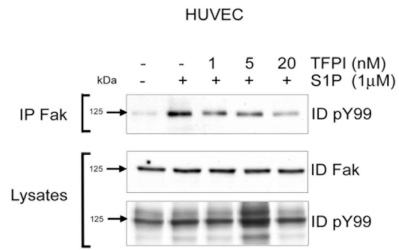
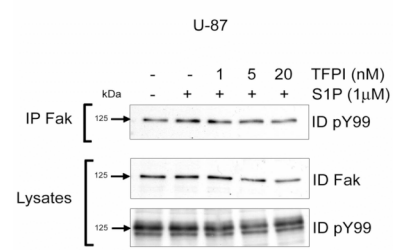
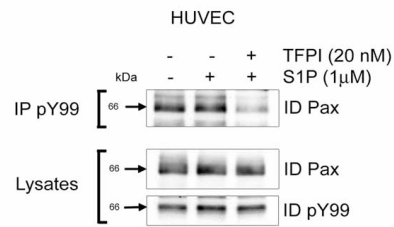
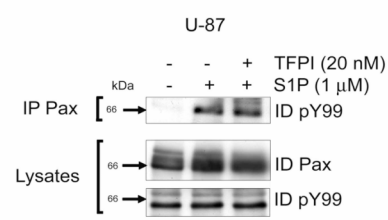
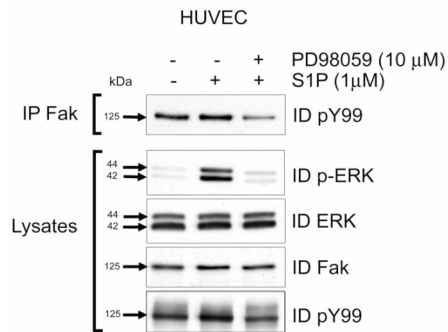
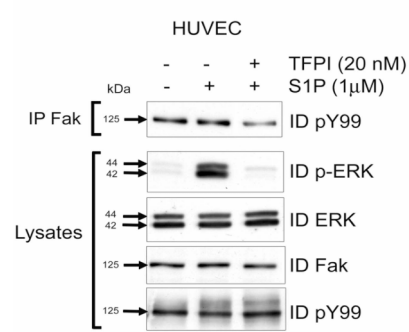
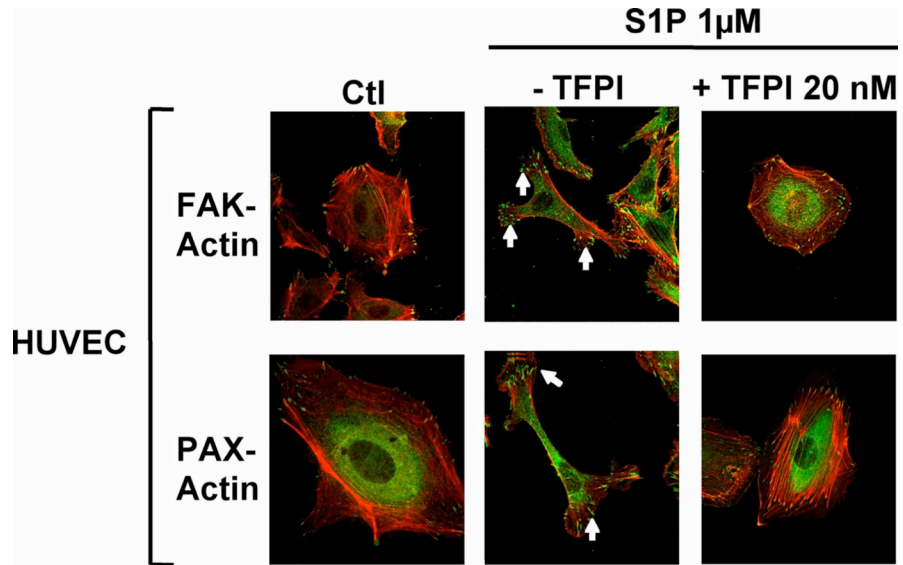
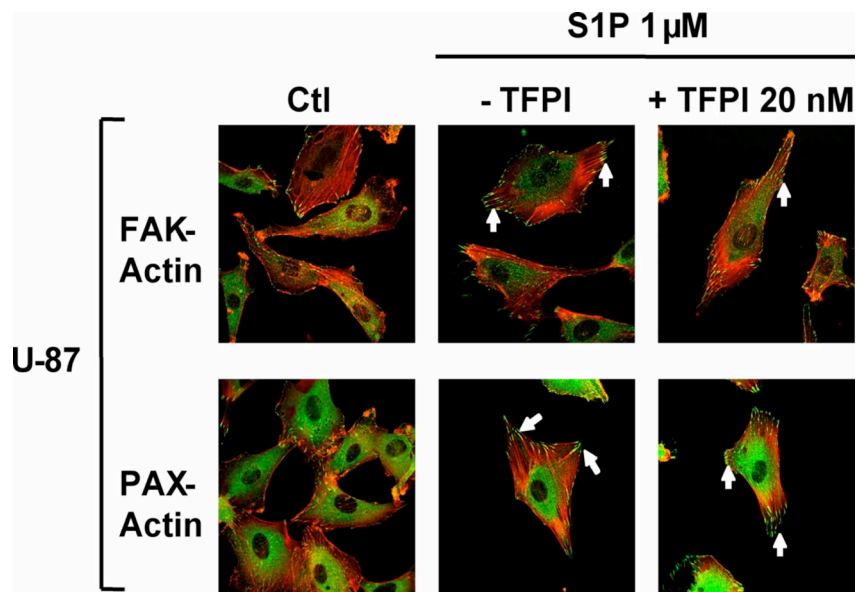
Fig. 6 Provençal *et al.***A****B****C****D****E****F**

Fig. 7 Provençal *et al.*,

A



B



2.2 C-MET ACTIVATION IN MEDULLOBLASTOMA INDUCES TISSUE FACTOR EXPRESSION AND ACTIVITY: EFFECTS ON COAGULATION AND CELL MIGRATION

Mathieu Provençal¹, David Labbé¹, Ryan Veitch¹, Dominique Boivin¹, Georges-Étienne Rivard², Hervé Sartelet³, Yves Robitaille³, Denis Gingras¹ and Richard Béliveau^{1,2} ¶

¹ *Laboratoire de médecine moléculaire, Université du Québec à Montréal, C.P. 8888, Succ. Centre-ville, Montréal, Québec H3C 3P8,* ² *Service d'Hématologie-Oncologie and* ³ *Département de Pathologie, Hôpital Ste-Justine, 3175, Chemin Côte-Sainte-Catherine, Montréal, Québec (Canada) H3T 1C5*

¶ To whom correspondence should be addressed : Laboratoire de médecine moléculaire, Université du Québec à Montréal, C.P. 8888, Succ. Centre-ville, Montréal, Québec H3C 3P8

Phone: (514) 987-3000 x8551

FAX: (514) 987-0246

E-mail: oncomol@nobel.si.uqam.ca

Key words: Medulloblastoma, MET, Tissue factor, Hepatocyte growth factor

Running title: TF expression in medulloblastoma

Abbreviations used: MB; medulloblastoma, RTK; receptor tyrosine kinase, HGF; hepatocyte growth factor, TF; tissue factor

* This work was supported by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC).

Summary

Met, the receptor for hepatocyte growth factor (HGF), is a receptor tyrosine kinase that has recently emerged as an important contributor to human neoplasia. In physiological and pathological conditions, Met triggers various cellular functions related to cell proliferation, cell migration and the inhibition of apoptosis, and also regulates a genetic program leading to coagulation. Since medulloblastomas (MB) express high levels of tissue factor (TF), the main initiator of blood coagulation, we therefore examined the link between Met and TF expression in these pediatric tumors. We observed that stimulation of the medulloblastoma cell line DAOY with HGF led to a marked increase of TF expression and procoagulant activity, in agreement with analysis of clinical MB tumor specimens, in which tumors expressing high levels of Met also showed high levels of TF. The HGF-dependent increase in TF expression and activity required Src family kinases and led to the translocation of TF to actin-rich structures at the cell periphery, suggesting a role of the protein in cell migration. Accordingly, addition of physiological concentrations of the TF activator FVIIa to HGF-stimulated DAOY cells promoted a marked increase in the migratory potential of these cells. Overall, these results suggest that HGF-induced activation of the Met receptor results in TF expression by MB cells and that this event likely contribute to tumor proliferation by enabling the formation of a provisional fibrin matrix. In addition, TF-mediated non-haemostatic functions, such as migration towards FVIIa, may also play a central role in MB aggressiveness.

Introduction

Medulloblastoma (MB) is the most common malignant tumor of the central nervous system (CNS) in children. These neuroepithelial tumors are thought to arise from neural stem cell precursors in the germinal cell layer of the cerebellum (1) and account for almost 20% of all intracranial tumors in children, and for 40% of all childhood posterior fossa tumors (2).

Brain tumors are generally associated with worse prognoses than many other common paediatric cancers (3). An average of only 60% of affected children are cured and, furthermore, many survivors suffer from treatment-induced side effects (2). The classic treatment procedure for these tumors includes surgical resection, craniospinal radiations and chemotherapy; however, the main limitation of this strategy is its lack of specificity, because it mainly relies on conventional cytotoxic therapies.

Despite important advances in neuroimaging, diagnosis of MB is still mainly based on histological criteria; often, a major challenge for clinicians is to correlate the World Health Organization MB classification with biological behaviour (4,5). Therefore, the necessity for improved risk stratification and clinical management requires a better understanding of the molecular mechanisms underlying MB growth and development (3,6).

A growing body of evidence indicates that altered regulation of receptor tyrosine kinases (RTKs) is frequent in epithelial human cancer and CNS tumors (7). Many RTKs have been identified as key components involved in MB progression and their expression levels are used as indicators of prognosis (8). For instance, neurotrophin-3 receptor (TRKC) was the first RTK found to be associated with clinical significance in CNS tumors and its

expression, as well as that of FGFR, is a favourable prognostic indicator in MB (9,10). In contrast, ErbB2 (HER2/Neu) (11), PDGFR α (12, 13) and IGFR (14) are linked to an unfavourable prognosis.

Recently, the Scatter Factor/Hepatocyte Growth Factor: Met (SF/HGF:Met) pathway has emerged as an important contributor to human neoplasia (15). Met has also been added to the list of RTKs associated with poor prognosis in human MB (16). Met affects tumorigenicity and malignant progression by inducing cell cycle progression (17), tumor cell migration, invasion and metastasis (18, 19), and tumor angiogenesis (20). Furthermore, Met activation leads to the expression of proteins such as matrix metalloproteinases (MMPs) (21, 22) and vascular endothelial growth factor (VEGF) (23), which are known for their important roles in tumor promotion. It has also been shown that the *MET* oncogene also drives a genetic program linking cancer to haemostasis, principally by promoting PAI-1 and Cox-2 protein expression (24).

Blood coagulation disorders, also referred as coagulopathies, have been known to be associated with cancer for many years; however the molecular basis of this relationship is not clearly understood (25). Nearly 50% of all patients with malignant disease, and up to 90% of those with metastatic lesions, suffer from these coagulopathies (26). Among these disorders, thrombosis is one of the major complications, occurring in 10 to 15% of cancer patients (27). Better known as Trousseau's syndrome, these thrombotic events are often the first clinical manifestations of an occult malignancy (28). This pro-coagulant state of tumors is due to the expression of specific proteins such as Tissue Factor (TF).

TF, a class 2 cytokine receptor, is a 47 kDa transmembrane glycoprotein that consists of three domains: a large extracellular domain, a transmembrane segment, and a

short cytoplasmic tail (29). TF was first identified as the main trigger of the extrinsic pathway of coagulation. The process of clot formation is considered to be a two-stage process and the initiation phase of coagulation begins when disruption of vessel walls exposes TF to circulating FVII. Ensuing interaction between TF and FVII induces a conformational change in the protease domain of FVII, allowing its activation into FVIIa. The newly formed TF:FVIIa activates FIX and FX, leading to the propagation phase of coagulation and the formation of a fibrin deposit (29). Aside from its pro-coagulant action, TF can act through intracellular and extracellular signaling to stimulate cell migration (30), therefore contributing to the cancer metastasis process (31, 32). TF also regulates angiogenesis through signaling by its cytoplasmic domain (33). However, despite all this knowledge about TF and its role in general cancer development little is known about the mechanisms of TF's expression and contribution in MB.

In this work, we report that stimulation of DAOY with HGF leads to a marked increase of TF expression in these cells. This TF expression is mediated by a Src-dependent mechanism and this increased expression contributes to an upregulated TF activity, thus inducing a procoagulant state. These *in vitro* experiments are supported by further results describing correlation between Met and TF expression in clinical tumor specimens. Furthermore, TF is also involved in non-haemostatic functions such as cell migration towards FVIIa, its natural ligand.

Materials and methods

Materials

Cell culture media were obtained from Wisant (St-Bruno, QC, Canada) and sera were purchased from Hyclone Laboratories (Logan, UT). Recombinant human growth factors (HGF, PDGF, IGF) were purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN), while α -FGF was obtained from Upstate Cell Signaling (Lake Placid, NY) and EGF was purchased from BD Biosciences Discovery Labware (Bedford, MA). The ERK-1/2 MAP kinase inhibitor (PD98059), p-38 MAP kinase inhibitor (SB203580), Src family kinase inhibitor (PP2), protein synthesis inhibitor (cycloheximide), transcription inhibitor (Actinomycin D) and the coagulation Factor X from human plasma were all purchased from Calbiochem (La Jolla, CA). c-MET specific inhibitor (SU11274) was obtained from EMD Chemicals (Gibbstown, NJ). All products for electrophoresis and western blots were purchased from Bio-Rad (Hercules, CA). TF antibodies were obtained from American Diagnostica (Stamford, CT), while anti-MET and anti-phospho-MET monoclonal antibody were obtained from Cell Signaling Technology (Beverly, MA). Transfection reagents Polyfect and LipofectamineTM 2000 were purchased from Qiagen and Invitrogen (Burlington, ON, Canada), respectively. TRIZol reagent and the Superscript one-step reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) kit were obtained from Invitrogen. FVIIa was kindly provided by Dr. Georges-Étienne Rivard (Service d'Hématologie-Oncologie, Hôpital Sainte-Justine, Montréal, QC, Canada) and Factor Xa chromogenic substrate Biophen CS-11 (22) was obtained from Aniara Corporation (Neuville-sur-Oise, France).

Cell culture

Medulloblastoma cell lines (DAOY and D283) and glioblastoma cell lines (U-87 and U-138) were purchased from the American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). All cells were cultured at 37°C under a humidified atmosphere containing 5% CO₂. DAOY, U-87 and U-138 cells were maintained in Eagle's modified minimum essential medium (EMEM) and supplemented with 10% (vol/vol) Bovine Calf Serum (BCS), 4 mM glutamine, 100 IU/ml penicillin, and 100 mg/ml streptomycin. D283 cells were cultured in EMEM containing 10% (vol/vol) Fetal Bovine Serum (FBS), 4 mM glutamine, 100 IU/ml penicillin, and 100 mg/ml streptomycin.

Cell stimulation with HGF and membrane isolation

DAOY, D283, U-87 and U-138 cells were grown to near confluence in 100 mm Petri dishes and starved for 48 h in serum-free media. In time-course experiments, cells were stimulated from 1 to 12 h at 37°C with 50 ng/ml HGF. Otherwise, cells were stimulated 6 h with 50 ng/ml HGF, EGF, PDGF, and IGF or 30 ng/ml α FGF. Cells were then washed with 4 ml of lysis buffer [50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM sodium orthovanadate and 1 mM sodium fluoride] (buffer A) and scraped with 2 ml of buffer A. For the isolation of cell membranes, cells were resuspended in 500 μ l of buffer [20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM sodium orthovanadate and 1 mM sodium fluoride] (buffer B) and homogenized twice using a Polytron for 30 sec at 50% amplitude. Cells were then centrifuged at 4000 rpm for 5 min at 4°C and the resulting supernatants were centrifuged again at 55 000 rpm for 60 min at 4°C. Pellets were resuspended in 50 μ l

of buffer B. Protein concentrations were determined by the bicinchoninic acid Method (Pierce).

RNA isolation and reverse transcription-PCR

Total RNA was isolated from DAOY using TRIzol reagent according to the manufacturer's instructions. One μg of total RNA isolated from cells was amplified with SuperscriptTM One-step RT-PCR with Platinum® TAQ, using specific primers annealing to human TF (sense, 5'CCCGTCAATCAAGTCTACACTGTTC-3' and anti-sense, 5'TTGGCTGTCCGAGGTTTGTCTC-3') and human TFPI (sense, 5'CATCAGAGATTTTACTTAGATGA-3' and antisense, 5'CATTGCTATAACAAATTCACA-3').

Western blotting procedures

Identical amounts of protein from each sample were prepared in Laemmli sample buffer [125 mM Tris-HCl, pH 6.8, 20% glycerol, 4% SDS, 10% β -mercaptoethanol and 0.00125% bromophenol blue], boiled for 5 min and resolved by SDS-PAGE. Proteins were transferred onto polyvinylidene difluoride membranes (PVDF) and blocked overnight at 4°C with TBST buffer [20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 147 mM NaCl, 0.1% Tween 20] containing 3% bovine serum albumin (BSA) or 5% milk. Membranes were incubated with the specific primary antibody for 1 h at room temperature. Immunoreactive bands were revealed following a 1 h incubation with horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse, anti-rabbit or anti-goat antibodies, and the signals were visualized using an ECL detection system.

TF activity

Cell membrane samples were assayed for TF activity using a chromogenic assay. Each sample was incubated with FVIIa (10 nM) and Factor Xa chromogenic substrate Biophen CS-11 (800 μ M) in cell buffer [21 mM HEPES, pH 7.4, 137 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.75 mM Na₂HPO₄, 11 mM glucose, 2 mM CaCl₂]. The reaction was started by the addition of FX (1 μ M), and FXa generation was measured by spectrophotometry at 37°C for 1 h at 405 nm, as described earlier (34).

Plasmid transfection method

The plasmid encoding wild-type Src was kindly provided by Dr. Isabelle Royal (Université de Montréal, Montréal, Canada). The plasmid encoding C-terminal Src kinase (CSK) was kindly provided by Dr. H. Hanafusa (Osaka Bioscience Institute, Japan) and the Csk coding sequence was subcloned at the EcoRI site of pcDNA3.1. Transient transfection of the plasmids (4 μ g) in subconfluent DAOY was performed using the Polyfect reagent according to the manufacturer's instructions (Qiagen). Cells were starved overnight 24 h post-transfection and then stimulated with 50 ng/ml HGF for 6 h.

siRNA transfection method

siRNA (hTF167i) targeting human TF mRNA and control siRNA were purchased from Qiagen. siRNA TF target sequences are sense, r(GCG CUU CAG GCA CUA CAA A)dTdT and antisense, r(UUU GUA GUG CCU GAA GCG C)dTdT, as described previously (35). Cell medium of subconfluent DAOY was replaced by serum- and antibiotics-free EMEM media. Meanwhile, TF or control siRNA (50 nM each) were mixed

with 30 μ l of lipofectamineTM 2000 reagent and incubated for 20 min at room temperature. After this incubation the mix was added to the cells for 6 h at 37°C. After this period cell medium was replaced with media containing 10% BCS as described in the previous cell culture section.

Cell migration assays

Prior to the migration assay, cells (DAOY) were stimulated 6 h with 50 ng/ml HGF as described above. Transwell inserts (8 μ m pore size; Costar, Cambridge, MA, USA) were pre-coated with 0.15% gelatin–PBS by adding 600/100 μ l in the lower/upper chambers for 24 h at 4°C. The Transwells were then washed with PBS and assembled in 24-well plates. The upper chamber of each Transwell was filled with 100 μ l of cells (50 000 cells/chamber) and the cells were allowed to adhere for 45 minutes. Migration was initiated by adding FVIIa (15 nM) to the lower chamber. The plate was placed at 37°C in 5% CO₂ – 95% air for 3 h. Cells that had migrated to the lower surface of the filters were fixed with 10% formalin phosphate and stained with 0.1% Crystal Violet–20% methanol (v/v). The migration was quantified using computer-assisted imaging and data are expressed as the average density of migrated cells per four fields (50X magnification).

Immunofluorescence and Confocal Microscopy

Confocal microscopy studies were done as previously described (36). Briefly, DAOY were seeded onto coverslips coated with 0.15% gelatin-PBS in a 24-well plate and were serum-starved 24 h in media containing 0% BCS. The cells were then stimulated for 6 h with 50 ng/ml HGF. After this stimulation, DAOY were fixed in 3.7% formaldehyde for 15 min, permeabilized with 0.2% Triton X-100 for 5 min and stained with a 1/2500 dilution of Texas Red phalloidin (Sigma) for 30 min. Non-specific sites were blocked with 1% BSA

in buffered saline containing 0.1% Tween 20 for 30 min and cells were stained with primary antibodies against TF (1/150) for 30 min at room temperature. Cells were then incubated with Alexa488-conjugated secondary antibody (for TF-staining) and slides were mounted with ImmunoFluor Mounting Medium (MP Biomedicals). Immunostaining was visualized and photographed using a Zeiss LSM 510 Meta confocal microscope.

Immunohistochemistry

The study used 18 Human MB specimens obtained surgically from patients at Hôpital Sainte-Justine between 1996 and 2007. These patients were all diagnosed with classic medulloblastoma. The surgical specimens were fixed in 10% formalin and embedded in paraffin. Thin tissue sections were dewaxed on a poly-L-lysine coated slide with xylene and rehydrated with a graded series of ethanol at room temperature. Blocking of endogenous peroxidase activity was carried out by immersing the tissue section in 0.3% methanolic hydrogen peroxide for 15 min at 4°C. Primary monoclonal antibodies for TF and Met were applied at a dilution of 1:100 and incubated overnight at 4°C. After 3 washes with PBS, the peroxidase-labeled mouse secondary antibody was applied. After 3 washes with PBS, the tumor sections were incubated with 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) in 0.1 M sodium acetate pH 5.2 for 30 min at room temperature. After 3 PBS washes, the sections were counterstained with hematoxylin for 10 min and then rinsed extensively with distilled water. Sections incubated with normal serum instead of primary antibodies served as controls. The intensity of TF and Met staining was classified into 5 levels as follows: (-), negative; (+), 0 to 25 % of positive cells; (++) , 25 to 50% of positive cells; (+++) , 50 to 75% of positive cells; (++++), 75 to 100% of positive cells.

Statistical analysis

The data are presented as means \pm SEMs and statistical analyses were performed with Student's *t*-test where one group was compared with the control group.

Results

HGF stimulates TF expression and activity in medulloblastoma

Previous reports have suggested that the *MET* oncogene may control a genetic program linking cancer to haemostasis (24). In order to determine if Met activation by HGF could stimulate TF expression, a time-course experiment was performed on DAOY cells. As shown in Fig. 1A, RT-PCR studies demonstrated that the stimulation of MB cells by 50 ng/ml HGF from 0 to 12 h caused an increase in mRNA levels for both TF and TFPI, the natural inhibitor of TF. However, at the protein level, only TF showed a significant increase, while TFPI protein expression remained steady throughout the time-course (Fig. 1B). To further explore whether TF expression correlated with increased procoagulant activity, cells were stimulated with HGF for 6 h and the extent of TF activity was measured by the FVIIa-dependent generation of Factor Xa activity. As shown in Fig. 1C, HGF induced a marked increase in the cells' procoagulant activity, this increase being mediated by TF as reflected by the marked inhibitory effect of a siRNA specific for this protein (Fig. 1D). Overall, these data suggest that, following stimulation with HGF, DAOY expresses TF and thus exhibits a procoagulant state.

