



Thèse de Doctorat de l'Université Paris VI

École Doctorale "Physiologie et Physiopathologie"

Responsable: Pr. Philippe CARDOT

Présentée par

Mlle. Clara GRIJELMO OLABARRIA

**SIGNALISATION ET IMPLICATION DE BMP-7
DANS L'INVASION CELLULAIRE ET LA
CARCINOGENÈSE COLIQUE**

Directeur de Thèse : Dr. Christian GESPACH

Soutenue le 18 septembre 2007

Devant le jury composé de:

Pr. Michel RAYMONDJEAN
Pr. Pierre MARIE
Dr. Guillemette HUET
Dr. Paul COPPO
Dr. Christian GESPACH

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Directeur de Thèse

Je ne crois pas que nous ayons un lien de parenté
Mais si vous êtes capables de trembler d'indignation
À chaque fois qu'une injustice est faite dans le monde
Alors nous serons compagnons
Et cela est le plus important

Ernesto « Che » Guevara (1964)

REMERCIEMENTS

Je remercie tout d'abord les membres du jury d'avoir accepté de faire partie de cette soutenance de thèse.

J'exprime ma sincère reconnaissance au Dr. Christian GESPACH pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et pour avoir dirigé ce travail. Je le remercie pour son soutien et sa grande disponibilité.

Je remercie particulièrement le Dr. Christelle RODRIGUE qui m'a encadré durant mon D.E.A. Elle est aujourd'hui une excellente amie toujours si critique et si bienveillante.

Un grand merci à tous les « anciens » qui ont, petit à petit, quitté le nid : Dr. Sylvie RODRIGUES, Dr. Nathalie LE FLOCH, Dr. Christine RIVAT, Nicolas ROULLET, Dr. Asmâa FRITAH, Marion BIELLI, Guillemette RAMEY, Dr. Samir ATTOUB et Dr. Frédérique SOUAZE. Je voudrais leur dire que sans eux ça aurait été difficile d'arriver jusqu'au bout. Ah oui ! Des conseils, de l'amitié, des soirées, des mariages et des vacances !

Merci à mes amis et collègues Nouridine FARESSSE, Christine DEMANGE et Asma ETTAHAR, pour leur soutien et leur bonne humeur. Ils ont commencé avec moi cette aventure au sein de l'INSERM U673, et je leur souhaite d'obtenir le titre de docteur avant la fin 2007. Courage !

Je n'oublie pas mes amis et collègues Aurélie COURTIN, Sandra DUPOUY, Conni BLEI, Jean Pierre ROPERCH, Frédéric CAILLE, Stéphane ZALINSKI, Karima EL OUADRANI, Aurélie JONQUOY et Audrey GILLET qui ont dû me supporter ces dernières années,. Je les remercie pour tous les bons moments. Je leur souhaite de tout mon cœur une bonne continuation, dans la recherche et dans la vie tout court. Oui ! il y a de la vie en dehors de ces portes ! Souligner aussi la patience et disponibilité de certaines (Aurélie et Sandra) à corriger mon français pourri...

J'adresse aussi toute ma sympathie à tous les membres de l'unité 673 pour leur accueil chaleureux et leurs critiques constructives.

Du Dr. Quang-dé NGUYEN, quoi dire... ? Qu'est-ce que j'aurais fait sans lui ? Merci pour tout.

Ce n'est pas nécessaire. Je le sais. Ils le savent. Mais tout de même... Un grand merci à mes parents pour leur éducation et leur soutien. Sans eux je ne serais sûrement pas là aujourd'hui.

Sans oublier ma « famille » à Paris : Myriam ESCOBAR, Aida MENENDEZ, Lucas RAVAUUX, Marjolaine GOSSET, Stéphanie CABASSUD, Cécile OLIN et Olivia RAJABALY. Je n'oublie pas leur présence dans les moments les plus durs.

Enfin, je dédie cette thèse à mes deux grand-mères, Mercedes MATTERN et Maria Teresa BAYO. Je sais qu'elles sont extrêmement fières de moi.