Over the years, many reports have pointed out that receptor tyrosine kinase (RTK) deregulation plays a pivotal role in cancer (7). For this reason, we stimulated DAOY with different growth factors known to influence the development of MB, and we monitored their effect on TF expression. As shown in Figure 2A, HGF was the only growth factor that induced an increase in TF expression, whereas all other growth factors tested were ineffective. Moreover, because other CNS tumors (i.e. glioblastoma) have been shown to

express TF (37), we further tested the impact of HGF stimulation on two medulloblastoma (DAOY, D283) and two glioblastoma (U-87, U-138) cell lines (Fig. 2B). Surprisingly, western blot analysis revealed that only DAOY express TF when stimulated with HGF. To confirm this result, we then verified that every cell line used in this experiment expressed Met and also that the receptor was activated upon HGF stimulation (Fig. 2C). These data suggest that TF expression induced by HGF/Met signaling pathway may represent a specific event occurring during the development of certain types of MB.

TF expression requires Met and Src family kinase activation

In order to preliminary determine the intracellular pathways involved in the transcription and expression of TF in MB cells, serum-starved DAOY were pretreated 1 h with MAP kinase inhibitors (PD98059, SB203580), transcription and protein synthesis inhibitors (actinomycin D, cycloheximide), a Met specific inhibitor (SU11274) and a Src family kinase inhibitor (PP2) prior to HGF stimulation. As shown in Figure 3A and B, TF expression and activity was clearly inhibited by actinomycin D and cycloheximide, thus indicating that *de novo* protein synthesis is required following HGF stimulation. Furthermore, SU11274 and PP2 also inhibited TF expression and activity (Fig. 3A-B), implying that TF protein expression requires proper activation of Met, which in turn signals through a Src family kinase-dependent pathway. To confirm the involvement of this pathway in TF expression, DAOY were transfected with Src or CSK, the endogenous inhibitor of Src, and cells were then stimulated with HGF, following which TF expression and activity were assessed as described above. As shown in Fig. 3C, DAOY overexpressing Src highly expressed TF when stimulated with HGF. By contrast, DAOY overexpressing

CSK were less sensitive to HGF, and TF expression was repressed in these cells. Moreover, TF activity is also dependent on Src expression and activity, since cells transfected with Src showed a two-fold increase in TF activity while cells transfected with CSK showed no increased procoagulant activity (Fig. 3D). Overall, these data strongly suggest that Src family kinases play an important role in the HGF-dependent increase in TF expression in DAOY.

HGF stimulates colocalization of TF and cortical actin in DAOY

We next sought to determine whether TF was randomly expressed in DAOY or whether it was colocalized with specific migration-related structures. As shown in Fig. 4, serum-starved control cells showed a low level of TF expression and evenly distributed actin; merging the images did not reveal any colocalization (top three panels). By contrast, stimulation of cells with 50 ng/ml HGF for 6 h led to high cortical and peri-nuclear TF expression that colocalized with actin-rich structures at the cell periphery (indicated by white arrows). The Met specific inhibitor (SU11274) and the Src family kinase inhibitor (PP2) both reduced TF and cortical actin expression to the levels found in unstimulated cells. These data imply that in DAOY, TF colocalizes with migration-related structures upon HGF stimulation and therefore suggest that TF may be involved in MB cell locomotion.

TF expression in DAOY enhances cell migration

Increasing evidence indicates that TF may be involved in cell migration through a non-haemostatic pathway (30). Therefore we assessed whether HGF-dependent expression

of TF favoured cell migration toward its natural ligand, FVIIa. As shown in Fig. 5A, cells which had been stimulated with 50 ng/ml HGF for 6 h clearly expressed increased levels of TF and had the ability to migrate towards a physiological concentration of FVIIa (15 nM). Cells transfected with a TF siRNA were unresponsive to HGF stimulation and unable to migrate towards FVIIa compared to cells transfected with the control siRNA, further highlighting the essential role of TF in this process (Fig. 5B). In order to validate the role of Met and Src activation in this process, the Met inhibitor (SU11274) and the Src family kinase inhibitor (PP2) were used (Fig. 5C). As expected, both inhibitors significantly reduced both TF expression levels and the number of migrating cells.

TF and Met expression levels correlate in clinical MB tumor specimens

Immunohistochemical staining with the monoclonal antibody against human TF (CD 142) and the monoclonal antibody against Met was carried out to evaluate the levels of TF and Met expression in clinical tumors. TF antibody was strongly immunoreactive in 8 of the 18 tumor specimens. The TF antibody labelled cancer cells as well as smooth muscle cells underlying tumor blood vessels. We found that 6 of the 8 TF-positive tumors also showed a strong Met immunoreactivity (Fig. 6), strongly suggesting that high TF expression correlated with high levels of Met in human tumors. Further exploration of the clinical database revealed that the 6 tumors exhibiting high TF and Met expression also exhibited the highest vascular proliferation and proliferative index, ranging from 40% to 90%. Furthermore, among the 6 tumors expressing high levels of TF and MET, 1 tumor showed evidence of leptomeningeal invasion. Together these results suggest that tumors

expressing high levels of both TF and Met are likely those with the greatest chances of evolving rapidly and forming distant metastases.

Discussion

Met was recently identified as a marker of poor prognosis in MB (16), as well as an important molecular link between cancer and haemostasis (24). In this study, we show that in DAOY, a well established *in vitro* model of metastatic MB, the HGF/Met pathway plays a major role in increased TF expression, conferring these malignant cells with a pro-coagulant and migratory phenotype. To the best of our knowledge this is the first report establishing a direct link between Met activation and TF expression in cancerous brain cells. Interestingly, this relationship is not restricted to cell lines grown *in vitro* since we observed a strong correlation between Met and TF expression levels in human MB tumor specimens.

HGF was the only growth factor found to influence TF synthesis in *in vitro* experiments. Upon stimulation, TF production in MB requires *de novo* protein synthesis, instead of being part of a recycling process from an intracellular pool. Further investigation revealed that the Src family kinases, previously shown to be involved in downstream signaling events mediated by MET (39), are needed for expression and activity of TF. While TF is upregulated upon HGF stimulation, the expression level of its natural inhibitor, TFPI, remains steady. Such an imbalance between haemostatic activator and inhibitor thus likely contribute to the establishment of the procoagulant state in HGF-stimulated cells (25).

Surprisingly, DAOY seem to exhibit a unique HGF/Met-dependent mechanism of TF expression when compared to other MB or GB cells, even though all these cell types express similar levels of TF under basal conditions (data not shown) and possess functional

Met receptors. The mechanisms underlying this differential sensitivity to HGF remain unclear but may be related to the heterogeneity of cell populations observed in CNS tumors, reflecting the diverse origins of MB malignant cells (5). Furthermore, other cellular pathways may contribute to TF expression in different tumors. For example, in glioma, other investigators reported that TF expression is regulated by other cellular circuitry, including downregulation of PTEN, activation of early growth response gene-1 (Egr-1) and paracrine stimulation by vascular endothelial growth factor (VEGF) secreted by tumor endothelial cells (40-42).

In our study, TF-expressing cells demonstrated a significant increase in their migratory potential towards a physiologic concentration of FVIIa, thus implying a role for TF in the invasion and metastasis processes, hallmarks of cancer aggressiveness. Moreover, to fulfill its chemotactic function, we observed that TF is not just randomly expressed in the cell but rather associates at the cell surface with actin-rich membrane ruffles. Others investigators have reported that the formation of these cortical actin structures was mediated by a Src family kinase (43), and also that Src activation by Met mediates metastatic properties of colorectal carcinoma cells (44). These findings corroborate our results because both PP2, a SFK inhibitor, and SU11274, a Met-specific inhibitor, inhibited TF expression and the formation of actin-rich ruffles at the cell periphery.

Overall, the acquisition of a procoagulant phenotype by MB may provide to the tumor a fibrin-rich environment, which is commonly observed in primary and metastatic human brain tumors (45). Fibrin deposits protect cancer cells from the immune system and also form a matrix to support cell migration (46). For a number of reasons, the coagulation system as a whole has been recently gaining momentum as a promising target for the

treatment of various cancers (47). The specific role of TF in CNS tumors makes it an attractive target for new therapies. Accordingly, FVIIa was recently conjugated to EF24, a synthetic curcumin analog, and used as a drug delivery molecule based on its high affinity for TF-expressing cells (48). This approach is exciting since TF is aberrantly expressed only on tumor vascular endothelial cells and on cancer malignant cells, therefore reducing the side effects commonly associated with current treatments. Further characterization of the mechanisms linking TF and Met may thus provide interesting new informations on the potential usefulness of targeting key elements of the hemostatic system for the treatment of medulloblastomas.

Acknowledgements

Scholarship funding to Mathieu Provençal was provided by the MCETC/FRSQ/CIHR Strategic Training program in Cancer Experimental Therapeutics. We thank Claude Potvin for her help with immunohistochemistry.

References

1. Wechsler-Reya R, Scott MP. The developmental biology of brain tumors. *Annu Rev Neurosci* 2001;24:385-428.
2. Rossi A, Caracciolo V, Russo G, Reiss K, Giordano A. Medulloblastoma: from molecular pathology to therapy. *Clin Cancer Res* 2008;14:971-6.
3. Gilbertson RJ. Medulloblastoma: signalling a change in treatment. *Lancet Oncol* 2004;5:209-18.
4. Ellison D. Classifying the medulloblastoma: insights from morphology and molecular genetics. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2002;28:257-82.
5. Gilbertson RJ, Ellison DW. The origins of medulloblastoma subtypes. *Annu Rev Pathol* 2008;3:341-65.
6. Polkinghorn WR, Tarbell NJ. Medulloblastoma: tumorigenesis, current clinical paradigm, and efforts to improve risk stratification. *Nat Clin Pract Oncol* 2007;4:295-304.
7. Zwick E, Bange J, Ullrich A. Receptor tyrosine kinases as targets for anticancer drugs. *Trends Mol Med* 2002;8:17-23.
8. Goumnerova LC. Growth factor receptors and medulloblastoma. *J Neurooncol* 1996;29:85-9.
9. Grotzer MA, Janss AJ, Phillips PC, Trojanowski JQ. Neurotrophin receptor TrkC predicts good clinical outcome in medulloblastoma and other primitive neuroectodermal brain tumors. *Klin Padiatr* 2000;212:196-9.
10. Duplan SM, Theoret Y, Kenigsberg RL. Antitumor activity of fibroblast growth factors (FGFs) for medulloblastoma may correlate with FGF receptor expression and tumor variant. *Clin Cancer Res* 2002;8:246-57.
11. Gilbertson RJ, Clifford SC, MacMeekin W, et al. Expression of the ErbB-neuregulin signaling network during human cerebellar development: implications for the biology of medulloblastoma. *Cancer Res* 1998;58:3932-41.

12. MacDonald TJ, Brown KM, LaFleur B, et al. Expression profiling of medulloblastoma: PDGFRA and the RAS/MAPK pathway as therapeutic targets for metastatic disease. *Nat Genet* 2001;29:143-52.
13. Gilbertson RJ, Clifford SC. PDGFRB is overexpressed in metastatic medulloblastoma. *Nat Genet* 2003;35:197-8.
14. Hartmann W, Koch A, Brune H, et al. Insulin-like growth factor II is involved in the proliferation control of medulloblastoma and its cerebellar precursor cells. *Am J Pathol* 2005;166:1153-62.
15. Birchmeier C, Birchmeier W, Gherardi E, Vande Woude GF. Met, metastasis, motility and more. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003;4:915-25.
16. Li Y, Lal B, Kwon S, et al. The scatter factor/hepatocyte growth factor: c-met pathway in human embryonal central nervous system tumor malignancy. *Cancer Res* 2005;65:9355-62.
17. Li Y, Guessous F, Johnson EB, et al. Functional and molecular interactions between the HGF/c-Met pathway and c-Myc in large-cell medulloblastoma. *Lab Invest* 2008;88:98-111.
18. Benvenuti S, Comoglio PM. The MET receptor tyrosine kinase in invasion and metastasis. *J Cell Physiol* 2007;213:316-25.
19. Wang X, Le P, Liang C, et al. Potent and selective inhibitors of the Met [hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) receptor] tyrosine kinase block HGF/SF-induced tumor cell growth and invasion. *Mol Cancer Ther* 2003;2:1085-92.
20. Abounader R, Laterra J. Scatter factor/hepatocyte growth factor in brain tumor growth and angiogenesis. *Neuro Oncol* 2005;7:436-51.
21. Hamasuna R, Kataoka H, Moriyama T, Itoh H, Seiki M, Kono M. Regulation of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) by hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) in human glioma cells: HGF/SF enhances MMP-2 expression and activation accompanying up-regulation of membrane type-1 MMP. *Int J Cancer* 1999;82:274-81.
22. Wang H, Keiser JA. Hepatocyte growth factor enhances MMP activity in human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;272:900-5.

23. Moriyama T, Kataoka H, Hamasuna R, et al. Up-regulation of vascular endothelial growth factor induced by hepatocyte growth factor/scatter factor stimulation in human glioma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;249:73-7.
24. Boccaccio C, Sabatino G, Medico E, et al. The MET oncogene drives a genetic programme linking cancer to haemostasis. *Nature* 2005;434:396-400.
25. Boccaccio C, Comoglio PM. A functional role for hemostasis in early cancer development. *Cancer Res* 2005;65:8579-82.
26. Wojtukiewicz MZ, Sierko E, Klement P, Rak J. The hemostatic system and angiogenesis in malignancy. *Neoplasia* 2001;3:371-84.
27. Nijziel MR, van Oerle R, Hillen HF, Hamulyak K. From Trousseau to angiogenesis: the link between the haemostatic system and cancer. *Neth J Med* 2006;64:403-10.
28. Varki A. Trousseau's syndrome: multiple definitions and multiple mechanisms. *Blood* 2007;110:1723-9.
29. Price GC, Thompson SA, Kam PC. Tissue factor and tissue factor pathway inhibitor. *Anaesthesia* 2004;59:483-92.
30. Ott I, Weigand B, Michl R, et al. Tissue factor cytoplasmic domain stimulates migration by activation of the GTPase Rac1 and the mitogen-activated protein kinase p38. *Circulation* 2005;111:349-55.
31. Bromberg ME, Sundaram R, Homer RJ, Garen A, Konigsberg WH. Role of tissue factor in metastasis: functions of the cytoplasmic and extracellular domains of the molecule. *Thromb Haemost* 1999;82:88-92.
32. Versteeg HH. Tissue factor as an evolutionary conserved cytokine receptor: Implications for inflammation and signal transduction. *Semin Hematol* 2004;41:168-72.
33. Belting M, Dorrell MI, Sandgren S, et al. Regulation of angiogenesis by tissue factor cytoplasmic domain signaling. *Nat Med* 2004;10:502-9.
34. Dietzen DJ, Page KL, Tetzloff TA. Lipid rafts are necessary for tonic inhibition of cellular tissue factor procoagulant activity. *Blood* 2004;103:3038-44.

35. Holen T, Amarzguioui M, Wiiger MT, Babaie E, Prydz H. Positional effects of short interfering RNAs targeting the human coagulation trigger Tissue Factor. *Nucleic Acids Res* 2002;30:1757-66.
36. Provencal M, Michaud M, Beaulieu E, et al. Tissue factor pathway inhibitor (TFPI) interferes with endothelial cell migration by inhibition of both the Erk pathway and focal adhesion proteins. *Thromb Haemost* 2008;99:576-85.
37. Guan M, Su B, Lu Y. Quantitative reverse transcription-PCR measurement of tissue factor mRNA in glioma. *Mol Biotechnol* 2002;20:123-9.
38. Bolanos-Garcia VM. MET meet adaptors: functional and structural implications in downstream signalling mediated by the Met receptor. *Mol Cell Biochem* 2005;276:149-57.
39. Rong Y, Post DE, Pieper RO, Durden DL, Van Meir EG, Brat DJ. PTEN and hypoxia regulate tissue factor expression and plasma coagulation by glioblastoma. *Cancer Res* 2005;65:1406-13.
40. Rong Y, Hu F, Huang R, et al. Early growth response gene-1 regulates hypoxia-induced expression of tissue factor in glioblastoma multiforme through hypoxia-inducible factor-1-independent mechanisms. *Cancer Res* 2006;66:7067-74.
41. 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* 2000;82:1967-73.
42. Singh VP, McNiven MA. Src-mediated Cortactin Phosphorylation Regulates Actin Localization and Injurious Blebbing in Acinar Cells. *Mol Biol Cell* 2008;19:2339-47.
43. Herynk MH, Zhang J, Parikh NU, Gallick GE. Activation of Src by c-Met overexpression mediates metastatic properties of colorectal carcinoma cells. *J Exp Ther Oncol* 2007;6:205-17.
44. Bardos H, Molnar P, Csecsei G, Adany R. Fibrin deposition in primary and metastatic human brain tumours. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1996;7:536-48.
45. Boccaccio C, Medico E. Cancer and blood coagulation. *Cell Mol Life Sci* 2006;63:1024-7.

46. Ornstein DL, Meehan KR, Zacharski LR. The coagulation system as a target for the treatment of human gliomas. *Semin Thromb Hemost* 2002;28:19-28.
47. Shoji M, Sun A, Kisiel W, et al. Targeting tissue factor-expressing tumor angiogenesis and tumors with EF24 conjugated to factor VIIa. *J Drug Target* 2008;16:185-97.

Figure legends

Figure 1: HGF induces TF expression and activity in DAOY. Confluent DAOY in 100-mm dishes were serum-starved for 48 h and then stimulated with 50 ng/ml HGF for 1 to 12 h. **(A)** Total RNA was isolated as described in *Materials and methods* and amplified by RT-PCR. Actin was used as control. **(B)** Equal amounts of protein from cell lysates were subjected to electrophoresis and TF and TFPI protein levels were visualized by western blot. **(C)** DAOY were stimulated with HGF for 6 h and procoagulant activity was measured using a chromogenic assay, as described in *Materials and methods*. **(D)** DAOY were transfected with either a control or with a TF-specific siRNA prior to stimulation with HGF and the extent of procoagulant activity was measured as described in C.

Figure 2: Met is responsible for TF expression in DAOY medulloblastoma cells. **(A)** Confluent DAOY in 100-mm dishes were serum-starved for 48 h, stimulated with growth factors (EGF, PDGF, HGF, IGF and \square -FGF) and TF expression was visualized by western blot. **(B)** Two medulloblastoma cell lines (DAOY and D283) and two glioblastoma cell lines (U-87 and U-138) were grown to confluency and serum-starved for 48 h. Cells were stimulated with 50 ng/ml HGF for 6 h and TF expression was visualized by western blot. **(C)** Confluent DAOY, D283, U-87 and U-138 cells were serum-starved for 48 h. Cells were then stimulated with 50 ng/ml HGF for 5 min. Equal amounts of protein from cell lysates were subjected to electrophoresis and western blotting. Levels of TF, phospho-MET, MET, phospho-ERK and ERK were detected using specific antibodies.

Figure 3: TF expression and activity in DAOY is regulated by Met activation and SRC family kinase. (A) Confluent and serum-starved DAOY were treated 1 h with different inhibitors at 37°C prior to HGF stimulation for 6 h. Equal amounts of protein from cell lysates were subjected to electrophoresis and TF protein expression was visualized by western blot. (B) TF activity was quantified as described in *Materials and methods*. (C) DAOY were transiently transfected with SRC and CSK. After a 24 h starvation, cells were stimulated with 50 ng/ml HGF for 6 h and TF expression was visualized by western blot. (D) TF activity was measured as described in *Materials and methods*.

Figure 4: HGF-stimulated DAOY exhibit a cortical expression of TF colocalizing with reorganized actin-rich structures. DAOY (3×10^4 cells/well) were seeded onto gelatin-coated coverslips in a 24-well plate. Cells were serum-starved for 48 h and pretreated (or not) for 1 h with SU11274 (5 μ M) or PP2 (10 μ M) and stimulated (or not) with HGF for 6 h. Cells were fixed and double stained with Texas Red-conjugated phalloidin for actin and with a specific antibody against TF, followed by incubation with Alexa488-secondary antibody. Representative cell images were obtained by confocal microscopy, as described in *Materials and methods*. Arrows indicate staining of TF and cortical actin (membrane ruffles) at the cell periphery of HGF stimulated cells.

Figure 5: TF expression in DAOY enhances cell migration towards Factor VIIa. (A) Control or HGF-stimulated DAOY were allowed to attach to filters and migrate for 3 h in serum-free media containing 15 nM FVIIa. (B) In order to silence TF expression, DAOY were transfected with a control or a siRNA specific to TF prior to stimulation with HGF

and cells were subjected to a migration assay for 3 h in serum-free media containing 15 nM FVIIa. **(C)** 1 h prior to HGF stimulation, DAOY were pretreated with SU11274 (5 μ M) and PP2 (10 μ M). Cells were then allowed to attach to filters and migrate in the presence of 15 nM FVIIa. In all cases, cell migration was quantified using a computer-based program as described in *Materials and methods*. Data are expressed as x -fold induction \pm SD of non-stimulated controls.

Figure 6: Immunohistochemistry of tissue factor (TF) and Met proteins in human medulloblastoma surgical specimens. (A, B) Controls prepared as described in *Materials and methods*. **(C, D)** Tumors expressing low levels of TF (+) and Met (-), respectively. **(E, F)** Tumors expressing high levels of both TF (++++) and Met (+++), respectively. The examples shown were obtained from the same tumors. (X400).