LISTE DES ABRÉVIATIONS

α-sma : alpha-Smooth Muscle Actin	LIMK1 : LIM-domain containing protein Kinase
ACF : Aberrant Crypt Foci	LOH : Loss Of Heterozygosity
ActR : Activine Receptor	
ADN : Acide DesoxyriboNucleique	MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase
ALK : Activin-Like receptor Kinase	MEC : Matrice Extracellulaire
APC : Adenomatous Polyposis Coli	MH1 : Mad Homology domain 1
ARN : Acide RiboNucleique	MH2 : Mad Homology domain 2
ATF-2 : Activated Transcription Factor 2	MLC : Myosin Light Chain
	MMP : MetalloProtéases Matricielles
BMP : Bone Morphogenetic Protein	MSI : Instabilité des loci microsatellites
BMPR : Bone Morphogenetic Protein Receptor	
CC : Cancer du côlon	NES : Nuclear Export Sequence
COX : Cyclooxygenase	NLS : Nuclear Localization Sequence
	Np-1 : Neupiline 1
EGF : Epidermal Growth Factor	Np-2 : NeuroPiline 2
ERK : Extracellular-signal Regulated Kinase	
FAK : Focal Adhesion Kinase	PDGF : Platelet Derived Growth Factor
FAP : Polypose Adénomateuse Familiale	PI3K : Phosphatidyl-Inositol 3-OH Kinase
FGF : Fibroblast Growth Factor	
GAP : GTPase-Activating Protein	SBE : Smad Binding Element
GDF : Growth and Differentiation Factor	SH2 : Src Homology domain 2
GDI : Guanine Nucleotide Dissociation Inhibitors	SH3 : Src Homology domain 3
GEF : Guanine nucleotide Exchange Factor	SMAD : Sma Mother Against Dpp
	Smurf : SMad Ubiquitin Regulatory Factor
HDAC : Histone Déacétylases	STAT3 : Signal Transducers and Activators of Transcription 3
HNPCC : Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer	
JNK : Jun N-terminal Kinase	TβR : TGF- β Receptor
	TEM : Transition Epithélium Mésenchyme
	TGF-β : Transforming Growth Factor Beta
	VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

INTRODUCTION – RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES..... 7

I. La superfamille des TGF-β.....	8
Les Différentes Sous-Familles	8
Les BMPs	9
L'histoire des BMPs	11
II. BMP-7	12
Signalisation	12
Les Récepteurs	13
Les récepteurs de type II	14
Les récepteurs de type I	15
Régulation de l'activité des récepteurs	16
Les récepteurs accessoires	16
Le pseudo-récepteur	18
Les autres protéines interagissant avec les récepteurs	18
La voie de signalisation canonique de la superfamille du TGF- β : La voie SMAD	19
Structure des R-SMADs et Co-SMADs	20
La localisation cellulaire des SMADs	22
Régulation transcriptionnelle et gènes cibles	24
Les autres voies de signalisation Contrôlées par la superfamille du TGF- β	25
Les voies des MAPK	25
La voie des Rho GTPases	28
La régulation négative de la signalisation BMPs	31
Les antagonistes des BMPs	31
SMAD7	33
Ubiquitination	33
La régulation de la voie SMAD par des interactions avec d'autres voies de signalisation	34
Effets Biologiques du BMP-7	35
Utilisation clinique de BMP-7	37
BMP-7 au Cours de la Progression Tumorale	38
Le rôle suppresseur de tumeurs de BMP-7	38
Le rôle promoteur de tumeurs.....	38
III. Cancer du côlon	40
Aspects Cliniques.....	40
FAP	41
HNPCC	41
Carcinogénèse Colique	42
La muqueuse colique normale.....	42
Aspect histologique du CC.....	43
Les lésions hyperplasiques	43
Les lésions adénomateuses	43
Les carcinomes	44
Bases génétiques du CC	45
Traitement du cancer du côlon.....	46
Pronostic.....	46
Thérapeutique.....	46
Les molécules anti-angiogéniques	47
Les molécules ciblant la signalisation de l'EGF	48
IV. Mécanismes moléculaires et cellulaires de la progression tumorale	49
De la cellule normale à la cellule cancéreuse	49
Progression des tumeurs vers la métastase	51
Angiogenèse tumorale	53
Hypoxie.....	54
VEGF	54
Micro-environnement tumoral	55