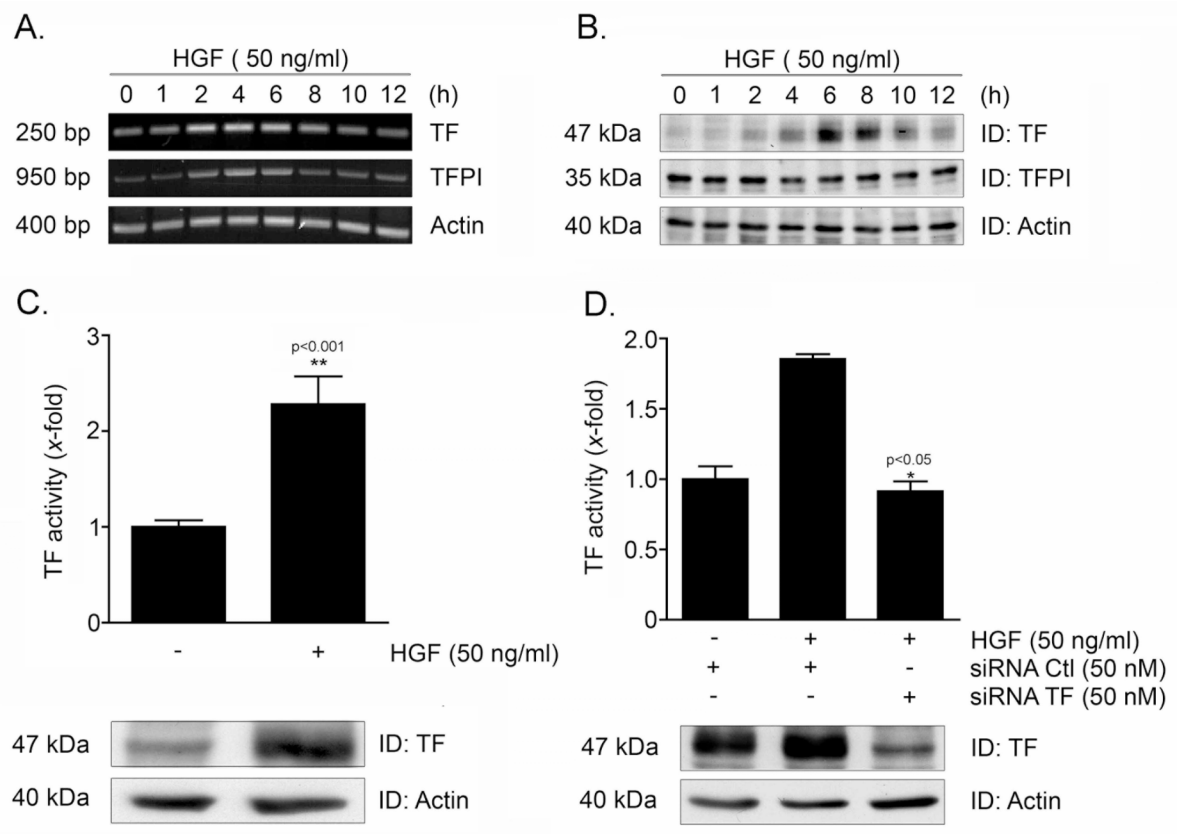
Fig. 1 Provençal *et al.*

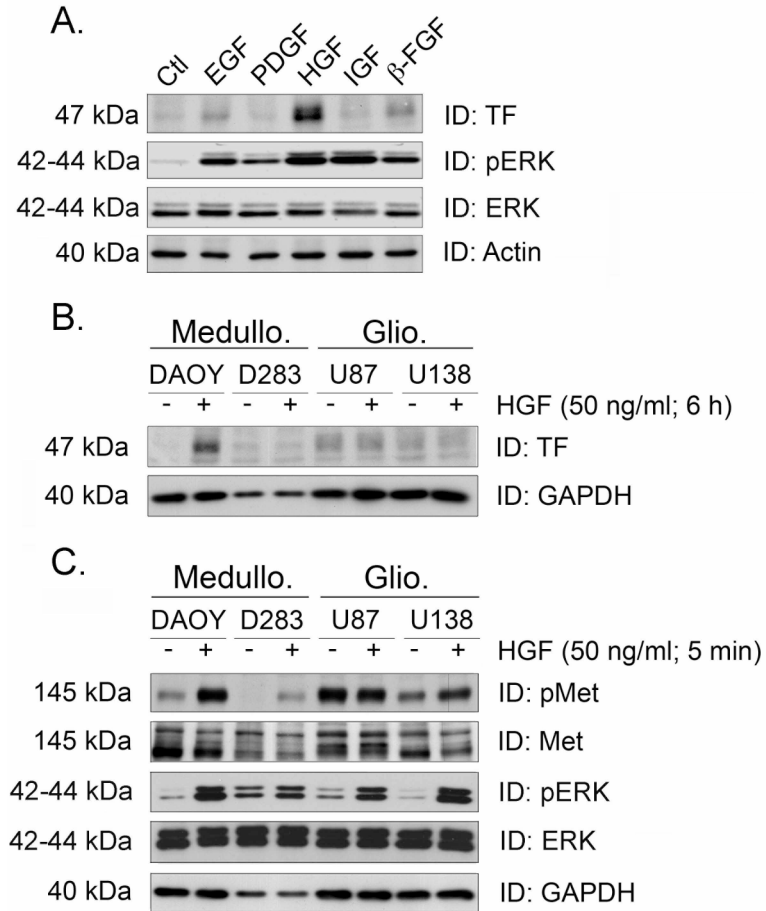
Fig. 2 Provençal *et al.*

Fig. 3 Provençal *et al.*

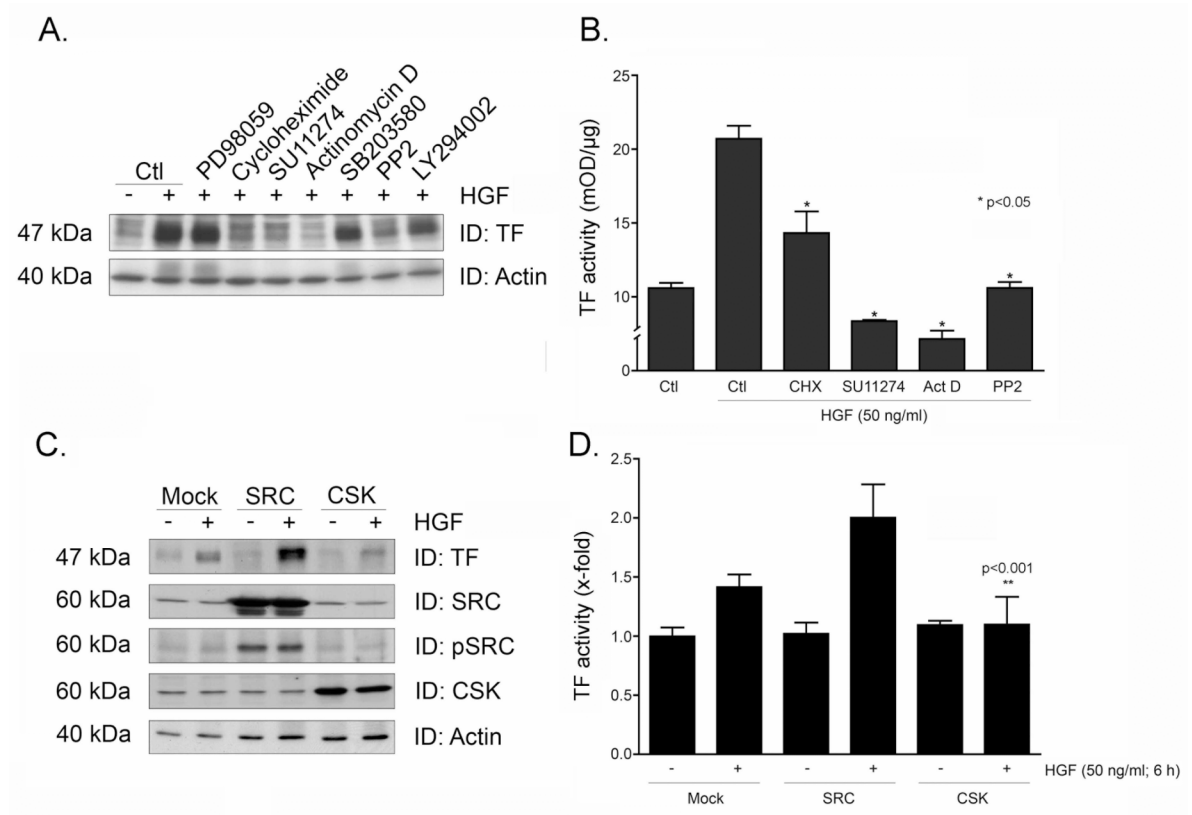


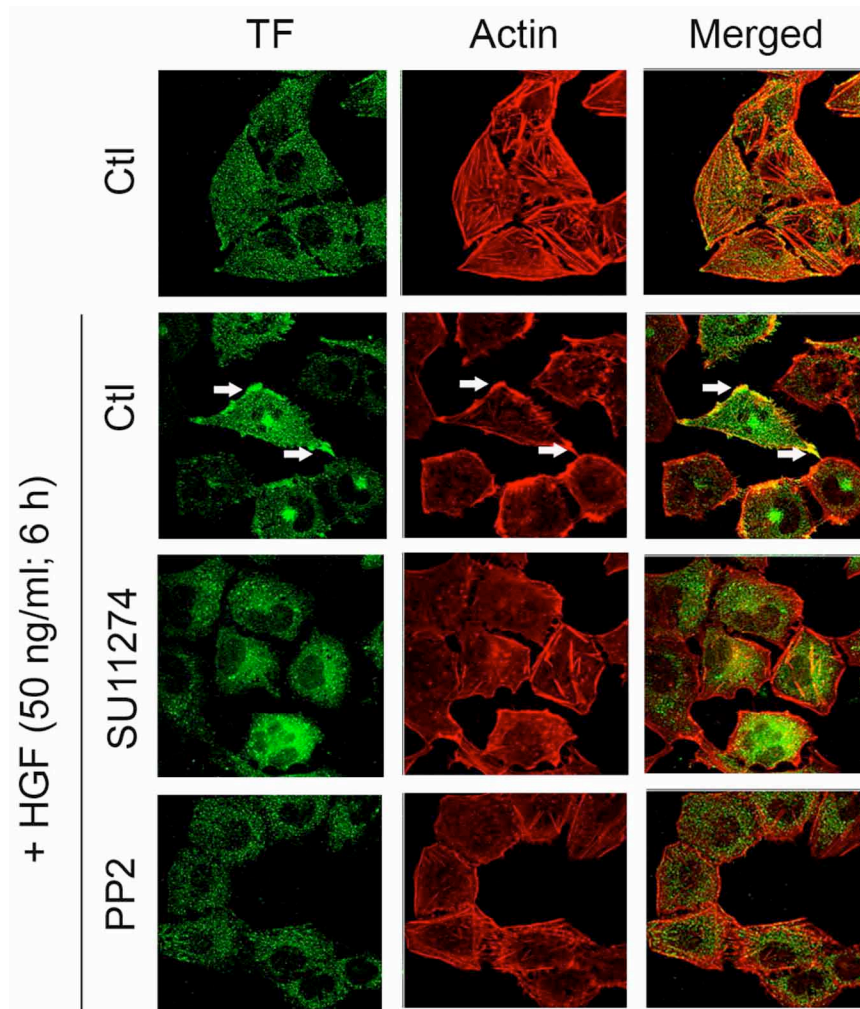
Fig. 4 Provençal *et al.*

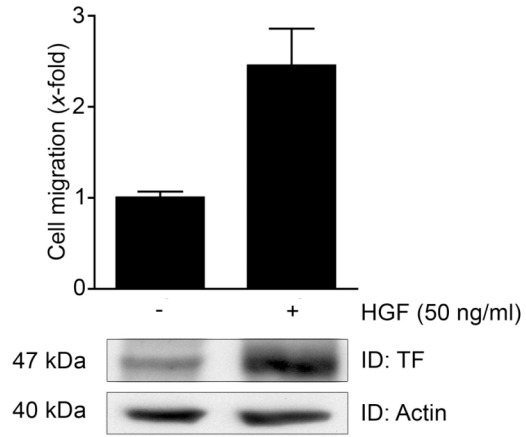
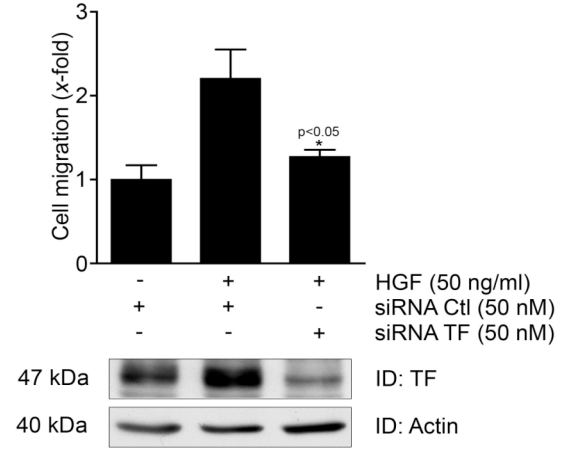
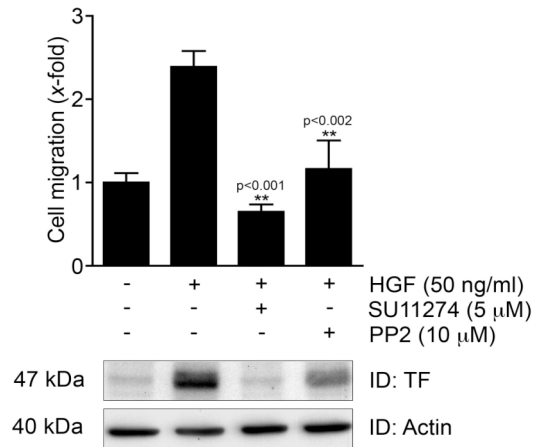
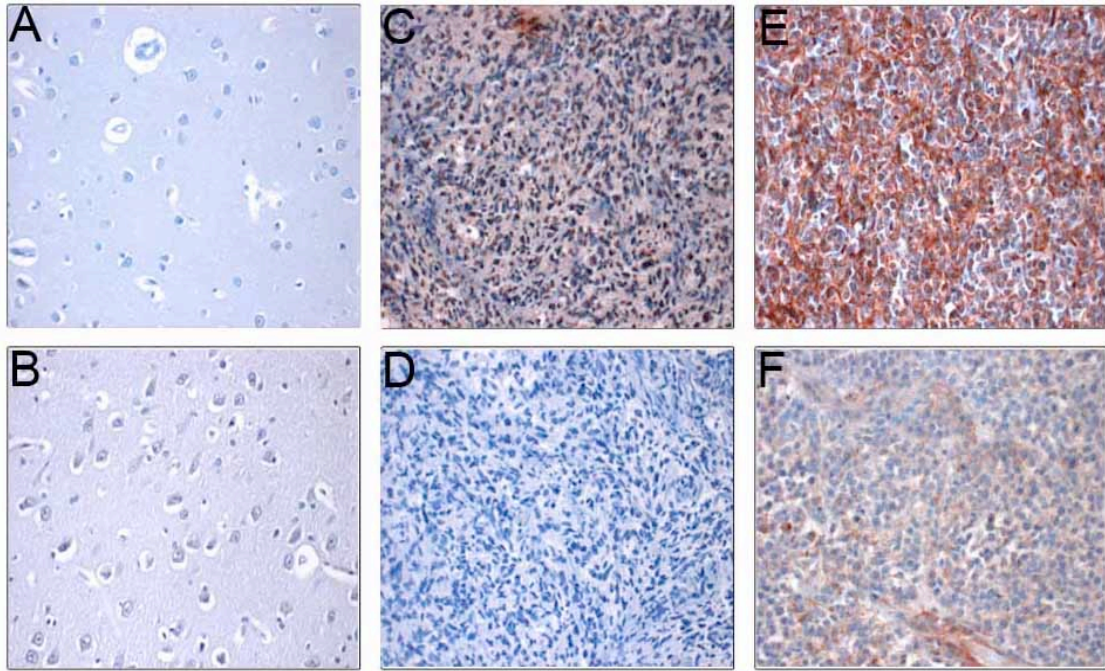
Fig. 5 Provençal *et al.***A****B****C**

Fig. 6 Provençal *et al.*

2.3 Tissue factor mediates the HGF/Met-induced anti-apoptotic pathway in DAOY medulloblastoma cells*

Mathieu Provençal¹, David Labbé¹, Ryan Veitch¹, Dominique Boivin¹, Georges-Étienne Rivard², Denis Gingras¹ and Richard Béliveau¹ ¶

¹ *Laboratoire de Médecine Moléculaire, Université du Québec à Montréal, C.P. 8888, Succ. Centre-ville, Montréal, Québec H3C 3P8 and* ²*Service d'Hématologie-Oncologie, Hôpital Ste-Justine, , 3175, Chemin Côte-Sainte-Catherine, Montréal, Québec (Canada) H3T 1C5.*

¶ To whom correspondence should be addressed : Laboratoire de médecine moléculaire , C.P. 8888, Succ. Centre-ville, Montréal, Québec H3C 3P8

Phone: (514) 987-3000 x 8551

FAX: (514) 987-0246

E-mail: oncomol@nobel.si.uqam.ca

Key words: Medulloblastoma, Met, Hepatocyte growth factor, Tissue Factor, Apoptosis

Running title: TF mediates HGF/Met anti-apoptotic activity

Abbreviations used: MB; Medulloblastoma, TF; Tissue Factor, RTK; Receptor Tyrosine Kinase, HGF; Hepatocyte Growth Factor

* This work was supported by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC).

Summary

The classical treatment scheme for medulloblastoma (MB) is based on a tri-therapy approach consisting of surgical tumor resection, craniospinal axis radiation and chemotherapy. With current treatments relying mainly on non-specific cytotoxic therapy, a better understanding of the mechanisms underlying resistance to these treatments is important in order to improve their effectiveness. In this study, we report that stimulation of DAOY with HGF resulted in the protection of these cells against etoposide-induced apoptosis, this anti-apoptotic effect being correlated with an increase in the expression of tissue factor (TF), the initiator of the extrinsic pathway of coagulation. HGF-mediated protection from apoptosis was abolished by a c-Met inhibitor as well as by siRNA-mediated reduction of TF levels, implying a central role of Met-dependent induction of TF expression in this process. Accordingly, stimulation of DAOY with FVIIa, the physiological ligand of TF, also resulted in a significant protection from etoposide-mediated cytotoxicity. Overall, our results suggest the participation of the haemostatic system to drug resistance in MB and may thus provide novel therapeutic approaches for the treatment of these tumors.

Introduction

Medulloblastoma (MB) is the most common malignant tumor of the central nervous system (CNS) in children and occurs bimodally, with peak incidences between 3 and 4 years and between 8 and 9 years of age [1]. These neuroectodermal tumors account for almost 20% of all intracranial tumors in children, and for 40% of all childhood posterior fossa tumors [2].

For many years now, conventional therapies for MB have consisted of surgical resection, craniospinal axis radiation and chemotherapy. However, this treatment scheme relies mainly on conventional cytotoxic therapies and its efficacy remains limited, mainly due to its lack of specificity [1]. In order to improve the efficiency of these therapies, several studies have been directed towards elucidation of the molecular pathways involved in MB, leading to the identification of a number of receptor tyrosine kinases (RTK) as key components involved in MB progression [3-8].

Among these, the Scatter Factor/Hepatocyte Growth Factor: Met (SF/HGF:Met) pathway has emerged as an important contributor to human neoplasia [9], and Met expression in MB is associated with poor prognosis [10, 11]. The HGF/Met pathway is implicated in numerous pro-tumorigenic actions such as cell cycle progression [12], cancer cell migration, invasion and metastasis [13,14], tumor angiogenesis [15] and protection from apoptosis [16].

Interestingly, the *MET* oncogene also drives a genetic program linking cancer to haemostasis, principally by promoting PAI-1 and Cox-2 protein expression [17]. Supporting an involvement of the coagulation system in Met function, we also recently

identified the HGF/Met pathway as being responsible for tissue factor (TF) expression in MB [18]. TF, a class 2 cytokine receptor, is a 47 kDa transmembrane glycoprotein which was originally identified as the main trigger of the extrinsic pathway of blood coagulation [19]. TF could mediate its cellular actions via its extracellular catalytic domain or through its short intracellular cytoplasmic tail [19].

Beside its haemostatic function, TF plays many non-haemostatic functions in human neoplasia. For example, TF plays a crucial role in cancer cell migration, via both extracellular and intracellular domain-induced signaling, thus promoting cancer invasion and metastasis processes [20]. Moreover, TF regulates a complex cellular circuitry promoting tumor angiogenesis through signaling by its cytoplasmic tail [21]. Finally, like Met, TF and its ligand (FVIIa) are known to prevent apoptosis in cancer cells, thus allowing tumor expansion [22].

In this work, we observed that stimulation of DAOY with HGF leads to a Met-dependent up-regulation of TF expression levels and that this event is correlated with increased resistance of these cells to apoptosis induced by the chemotherapeutic drug etoposide. Therefore, TF expression in MB promotes tumor cell survival, thus lowering chances of therapeutic success.

Materials and methods

Materials

Cell culture media were obtained from Wisant (St-Bruno, QC, Canada) and serum were purchased from Hyclone Laboratories (Logan, UT). Recombinant hepatocyte growth factor (HGF) was purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN). FVIIa was kindly provided by Dr. Georges-Étienne Rivard (Service d'Hématologie-Oncologie, Hôpital Sainte-Justine, Montréal, QC, Canada). c-MET specific inhibitor (SU11274) was obtained from EMD Chemicals (Gibbstown, NJ). All products for electrophoresis and western blotting were purchased from Bio-Rad (Hercules, CA). Anti-TF antibody was obtained from American Diagnostica (Stamford, CT) while anti-p53 rabbit polyclonal antibody came from Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA) and anti-phospho-p53 monoclonal antibody was purchased from Cell Signaling Technology (Beverly, MA). Anti-Erk1/2, anti-phospho-Erk1/2, anti-Akt, anti-phospho-Akt, anti-p38 and anti-phospho-p38 rabbit monoclonal antibodies were obtained from Cell Signalling Technology (Beverly, MA). Anti-Vimentin mouse monoclonal antibody was purchased from Santa Cruz Biotechnology Inc. Anti-Bcl-2 rabbit polyclonal antibody was obtained from Upstate (Charlottesville, VA). Transfection reagent LipofectamineTM 2000 was purchased from Invitrogen (Burlington, ON, Canada). Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-AFC (Ac-DEVD-AFC), a specific substrate for caspase-3, was purchased from BioSource International (Camarillo, CA).

Cell culture

The medulloblastoma cell line DAOY was purchased from the American Type Culture Collection (Manassas, VA). Cells were cultured at 37°C under a humidified atmosphere containing 5% CO₂. DAOY were maintained in Eagle's modified minimum essential medium (EMEM) supplemented with 10% (v/v) Bovine Calf Serum (BCS), 4 mM glutamine, 100 IU/ml penicillin and 100 mg/ml streptomycin.

Cell stimulation with HGF and membrane isolation

DAOY cells were grown to confluence in 100 mm Petri dishes and starved for 48 h in serum-free media. In the time-course experiment, cells were stimulated for 6 h at 37°C with 50 ng/ml HGF. In experiments using SU11274, cells were treated for 1 h with the inhibitor (5 µM) prior to HGF stimulation. Cells were then washed with 4 ml of lysis buffer [50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM sodium orthovanadate and 1 mM sodium fluoride] (buffer A). Cells were scraped with 2 ml of buffer A. Cells were resuspended in 500 µl of buffer [20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM sodium orthovanadate and 1 mM sodium fluoride] (buffer B) and homogenized using a Polytron twice for 30 sec at speed 4. Cells were then centrifuged at 4000 rpm for 5 min at 4°C and the resulting supernatants were centrifuged again at 55 000 rpm for 60 min at 4°C. Pellets were resuspended in 50 µl of buffer B. Protein concentrations were determined by the bicinchoninic acid method (Pierce).

Western blotting procedures

Identical amounts of protein from each sample were prepared in Laemmli sample buffer [125 mM Tris-HCl, pH 6.8, 20% glycerol, 4% SDS, 10% β -mercaptoethanol and 0.00125% bromophenol blue], boiled for 5 min and resolved by SDS-PAGE. Proteins were transferred onto polyvinylidene difluoride membranes (PVDF) and blocked overnight at 4°C with TBST buffer [20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 147 mM NaCl, 0.1% Tween 20] containing 3% bovine serum albumin (BSA) or 5% milk. Membranes were incubated with the specific primary antibody for 1 h at room temperature. Immunoreactive bands were revealed following a 1 h incubation with horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse, anti-rabbit or anti-goat antibodies, and the signals were visualized using an ECL detection system.

siRNA transfection method

A siRNA (hTF167i) specific towards TF (target sequences are sense, r(GCG CUU CAG GCA CUA CAA A)dTdT and antisense, r(UUU GUA GUG CCU GAA GCG C)dTdT) [23] and a control siRNA were purchased from Qiagen. Transfections were done in serum- and antibiotics-free EMEM media. Meanwhile, siRNA TF or control siRNA (at 50 nM each) were mixed with 30 μ l of LipofectamineTM 2000 reagent and incubated for 20 min at room temperature. After this incubation, the mix was added to the cells for 6 h at 37°C. After this period, cell media were replaced with media containing 10% BCS as described in the previous section.