Interactions cellule-cellule : Ig-CAM et cadhérines.....	56
Interactions cellule-MEC : Intégrines.....	57
Protéases matricielles.....	63
Migration et invasion cellulaires.....	64
Dissémination et envahissement métastatique.....	66

ÉTAT DE LA QUESTION..... 69

RESULTATS – COMMENTAIRE D'ARTICLE..... 73

Article I	74
L'action proinvasive de BMP-7 dans des cellules cancéreuses coliques humaines est dépendante de ERK, Rac et JNK, mais indépendante de SMAD4 et src.....	

DISCUSSION ET PERSPECTIVES..... 77

I. BMP-7, un puissant agent inducteur de l'invasion cellulaire et du « scattering »	78
II. L'activité pro-invasive de BMP-7 est déterminée par des voies de signalisation SMAD-indépendantes	80
III. BMP-7 possède le statut d'un agent autocrine et paracrine	82
IV. BMP-7, une cytokine anti-inflammatoire ?	84
V. Les perspectives de ce travail	85

ARTICLES PRESENTES EN ANNEXE..... 87

Article II	88
Activation de l'échafaudage moléculaire FAK/src et de la cascade de signalisation p130Cas/JNK par les intégrines $\alpha 1$ pendant l'invasion du collagène de type I par les cellules colorectales humaines HCT8/S11.....	
Article III	91
Le VEGF induit l'invasion des cellules colorectales humaines : Réversion de l'invasion cellulaire et de la croissance tumorale par l'inhibiteur des récepteurs du VEGF ZD4190.....	

REFERENCES..... 93

INTRODUCTION - RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

La protéine **Bone Morphogenetic Protein 7 (BMP-7)** est une cytokine multifonctionnelle qui appartient à la superfamille du TGF- β impliquée dans de nombreux phénomènes biologiques importants. La voie de signalisation canonique des TGF- β , la voie des **SMADs**, constitue une voie transcriptionnelle complexe soumise à de nombreuses régulations. Un déséquilibre de la voie SMAD-dépendante entraîne une modification des effets de ces cytokines aboutissant à de graves pathologies, comme les maladies auto-immunes, le développement de fibroses ou l'initiation du processus de cancérisation.

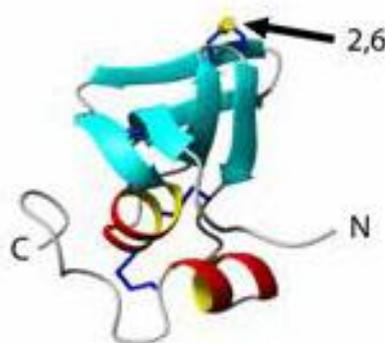
I. LA SUPERFAMILLE DES TGF- β

La superfamille des TGF- β comprend plus d'une quarantaine de protéines. Les membres de cette famille sont impliqués dans la plupart des grands mécanismes cellulaires, comme le développement embryonnaire, la prolifération et la différenciation cellulaires ou l'apoptose. Les nombreux effets de ces facteurs biologiques, qui varient selon le type cellulaire considéré et le contexte physio-pathologique de la cellule, expliquent leur implication dans de nombreuses pathologies, notamment les **cancers**.

LES DIFFERENTES SOUS-FAMILLES

Les protéines appartenant à la superfamille des TGF- β sont caractérisées par l'existence de sept résidus cystéines invariants, dans leur région C-terminale, au sein de leur domaine actif. Six de ces cystéines sont impliquées dans la formation de trois ponts disulfure, générant une structure centrale rigide appelée « nœud de cystéines » (*Fig. 1*). La septième cystéine permet l'association avec un second monomère, ce qui laisse sous-entendre que toutes ces protéines peuvent s'associer en dimères.

Figure 1 : Structure schématique des protéines à « nœud de cystéines » de la superfamille du TGF- β . Les cystéines 1, 2 et 3 forment des ponts disulfures avec les cystéines 4, 5 et 6 respectivement (en bleu). Certaines molécules, appartenant à ce groupe de protéines, possèdent une autre cystéine localisée en amont de la cystéine quatre impliquée dans la formation de dimères.



L'analyse comparative des séquences correspondant à leur domaine actif a permis la classification de cette superfamille en huit sous-familles. Elles sont classées selon un ordre décroissant correspondant

NOMS	Homologie avec BMP-2 (%)
<u>Sous-famille BMP-2</u>	
BMP-2	100
BMP-4	92
<u>Sous-famille BMP-5</u>	
BMP-5	61
BMP-6	61
BMP-7	60
BMP-8	55
<u>Sous-famille GDF-5</u>	
GDF-5	57
GDF-6	54
GDF-7	57
<u>Sous-famille Vg1</u>	
GDF-1 (Vg1)	42
GDF-3	53
<u>Sous-famille BMP-3</u>	
BMP-3 (Osteogenine)	48
GDF-10	46
<u>Sous-famille intermédiaires</u>	
Nodal	42
Dorsaline	40
GDF-8	41
GDF-9	34
<u>Sous-famille Activines</u>	
Activines β A	42
Activines β B	42
Activines β C	37
Activines β E	40
<u>Sous-famille TGF-β</u>	
TGF- β 1	35
TGF- β 4/TGF- β 5	35
TGF- β 2	34
TGF- β 3	36
<u>Sous-famille membres éloignés</u>	
MIS/AMH	27
Inhibine α	22
GDNF	23

au pourcentage d'identité des séquences protéiques des différentes formes matures par rapport à BMP-2. On distingue la famille BMP-2, puis celle de BMP-5, de GDF-5 (Growth and Differentiation Factor-5), de Vg1, de BMP-3, des membres intermédiaires, des Activines, des TGF- β , et enfin celle des facteurs éloignés (*Tableau 1*). Il existe aussi d'autres classifications, notamment pour la famille des BMPs classée en sous-familles en fonction de leur pourcentage d'identité et de leur homologie avec les orthologues chez la drosophile (dpp, 60A et Scw).

Tableau 1 : Les membres de la superfamille du TGF- β et leur pourcentage d'homologie avec BMP-2
(D'après Massague, 1998).

LES BMPS

Les BMPs, comme les autres protéines de la superfamille du TGF- β , sont synthétisées sous la forme de précurseurs contenant un **peptide signal hydrophobe**, un **pro-domaine** de taille variable contenant des sites potentiels de N-glycosylation et un **domaine C-terminal**.

Ces précurseurs sont clivés au niveau d'un domaine RXXR par des **pro-protéines convertases (PC)**, ce qui permet la libération du domaine C-terminal actif (*Fig. 2*). Les protéines convertases appartiennent

à une famille de sept sérines endoprotéases parmi lesquelles, au moins une, la **furine**, induit une coupure après un motif R-X-R/K-R. Cette PC, localisée dans l'appareil de Golgi est décrite comme impliquée dans le processus de clivage du pro-domaine du précurseur du BMP-4 (Cui, Jean et al. 1998).

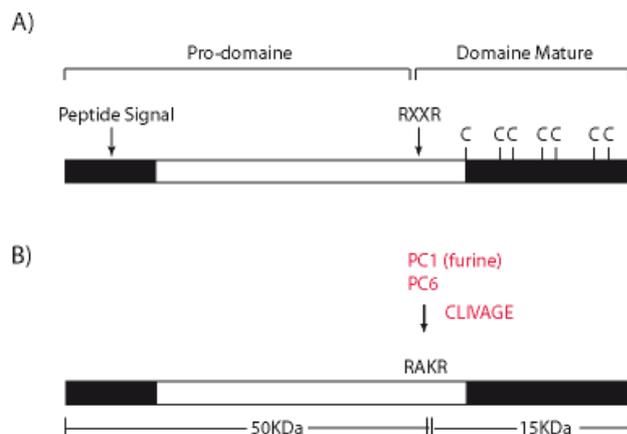


Figure 2 : Représentation schématique des BMPs sécrétés sous forme de précurseurs contenant un peptide signal hydrophobe ainsi qu'un site de coupure RXXR permettant la libération du domaine mature après clivage par une endoprotéase. B) Exemple de la molécule BMP-4.