Fluorometric caspase-3 assay

Confluent cells were made quiescent by 24 h starvation in a medium containing 0.5 % serum and cells were then stimulated (or not) with HGF (50 ng/ml) for 6 h. After this stimulation, cells were exposed to etoposide (50 μ M) for 3 h. Cells were collected, washed in cold PBS and lysed in Apo-Alert lysis buffer (Clontech, Palo Alto, CA) for 20 min at 4°C. Lysates were clarified by centrifugation at 16,000 x g for 20 min. Caspase activities were determined by incubation with 50 μ M fluorogenic peptide substrate acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-AFC (Ac-DEVD-AFC, caspase-3-specific) in assay buffer (50 mM HEPES-NaOH (pH 7.4), 100 mM NaCl, 10% sucrose, 0.1% 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate, 5 mM DTT, and 1 mM EDTA) on 96-well plates. The release of AFC (λ_{ex} = 400 nm, λ_{em} = 505 nm) was monitored for 30 min at 37°C on a SpectraMAX Gemini fluorescence plate reader (Molecular Devices). Caspase-3 activities were expressed as rfu/s/ μ g of protein used in the assay.

Staining of apoptotic cells

DAOY were grown on glass coverslips, starved and incubated or not with HGF prior to treatment with etoposide, as described above. After the treatment, the coverslips were washed twice with PBS, fixed for 60 min in 3.7% paraformaldehyde/PBS at room temperature, washed again twice in PBS and then permeabilized in 0.2% Triton X-100/PBS for 5 min at 4°C. Permeabilized cells were washed in PBS and the TUNEL assay was performed using the In Situ Cell Death Detection Kit (Roche Diagnostic), following the manufacturer's protocol.

Cell survival

DAOY were plated at 25 000 cells per well and allowed to attach for 8 h at 37°C. Cells were then serum-starved for 32 h and FVIIa was added for another 6 h. Etoposide (0, 50 or 100 μ M) was added to cells for 8 h and cell survival was quantified by cleavage of WST-1 in formazan by spectrophotometry at 450 nm.

Statistical analysis

The data are presented as means \pm SEMs and statistical analyses were performed with Student's *t*-test where one group was compared with the control group.

Results

The HGF/Met pathway protects medulloblastoma cells (DAOY) against etoposide-induced apoptosis.

DAOY cells treated with etoposide (50 μ M) for 3 h showed characteristics of apoptosis, including DNA fragmentation and increased caspase-3 activity (Fig. 1A). However, when DAOY were stimulated with different concentrations of HGF (0 to 50 ng/ml) for 6 h prior to etoposide treatment, the cells showed a dose-dependent protection against the drug, as reflected by a marked reduction in caspase-3 activation and DNA fragmentation (Fig. 1A). In agreement with our previous observation that activation of the HGF/Met pathway resulted in a marked increase in TF expression in DAOY [18], we observed that the anti-apoptotic effect of HGF correlated with increased TF expression in these cells (Fig. 1B). To further explore the molecular mechanisms underlying HGF/Met anti-apoptotic activity, we monitored several proteins that play important roles in the apoptotic process. As shown in Figure 1B, HGF had no effect on the expression levels of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and survivin, but markedly inhibited, in a concentration-dependent manner, the phosphorylation of p53 on Ser15. Interestingly, SU11274, a specific inhibitor of Met, completely blocked HGF-dependent TF expression and also reversed the protective effect of HGF by rendering DAOY cells sensitive to etoposide (Fig. 1C). These data indicate that the HGF anti-apoptotic function is correlated with an increase in TF expression, suggesting a potential role for this protein in the survival response induced by HGF/Met.

Effect of a TF siRNA on HGF-induced apoptosis protection in DAOY

In order to explore in more detail the link between TF expression and HGF-induced protection from apoptosis, we used siRNA technology to inhibit TF expression in DAOY. As shown in Figure 2A, cells transfected with a control siRNA and stimulated with 50 ng/ml HGF for 6 h were resistant to etoposide- induced caspase-3 activity. By contrast, cells transfected with the TF siRNA were not protected from apoptosis despite incubation of the cells with HGF prior to etoposide treatment. Immunoblotting of the cell lysates showed a high expression of TF in cells transfected with the control siRNA whereas TF levels were markedly reduced by the TF siRNA (Fig. 2B). The etoposide-induced increase in caspase-3 activity observed in Figure 2A is corroborated by the cleavage of this enzyme, as reflected by the appearance of 17 and 15 kDa fragments, and this activation of caspase-3 was inhibited by HGF under control siRNA conditions. In cells treated with the TF siRNA, however, etoposide alone induced the cleavage of caspase-3 and HGF did not inhibit this activation, as shown by the unchanged quantity of the 17-kDa fragment. Activation of caspase-3 by etoposide could also be visualized by the cleavage of vimentin, a well-known substrate of caspase-3, and again this process was reduced by preincubation with HGF. However, when TF expression was suppressed, HGF did not prevent the cleavage of vimentin. Overall, these results link the HGF anti-apoptotic activity to the expression of TF in DAOY, this process being associated with the inhibition of a caspase-3 dependent mechanism.

TF:FVIIa increase cell survival upon etoposide treatment

In order to further document the role of TF in the protection of DAOY from etoposide-induced cell death, we next examined the influence of FVIIa, the physiological ligand of TF, on this process. In agreement with many reports showing that the interaction of TF with FVIIa activates an anti-apoptotic pathway in various cancer cells [24,25], we observed that addition of FVIIa to DAOY resulted in the activation of several pathways involved in cell survival, including Erk-1/2, p38 MAPK and AKT (Fig 3A). Interestingly, we also observed that FVIIa induced a complete inhibition of the phosphorylation of serine 15 on p53, as previously observed following stimulation of the cells with HGF (Fig. 1B).

We next conducted *in vitro* cytotoxicity experiments to determine whether the effect of FVIIa on intracellular anti-apoptotic pathways was correlated with increased cell survival. DAOY, which express detectable basal levels of TF, were grown in the presence or absence of FVIIa and were then incubated with different concentrations of etoposide (0 to 100 μ M). As shown in Figure 4, we observed that in the presence of FVIIa, 57 % of DAOY survive even at high etoposide concentrations (100 μ M), while in the absence of FVIIa less than 20 % of cells remain viable after this treatment. These results suggest that, in a tumor environment where the TF:FVIIa complex is active, cancer cells are likely to be more resistant to chemotherapeutic drugs. Since we have previously shown that MB tumors expressing high levels of Met also express high levels of TF [18], these findings may help to explain how these tumors are more resistant to chemotherapy.

Discussion

In the present work, we observed that HGF exerts a cytoprotective effect in the MB DAOY cell line, as reflected by the c-Met-dependent increase in the resistance of these cells to etoposide-induced apoptosis. Such an involvement of the HGF/Met pathway in the protection of tumor cells from apoptotic death has been previously described for glioma and epithelial carcinomas [16, 26] and thus suggest that this pathway may represent a common anti-apoptotic mechanism used by cancer cells to circumvent cytotoxic drug-induced cell death.

One major finding of this study is that the cytoprotective effect of HGF was correlated with a marked increase in TF expression, suggesting that this process participate to the resistance of DAOY to etoposide. Such a close relationship between increased TF levels and HGF-mediated anti-apoptotic activity is strengthened by the observation that reduction of TF expression by RNA interference restored the sensitivity of DAOY to etoposide. Moreover, the inhibition of HGF-mediated TF expression using a kinase inhibitor specific to c-Met was correlated with an increase in etoposide-mediated apoptosis, again suggesting the participation of TF to the cytoprotective effect of HGF. To the best of our knowledge, this is the first report establishing a link between the anti-apoptotic activity of the HGF/Met signaling axis and TF expression.

The association between TF expression and malignancy is well established and this protein is now recognized to play an important role in the progression of cancer [27-30]. In addition to its activation of a variety of intracellular signaling pathways that lead to stimulate tumor cell migration [20] and angiogenesis [21], and thereby contribute to cancer

metastasis [31], additional studies have shown that TF expression may also protect tumor cells from apoptosis, as reflected by impaired cell survival and apoptosis following downregulation of TF levels [32]. Since increased TF expression is a widespread feature of tumor cells [33] and that high HGF levels are associated with tumorigenicity and malignant progression of several types of cancers, including MB [10, 11], the close relationship existing between these two pathways on cell survival is thus likely to significantly contribute to tumor progression.

The mechanisms underlying the TF-dependent cytoprotective effect of HGF remain to be established. In agreement with previous studies showing that the binding of FVIIa to TF is necessary for activation of signaling pathways downstream of TF [34], we observed that addition of FVIIa to DAOY resulted in a marked protection of these cells from etoposide-mediated cell death, suggesting that the cytoprotective effect requires formation of a TF:FVIIa complex. Intriguingly, however, HGF-mediated anti-apoptotic activity was also observed in the absence of exogenous FVIIa, suggesting that DAOY contain endogenous FVIIa bound to the cell surface. In this respect, initial experiments indicated that serum-starved DAOY possess the intrinsic ability to cross-link fibrinogen into fibrin, even in the absence of exogenous FVIIa or thrombin (M. Provençal, D. Ratel and R. Béliveau, unpublished results). Since FVII is synthesized in the liver and released into the bloodstream under physiological conditions, this behaviour is likely to be related to residual serum borne FVIIa that remained bound to TF expressed at the DAOY cell surface. However, since some cancer cells were previously shown to synthesize FVIIa endogenously [35], it would be interesting to determine if a similar phenomenon occurs in DAOY.

TF induces the activation of several anti-apoptotic pathways in various tumor cell types. For instance, in breast cancer cells, TF:FVIIa inhibited apoptosis by upregulating survivin through the Erk-1/2 MAPK and AKT pathways [24] while in neuroblastoma, TF:FVIIa interaction induced Bcl-2 expression via the JAK/STAT5 signaling pathway [25]. Since we observed that neither survivin nor Bcl-2 were affected by FVIIa or HGF stimulation of DAOY cells, it is likely that other cell survival pathways are activated by these ligands in this cell line. In this respect, the TF:FVIIa complex is known to signal directly by cleaving the protease activated receptor PAR-2 in several tumors [36]. Since activation of PAR receptors induces neuroprotection [37], the potential involvement of this pathway deserves future investigation.

We also observed that stimulation of DAOY with HGF inhibits p53 phosphorylation on serine 15, a residue that is normally phosphorylated upon DNA damage induced by UV radiation, chemical agents or chemotherapeutic drugs [38]. Phosphorylation at Ser15 activates p53 by diminishing its affinity to MDM2, a negative regulator of p53, therefore allowing p53 translocation to the nucleus in order to achieve cell cycle arrest or to trigger apoptosis [38]. This effect of HGF on p53 is interesting since other investigators have shown that MB overexpress the p53-inactivating oncogene *WIP1/PPM1D* which encodes *Wild-type p53-induced phosphatase-1*, a negative regulator of p53 [39]. Based on these observations, it is thus tempting to speculate that the anti-apoptotic effect of HGF could involve an alteration of the p53 phosphorylation status.

In a clinical context, our results suggest that tumors expressing high levels of both Met and TF are more likely to be resistant to chemotherapy. These observations, as well as other studies [40], thus suggest that the combination of existing anticoagulant drugs and

chemotherapy could improve chemotherapeutic treatment. For example, Warfarin, the most commonly used anticoagulant, specifically targets the synthesis of vitamin K clotting factors such as FVII. Therefore, pre-treatment with low-dose Warfarin before initiating chemotherapy protocols would likely minimize FVII levels in circulation and, at the same time, could sensitize tumors to chemotherapeutic drugs [41]. This strategy has already been tested for aggressive metastatic breast cancer and has proven to be efficient [42].

The hyper-activation of the haemostatic system is more than merely a consequence of clinical cancer and recent work has shown that it plays an important role in the strategy used by tumors to promote their growth. For this reason, the coagulation system as a whole has been recently gaining momentum as a promising target for the treatment of various cancers, including brain tumors [43]. Further studies aimed at the elucidation of the mechanisms underlying the participation of the haemostatic system in the drug resistance of MB may provide interesting novel therapeutic approaches for the treatment of pediatric brain tumors.

Acknowledgements

We thank the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and the Chair Claude-Bertrand in Neurosurgery for support of this work. Scholarship funding to Mathieu Provençal was provided by the MCETC/FRSQ/CIHR Strategic Training program in cancer Experimental Therapeutic.

References

1. Crawford JR, MacDonald TJ, Packer RJ: Medulloblastoma in childhood: new biological advances. *Lancet Neurol* 6: 1073-1085, 2007
2. Rossi A, Caracciolo V, Russo G, Reiss K, Giordano A: Medulloblastoma: from molecular pathology to therapy. *Clin Cancer Res* 14: 971-976, 2008
3. Grotzer MA, Janss AJ, Phillips PC, Trojanowski JQ: Neurotrophin receptor TrkC predicts good clinical outcome in medulloblastoma and other primitive neuroectodermal brain tumors. *Klin Padiatr* 212: 196-199, 2000
4. Duplan SM, Theoret Y, Kenigsberg RL: Antitumor activity of fibroblast growth factors (FGFs) for medulloblastoma may correlate with FGF receptor expression and tumor variant. *Clin Cancer Res* 8: 246-257, 2002
5. Gilbertson RJ, Clifford SC, MacMeekin W, Meekin W, Wright C, Perry RH, Kelly P, Pearson AD, Lunec J: Expression of the ErbB-neuregulin signaling network during human cerebellar development: implications for the biology of medulloblastoma. *Cancer Res* 58: 3932-3941, 1998
6. MacDonald TJ, Brown KM, LaFleur B, Peterson K, Lawlor C, Chen Y, Packer RJ, Cogen P, Stephan DA: Expression profiling of medulloblastoma: PDGFRA and the RAS/MAPK pathway as therapeutic targets for metastatic disease. *Nat Genet* 29: 143-152, 2001
7. Gilbertson RJ, Clifford SC: PDGFRB is overexpressed in metastatic medulloblastoma. *Nat Genet* 35: 197-198, 2003
8. Hartmann W, Koch A, Brune H, Waha A, Schuller U, Dani I, Denkhaus D, Langmann W, Bode U, Wiestler OD, Schilling K, Pietsch T: Insulin-like growth factor II is involved in the proliferation control of medulloblastoma and its cerebellar precursor cells. *Am J Pathol* 166: 1153-1162, 2005
9. Birchmeier C, Birchmeier W, Gherardi E, Vande Woude GF: Met, metastasis, motility and more. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4: 915-925, 2003
10. Goumnerova LC: Growth factor receptors and medulloblastoma. *J Neurooncol* 29: 85-89, 1996

11. Li Y, Lal B, Kwon S, Fan X, Saldanha U, Reznik TE, Kuchner EB, Eberhart C, Laterra J, Abounader R: The scatter factor/hepatocyte growth factor: c-met pathway in human embryonal central nervous system tumor malignancy. *Cancer Res* 65: 9355-9362, 2005
12. Li Y, Guessous F, Johnson EB, Eberhart CG, Li XN, Shu Q, Fan S, Lal B, Laterra J, Schiff D, Abounader R: Functional and molecular interactions between the HGF/c-Met pathway and c-Myc in large-cell medulloblastoma. *Lab Invest* 88: 98-111, 2008
13. Benvenuti S, Comoglio PM: The MET receptor tyrosine kinase in invasion and metastasis. *J Cell Physiol* 213: 316-325, 2007
14. Wang X, Le P, Liang C, Chan J, Kiewlich D, Miller T, Harris D, Sun L, Rice A, Vasile S, Blake RA, Howlett AR, Patel N, McMahon G, Lipson KE: Potent and selective inhibitors of the Met [hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) receptor] tyrosine kinase block HGF/SF-induced tumor cell growth and invasion. *Mol Cancer Ther* 2: 1085-1092, 2003
15. Abounader R, Laterra J: Scatter factor/hepatocyte growth factor in brain tumor growth and angiogenesis. *Neuro Oncol* 7: 436-451, 2005
16. Bowers DC, Fan S, Walter KA, Abounader R, Williams JA, Rosen EM, Laterra J: Scatter factor/hepatocyte growth factor protects against cytotoxic death in human glioblastoma via phosphatidylinositol 3-kinase- and AKT-dependent pathways. *Cancer Res* 60: 4277-4283, 2000
17. Boccaccio C, Sabatino G, Medico E, Girolami F, Follenzi A, Reato G, Sottile A, Naldini L, Comoglio PM: The MET oncogene drives a genetic programme linking cancer to haemostasis. *Nature* 434: 396-400, 2005
18. Price GC, Thompson SA, Kam PC: Tissue factor and tissue factor pathway inhibitor. *Anaesthesia* 59: 483-492, 2004
19. Ott I, Weigand B, Michl R, Seitz I, Sabbari-Erfani N, Neumann FJ, Schomig A: Tissue factor cytoplasmic domain stimulates migration by activation of the GTPase Rac1 and the mitogen-activated protein kinase p38. *Circulation* 111: 349-355, 2005
20. Belting M, Dorrell MI, Sandgren S, Aguilar E, Ahamed J, Dorfleutner A, Carmeliet P, Mueller BM, Friedlander M, Ruf W: Regulation of angiogenesis by tissue factor cytoplasmic domain signaling. *Nat Med* 10: 502-509, 2004

21. Versteeg HH, Spek CA, Richel DJ, Peppelenbosch MP: Coagulation factors VIIa and Xa inhibit apoptosis and anoikis. *Oncogene* 23: 410-417, 2004
22. Holen T, Amarzguioui M, Wiiger MT, Babaie E, Prydz H: Positional effects of short interfering RNAs targeting the human coagulation trigger Tissue Factor. *Nucleic Acids Res* 30: 1757-1766, 2002
23. Jiang X, Guo YL, Bromberg ME: Formation of tissue factor-factor VIIa-factor Xa complex prevents apoptosis in human breast cancer cells. *Thromb Haemost* 96: 196-201, 2006
24. Fang J, Gu L, Zhu N, Tang H, Alvarado CS, Zhou M: Tissue factor/FVIIa activates Bcl-2 and prevents doxorubicin-induced apoptosis in neuroblastoma cells. *BMC Cancer* 8: 69, 2008
25. Lin T, Mak NK, Yang MS: MAPK regulate p53-dependent cell death induced by benzo[a]pyrene: involvement of p53 phosphorylation and acetylation. *Toxicology* 247: 145-153, 2008
26. Fan S, Wang JA, Yuan RQ, Rockwell S, Andres J, Zlatapolskiy A, Goldberg ID, Rosen EM: Scatter factor protects epithelial and carcinoma cells against apoptosis induced by DNA-damaging agents. *Oncogene* 17: 131-141, 1998
27. Shieh SY, Ikeda M, Taya Y, Prives C: DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell* 91: 325-334, 1997
28. Castellino RC, De Bortoli M, Lu X, Moon SH, Nguyen TA, Shepard MA, Rao PH, Donehower LA, Kim JY: Medulloblastomas overexpress the p53-inactivating oncogene WIP1/PPM1D. *J Neurooncol* 86: 245-256, 2008
29. Guan M, Jin J, Su B, Liu WW, Lu Y: Tissue factor expression and angiogenesis in human glioma. *Clin Biochem* 35: 321-325, 2002
30. Hamada K, Kuratsu J, Saitoh Y, Takeshima H, Nishi T, Ushio Y: Expression of tissue factor in glioma. *Noshuyo Byori* 13: 115-118, 1996
31. Ueno T, Toi M, Koike M, Nakamura S, Tominaga T: Tissue factor expression in breast cancer tissues: its correlation with prognosis and plasma concentration. *Br J Cancer* 83: 164-170, 2000

32. Goldin-Lang P, Tran QV, Fichtner I, Eisenreich A, Antoniak S, Schulze K, Coupland SE, Poller W, Schultheiss HP, Rauch U: Tissue factor expression pattern in human non-small cell lung cancer tissues indicate increased blood thrombogenicity and tumor metastasis. *Oncol Rep* 20: 123-128, 2008
33. Osterholm C, Li S, Ekberg H, Hedner U, Holgersson J: Downregulation of tissue factor (TF) by RNA interference induces apoptosis and impairs cell survival of primary endothelium and tumor cells. *Cell Tissue Res*, 2008
34. Ruf W: Molecular regulation of blood clotting in tumor biology. *Haemostasis* 31 Suppl 1: 5-7, 2001
35. Koizume S, Jin MS, Miyagi E, Hirahara F, Nakamura Y, Piao JH, Asai A, Yoshida A, Tsuchiya E, Ruf W, Miyagi Y: Activation of cancer cell migration and invasion by ectopic synthesis of coagulation factor VII. *Cancer Res* 66: 9453-9460, 2006
36. Li C, Colman LM, Collier ME, Dyer CE, Greenman J, Ettelaie C: Tumour-expressed tissue factor inhibits cellular cytotoxicity. *Cancer Immunol Immunother* 55: 1301-1308, 2006
37. Sakata T, Kario K, Matsuo T, Katayama Y, Matsuyama T, Kato H, Miyata T: Suppression of plasma-activated factor VII levels by warfarin therapy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15: 241-246, 1995
38. Falanga A, Levine MN, Consonni R, Gritti G, Delaini F, Oldani E, Julian JA, Barbui T: The effect of very-low-dose warfarin on markers of hypercoagulation in metastatic breast cancer: results from a randomized trial. *Thromb Haemost* 79: 23-27, 1998
39. Ornstein DL, Meehan KR, Zacharski LR: The coagulation system as a target for the treatment of human gliomas. *Semin Thromb Hemost* 28: 19-28, 2002
40. Li C, Colman LM, Collier ME, Dyer CE, Greenman J, Ettelaie C: Tumour-expressed tissue factor inhibits cellular cytotoxicity. *Cancer Immunol Immunother* 55: 1301-1308, 2006
41. Sakata T, Kario K, Matsuo T, Katayama Y, Matsuyama T, Kato H, Miyata T: Suppression of plasma-activated factor VII levels by warfarin therapy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15: 241-246, 1995

42. Falanga A, Levine MN, Consonni R, Gritti G, Delaini F, Oldani E, Julian JA, Barbui T: The effect of very-low-dose warfarin on markers of hypercoagulation in metastatic breast cancer: results from a randomized trial. *Thromb Haemost* 79: 23-27, 1998

43. Ornstein DL, Meehan KR, Zacharski LR: The coagulation system as a target for the treatment of human gliomas. *Semin Thromb Hemost* 28: 19-28, 2002

Figure legends

Figure 1: Correlation between HGF-induced apoptosis protection and TF expression in DAOY. Confluent DAOY in 60-mm dishes were serum-starved in 0% serum for 48 h. DAOY were then stimulated with various HGF concentrations ranging from 0 to 50 ng/ml for 6 h. After stimulation cells were treated with etoposide (50 μ M) for 3 h. **(A) Upper panel:** DAOY were harvested and lysed as described in *Materials and methods* and cell lysates were used for the fluorometric caspase-3 assay. **Lower panel:** DAOY grown on coverslips were either left untreated or treated for 6 h with 50 ng/mL HGF and then incubated with 50 μ M etoposide for 3 h. Fragmented DNA was detected by the TUNEL assay. **(B)** Equal amounts of protein from cell lysates were subjected to electrophoresis. TF and other apoptosis-related protein expression levels were visualized by western blot, using specific antibodies. *NS*: Non specific **(C)** DAOY in 60-mm dishes were serum starved in 0 % serum for 48 h. Cells were pre-treated (or not) for 1 h with the Met specific inhibitor SU11274 (5 μ M). After pre-treatment DAOY were stimulated (or not) with HGF (50 ng/ml) for 6 h and then etoposide (50 μ M) was added for another 3 h. Cell lysates were used in the fluorometric caspase-3 assay and for western blot analysis.

Figure 2: TF mediates the HGF-induced apoptosis protection in DAOY (A) DAOY were transfected with control or TF siRNAs as described in *Materials and methods* and allowed to recover for 24 h before being made quiescent by serum-starvation in 0.5 % serum for another 24 h. Cells were then stimulated (or not) with HGF (50 ng/ml) for 6 h before being treated (or not) with etoposide (50 μ M) for an additional 3 h. DAOY were

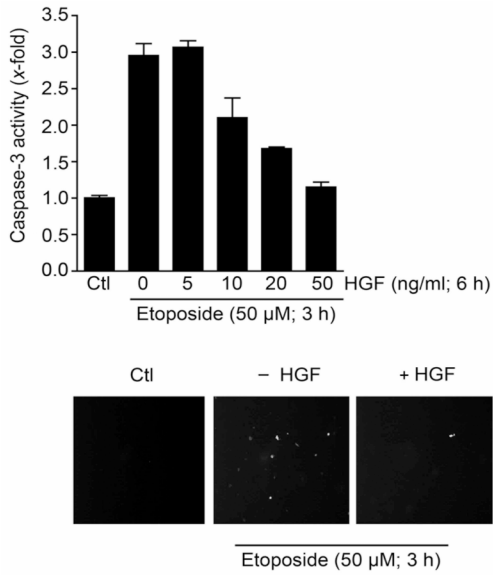
harvested and lysed as described in *Materials and methods* and cell lysates were used for the fluorometric caspase-3 assay. **(B)**. Cell lysates were used for western blot analysis. Equal amounts of protein from cell lysates were subjected to electrophoresis and western blotting. Levels of TF, cleaved-caspase-3 and cleaved vimentin were detected using specific antibodies.

Figure 3: Effect of FVIIa on DAOY signal transduction processes. Confluent and serum-starved DAOY were stimulated from 0 to 8 h with FVIIa (50 nM) and after cell lysis, equal amounts of protein were subjected to electrophoresis to monitor variations in the extent of phosphorylation of Erk-1/2, p38 and AKT **(A)** as well as on the levels of markers of different apoptotic pathways **(B)**

Figure 4: FVIIa renders DAOY more resistant to etoposide treatment. DAOY were plated in 96-well plates and allowed to attach for 8 h before serum starvation in 0 % serum for 24 h. FVIIa was then added (or not) for 6 h and cells were treated with different concentrations of etoposide ranging from 0 to 100 μ M for 8 h. Cell survival was quantified as described in *Materials and methods*.

Fig. 1 Provençal *et al.*

A



B

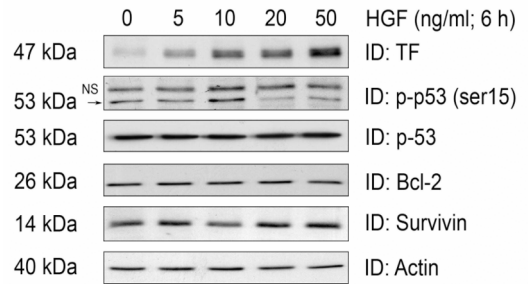


Figure 1 B

C

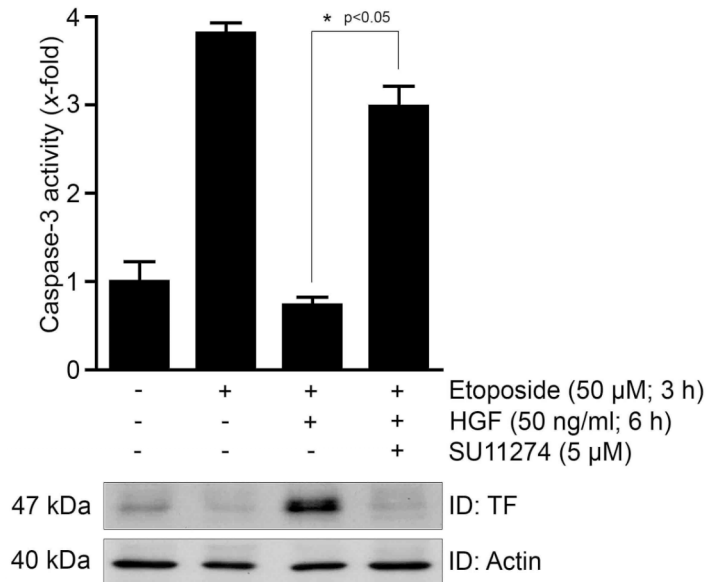


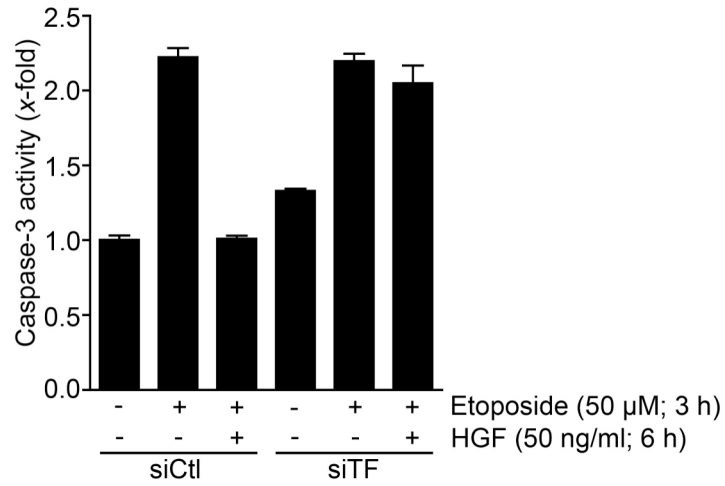
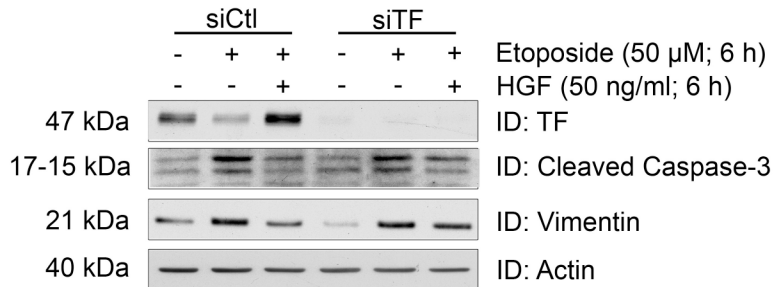
Fig. 2 Provençal *et al.***A****B**

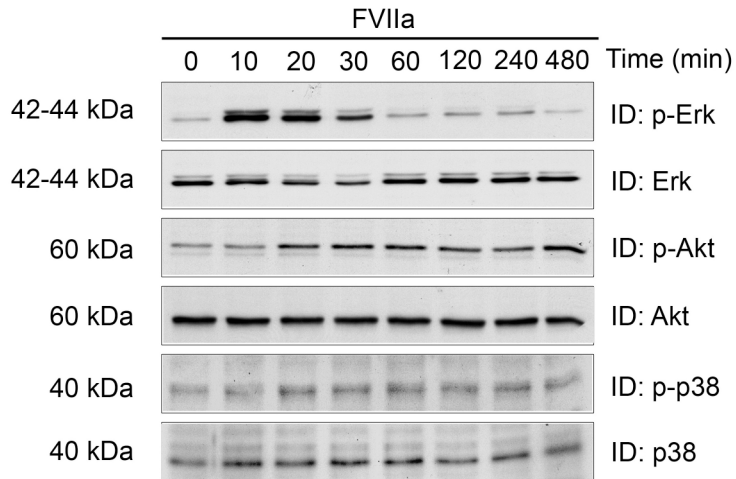
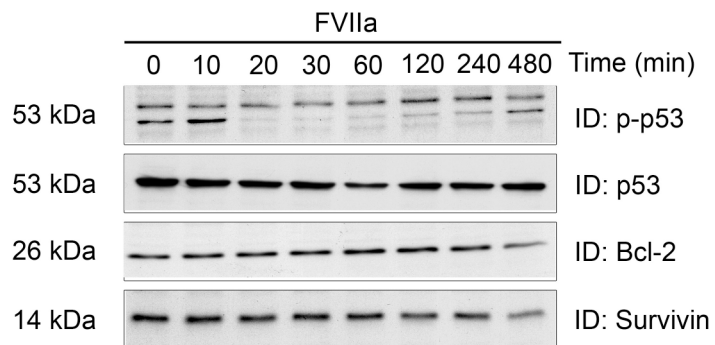
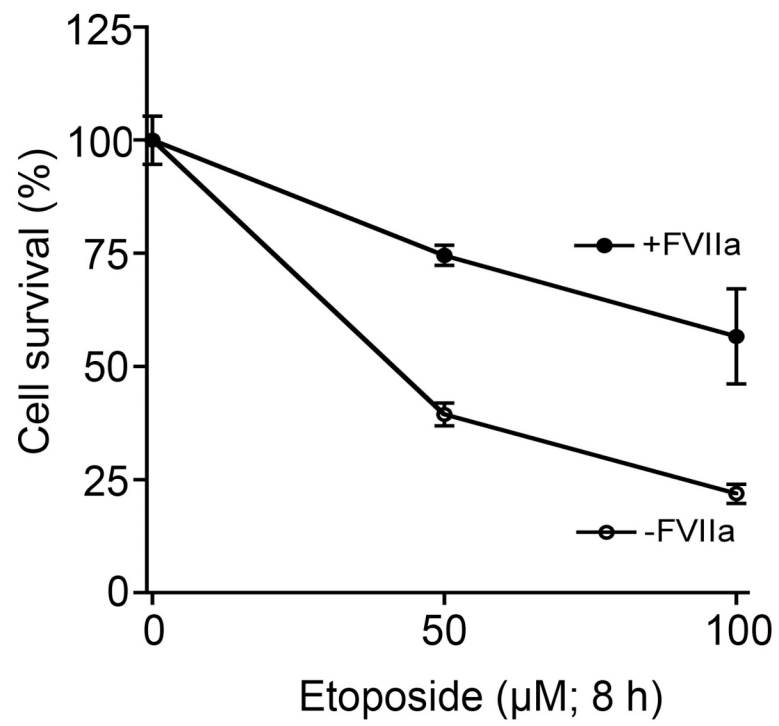
Fig. 3 Provençal *et al.***A****B**

Fig. 4 Provençal *et al.*

CHAPITRE III

DISCUSSION

Nous nous sommes attardés tout au long de l'introduction de cette thèse à décrire d'une manière générale comment le cancer, afin de favoriser sa progression et sa propagation, tire profit du détournement de deux systèmes physiologiques importants, soit le système vasculaire et le système hémostatique. Pendant de nombreuses années, les coagulopathies furent considérées comme n'étant qu'une simple conséquence du développement tumoral. D'ailleurs, pour les cliniciens, l'observation d'anomalies hémostatiques coïncide souvent avec la découverte d'un cancer occulte. Toutefois, l'étude approfondie du lien existant entre le système hémostatique et la malignité montre qu'il se reflète évidemment au niveau moléculaire, là où différents facteurs de la coagulation vont intervenir dans le développement des cellules cancéreuses. De plus, puisque les systèmes hémostatique et vasculaire sont anatomiquement et physiologiquement inséparables, les facteurs de coagulation sont également en mesure de modifier considérablement l'environnement tumoral : entre autres, en participant à la formation ou l'inhibition des réseaux vasculaires alimentant la tumeur. Au cours de ces travaux, nous avons donc porté une attention particulière à deux protéines jouant un rôle primordial dans l'hémostase, soit TF, le principal activateur de la coagulation, et son inhibiteur TFPI. Ces deux protéines peuvent jouer des rôles pro- ou anti-néoplasiques et ce, indépendamment de leurs fonctions hémostatiques normales. Dans le premier volet de cette thèse, nous avons abordé les propriétés anti-angiogéniques de TFPI, alors que dans le second nous avons étudié les rôles de TF sur le développement des médulloblastomes.

3.1 Rôles de TFPI dans l'angiogenèse tumorale

Dans notre organisme, TFPI est distribué de la façon suivante : 80-85% de l'inhibiteur est associé à la surface des cellules endothéliales par l'intermédiaire d'un ancrage glycosyl-phosphoinositol (GPI) situé au niveau du troisième domaine Kunitz de la protéine (Piro *et al.*, 2004); 10% circule dans le plasma lié aux lipoprotéines et finalement 3% se retrouve au niveau des plaquettes sanguines (Bajaj *et al.*, 2001). La concentration physiologique se situe entre 2.5 et 5 nM et l'activité de TFPI peut varier selon l'évolution du cycle circadien et selon les individus (Pinotti *et al.*, 2005). Cependant, il fut démontré expérimentalement que les patients souffrant de troubles hémostatiques associés au développement tumoral présentaient des taux plasmatiques élevés d'une forme tronquée inactive de TFPI (Shimura *et al.*, 1999). La protéine est d'ailleurs particulièrement susceptible au clivage enzymatique généré par l'activité des MMP produites par l'environnement pro-inflammatoire de la tumeur (Belaoouaj *et al.*, 2000). Le TFPI, à l'instar de plusieurs autres molécules hémostatiques, est une protéine multifonctionnelle capable d'influencer les fonctions vasculaires chez l'adulte (Kato *et al.*, 2002) et le développement vasculaire chez l'embryon. Ainsi, il fut démontré qu'une fine régulation de l'activité du complexe TF:FVIIa par TFPI est nécessaire au bon développement vasculaire chez l'embryon. Par ailleurs, les embryons n'exprimant pas TFPI (TFPI^{-/-}) démontrent des signes évidents de déposition de fibrine au niveau hépatique, causant des thromboses intravasculaires ainsi que de fréquentes hémorragies (Pedersen *et al.*, 2005). Puisque ces désordres hémostatiques sont similaires à ceux normalement observés chez les patients cancéreux, il fut suggéré que le TFPI peut jouer un rôle antinéoplasique. Une littérature abondante démontre que plusieurs protéines hémostatiques peuvent réguler positivement ou négativement l'angiogenèse tumorale et ce, indépendamment de leur fonction hémostatique normale (Nijziel *et al.*, 2006; Wojtukiewicz *et al.*, 2004).

3.1.1 Effet de TFPI sur la formation de structures de type capillaire

La plupart des protéines hémostatiques associées à une régulation négative des processus angiogéniques sont celles dont les fonctions hémostatiques normales se rapportent à l'inhibition de la cascade de coagulation (Browder *et al.*, 2000). À titre d'exemple, des études antérieures ont rapporté que le traitement des CEs avec certaines molécules anticoagulantes de la famille des LMWH, couramment utilisées en clinique, était en mesure d'inhiber l'angiogenèse (Mousa, 2004). Il fut par la suite démontré que le mécanisme d'action par lequel cette régulation prenait forme impliquait une déstabilisation de l'ancre GPI de TFPI par les LMWH. Ce décrochage de TFPI provoque alors une augmentation de la concentration de l'inhibiteur sous forme libre dans le milieu vasculaire, ce qui provoque une inhibition de la formation de structures de types capillaires selon un mécanisme inconnu des auteurs de cette étude (Mousa et Mohamed, 2004). Afin d'éclaircir le mécanisme par lequel TFPI exerce son effet inhibiteur sur la formation de structure de type capillaire, nous avons dans un premier temps observé que le traitement *in vitro* des CEs avec une concentration physiologique de TFPI mène à une inhibition significative de la formation de structures de type capillaire. Cette première étape confirme donc la validité de l'utilisation de la protéine recombinante de TFPI produite spécialement dans le cadre de cette étude afin de mettre en évidence le mécanisme anti-angiogénique de TFPI.

Il existe deux phénomènes simples qui permettraient d'expliquer l'effet inhibiteur de TFPI. Premièrement, il serait possible d'imaginer que le traitement des CEs avec le TFPI recombinant entraîne une cytotoxicité affectant ainsi la formation des réseaux capillaires sur Matrigel™. Or, nos analyses ont démontré que des traitements prolongés des CEs avec le TFPI n'induisait aucune cytotoxicité, écartant ainsi ce phénomène comme explication possible de l'effet observé. Le second mécanisme, quant à lui, fait appel au pouvoir d'interférence de TFPI sur la prolifération des CEs. En effet, précédant nos travaux, des études ont démontré que le TFPI possède la capacité d'inhiber la prolifération des cellules

HUVEC. Toutefois, cet effet de TFPI n'est observé qu'à de très hautes concentrations (environ 350 nM), excédant ainsi de plusieurs fois la concentration physiologique normale (Hembrough, *et al.*, 2001). Donc, dans notre étude, puisque l'utilisation de TFPI à faible concentration n'affecte ni la cytotoxicité ni la prolifération des CEs, ces résultats laissent donc entrevoir la possibilité que l'effet inhibiteur de TFPI sur l'angiogenèse résulte de mécanismes distincts.

3.1.2 Effet de TFPI sur la migration des cellules endothéliales

Outre la prolifération et la formation de nouveaux tubules, la migration des CEs représente une autre étape morphologique primordiale marquant le processus angiogénique (Scoazec, 2000). La migration des CEs au cours de l'angiogenèse tumorale peut survenir en réponse à des stimuli mitogènes émis aussi bien par les cellules malignes que par les cellules saines de l'hôte. Dans le large éventail de molécules présentes au site de néo-vascularisation, l'une d'entre elles, la sphingosine-1-phosphate (S1P), est produite et libérée par les plaquettes activées (Lee *et al.*, 1999; Dyatlovitskaya et Kandyba, 2006). La S1P est reconnue pour sa capacité à induire fortement la migration des CEs (Paik *et al.*, 2001). Lors de la réalisation de nos travaux, nous avons observé que l'ajout de concentrations physiologiques de TFPI provoque une inhibition spécifique de la migration des CEs en réponse à la S1P. Il est à noter que TFPI n'exerce aucun effet inhibiteur sur la migration des cellules cancéreuses de glioblastomes (U-87). Cet effet de TFPI correspond bien à l'action connue d'autres molécules anti-angiogéniques comme l'angiostatine et l'endostatine qui agissent également par des mécanismes visant à inhiber spécifiquement la migration des CEs (Cao, 2001).

3.1.2.1 Spécificité endothéliale de l'action de TFPI : rôle des récepteurs aux VLDL

Le mécanisme exact impliqué dans la spécificité endothéliale de l'action anti-migratoire de TFPI demeure nébuleux et exigera des investigations plus approfondies dans le futur. Toutefois, en nous appuyant sur les travaux qui ont été publiés dans le domaine, nous pouvons imaginer au moins deux hypothèses concernant le mode d'action de TFPI au niveau des CEs. La première de ces hypothèses provient de l'observation qu'en conditions normales les CEs n'expriment pas TF, ce qui suggère que TFPI doit interagir avec les CEs par un moyen indépendant de la formation du complexe TF:FVIIa. Des interactions ne nécessitant pas la formation du complexe TF:FVIIa ont été décrites lors d'études antérieures, où il fut démontré que le TFPI pouvait se lier au récepteur des VLDL, qui est fortement exprimé à la surface des CEs (Hembrough *et al.*, 2001).

Le récepteur des VLDL fut récemment identifié en tant que régulateur important non seulement du métabolisme des lipides et des acides gras, mais également de la migration des cellules neuronales. De plus, la signalisation induite par ce récepteur a des répercussions dans plusieurs maladies comme le syndrome métabolique, l'athérosclérose et l'angiogenèse (Takahashi *et al.*, 2004). Cette hypothèse stipulant que l'action de TFPI puisse nécessiter la liaison au récepteur des VLDL est renforcée par les résultats d'une étude récente démontrant que d'autres inhibiteurs angiogéniques comme la TSP-1 et la TSP-2 utilisent également le récepteur aux VLDL pour médier leurs effets sur les CEs (Oganesian *et al.*, 2008).

3.1.2.2 Spécificité endothéliale de l'action de TFPI : la localisation cavéolaire

La seconde hypothèse fait référence à la possible implication des cavéoles présentes aux niveaux membranaires des CEs. Les cavéoles représentent des domaines lipidiques (*lipid rafts*) présents à la surface de la membrane plasmique des cellules. Ces domaines

membranaires sont enrichis en cholestérol, sphingolipides et en protéines spécialisées comme les cavéolines-1, -2 et -3 (Simons *et al.*, 2000). Plusieurs études ont proposé un rôle important des cavéoles dans la régulation de l'angiogenèse. En effet, ces petits domaines agissent comme des réservoirs servant à concentrer l'action de plusieurs protéines pro-angiogéniques. Ainsi, les cavéoles influencent la perméabilité vasculaire, la dégradation de la MEC, la migration, la prolifération et la différenciation cellulaires des CEs (Thomas et Smart, 2008).

La spécificité de TFPI et son effet inhibiteur envers les CEs pourraient également s'expliquer par la localisation de la protéine à l'intérieur de micro-domaines cavéolaires. En effet, il a été démontré que la régulation de l'expression de surface et l'activité de TFPI est dépendante de la présence de cavéoles à la surface des CEs (Lupu *et al.*, 1997). Toutefois, cette hypothèse d'un mécanisme dépendant de la localisation cavéolaire est peu probable puisqu'il serait insuffisant pour expliquer la spécificité endothéliale, en considérant que les cavéoles sont présentes dans plusieurs types cellulaires notamment dans les astrocytes cérébraux (Cameron *et al.*, 1997). De plus, des travaux antérieurs confirment clairement que suite à l'addition de TFPI exogène à des cellules en culture, ce dernier ne se colocalise pas au niveau des cavéoles (Sevinski *et al.*, 1996).

3.1.3 Effet de TFPI sur l'adhésion des cellules endothéliales

La migration est un ensemble coordonné de processus qui implique des changements rapides affectant la dynamique des filaments d'actine ainsi que l'assemblage de sites d'adhésion cellulaire, mieux connus sous le nom de complexes focaux (Mitra *et al.*, 2005). Les complexes focaux sont composés de nombreuses protéines, dont les principales, FAK et PAX régissent l'assemblage de ces complexes. La formation des complexes focaux se produit à la jonction entre la MEC et les intégrines, dans le but de rapprocher les protéines du cytosquelette et celles impliquées dans la signalisation intracellulaire (Mitra *et al.*, 2005).

Nos résultats démontrent clairement que le TFPI affecte l'adhésion des CEs, sans toutefois influencer celle des cellules de glioblastomes. De plus, nos analyses effectuées à l'aide de la technique de l'immunoprécipitation de complexes protéiques démontrent que cet effet est corrélé avec une diminution importante de la phosphorylation des protéines FAK et PAX, tel qu'observé au niveau des CEs. Puisque la phosphorylation de ces protéines est nécessaire à l'assemblage des complexes focaux et que ces phosphorylations sont régulées par l'action des protéines MAPK, nous avons étudié l'état d'activation de plusieurs protéines étant susceptibles de participer à la formation des complexes focaux (Huang *et al.*, 2004). Nos analyses démontrent que c'est l'inhibition spécifique de ERK-1/2, qui survient en amont des effets de TFPI sur FAK et PAX, qui est responsable de la déphosphorylation observée précédemment sur FAK et PAX. Ces résultats suggèrent que les interactions survenant dans le contexte de l'assemblage des complexes focaux sont absentes, du moins en partie, au niveau des CEs traitées avec TFPI, ce qui dénote une fois de plus la spécificité endothéliale de l'action de TFPI. Ces observations sont également confirmées par microscopie confocale où l'on constate que le traitement des CEs avec le TFPI prévient à la fois les changements morphologiques normalement associés à la migration cellulaire (comme par exemple la formation de lamellipodes) et la formation des complexes focaux (Le Clainche et Carlier, 2008). De plus, ces résultats sont en accord avec ce qui a été publié concernant l'action de l'endostatine sur les protéines impliquées dans la formation des complexes focaux. En effet, de façon très similaire à ce qui est observé dans le cas d'un traitement avec le TFPI, l'endostatine peut affecter l'adhésion des CEs en modifiant la redistribution cellulaire des protéines d'adhésions ainsi que de l'actine (Wickström *et al.*, 2001).