Si les domaines matures (C-terminal) des cytokines sont très conservés entre les sous-groupes, il y a par contre une plus grande variabilité entre les pro-domaines des différents BMPs.

Le rôle de ce pro-domaine est encore mal défini. Il semble toutefois impliqué dans la stabilité de la cytokine et dans sa spécificité, il est nécessaire à la formation du dimère (Gray and Mason 1990). Pour BMP-4, il a été décrit un second site de clivage en aval du premier site, dont l'utilisation favoriserait sa sécrétion (Cui, Jean et al. 1998).

Nous avons vu que le domaine mature des membres de la superfamille du TGF- β présente une structure en « nœud de cystéines ». Six des sept cystéines présentes dans le domaine mature forment des ponts disulfure. La septième cystéine, située en amont de la cystéine quatre, est impliquée dans la formation du dimère (Vitt, Hsu et al. 2001). Cependant, toutes les protéines de la famille ne possèdent pas la cystéine supplémentaire impliquée dans la dimérisation. Dans BMP-15 et GDF-9 par exemple, cette cystéine est remplacée par une sérine, ce qui suggère un autre mécanisme pour la dimérisation de ces molécules.

Les BMPs peuvent former des hétérodimères dont certains possèdent une activité biologique supérieure à celle des homodimères. Par exemple, les hétérodimères BMP-2/BMP-7 ou BMP-2/BMP-6 montrent une action biologique 5 à 10 fois supérieure sur la formation du cartilage et de l'os, par rapport à l'homodimère BMP-2/BMP-2 (Israel, Nove et al. 1996). C'est également ce qui est observé pour

l'hétérodimère BMP-4/BMP-7 sur la formation du mésoderme ventral chez l'embryon du Xenope (Suzuki, Kaneko et al. 1997).

L'HISTOIRE DES BMPS

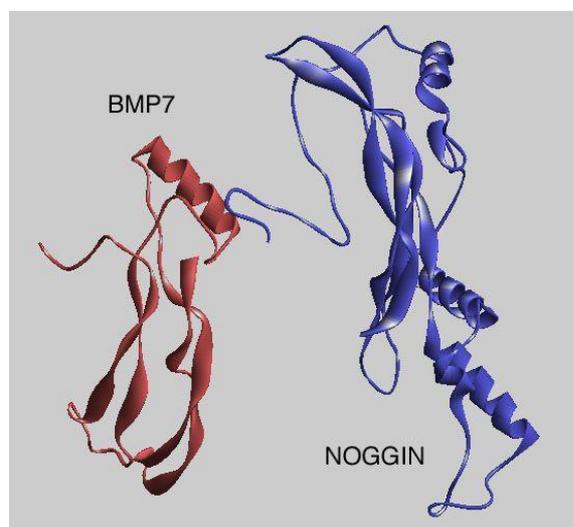
En 1889, Senn observe que l'os décalcifié peut réparer l'os endommagé. Il traitait les dommages ostéomyélitiques en utilisant un résidu décalcifié d'os avec l'iodoforme. Son principal but était l'utilisation de l'iodoforme comme antiseptique pour traiter les ostéomyélites, et le résidu décalcifié d'os comme transporteur. Il avait observé par la suite que non seulement l'infection était contrôlée mais que la formation d'un nouvel os était favorisée autour de l'os défectueux.

En 1930, Levander observe que l'extrait d'os dans l'alcool induit la néoformation de l'os après injection dans le muscle. En 1961, Sharrard et Collins reportent l'usage de greffes d'os décalcifié par l'acide ethylenediaminetetraacétique chez les enfants.

La découverte de l'activité des BMPs a été publiée en 1965 by Urist (Urist 1965). Marshal Urist était le directeur du Laboratoire de Recherche de l'Os à l'Université de Californie, Ecole de Médecine de Los Angeles, et était un chirurgien praticien orthopédique. Dans les expériences initiales, il avait été capable d'identifier un mélange de protéines isolées de la moelle osseuse. Ces protéines étaient activées quand l'os était endommagé. C'est à la fin des années 80 que chaque composant a pu être séparé et identifié. Les tests utilisés pour déterminer la capacité d'induire la formation d'os de chaque composant individuel consistaient à placer une petite quantité de ce matériel au-dessous de la peau des animaux. Un composant, BMP-7, a été capable de stimuler le tissu local mésenchymateux pour le transformer en tissu en voie d'ossification.

II. BMP-7

BMP-7 (Bone Morphogenetic Protein 7), aussi connu sur le nom d'**OP-1 (Osteogenic Protein 1)**, a été décrit dans le contexte osseux (Ozkaynak, 1990). Le gène *bmp-7* se trouve sur le chromosome 20q13.1-q13.3 et code pour un polypeptide d'environ 431 acides aminés. C'est une molécule soluble dans l'eau, de 54kDa dans sa version de pro-protéine et de 16 kDa pour la protéine mature (16kDa), qui diffuse facilement dans les fluides de l'organisme. Elle est active sous forme de dimère (homodimère ou hétérodimère avec une autre cytokine de la superfamille du TGF- β) en agissant via ses récepteurs de type II et type I. Groppe *et al.* ont montré par cristallographie que noggin se lie à BMP-7 (Fig. 3). Cette illustration montre que noggin est capable d'inhiber la signalisation dépendante de



BMP-7 en bloquant les sites de reconnaissance des deux types de récepteurs. L'échafaudage créé par noggin contient une topologie de « nœud de cystine » (la forme oxydée de la cystéine) similaire à celle des BMPs (Groppe, Greenwald *et al.* 2002).

Figure 3 : Structure de BMP-7 lié à son antagoniste Noggin.

SIGNALISATION

Les protéines membres de la superfamille du TGF- β interagissent avec leurs récepteurs de surface dans leur forme dimérique. Contrairement aux récepteurs de l'**EGF (Epidermal Growth Factor)**, du **PDGF (Platelet-derived Growth Factor)**, ou du **FGF (Fibroblast Growth Factor)**, ces récepteurs du TGF- β ont une activité intrinsèque Sérine/Thréonine Kinase, et induisent des voies de signalisation différentes.

LES RECEPTEURS

Ces cytokines vont lier deux types de récepteurs à activité sérine/thréonine kinase : des récepteurs de type I et de type II. Le *Tableau 2* récapitule brièvement les récepteurs et leurs interactions fonctionnelles « crosstalk ». Chez les mammifères cinq récepteurs de type I et sept récepteurs de type II ont été identifiés.

Ligands	Récepteurs	Antagonistes	Récepteurs Accessoires	SMADs
TGF- β	T β R-II T β R-I (ALK-5)	LAP (Latency-associated polypeptide) Decorin α 2-macroglobuline	Betaglycane	SMAD2 SMAD3 SMAD4
Inhibine	ActR-IIB ALK-4		Betaglycane	SMAD2 SMAD3 SMAD4
Activine	ActR-IIB ALK-4	Follistatine		SMAD2 SMAD3 SMAD4
Nodal GDF-1 Vg1	ActR-IIB ALK-4, ALK-7	DAN Cerberus	Crypto	SMAD2 SMAD3 SMAD4
BMP-2 BMP-4 BMP-7	BMPR-II ALK-3, ALK-6	DAN Cerberus Chordin/SOG Follistatine Noggin		SMAD1 SMAD5 SMAD8 SMAD4
BMP-4 GDF-5	ActR-IIB ALK-3, ALK-6	Chordin/SOG Follistatine Noggin		SMAD1 SMAD5 SMAD8 SMAD4
BMP-7	ActR-IIB ALK-2	Chordin/SOG Follistatine Noggin		SMAD1 SMAD5 SMAD8 SMAD4
MIS	AMHR-II ALK-2, ALK-3, ALK-6			SMAD1 SMAD5 SMAD8 SMAD4
TGF- β	T β R-II ALK-1		Endogline	SMAD1 SMAD5 SMAD8 SMAD4

Tableau 2 : Récapitulatif des différents éléments essentiels dans la signalisation SMAD-dépendante de membres de la superfamille du TGF- β , et le « crosstalk » susceptible de s'établir entre ces éléments.