3.2 La voie HGF/Met et l'expression de TF dans les médulloblastomes

En tant que récepteur membranaire appartenant à la famille des récepteurs de cytokines de classe II, TF n'est pas seulement le principal activateur de la cascade de

coagulation, il est également un acteur important impliqué dans le développement néoplasique. Ainsi, l'expression aberrante de TF est observée dans plusieurs types de cancers différents, dont les tumeurs du CNS (Rak *et al.*, 2008). Dans la plupart des tumeurs exprimant TF, les voies de signalisation responsables de l'expression anormale de cette protéine sont peu connues. En conditions physiologiques, les protéines possédant une activité tyrosine kinase, comme les RTK, jouent un rôle essentiel dans le contrôle de la croissance cellulaire et de la différenciation. Or, dans le contexte tumoral, les nombreux mécanismes oeuvrant au contrôle de l'activité de ces récepteurs sont complètement déréglés et les RTK présentent également plusieurs modifications importantes altérant leur état d'activation (Zwick *et al.*, 2002).

Le récepteur du HGF, Met, fut récemment identifié comme étant un important contributeur au développement et à la progression tumorale dans plusieurs types de cancers (Birchmeir *et al.*, 2003). En plus d'être responsable de la motilité cellulaire impliquée dans les phénomènes de formation de métastases, Met est également reconnu pour diriger un important programme génétique reliant la coagulation et les phénomènes néoplasiques (Boccacio *et al.*, 2005). D'autre part, l'expression de Met est également associée à un mauvais pronostic dans les MB pédiatriques (Li *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2008). Nous avons démontré dans le second volet de cette thèse que la voie HGF/Met joue un rôle clé dans l'expression de TF par ces tumeurs. L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de la transcription et de la traduction protéique nous indique que cette expression de TF stimulée par HGF exige une production *de novo* de la protéine, plutôt qu'un simple phénomène de redistribution des réserves intracellulaires. Notre étude a également permis de dévoiler que les protéines de la famille de la kinase Src, reconnues comme étant des protéines impliquées dans la signalisation induite par Met (Bolanos-Garcia, 2005), sont également importantes dans la signalisation nécessaire à l'expression de TF. Malgré la stimulation de plusieurs autres RTK également connus pour être impliqués dans la biologie des MB, seul Met et son ligand HGF ont influencé à la hausse le niveau d'expression de TF dans les

cellules DAOY. Il est également intéressant de noter que HGF n'a aucun effet sur l'expression de TF dans une autre lignée de MB (les cellules D283). Cette divergence d'effet entre les deux lignées de cellules médulloblastiques illustre assez bien le phénomène d'hétérogénéité des MB, qui s'explique par la diversité d'origine des différentes populations cellulaires formant ces tumeurs (Gilbertson et Ellison, 2008). À l'instar des D283, les cellules U-87 de GB sont également insensibles à l'effet de HGF/Met sur l'expression de TF. Malgré le fait que les GB sont des tumeurs reconnues pour leur forte expression de TF (Hamada *et al.*, 1996; Guan *et al.*, 2002), il semble que les mécanismes responsables de l'expression de cette protéine au niveau de ces tumeurs sont distincts de la voie HGF/Met. En accord avec cette hypothèse, des études antérieures démontrent que l'expression de TF, dans les GB, est fortement induite par différents mécanismes en réponse à l'hypoxie combinée avec la perte d'expression de la protéine PTEN (Rong *et al.*, 2005), l'activation de EGR-1 (Rong *et al.*, 2006) et la stimulation paracrine par VEGF sécrété par les cellules tumorales (Takano *et al.*, 2000). En résumé, il est remarquable de constater que l'activation de la voie HGF/Met est propice à l'expression aberrante de TF et ce, uniquement dans un type cellulaire de MB.

3.2.1 Rôle de TF dans l'induction d'un état procoagulant

Pour qu'un état procoagulant puisse se développer, il faut non seulement l'augmentation d'expression d'un facteur procoagulant, mais il doit également se produire un déséquilibre entre les facteurs procoagulants et anticoagulants, ce qui permet l'apparition du syndrome de Trousseau (Boccacio et Comoglio, 2005; Rak *et al.*, 2006; Varki, 2007). Dans le cadre de notre étude, ce déséquilibre est observé puisque HGF provoque une hausse d'expression de TF, mais n'influence aucunement l'expression de l'inhibiteur TFPI.

L'induction de l'état procoagulant au sein d'une tumeur en développement permet de former un dépôt de fibrine dans l'environnement immédiat de la tumeur, un phénomène

particulièrement important pour les tumeurs cérébrales primaires et métastatiques (Bardos *et al.*, 1996). Cette matrice provisoire de fibrine sert de support à la migration des CEs se déplaçant en direction de la tumeur au cours du processus angiogénique (van Hinsbergh et Collen, 2001). Cette matrice de fibrine forme également un environnement relativement isolé du reste de l'organisme, permettant ainsi à la tumeur d'échapper à la surveillance du système immunitaire de l'hôte (Fernandez *et al.*, 2004).

3.2.2 Rôle de TF dans la migration des cellules tumorales

Dans notre étude, les cellules tumorales exprimant TF démontrent un potentiel migratoire important envers le compartiment contenant une concentration physiologique de FVIIa, suggérant ainsi un rôle pour TF dans les processus invasifs et métastatiques, deux traits caractéristiques de l'agressivité tumorale. De plus, pour accomplir son rôle dans la migration cellulaire, TF n'est pas simplement exprimé de façon aléatoire dans la cellule, mais est plutôt associé à des structures en périphérie riches en actine, qui sont normalement observées chez des cellules ayant un pouvoir mitogène (Le Clainche et Carlier, 2008). La formation de ces structures migratoires requiert par ailleurs la participation des protéines de la famille des Src kinases (Singh et McNiven, 2008). D'autres travaux démontrent aussi que l'activation de Src par Met est nécessaire à la médiation des propriétés métastatiques de certains cancers comme le carcinome colorectal (Herynk *et al.*, 2007). Ces résultats, ainsi que nos observations, sont validés par l'utilisation de l'inhibiteur général de la famille des protéines Src Kinases (PP2) et l'inhibiteur spécifique de Met (SU11274), qui inhibent à la fois l'expression de TF et la formation des régions corticales riches en actine.

3.2.3 Rôle de TF dans la protection contre l'apoptose

L'implication de la voie HGF/Met dans la protection contre l'apoptose n'est pas une observation complètement nouvelle puisque cet effet a déjà été démontré pour certains types de cancers comme les carcinomes épithéliaux et les gliomes (Fan *et al.*, 1998; Bowers

et al., 2000). Les MB présentent plusieurs caractéristiques moléculaires qui les rendent particulièrement résistants aux thérapies conventionnelles (Rossi *et al.*, 2008). Au cours du deuxième article, nous avons démontré l'importance de la voie HGF/Met dans l'expression aberrante de TF. Au cours du troisième article, nous suggérons que les fonctions non hémostatiques de TF participent à l'effet anti-apoptotique de la voie HGF/Met au niveau des cellules DAOY.

3.2.3.1 Effet de la stimulation de HGF sur p53

Il est intéressant de noter que la stimulation des cellules DAOY avec HGF inhibe la phosphorylation de la sérine 15 au niveau de la protéine p53. En condition de stress, survenant à la suite de l'irradiation par des rayons UV de la double-hélice d'ADN ou encore par l'action d'agents chimiques ou de drogues thérapeutiques, cette sérine 15 est normalement phosphorylée, indiquant l'activation de p53 (Shieh *et al.*, 1997). Une fois activé, p53 perd de son affinité pour son régulateur négatif naturel MDM2, ce qui permet à p53 de se rendre au noyau afin de déclencher un arrêt du cycle cellulaire ou encore d'induire l'apoptose (Shieh *et al.*, 1997). L'observation de cet effet sur la protéine p53 est particulièrement intrigant puisque d'autres groupes de recherche ont démontré que les MB surexpriment le gène *WIP1/PPM1D*, qui code pour une phosphatase possédant une activité régulatrice négative de p53 (Castellino *et al.*, 2008). Bien que les mécanismes responsables de la surexpression de cette phosphatase soient relativement peu connus, il serait intéressant d'étudier si TF n'y jouerait pas un rôle.

3.2.3.2 La corrélation entre l'effet anti-apoptotique de HGF et l'expression de TF

Il existe une étroite association entre l'expression de TF et la malignité et, pour cette raison, TF est connu comme étant une composante importante de la progression tumorale (Hamada *et al.*, 1996; Guan *et al.*, 2002; Ueno *et al.*, 2000; Goldin-Lang *et al.*, 2008). De façon surprenante, nous avons observé que l'effet de HGF sur p53 était corrélé avec une

hausse d'expression de TF dans les cellules DAOY. Ce lien fut raffermi par l'utilisation de la technologie des ARN interférents (siRNA), avec laquelle nous avons démontré que la réduction de l'expression de TF permettait de rétablir la sensibilité des cellules DAOY à l'égard d'un traitement à l'étoposide. Ce résultat est tout à fait en accord avec la littérature, puisque d'autres équipes de recherche sont parvenues à démontrer le lien existant entre la perte d'expression de TF et la sensibilité à l'apoptose, ainsi que la survie cellulaire (Osterholm *et al.*, 2008). Nos travaux suggèrent donc qu'en absence de TF, HGF ne peut protéger les cellules DAOY de l'apoptose.

3.2.3.3 Signalisation induite par le complexe TF:FVIIa et résistance à l'apoptose

Plusieurs données provenant de la littérature suggèrent que le rôle anti-apoptotique de TF implique la formation du complexe TF:FVIIa. Ainsi, des études antérieures démontrent que ce complexe peut influencer différentes voies moléculaires selon le type de tumeurs. À titre d'exemple, dans le cancer du sein, le complexe TF:FVIIa inhibe l'apoptose en favorisant l'augmentation de la survivin par le biais de la voie des MAPK Erk-1/2 et AKT (Jiang *et al.*, 2006), alors que dans les neuroblastomes la signalisation induite par ce même complexe produit une augmentation d'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 via la voie de JAK/STAT5 (Fang *et al.*, 2008). Cependant, en ce qui concerne nos travaux effectués avec des cellules de MB, nous n'avons observé aucun effet sur les protéines survivin et Bcl-2 après la stimulation des cellules DAOY avec le FVIIa, suggérant que l'activation de la voie apoptotique par l'étoposide et son inhibition par le FVIIa se produisent au niveau des mécanismes régissant la voie extrinsèque de l'apoptose.

En revanche, cette stimulation des cellules DAOY avec le FVIIa produit sur la phosphorylation de la sérine 15 de p53 exactement le même effet que la stimulation avec HGF. Finalement, nous ne pouvons exclure que l'effet observé puisse également impliquer une signalisation produite par PAR-2, car il est démontré que le complexe TF:FVIIa agit

normalement en clivant et en activant le récepteur PAR-2 dans plusieurs types tumoraux (Schaffner et Ruf, 2008).

CHAPITRE IV

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

L'ensemble des travaux présentés dans cette thèse confirment que les désordres du système hémostatique représentent beaucoup plus qu'une simple conséquence associée au développement tumoral et que ces coagulopathies font plutôt partie intégrante des stratégies mises en place par le cancer pour assurer sa croissance. L'amélioration constante des connaissances sur la biologie et les multiples fonctions des multiples protéines de la coagulation, telle que TF et TFPI, permet de mieux comprendre les rôles joués par ces protéines dans la croissance tumorale. Par conséquent, le système de la coagulation sanguine dans son ensemble est maintenant perçu comme étant une cible thérapeutique potentielle pouvant être utilisée dans le traitement de certains cancers, particulièrement ceux du cerveau (Ornstein *et al.*, 2002). Toutefois, comme le chemin menant à la découverte de nouvelles thérapies est souvent très long, il est possible d'utiliser à court terme nos connaissances sur les différentes protéines de la coagulation afin de les exploiter en tant que marqueur diagnostique ou encore d'améliorer les traitements par l'utilisation de combinaisons thérapeutiques déjà disponibles.

La première partie de nos travaux sur TF ont permis de mettre en lumière une des voies de signalisation responsable de l'expression de cette protéine. Nous avons par la suite établi que la co-expression de TF et du récepteur Met dans des coupes histologiques de 18 tumeurs cliniques était associée aux phénotypes tumoraux les plus agressifs. Comme le diagnostic des tumeurs cérébrales et en particulier des MB repose encore de nos jours sur des critères d'histopathologie, la recherche de marqueurs est très importante (Crawford *et al.*, 2007; Polkinghorn et Tarbell, 2007). Le défi consiste à mettre au point des marqueurs

qui puissent permettre de lier un profil d'expression d'une ou de plusieurs protéines aux caractères agressifs de la tumeur. Ainsi, l'établissement de marqueurs toujours plus précis permet d'améliorer la stratification du risque encouru par les patients souffrant de ces tumeurs et augmente considérablement l'efficacité des traitements en optimisant les chances de succès et en minimisant les effets secondaires (Polkinghorn et Tarbell, 2007).

Éventuellement, nous espérons que ces protéines serviront également de cibles thérapeutiques et pas seulement de marqueurs diagnostiques. La mise au point de ces thérapies spécifiques est présentement en cours dans plusieurs groupes de recherche. À titre d'exemple, une méthode particulièrement intéressante permettant de cibler TF a été récemment dévoilée (Shoji *et al.*, 2008). Dans cette stratégie, le FVIIa fut couplé à un analogue synthétique de la curcumine et la très haute affinité du FVIIa, pour son récepteur TF, est utilisée afin de faire pénétrer la drogue, par internalisation du complexe TF:FVIIa, à l'intérieur des cellules tumorales. Une fois internalisée, la drogue induit la mort cellulaire. L'avantage majeur d'une telle approche provient de la haute spécificité de liaison du FVIIa pour TF et également du fait que l'expression aberrante de TF ne se produit qu'au niveau des cellules vasculaires anormales et les cellules malignes (Shoji *et al.*, 2008). L'utilisation d'une telle approche sera particulièrement intéressante dans l'avenir pour le traitement des tumeurs du SNC, puisque ces dernières expriment fortement TF et qu'elles sont particulièrement résistantes à l'apoptose induite par les traitements de chimiothérapie classiques.

Par ailleurs, nos observations au sujet de l'activité anti-apoptotique du complexe TF:FVIIa rend attrayante toute approche thérapeutique ciblant ces deux protéines et la signalisation qui en découle. En attendant le développement de ces nouvelles stratégies, certaines combinaisons thérapeutiques déjà existantes pourraient être tentées afin d'améliorer les chances de survie des patients. En effet, il est reconnu que les cellules cancéreuses expriment non seulement TF, mais synthétisent également le FVIIa (Koizume *et al.*, 2006). Puisque nos travaux démontrent que la formation de ce complexe est

nécessaire pour induire l'état pro-coagulant, la migration cellulaire ainsi que la résistance à l'apoptose, il est primordial d'empêcher sa formation. Un moyen d'y parvenir consiste à traiter les patients avec de faibles doses de la drogue anti-coagulante warfarin (Coumadin®), un inhibiteur de la synthèse des facteurs de coagulation dépendant de la vitamine K, dont le FVII (Sakata *et al.*, 1995). De cette manière, un pré-traitement aux anti-coagulants préviendrait la formation de FVIIa et éventuellement la formation du complexe TF:FVIIa, rendant ainsi plus efficace les traitements de chimiothérapie. Cette approche fut utilisée avec succès dans le cas de cancers du sein métastatiques et les résultats permettent de croire que cette combinaison de traitements pourrait être utilisée dans d'autres types de cancers (Falanga *et al.*, 1998).

À l'instar de TF, l'expression fonctionnelle de TFPI dans plusieurs types de cancers suggère que cette protéine joue un rôle important dans la biologie de plusieurs néoplasmes (Kurer, 2007). En revanche, si l'expression de TF dans l'environnement tumoral est synonyme de progression tumorale, la présence de TFPI signifie l'inverse. Au cours de nos travaux, nous nous sommes intéressés aux mécanismes pouvant expliquer le rôle anti-angiogénique de l'inhibiteur TFPI. Cependant, comme cela est observé pour plusieurs autres protéines hémostatiques, certains clivages enzymatiques peuvent produire des fragments peptidiques possédant des activités biologiques complètement différentes de la protéine initiale (ex. plasminogène et angiostatine). Ainsi, des études récentes indiquent qu'il existe dans la séquence protéique de TFPI un fragment peptidique de 23 acides aminés de la portion C-terminale qui, une fois libéré, possède des activités anti-tumorales et anti-métastatiques (Hembrough *et al.*, 2004). Les résultats de cette étude sont également confirmés par des travaux plus récents, cette fois décrivant les actions anti-métastatiques de la forme circulante et de la forme liée aux cellules tumorales de TFPI dans un modèle animal expérimental de formation de métastases pulmonaires (Amirkhosravi *et al.*, 2007). Toutefois, les mécanismes par lesquels cette action anti-tumorale de TFPI est réalisée demeurent encore incompris. Néanmoins, nos résultats concernant l'effet de TFPI sur la

migration et l'adhésion suggèrent que l'inhibition de l'angiogenèse constitue fort probablement l'une des principales actions anti-tumorales associées à cette protéine.

BIBLIOGRAPHIE

- Abe, K., Shoji, M., Chen, J., Bierhaus, A., Danave, I, Micko, C., Casper, K., Dillehay, D.L., Nawroth, P.P., Rickles, F.R. 1999. Regulation of vascular endothelial growth factor production and angiogenesis by the cytoplasmic tail of tissue factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(15):8663-8668.
- Abounader, R., Laterra, J. 2005. Scatter factor/hepatocyte growth factor in brain tumor growth and angiogenesis. *Neuro Oncol* **7**(4):436-451.
- Alexandrakis, M.G., Passam, F.J., Ganotakis, E., Dafnis. E., Dambaki, C., Konsolas, J., Kyriakou, D.S., Stathopoulos, E. 2004. Bone marrow microvascular density and angiogenic growth factors in multiple myeloma. *Clin Chem Lab Med* **42**(10):1122-1126.
- Alnemri, E.S., Livingston, D.J., Nicholson, D.W., Salvesen, G., Thornberry, N.A., Wong, W.W., Yuan, J. 1996. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* **87**(2):171.
- Ambrosini, G., Adida, C., Altieri, D.C. 1997. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med* **3**(8):917-921.
- Amirkhosravi, A., Meyer, T., Amaya, M., Davila, M., Mousa, S.A., Robson, T., Francis, J.L. 2007. The role of tissue factor pathway inhibitor in tumor growth and metastasis. *Semin Thromb Hemost* **33**(7): 643-652.
- Ang, C., Hauerstock, D., Guiot, M.C., Kasymjanova, G., Roberge, D., Kavan, P., Muanza, T. 2008. Characteristics and outcomes of medulloblastoma in adults. *Pediatr Blood Cancer* **51**(5):603-607.
- Armulik, A., Abramsson, A., Betsholtz, C. 2005. Endothelial/pericyte interactions. *Circ Res* **97**(6):512-523.
- Bajaj, M.S., Birktoft, J.J., Steer, S.A., Bajaj, S.P. 2001. Structure and biology of tissue factor pathway inhibitor. *Thromb Haemost* **86**(4):959-972.
- Bardos, H., Molnar, P., Csecsei, G., Adany, R. 1996. Fibrin deposition in primary and metastatic human brain tumours. *Blood Coagul Fibrinolysis* **7**(5):536-548.
- Belaouaj, A.A., Li, A., Wun, T.C., Welgus, H.G., Shapiro, S.D. 2000. Matrix metalloproteinases cleave tissue factor pathway inhibitor. Effects on coagulation. *J Biol Chem* **275**(35):27123-27128.

- Belting, M., Dorrell, M.I., Sandgren, S., Aguilar, E., Ahamed, J., Dorfleutner, A., Carmeliet, P., Mueller, B.M., Friedlander, M., Ruf, W. 2004. Regulation of angiogenesis by tissue factor cytoplasmic domain signaling. *Nat Med* **10**(5): 502-509.
- Bennett, M., Macdonald, K., Chan, S.W., Luzio, J.P., Simari, R., Weissberg, P. 1998. Cell surface trafficking of Fas: a rapid mechanism of p53-mediated apoptosis. *Science* **282**(5387):290-293.
- Benvenuti, S., Comoglio, P.M. 2007. The MET receptor tyrosine kinase in invasion and metastasis. *J Cell Physiol* **213**(2):316-325.
- Bergers, G., Benjamin, L.E. 2003. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* **3**(6):401-410.
- Birchmeier, C., Birchmeier, W., Gherardi, E., Vande, Woude, G.F. 2003. Met, metastasis, motility and more. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**(12):915-925.
- Birchmeier, C., Gherardi, E. 1998. Developmental roles of HGF/SF and its receptor, the c-Met tyrosine kinase. *Trends Cell Biol* **8**(10):404-410.
- Boatright, K.M., Salvesen, G.S. 2003. Mechanisms of caspase activation. *Curr Opin Cell Biol* **15**(6):725-731.
- Boccaccio, C., Comoglio, P.M. 2005. A functional role for hemostasis in early cancer development. *Cancer Res* **65**(19):8579-8582.
- Boccaccio, C., Medico, E. 2006. Cancer and blood coagulation. *Cell Mol Life Sci* **63**(9):1024-1027.
- Boccaccio, C., Sabatino, G., Medico, E., Girolami, F., Follenzi, A., Reato, G., Sottile, A., Naldini, L., Comoglio, P.M. 2005. The MET oncogene drives a genetic programme linking cancer to haemostasis. *Nature* **434**(7031):396-400.
- Bolanos-Garcia, V.M. 2005. MET meet adaptors: functional and structural implications in downstream signalling mediated by the Met receptor. *Mol Cell Biochem* **276** (1-2):149-157.
- Boldin, M.P., Varfolomeev, E.E., Pancer, Z., Mett, I.L., Camonis, J.H., Wallach, D. 1995. A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain. *J Biol Chem* **270**(14):7795-7798.

- Bouvard, V., Zaitchouk, T., Vacher, M., Duthu, A., Canivet, M., Choisy-Rossi, C., Nieruchalski, M., May, E. 2000. Tissue and cell-specific expression of the p53-target genes: bax, fas, mdm2 and waf1/p21, before and following ionising irradiation in mice. *Oncogene* **19**(5):649-660.
- Bowers, D.C., Fan, S., Walter, K.A., Abounader, R., Williams, J.A., Rosen, E.M., Laterra, J. 2000. Scatter factor/hepatocyte growth factor protects against cytotoxic death in human glioblastoma via phosphatidylinositol 3-kinase- and AKT-dependent pathways. *Cancer Res* **60**(15):4277-4283.
- Brawley, O.W., Berger, M.Z. 2008. Cancer and disparities in health: perspectives on health statistics and research questions. *Cancer* **113**(7 Suppl):1744-1754.
- Brodsky, S.V. 2002. Coagulation, fibrinolysis and angiogenesis: new insights from knockout mice. *Exp Nephrol* **10**(5-6):299-306.
- Browder, T., Folkman, J., Pirie-Shepherd, S. 2000. The hemostatic system as a regulator of angiogenesis. *J Biol Chem* **275**(3):1521-1524.
- Brummel, K.E., Paradis, S.G., Butenas, S., Mann, K.G. 2002. Thrombin functions during tissue factor-induced blood coagulation. *Blood* **100**(1):148-152.
- Butenas, S., Mann, K.G. 2002. *Blood coagulation. Biochemistry (Mosc)* **67**(1):3-12.
- Cai, W., Chen, X. 2006. Anti-angiogenic cancer therapy based on integrin alphavbeta3 antagonism. *Anticancer Agents Med Chem* **6**(5):407-428.
- Cameron, P.L., Ruffin, J.W., Bollag, R., Rasmussen, H., Cameron, R.S. 1997. Identification of caveolin and caveolin-related proteins in the brain. *J Neurosci* **17**(24):9520-9535.
- Campos, L., Rouault, J.P., Sabido, O., Oriol, P., Roubi, N., Vasselon, C., Archimbaud, E., Magaud, J.P., Guyotat, D. 1993. High expression of bcl-2 protein in acute myeloid leukemia cells is associated with poor response to chemotherapy. *Blood* **81**(11):3091-3096.
- Cao, Y. 2001. Endogenous angiogenesis inhibitors and their therapeutic implications. *Int J Biochem Cell Biol* **33**(4):357-369.
- Carlotti, C.G., Jr., Smith, C., Rutka, J.T. 2008. The molecular genetics of medulloblastoma: an assessment of new therapeutic targets. *Neurosurg Rev* **31**(4):359-369.