Les récepteurs de type II

Trois récepteurs de type II sont impliqués dans la signalisation des BMPs : **BMPR-II**, **ActR-II** et **ActR-IIB**. Les récepteurs de type II de l'activine peuvent également participer à la signalisation des BMPs, mais leur affinité pour BMP-7 est différente. Par exemple, BMP-7 lie le récepteur ActR-II avec une affinité deux à trois fois plus faible que l'activine A (Kawabata, Chytil et al. 1995; Rosenzweig, Imamura et al. 1995; Yamashita, ten Dijke et al. 1995).

Les récepteurs de type II sont constitutivement actifs, leur phosphorylation n'est pas régulée par la liaison du ligand (Wrana, Tran et al. 1994). BMPRII possède un domaine de liaison au ligand en N-terminale, un domaine transmembranaire et un domaine kinase cytoplasmique (Fig. 4). Contrairement aux récepteurs ActR-II et T β RII qui possèdent une partie C-terminal cytoplasmique de 30 résidus, BMPRII possède un long domaine C-terminal de 530 acides aminés riches en sérine et thréonine (Kawabata, Chytil et al. 1995).

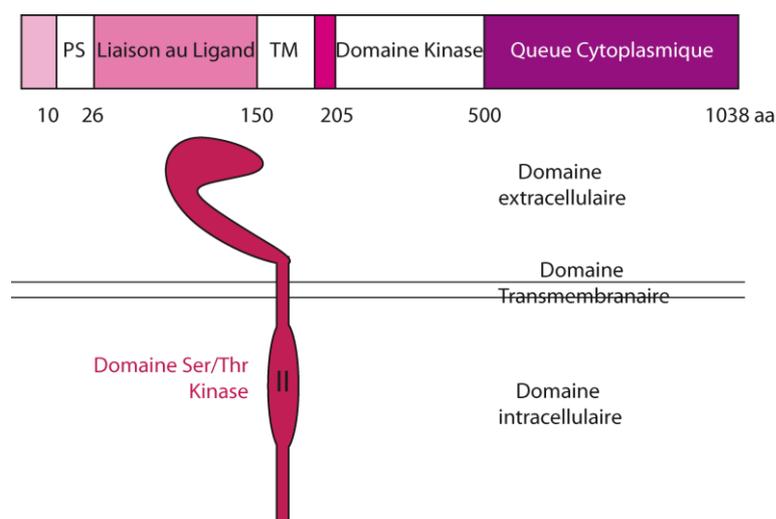


Figure 4 : Structure du récepteur de type II des BMPs (BMPRII). PS (Peptide signal), TM (Domaine transmembranaire).

Les molécules d'activine et de TGF- β lient le récepteur de type II, ce complexe ligand/récepteur II va ensuite recruter le récepteur de type I. Ce mécanisme d'activation diffère pour les BMPs capables de lier aussi bien les récepteurs de type II et I, mais avec une meilleure affinité pour le récepteur I, en présence du récepteur II (Koenig, Cook et al. 1994).

Les récepteurs de type I

Sept récepteurs de type I de la superfamille du TGF- β ont été décrits, ils sont nommés ALK1 à 6 pour Activin-Like Receptor. Parmi ces récepteurs, trois sont impliqués dans la signalisation de BMP-7. Il s'agit de **ALK-2 (ActR-I)**, **ALK-3 (BMPR-IA)** et **ALK-6 (BMPR-IB)**. ALK-3 et ALK-6 sont spécifiques de la signalisation BMPs alors que le récepteur ALK-2 participe également à la signalisation de l'activine. ALK-3 et ALK-6 présentent 84% d'identité de séquence et 62% d'identité avec le récepteur ALK-2 (Koenig, Cook et al. 1994; ten Dijke, Yamashita et al. 1994; Macias-Silva, Hoodless et al. 1998).

Les récepteurs de type I possèdent un domaine N-terminal extra-cellulaire de liaison au ligand, un domaine transmembranaire et un domaine cytoplasmique. Ce domaine intracellulaire est constitué d'une séquence juxta-membranaire riche en glycine et sérine (**domaine GS**) et d'un **domaine kinase** (Fig. 5).