- Carmeliet, P. 2003. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* **9**(6):653-660.
- Carmeliet, P., Jain, R.K. 2000. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* **407**(6801):249-257.
- Carmeliet, P., Mackman, N., Moons, L., Luther, T., Gressens, P., Van Vlaenderen, I., Demunck, H., Kasper, M., Breier, G., Evrard, P., Muller, M., Risau, W., Edgington, T., Collen, D. 1996. Role of tissue factor in embryonic blood vessel development. *Nature* **383**(6595):73-75.
- Castellino, R.C., De Bortoli, M., Lu, X., Moon, S.H., Nguyen, T.A., Shepard, M.A., Rao, P.H., Donehower, L.A., Kim, J.Y. 2008. Medulloblastomas overexpress the p53-inactivating oncogene WIP1/PPM1D. *J Neurooncol* **86**(3):245-256.
- Chinnaiyan, A.M., O'Rourke, K., Tewari, M., Dixit, V.M. 1995. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* **81**(4):505-512.
- Chou, T.T., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M. 2000. A novel apoptotic pathway induced by nerve growth factor-mediated TrkA activation in medulloblastoma. *J Biol Chem* **275**(1):565-570.
- Conway, E.M., Collen, D., Carmeliet, P. 2001. Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovasc Res* **49**(3):507-521.
- Crawford, J.R., MacDonald, T.J., Packer, R.J. 2007. Medulloblastoma in childhood: new biological advances. *Lancet Neurol* **6**(12):1073-1085.
- Davie, E.W., Ratnoff, O.D. 1964. Waterfall Sequence for Intrinsic Blood Clotting. *Science* **145**:1310-1312.
- Davis, G.E., Senger, D.R. 2005. Endothelial extracellular matrix: biosynthesis, remodeling, and functions during vascular morphogenesis and neovessel stabilization. *Circ Res* **97**(11):1093-1107.
- De Cicco, M. 2004. The prothrombotic state in cancer: pathogenic mechanisms. *Crit Rev Oncol Hematol* **50**(3):187-196.
- Deng, Y., Chang, S. 2007. Role of telomeres and telomerase in genomic instability, senescence and cancer. *Lab Invest* **87**(11):1071-1076.
- DePinho, R.A. 2000. The age of cancer. *Nature* **408**(6809):248-254.

- Deryugina, E.I., Quigley, J.P. 2006. Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev* **25**(1):9-34.
- Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L., Wang, X. 2000. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* **102**(1):33-42.
- Duplan, S.M., Theoret, Y., Kenigsberg, R.L. 2002. Antitumor activity of fibroblast growth factors (FGFs) for medulloblastoma may correlate with FGF receptor expression and tumor variant. *Clin Cancer Res* **8**(1):246-257.
- Dyatlovitskaya, E.V., Kandyba, A.G. 2006. Role of biologically active sphingolipids in tumor growth. *Biochemistry (Mosc)* **71**(1):10-17.
- Eberhart, C.G., Tihan, T., Burger, P.C. 2000. Nuclear localization and mutation of beta-catenin in medulloblastomas. *J Neuropathol Exp Neurol* **59**(4):333-337.
- Ellison, D. 2002. Classifying the medulloblastoma: insights from morphology and molecular genetics. *Neuropathol Appl Neurobiol* **28**(4):257-282.
- Ellison, D.W., Onilude, O.E., Lindsey, J.C., Lusher, M.E., Weston, C.L., Taylor, R.E., Pearson, A.D., Clifford, S.C. 2005. beta-Catenin status predicts a favorable outcome in childhood medulloblastoma: the United Kingdom Children's Cancer Study Group Brain Tumour Committee. *J Clin Oncol* **23**(31):7951-7957.
- Eriksson, K., Magnusson, P., Dixelius, J., Claesson-Welsh, L., Cross, M.J. 2003. Angiostatin and endostatin inhibit endothelial cell migration in response to FGF and VEGF without interfering with specific intracellular signal transduction pathways. *FEBS Lett* **536**(1-3):19-24.
- Erman, M., Abali, H., Oran, B., Haznedaroglu, I.C., Canpinar, H., Kirazli, S., Celik, I. 2004. Tamoxifen-induced tissue factor pathway inhibitor reduction: a clue for an acquired thrombophilic state? *Ann Oncol* **15**(11):1622-1626.
- Esmon, C.T. 2003. The protein C pathway. *Chest* **124**(3 Suppl):26S-32S.
- Esmon, C.T., Gu, J.M., Xu, J., Qu, D., Stearns-Kurosawa, D.J., Kurosawa, S. 1999. Regulation and functions of the protein C anticoagulant pathway. *Haematologica* **84**(4):363-368.

- Ettelaie, C., Adam, J.M., James, N.J., Oke, A.O., Harrison, J.A., Bunce, T.D., Bruckdorfer, K.R. 1999. The role of the C-terminal domain in the inhibitory functions of tissue factor pathway inhibitor. *FEBS Lett* **463**(3):341-344.
- Falanga, A., Levine, M.N., Consonni, R., Gritti, G., Delaini, F., Oldani, E., Julian, J.A., Barbui, T. 1998. The effect of very-low-dose warfarin on markers of hypercoagulation in metastatic breast cancer: results from a randomized trial. *Thromb Haemost* **79**(1):23-27.
- Fan, S., Wang, J.A., Yuan, R.Q., Rockwell, S., Andres, J., Zlatapolskiy, A., Goldberg, I.D., Rosen, E.M. 1998. Scatter factor protects epithelial and carcinoma cells against apoptosis induced by DNA-damaging agents. *Oncogene* **17**(2):131-141.
- Fang, J., Gu, L., Zhu, N., Tang, H., Alvarado, C.S., Zhou, M. 2008. Tissue factor/FVIIa activates Bcl-2 and prevents doxorubicin-induced apoptosis in neuroblastoma cells. *BMC Cancer* **8**:69.
- Fernandez, P.M., Patierno, S.R., Rickles, F.R. 2004. Tissue factor and fibrin in tumor angiogenesis. *Semin Thromb Hemost* **30**(1):31-44.
- Ferrara, N., Kerbel, R.S. 2005. Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature* **438**(7070):967-974.
- Fidler, I.J. 2003. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer* **3**(6):453-458.
- Folkman, J. 1995. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* **1**(1):27-31.
- Folkman, J. 2003. Angiogenesis and apoptosis. *Semin Cancer Biol* **13**(2):159-167.
- Folkman, J. 2003. Angiogenesis inhibitors: a new class of drugs. *Cancer Biol Ther* **2**(4 Suppl 1):S127-133.
- Folkman, J. 2007. Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? *Nat Rev Drug Discov* **6**(4):273-286.
- Furie, B., Furie, B.C. 2008. Mechanisms of thrombus formation. *N Engl J Med* **359**(9):938-949.

- Futreal, P.A., Coin, L., Marshall, M., Down, T., Hubbard, T., Wooster, R., Rahman, N., Stratton, M.R. 2004. A census of human cancer genes. *Nat Rev Cancer* **4**(3):177-183.
- Gailani, D., Renné, T. 2007. The intrinsic pathway of coagulation: a target for treating thromboembolic disease? *J Thromb Haemost* **5**(6):1106-1112.
- Gilbertson, R., Wickramasinghe, C., Hernan, R., Balaji, V., Hunt, D., Jones-Wallace, D., Crolla, J., Perry, R., Lunec, J., Pearson, A., Ellison, D. 2001. Clinical and molecular stratification of disease risk in medulloblastoma. *Br J Cancer* **85**(5):705-712.
- Gilbertson, R.J., Clifford, S.C. 2003. PDGFRB is overexpressed in metastatic medulloblastoma. *Nat Genet* **35**(3):197-198.
- Gilbertson, R.J., Clifford, S.C., MacMeekin, W., Meekin, W., Wright, C., Perry, R.H., Kelly, P., Pearson, A.D., Lunec, J. 1998. Expression of the ErbB-neuregulin signaling network during human cerebellar development: implications for the biology of medulloblastoma. *Cancer Res* **58**(17):3932-3941.
- Gilbertson, R.J., Ellison, D.W. 2008. The origins of medulloblastoma subtypes. *Annu Rev Pathol* **3**:341-365.
- Goldin-Lang, P., Tran, Q.V., Fichtner, I., Eisenreich, A., Antoniak, S., Schulze, K., Coupland, S.E., Poller, W., Schultheiss, H.P., Rauch, U. 2008. Tissue factor expression pattern in human non-small cell lung cancer tissues indicate increased blood thrombogenicity and tumor metastasis. *Oncol Rep* **20**(1):123-128.
- Gomez-Manzano, C., Fueyo, J., Jiang, H., Glass, T.L., Lee, H.Y., Hu, M., Liu, J.L., Jasti, S.L., Liu, T.J., Conrad, C.A., Yung, W.K. 2003. Mechanisms underlying PTEN regulation of vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Ann Neurol* **53**(1):109-117.
- Gottlieb, T.M., Leal, J.F., Seger, R., Taya, Y., Oren, M. 2002. Cross-talk between Akt, p53 and Mdm2: possible implications for the regulation of apoptosis. *Oncogene* **21**(8):1299-1303.
- Goumnerova, L.C. 1996. Growth factor receptors and medulloblastoma. *J Neurooncol* **29**(1):85-89.
- Greaves, M. 2007. Darwinian medicine: a case for cancer. *Nat Rev Cancer* **7**(3):213-221.
- Green, D.R. 2005. Apoptotic pathways: ten minutes to dead. *Cell* **121**(5):671-674.

- Greenspon, J., Li, R., Xiao, L., Rao, J.N., Marasa, B.S., Strauch, E.D., Wang, J.Y., Turner, D.J. 2008. Sphingosine-1-Phosphate Protects Intestinal Epithelial Cells from Apoptosis Through the Akt Signaling Pathway. *Dig Dis Sci*.
- Griffin, M., Casadio, R., Bergamini, C.M. 2002. Transglutaminases: nature's biological glues. *Biochem J* **368**(Pt 2):377-396.
- Grotzer, M.A., Janss, A.J., Phillips, P.C., Trojanowski, J.Q. 2000. Neurotrophin receptor TrkC predicts good clinical outcome in medulloblastoma and other primitive neuroectodermal brain tumors. *Klin Padiatr* **212**(4):196-199.
- Guan, M., Jin, J., Su, B., Liu, W.W., Lu, Y. 2002. Tissue factor expression and angiogenesis in human glioma. *Clin Biochem* **35**(4):321-325.
- Guan, M., Su, B., Lu, Y. 2002. Quantitative reverse transcription-PCR measurement of tissue factor mRNA in glioma. *Mol Biotechnol* **20**(2):123-129.
- Guessous, F., Li, Y., Abounader, R. 2008. Signaling pathways in medulloblastoma. *J Cell Physiol* **217**(3):577-583.
- Guyton, C.A., Hall, J.E. 2003. Précis de physiologie médicale. Piccin, Deuxième édition française, Padoue, Italie.
- Hahn, W.C., Weinberg, R.A. 2002. Rules for making human tumor cells. *N Engl J Med* **347**(20):1593-1603.
- Hamada, K., Kuratsu, J., Saitoh, Y., Takeshima, H., Nishi, T., Ushio, Y. 1996. Expression of tissue factor correlates with grade of malignancy in human glioma. *Cancer* **77**(9):1877-1883.
- Hamasuna, R., Kataoka, H., Moriyama, T., Itoh, H., Seiki, M., Koono, M. 1999. Regulation of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) by hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) in human glioma cells: HGF/SF enhances MMP-2 expression and activation accompanying up-regulation of membrane type-1 MMP. *Int J Cancer* **82**(2):274-281.
- Hanahan, D., Folkman, J. 1996. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* **86**(3):353-364.
- Hanahan, D., Weinberg, R.A. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**(1):57-70.

- Hartmann, W., Koch, A., Brune, H., Waha, A., Schuller, U., Dani, I., Denkhaus, D., Langmann, W., Bode, U., Wiestler, O.D., Schilling, K., Pietsch, T. 2005. Insulin-like growth factor II is involved in the proliferation control of medulloblastoma and its cerebellar precursor cells. *Am J Pathol* **166**(4):1153-1162.
- Haupt, S., Berger, M., Goldberg, Z., Haupt, Y. 2003. Apoptosis - the p53 network. *J Cell Sci* **116**(Pt 20):4077-4085.
- Hayflick, L. 2000. The illusion of cell immortality. *Br J Cancer* **83**(7):841-846.
- Helmlinger, G., Yuan, F., Dellian, M., Jain, R.K. 1997. Interstitial pH and pO₂ gradients in solid tumors in vivo: high-resolution measurements reveal a lack of correlation. *Nat Med* **3**(2):177-182.
- Hembrough, T.A., Ruiz, J.F., Papathanassiou, A.E., Green, S.J., Strickland, D.K. 2001. Tissue factor pathway inhibitor inhibits endothelial cell proliferation via association with the very low density lipoprotein receptor. *J Biol Chem* **276**(15):12241-12248.
- Hembrough, T.A., Ruiz, J.F., Swerdlow, B.M., Swartz, G.M., Hammers, H.J., Zhang, L., Plum, S.M., Williams, M.S., Strickland, D.K., Pribluda, V.S. 2004. Identification and characterization of a very low density lipoprotein receptor-binding peptide from tissue factor pathway inhibitor that has antitumor and antiangiogenic activity. *Blood* **103**(9):3374-3380.
- Hengartner, M.O. 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature* **407**(6805):770-776.
- Hermine, O., Haioun, C., Lepage, E., d'Agay, M.F., Briere, J., Lavignac, C., Fillet, G., Salles, G., Marolleau, J.P., Diebold, J., Reyas, F., Gaulard, P. 1996. Prognostic significance of bcl-2 protein expression in aggressive non-Hodgkin's lymphoma. Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte (GELA). *Blood* **87**(1):265-272.
- Herynk, M.H., Zhang, J., Parikh, N.U., Gallick, G.E. 2007. Activation of Src by c-Met overexpression mediates metastatic properties of colorectal carcinoma cells. *J Exp Ther Oncol* **6**(3):205-217.
- Hida, K., Hida, Y., Amin, D.N., Flint, A.F., Panigrahy, D., Morton, C.C., Klagsbrun, M. 2004. Tumor-associated endothelial cells with cytogenetic abnormalities. *Cancer Res* **64**(22):8249-8255.
- Hiratsuka, S., Nakamura, K., Iwai, S., Murakami, M., Itoh, T., Kijima, H., Shipley, J.M., Senior, R.M., Shibuya, M. 2002. MMP9 induction by vascular endothelial growth factor receptor-1 is involved in lung-specific metastasis. *Cancer Cell* **2**(4):289-300.

- Hjortoe, G.M., Petersen, L.C., Albrektsen, T., Sorensen, B.B., Norby, P.L., Mandal, S.K., Pendurthi, U.R., Rao, L.V. 2004. Tissue factor-factor VIIa-specific up-regulation of IL-8 expression in MDA-MB-231 cells is mediated by PAR-2 and results in increased cell migration. *Blood* **103**(8):3029-3037.
- Hockenbery, D., Nunez, G., Milliman, C., Schreiber, R.D., Korsmeyer, S.J. 1990. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* **348**(6299):334-336.
- Holmgren, L., O'Reilly, M.S., Folkman, J. 1995. Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nat Med* **1**(2):149-153.
- Hsu, A.R., Veeravagu, A., Cai, W., Hou, L.C., Tse, V., Chen, X. 2007. Integrin alpha (v)beta (3) Antagonists for Anti-Angiogenic Cancer Treatment. *Recent Patents Anticancer Drug Discov* **2**(2):143-158.
- Huang, C., Jacobson, K., Schaller, M.D. 2004. MAP kinases and cell migration. *J Cell Sci* **117**(Pt 20):4619-4628.
- Huang, H., Mahler-Araujo, B.M., Sankila, A., Chimelli, L., Yonekawa, Y., Kleihues, P., Ohgaki, H. 2000. APC mutations in sporadic medulloblastomas. *Am J Pathol* **156**(2):433-437.
- Huang, Z.F., Higuchi, D., Lasky, N., Broze, G.J., Jr. 1997. Tissue factor pathway inhibitor gene disruption produces intrauterine lethality in mice. *Blood* **90**(3):944-951.
- Igney, F.H., Krammer, P.H. 2002. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer* **2**(4):277-288.
- Im, E., Kazlauskas, A. 2006. New insights regarding vessel regression. *Cell Cycle* **5**(18):2057-2059.
- Itoh, Y. 2006. MT1-MMP: a key regulator of cell migration in tissue. *IUBMB Life* **58**(10):589-596.
- Jackson, A.L., Loeb, L.A. 1998. The mutation rate and cancer. *Genetics* **148**(4):1483-1490.
- Jacobson, M.D., Weil, M., Raff, M.C. 1997. Programmed cell death in animal development. *Cell* **88**(3):347-354.

- Javerzat, S., Auguste, P., Bikfalvi, A. 2002. The role of fibroblast growth factors in vascular development. *Trends Mol Med* **8**(10):483-489.
- Jiang, X., Guo, Y.L., Bromberg, M.E. 2006. Formation of tissue factor-factor VIIa-factor Xa complex prevents apoptosis in human breast cancer cells. *Thromb Haemost* **96**(2):196-201.
- Kannan, K., Kaminski, N., Rechavi, G., Jakob-Hirsch, J., Amariglio, N., Givol, D. 2001. DNA microarray analysis of genes involved in p53 mediated apoptosis: activation of Apaf-1. *Oncogene* **20**(26):3449-3455.
- Kato, H. 2002. Regulation of functions of vascular wall cells by tissue factor pathway inhibitor: basic and clinical aspects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **22**(4):539-548.
- Kaufmann, S.H., Hengartner, M.O. 2001. Programmed cell death: alive and well in the new millennium. *Trends Cell Biol* **11**(12):526-534.
- Kenney, A.M., Rowitch, D.H. 2000. Sonic hedgehog promotes G(1) cyclin expression and sustained cell cycle progression in mammalian neuronal precursors. *Mol Cell Biol* **20**(23):9055-9067.
- Kerbel, R.S., Yu, J., Tran, J., Man, S., Vilorio-Petit, A., Klement, G., Coomber, B.L., Rak, J. 2001. Possible mechanisms of acquired resistance to anti-angiogenic drugs: implications for the use of combination therapy approaches. *Cancer Metastasis Rev* **20**(1-2):79-86.
- Koizume, S., Jin, M.S., Miyagi, E., Hirahara, F., Nakamura, Y., Piao, J.H., Asai, A., Yoshida, A., Tsuchiya, E., Ruf, W., Miyagi, Y. 2006. Activation of cancer cell migration and invasion by ectopic synthesis of coagulation factor VII. *Cancer Res* **66**(19):9453-9460.
- Kornblum, H.I., Hussain, R., Wiesen, J., Miettinen, P., Zurcher, S.D., Chow, K., Derynck, R., Werb, Z. 1998. Abnormal astrocyte development and neuronal death in mice lacking the epidermal growth factor receptor. *J Neurosci Res* **53**(6):697-717.
- Kornblum, H.I., Zurcher, S.D., Werb, Z., Derynck, R., Seroogy, K.B. 1999. Multiple trophic actions of heparin-binding epidermal growth factor (HB-EGF) in the central nervous system. *Eur J Neurosci* **11**(9):3236-3246.
- Koul, D. 2008. PTEN signaling pathways in glioblastoma. *Cancer Biol Ther* **7**(9):1321-1325.

- Kuhnen, C., Muehlberger, T., Honsel, M., Tolnay, E., Steinau, H.U., Muller, K.M. 2003. Impact of c-Met expression on angiogenesis in soft tissue sarcomas: correlation to microvessel-density. *J Cancer Res Clin Oncol* **129**(7):415-422.
- Kumar, S. 1995. ICE-like proteases in apoptosis. *Trends Biochem Sci* **20**(5):198-202.
- Kurer, M.A. 2007. Protein and mRNA expression of tissue factor pathway inhibitor-1 (TFPI-1) in breast, pancreatic and colorectal cancer cells. *Mol Biol Rep* **34**(4):221-224.
- Lamszus, K., Schmidt, N.O., Jin, L., Laterra, J., Zagzag, D., Way, D., Witte, M., Weinand, M., Goldberg, I.D., Westphal, M., Rosen, E.M. 1998. Scatter factor promotes motility of human glioma and neuromicrovascular endothelial cells. *Int J Cancer* **75**(1):19-28.
- Lavallee, M., Takamura, M., Parent, R., Thorin, E. 2001. Crosstalk between endothelin and nitric oxide in the control of vascular tone. *Heart Fail Rev* **6**(4):265-276.
- Lawler, J. 2002. Thrombospondin-1 as an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *J Cell Mol Med* **6**(1):1-12.
- Le Clainche, C., Carlier, M.F. 2008. Regulation of actin assembly associated with protrusion and adhesion in cell migration. *Physiol Rev* **88**(2):489-513.
- Lee, A.Y. 2002. Cancer and thromboembolic disease: pathogenic mechanisms. *Cancer Treat Rev* **28**(3):137-140.
- Lee, O.H., Kim, Y.M., Lee, Y.M., Moon, E.J., Lee, D.J., Kim, J.H., Kim, K.W., Kwon, Y.G. 1999. Sphingosine 1-phosphate induces angiogenesis: its angiogenic action and signaling mechanism in human umbilical vein endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **264**(3):743-750.
- Li, Y., Guessous, F., Johnson, E.B., Eberhart, C.G., Li, X.N., Shu, Q., Fan, S., Lal, B., Laterra, J., Schiff, D., Abounader, R. 2008. Functional and molecular interactions between the HGF/c-Met pathway and c-Myc in large-cell medulloblastoma. *Lab Invest* **88**(2):98-111.
- Li, Y., Lal, B., Kwon, S., Fan, X., Saldanha, U., Reznik, T.E., Kuchner, E.B., Eberhart, C., Laterra, J., Abounader, R. 2005. The scatter factor/hepatocyte growth factor: c-met pathway in human embryonal central nervous system tumor malignancy. *Cancer Res* **65**(20):9355-9362.

- Libermann, T.A., Nusbaum, H.R., Razon, N., Kris, R., Lax, I., Soreq, H., Whittle, N., Waterfield, M.D., Ullrich, A., Schlessinger, J. 1985. Amplification, enhanced expression and possible rearrangement of EGF receptor gene in primary human brain tumours of glial origin. *Nature* **313**(5998):144-147.
- Lopez-Pedrerera, C., Barbarroja, N., Dorado, G., Siendones, E., Velasco, F. 2006. Tissue factor as an effector of angiogenesis and tumor progression in hematological malignancies. *Leukemia* **20**(8):1331-1340.
- Loreto, M.F., De Martinis, M., Corsi, M.P., Modesti, M., Ginaldi, L. 2000. Coagulation and cancer: implications for diagnosis and management. *Pathol Oncol Res* **6**(4):301-312.
- Lupu, C., Goodwin, C.A., Westmuckett, A.D., Emeis, J.J., Scully, M.F., Kakkar, V.V., Lupu, F. 1997. Tissue factor pathway inhibitor in endothelial cells colocalizes with glycolipid microdomains/caveolae. Regulatory mechanism(s) of the anticoagulant properties of the endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **17**(11):2964-2974.
- Lwaleed, B.A., Bass, P.S. 2006. Tissue factor pathway inhibitor: structure, biology and involvement in disease. *J Pathol* **208**(3):327-339.
- Macfarlane, R.G. 1964. An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biochemical amplifier. *Nature* **202**:498-499.
- Mackman, N. 2004. Role of tissue factor in hemostasis, thrombosis, and vascular development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24**(6):1015-1022.
- Maruyama, I. 1998. Biology of endothelium. *Lupus* **7** Suppl 2:S41-43.
- Mayer, B., Oberbauer, R. 2003. Mitochondrial regulation of apoptosis. *News Physiol Sci* **18**:89-94.
- Mayo, L.D., Donner, D.B. 2001. A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(20):11598-11603.
- Mayo, L.D., Donner, D.B. 2002. The PTEN, Mdm2, p53 tumor suppressor-oncoprotein network. *Trends Biochem Sci* **27**(9):462-467.
- McCarty, M.F., Liu, W., Fan, F., Parikh, A., Reimuth, N., Stoeltzing, O., Ellis, L.M. 2003. Promises and pitfalls of anti-angiogenic therapy in clinical trials. *Trends Mol Med* **9**(2):53-58.

- McVey, J.H. 1999. Tissue factor pathway. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol* **12**(3):361-372.
- Meier, P., Finch, A., Evan, G. 2000. Apoptosis in development. *Nature* **407**(6805):796-801.
- Michiels, C. 2003. Endothelial cell functions. *J Cell Physiol* **196**(3):430-443.
- Migliore, C., Giordano, S. 2008. Molecular cancer therapy: can our expectation be MET? *Eur J Cancer* **44**(5):641-651.
- Mitra, S.K., Hanson, D.A., Schlaepfer, D.D. 2005. Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**(1):56-68.
- Moreau, M.E., Garbacki, N., Molinaro, G., Brown, N.J., Marceau, F., Adam, A. 2005. The kallikrein-kinin system: current and future pharmacological targets. *J Pharmacol Sci* **99**(1):6-38.
- Moriyama, T., Kataoka, H., Hamasuna, R., Yokogami, K., Uehara, H., Kawano, H., Goya, T., Tsubouchi, H., Koono, M., Wakisaka, S. 1998. Up-regulation of vascular endothelial growth factor induced by hepatocyte growth factor/scatter factor stimulation in human glioma cells. *Biochem Biophys Res Commun* **249**(1):73-77.
- Mousa, S.A. 2004. Low-molecular-weight heparin in thrombosis and cancer. *Semin Thromb Hemost* **30** Suppl 1:25-30.
- Mousa, S.A., Mohamed, S. 2004. Anti-angiogenic mechanisms and efficacy of the low molecular weight heparin, tinzaparin: anti-cancer efficacy. *Oncol Rep* **12**(4):683-688.
- Muchmore, S.W., Sattler, M., Liang, H., Meadows, R.P., Harlan, J.E., Yoon, H.S., Nettesheim, D., Chang, B.S., Thompson, C.B., Wong, S.L., Ng, S.L., Fesik, S.W. 1996. X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death. *Nature* **381**(6580):335-341.
- Muller, M., Wilder, S., Bannasch, D., Israeli, D., Lehlbach, K., Li-Weber, M., Friedman, S.L., Galle, P.R., Stremmel, W., Oren, M., Krammer, P.H. 1998. p53 activates the CD95 (APO-1/Fas) gene in response to DNA damage by anticancer drugs. *J Exp Med* **188**(11):2033-2045.
- Muzio, M. 1998. Signalling by proteolysis: death receptors induce apoptosis. *Int J Clin Lab Res* **28**(3):141-147.

- Nagata, S. 1997. Apoptosis by death factor. *Cell* **88**(3):355-365.
- Nagy, J.A., Benjamin, L., Zeng, H., Dvorak, A.M., Dvorak, H.F. 2008. Vascular permeability, vascular hyperpermeability and angiogenesis. *Angiogenesis* **11**(2):109-119.
- Nicholson, D.W., Thornberry, N.A. 1997. Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci* **22**(8):299-306.
- Nijziel, M.R., van Oerle, R., Hillen, H.F., Hamulyak, K. 2006. From Trousseau to angiogenesis: the link between the haemostatic system and cancer. *Neth J Med* **64**(11):403-410.
- Norris, L.A. 2003. Blood coagulation. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* **17**(3):369-383.
- Nugent, M.A., Iozzo, R.V. 2000. Fibroblast growth factor-2. *Int J Biochem Cell Biol* **32**(2):115-120.
- O'Reilly, M.S., Boehm, T., Shing, Y., Fukai, N., Vasios, G., Lane, W.S., Flynn, E., Birkhead, J.R., Olsen, B.R., Folkman, J. 1997. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* **88**(2):277-285.
- O'Reilly, M.S., Holmgren, L., Chen, C., Folkman, J. 1996. Angiostatin induces and sustains dormancy of human primary tumors in mice. *Nat Med* **2**(6):689-692.
- Oganesian, A., Armstrong, L.C., Migliorini, M.M., Strickland, D.K., Bornstein, P. 2008. Thrombospondins use the VLDL receptor and a nonapoptotic pathway to inhibit cell division in microvascular endothelial cells. *Mol Biol Cell* **19**(2):563-571.
- Ohta, T., Watanabe, T., Katayama, Y., Kurihara, J., Yoshino, A., Nishimoto, H., Kishimoto, H. 2006. TrkA expression is associated with an elevated level of apoptosis in classic medulloblastomas. *Neuropathology* **26**(3):170-177.
- Ornstein, D.L., Meehan, K.R., Zacharski, L.R. 2002. The coagulation system as a target for the treatment of human gliomas. *Semin Thromb Hemost* **28**(1):19-28.
- Osterholm, C., Li, S., Ekberg, H., Hedner, U., Holgersson, J. 2008. Downregulation of tissue factor (TF) by RNA interference induces apoptosis and impairs cell survival of primary endothelium and tumor cells. *Cell Tissue Res* **334**(1):93-102.

- Ott, I., Weigand, B., Michl, R., Seitz, I., Sabbari-Erfani, N., Neumann, F.J., Schomig, A. 2005. Tissue factor cytoplasmic domain stimulates migration by activation of the GTPase Rac1 and the mitogen-activated protein kinase p38. *Circulation* **111**(3):349-355.
- Ow, Y.L., Green, D.R., Hao, Z., Mak, T.W. 2008. Cytochrome c: functions beyond respiration. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**(7):532-542.
- Paik, J.H., Chae, S., Lee, M.J., Thangada, S., Hla, T. 2001. Sphingosine 1-phosphate-induced endothelial cell migration requires the expression of EDG-1 and EDG-3 receptors and Rho-dependent activation of alpha vbeta3- and beta1-containing integrins. *J Biol Chem* **276**(15):11830-11837.
- Pedersen, B., Holscher, T., Sato, Y., Pawlinski, R., Mackman, N. 2005. A balance between tissue factor and tissue factor pathway inhibitor is required for embryonic development and hemostasis in adult mice. *Blood* **105**(7):2777-2782.
- Peters, K., Troyer, D., Kummer, S., Kirkpatrick, C.J., Rauterberg, J. 2002. Apoptosis causes lumen formation during angiogenesis in vitro. *Microvasc Res* **64**(2):334-338.
- Peto, J. 2001. Cancer epidemiology in the last century and the next decade. *Nature* **411**(6835):390-395.
- Pietsch, T., Waha, A., Koch, A., Kraus, J., Albrecht, S., Tonn, J., Sorensen, N., Berthold, F., Henk, B., Schmandt, N., Wolf, H.K., von Deimling, A., Wainwright, B., Chenevix-Trench, G., Wiestler, O.D., Wicking, C. 1997. Medulloblastomas of the desmoplastic variant carry mutations of the human homologue of Drosophila patched. *Cancer Res* **57**(11):2085-2088.
- Pinotti, M., Bertolucci, C., Portaluppi, F., Colognesi, I., Frigato, E., Foa, A., Bernardi, F. 2005. Daily and circadian rhythms of tissue factor pathway inhibitor and factor VII activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **25**(3):646-649.
- Pirie-Shepherd, S.R. 2003. Regulation of angiogenesis by the hemostatic system. *Front Biosci* **8**:d286-293.
- Piro, O., Broze, G.J., Jr. 2004. Role for the Kunitz-3 domain of tissue factor pathway inhibitor-alpha in cell surface binding. *Circulation* **110**(23):3567-3572.
- Polkinghorn, W.R., Tarbell, N.J. 2007. Medulloblastoma: tumorigenesis, current clinical paradigm, and efforts to improve risk stratification. *Nat Clin Pract Oncol* **4**(5):295-304.

- Price, G.C., Thompson, S.A., Kam, P.C. 2004. Tissue factor and tissue factor pathway inhibitor. *Anaesthesia* **59**(5):483-492.
- Raffel, C., Jenkins, R.B., Frederick, L., Hebrink, D., Alderete, B., Fults, D.W., James, C.D. 1997. Sporadic medulloblastomas contain PTCH mutations. *Cancer Res* **57**(5):842-845.
- Rak, J., Milsom, C., Yu, J. 2008. Tissue factor in cancer. *Curr Opin Hematol* **15**(5):522-528.
- Rak, J., Yu, J.L., Luyendyk, J., Mackman, N. 2006. Oncogenes, trousseau syndrome, and cancer-related changes in the coagulome of mice and humans. *Cancer Res* **66**(22):10643-10646.
- Ramsay, A.G., Marshall, J.F., Hart, I.R. 2007. Integrin trafficking and its role in cancer metastasis. *Cancer Metastasis Rev* **26**(3-4):567-578.
- Ren, B., Yee, K.O., Lawler, J., Khosravi-Far, R. 2006. Regulation of tumor angiogenesis by thrombospondin-1. *Biochim Biophys Acta* **1765**(2):178-188.
- Renne, T., Nieswandt, B., Gailani, D. 2006. The intrinsic pathway of coagulation is essential for thrombus stability in mice. *Blood Cells Mol Dis* **36**(2):148-151.
- Ribatti, D., Nico, B., Vacca, A., Roncali, L., Dammacco, F. 2002. Endothelial cell heterogeneity and organ specificity. *J Hematother Stem Cell Res* **11**(1):81-90.
- Rickles, F.R., Falanga, A. 2001. Molecular basis for the relationship between thrombosis and cancer. *Thromb Res* **102**(6):V215-224.
- Risau, W. 1997. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* **386**(6626):671-674.
- Risau, W., Flamme, I. 1995. Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* **11**:73-91.
- Rodriguez, J., Lazebnik, Y. 1999. Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme. *Genes Dev* **13**(24):3179-3184.
- Rong, Y., Hu, F., Huang, R., Mackman, N., Horowitz, J.M., Jensen, R.L., Durden, D.L., Van Meir, E.G., Brat, D.J. 2006. Early growth response gene-1 regulates hypoxia-induced expression of tissue factor in glioblastoma multiforme through hypoxia-inducible factor-1-independent mechanisms. *Cancer Res* **66**(14):7067-7074.

- Rong, Y., Post, D.E., Pieper, R.O., Durden, D.L., Van Meir, E.G., Brat, D.J. 2005. PTEN and hypoxia regulate tissue factor expression and plasma coagulation by glioblastoma. *Cancer Res* **65**(4):1406-1413.
- Roskoski, R., Jr. 2008. VEGF receptor protein-tyrosine kinases: structure and regulation. *Biochem Biophys Res Commun* **375**(3):287-291.
- Rossi, A., Caracciolo, V., Russo, G., Reiss, K., Giordano, A. 2008. Medulloblastoma: from molecular pathology to therapy. *Clin Cancer Res* **14**(4):971-976.
- Rothschild, B.M., Tanke, D., Hershkovitz, I., Schultz, M. 1998. Mesozoic neoplasia: origins of haemangioma in the Jurassic age. *Lancet* **351**(9119):1862.
- Rothschild, B.M., Witzke, B.J., Hershkovitz, I. 1999. Metastatic cancer in the Jurassic. *Lancet* **354**(9176):398.
- Sakata, T., Kario, K., Matsuo, T., Katayama, Y., Matsuyama, T., Kato, H., Miyata, T. 1995. Suppression of plasma-activated factor VII levels by warfarin therapy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **15**(2):241-246.
- Sakuma, M., Fukui, S., Nakamura, M., Takahashi, T., Kitamukai, O., Yazu, T., Yamada, N., Ota, M., Kobayashi, T., Nakano, T., Shirato, K. 2006. Cancer and pulmonary embolism: thrombotic embolism, tumor embolism, and tumor invasion into a large vein. *Circ J* **70**(6):744-749.
- Schaffner, F., Ruf, W. 2008. Tissue factor and protease-activated receptor signaling in cancer. *Semin Thromb Hemost* **34**(2):147-153.
- Schlumberger, H.G., Lucke, B.H. 1948. Tumors of fishes, amphibians, and reptiles. *Cancer Res* **8**(12):657-753.
- Scoazec, J. 2000. [Tumor angiogenesis]. *Ann Pathol* **20**(1):25-37.
- Segura, I., Serrano, A., De Buitrago, G.G., Gonzalez, M.A., Abad, J.L., Claveria, C., Gomez, L., Bernad, A., Martinez, A.C., Riese, H.H. 2002. Inhibition of programmed cell death impairs in vitro vascular-like structure formation and reduces in vivo angiogenesis. *FASEB J* **16**(8):833-841.
- Sevinsky, J.R., Rao, L.V., Ruf, W. 1996. Ligand-induced protease receptor translocation into caveolae: a mechanism for regulating cell surface proteolysis of the tissue factor-dependent coagulation pathway. *J Cell Biol* **133**(2):293-304.

- Shibuya, M. 2006. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-Receptor2: its biological functions, major signaling pathway, and specific ligand VEGF-E. *Endothelium* **13**(2):63-69.
- Shibuya, M., Claesson-Welsh, L. 2006. Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Exp Cell Res* **312**(5):549-560.
- Shieh, S.Y., Ikeda, M., Taya, Y., Prives, C. 1997. DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell* **91**(3):325-334.
- Shim, W.S., Ho, I.A., Wong, P.E. 2007. Angiopoietin: a TIE(d) balance in tumor angiogenesis. *Mol Cancer Res* **5**(7):655-665.
- Shimura, M., Wada, H., Nakasaki, T., Hiyoyama, K., Mori, Y., Nishikawa, M., Deguchi, H., Deguchi, K., Gabazza, E.C., Shiku, H. 1999. Increased truncated form of plasma tissue factor pathway inhibitor levels in patients with disseminated intravascular coagulation. *Am J Hematol* **60**(2):94-98.
- Shoji, M., Sun, A., Kisiel, W., Lu, Y.J., Shim, H., McCarey, B.E., Nichols, C., Parker, E.T., Pohl, J., Mosley, C.A., Alizadeh, A.R., Liotta, D.C., Snyder, J.P. 2008. Targeting tissue factor-expressing tumor angiogenesis and tumors with EF24 conjugated to factor VIIa. *J Drug Target* **16**(3):185-197.
- Simons, K., Toomre, D. 2000. Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**(1):31-39.
- Simpson-Haidaris, P.J., Rybarczyk, B. 2001. Tumors and fibrinogen. The role of fibrinogen as an extracellular matrix protein. *Ann N Y Acad Sci* **936**:406-425.
- Singh, V.P., McNiven, M.A. 2008. Src-mediated cortactin phosphorylation regulates actin localization and injurious blebbing in acinar cells. *Mol Biol Cell* **19**(5):2339-2347.
- Slongo, M.L., Molena, B., Brunati, A.M., Frasson, M., Gardiman, M., Carli, M., Perilongo, G., Rosolen, A., Onisto, M. 2007. Functional VEGF and VEGF receptors are expressed in human medulloblastomas. *Neuro Oncol* **9**(4):384-392.
- Soengas, M.S., Capodici, P., Polsky, D., Mora, J., Esteller, M., Opitz-Araya, X., McCombie, R., Herman, J.G., Gerald, W.L., Lazebnik, Y.A., Cordon-Cardo, C., Lowe, S.W. 2001. Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma. *Nature* **409**(6817):207-211.

- Sonnenberg, E., Meyer, D., Weidner, K.M., Birchmeier, C. 1993. Scatter factor/hepatocyte growth factor and its receptor, the c-met tyrosine kinase, can mediate a signal exchange between mesenchyme and epithelia during mouse development. *J Cell Biol* **123**(1):223-235.
- Sorensen, B.B., Rao, L.V., Tornehave, D., Gammeltoft, S., Petersen, L.C. 2003. Antiapoptotic effect of coagulation factor VIIa. *Blood* **102**(5):1708-1715.
- Soussi, T., Lozano, G. 2005. p53 mutation heterogeneity in cancer. *Biochem Biophys Res Commun* **331**(3):834-842.
- Spronk, H.M., Govers-Riemslog, J.W., ten Cate, H. 2003. The blood coagulation system as a molecular machine. *Bioessays* **25**(12):1220-1228.
- Stennicke, H.R., Deveraux, Q.L., Humke, E.W., Reed, J.C., Dixit, V.M., Salvesen, G.S. 1999. Caspase-9 can be activated without proteolytic processing. *J Biol Chem* **274**(13):8359-8362.
- Streubel, B., Chott, A., Huber, D., Exner, M., Jager, U., Wagner, O., Schwarzingler, I. 2004. Lymphoma-specific genetic aberrations in microvascular endothelial cells in B-cell lymphomas. *N Engl J Med* **351**(3):250-259.
- Stupack, D.G., Chersesh, D.A. 2004. Integrins and angiogenesis. *Curr Top Dev Biol* **64**:207-238.
- Susin, S.A., Lorenzo, H.K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B.E., Brothers, G.M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., Larochette, N., Goodlett, D.R., Aebersold, R., Siderovski, D.P., Penninger, J.M., Kroemer, G. 1999. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* **397**(6718):441-446.
- Takahashi, S., Sakai, J., Fujino, T., Hattori, H., Zenimaru, Y., Suzuki, J., Miyamori, I., Yamamoto, T.T. 2004. The very low-density lipoprotein (VLDL) receptor: characterization and functions as a peripheral lipoprotein receptor. *J Atheroscler Thromb* **11**(4):200-208.
- Takano, S., Tsuboi, K., Tomono, Y., Mitsui, Y., Nose, T. 2000. Tissue factor, osteopontin, alphavbeta3 integrin expression in microvasculature of gliomas associated with vascular endothelial growth factor expression. *Br J Cancer* **82**(12):1967-1973.

- Takeya, H., Gabazza, E.C., Aoki, S., Ueno, H., Suzuki, K. 2003. Synergistic effect of sphingosine 1-phosphate on thrombin-induced tissue factor expression in endothelial cells. *Blood* **102**(5):1693-1700.
- Takuwa, Y., Takuwa, N., Sugimoto, N. 2002. The Edg family G protein-coupled receptors for lysophospholipids: their signaling properties and biological activities. *J Biochem* **131**(6):767-771.
- Teitz, T., Wei, T., Valentine, M.B., Vanin, E.F., Grenet, J., Valentine, V.A., Behm, F.G., Look, A.T., Lahti, J.M., Kidd, V.J. 2000. Caspase 8 is deleted or silenced preferentially in childhood neuroblastomas with amplification of MYCN. *Nat Med* **6**(5):529-535.
- Thomas, C.M., Smart, E.J. 2008. Caveolae structure and function. *J Cell Mol Med* **12**(3):796-809.
- Thornberry, N.A. 1997. The caspase family of cysteine proteases. *Br Med Bull* **53**(3):478-490.
- Ueno, T., Toi, M., Koike, M., Nakamura, S., Tominaga, T. 2000. Tissue factor expression in breast cancer tissues: its correlation with prognosis and plasma concentration. *Br J Cancer* **83**(2):164-170.
- van Hinsbergh, V.W., Collen, A., Koolwijk, P. 2001. Role of fibrin matrix in angiogenesis. *Ann N Y Acad Sci* **936**:426-437.
- Varki, A. 2007. Trousseau's syndrome: multiple definitions and multiple mechanisms. *Blood* **110**(6):1723-1729.
- Verhagen, A.M., Ekert, P.G., Pakusch, M., Silke, J., Connolly, L.M., Reid, G.E., Moritz, R.L., Simpson, R.J., Vaux, D.L. 2000. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* **102**(1):43-53.
- Versteeg, H.H., Spek, C.A., Richel, D.J., Peppelenbosch, M.P. 2004. Coagulation factors VIIa and Xa inhibit apoptosis and anoikis. *Oncogene* **23**(2):410-417.
- Vousden, K.H. 2000. p53: death star. *Cell* **103**(5):691-694.
- Wang, H., Keiser, J.A. 2000. Hepatocyte growth factor enhances MMP activity in human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **272**(3):900-905.

- Wechsler-Reya, R., Scott, M.P. 2001. The developmental biology of brain tumors. *Annu Rev Neurosci* **24**:385-428.
- Weinberg, A. R. 2007. The biology of cancer. Garland-Science, Taylor and Francis Group, New-York.
- Wen, P.Y., Kesari, S. 2008. Malignant gliomas in adults. *N Engl J Med* **359**(5):492-507.
- Wen, S., Stolarov, J., Myers, M.P., Su, J.D., Wigler, M.H., Tonks, N.K., Durden, D.L. 2001. PTEN controls tumor-induced angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(8):4622-4627.
- Wheelock, M.J., Shintani, Y., Maeda, M., Fukumoto, Y., Johnson, K.R. 2008. Cadherin switching. *J Cell Sci* **121**(Pt 6):727-735.
- Wickstrom, S.A., Veikkola, T., Rehn, M., Pihlajaniemi, T., Alitalo, K., Keski-Oja, J. 2001. Endostatin-induced modulation of plasminogen activation with concomitant loss of focal adhesions and actin stress fibers in cultured human endothelial cells. *Cancer Res* **61**(17):6511-6516.
- Wojtukiewicz, M.Z., Sierko, E., Klement, P., Rak, J. 2001. The hemostatic system and angiogenesis in malignancy. *Neoplasia* **3**(5):371-384.
- Wojtukiewicz, M.Z., Sierko, E., Rak, J. 2004. Contribution of the hemostatic system to angiogenesis in cancer. *Semin Thromb Hemost* **30**(1):5-20.
- Xin, X., Yang, S., Ingle, G., Zlot, C., Rangell, L., Kowalski, J., Schwall, R., Ferrara, N., Gerritsen, M.E. 2001. Hepatocyte growth factor enhances vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis in vitro and in vivo. *Am J Pathol* **158**(3):1111-1120.
- Ziche, M., Donnini, S., Morbidelli, L. 2004. Development of new drugs in angiogenesis. *Curr Drug Targets* **5**(5):485-493.
- Zwick, E., Bange, J., Ullrich, A. 2002. Receptor tyrosine kinases as targets for anticancer drugs. *Trends Mol Med* **8**(1):17-23.