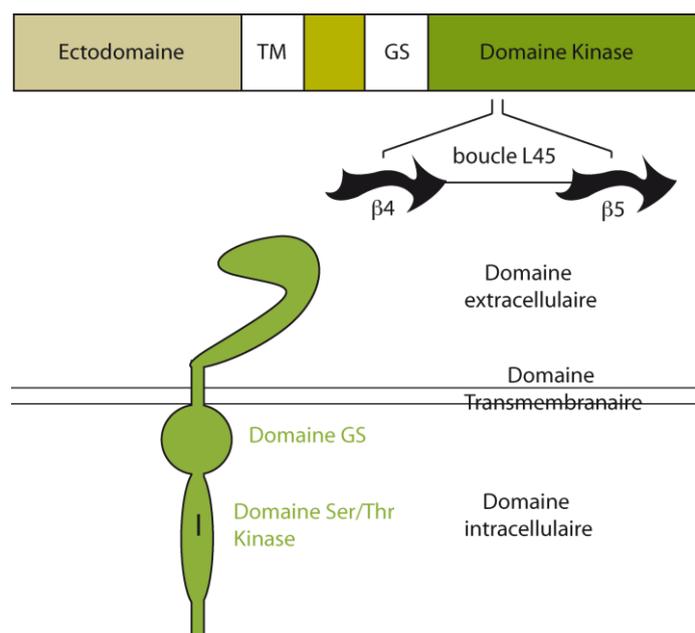


Figure 5 : Structure des récepteurs de type I de la superfamille du TGF- β . Domaine de liaison au ligand (ectodomaine), domaine transmembranaire (TM), domaine d'activation (GS) et le domaine kinase.

Le domaine GS est composé d'un motif caractéristique : **SGSGS** constituant le site de phosphorylation et donc d'activation du récepteur I par le récepteur II. Le domaine kinase possède une partie spécifique de liaison aux SMADs : **la boucle L45**, située entre deux hélices β , qui va déterminer la spécificité de liaison des effecteurs intracellulaires, les SMADs, aux récepteurs (Feng and Derynck 1997; Persson, Izumi et al. 1998).

La liaison du ligand va entraîner la formation d'un complexe hétéro-tétramérique, composé de deux récepteurs de type I et de deux récepteurs de type II. Il y aura alors phosphorylation du récepteur de type I par le récepteur de type II. Le récepteur de type I peut alors recruter et activer les SMADs (Fig. 6).

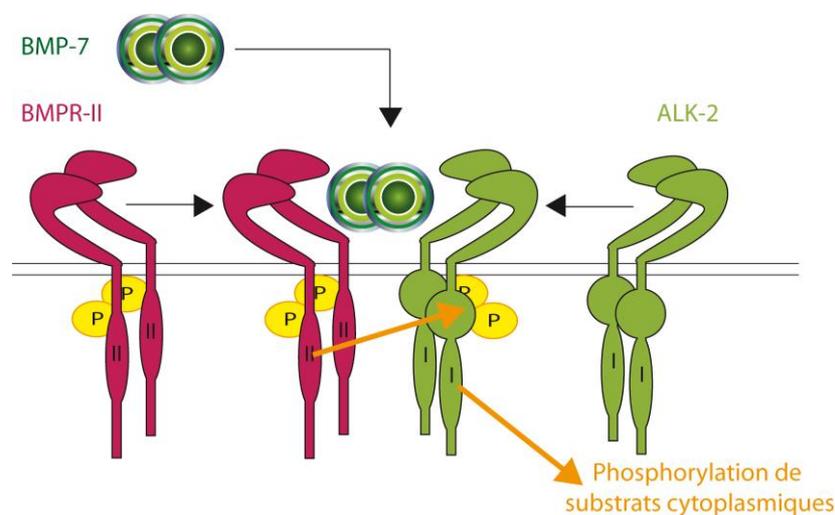


Figure 6 : Formation du complexe ligand BMP-7/récepteur. BMP-7 se fixe en même temps aux deux types de récepteurs. Le récepteur de type II, constitutivement activé, va alors phosphoryler le récepteur de type I dans son domaine GS. Ce récepteur de type I, désormais activé, va à son tour phosphoryler les différents substrats cytoplasmiques grâce à son domaine Ser/Thr kinase.

REGULATION DE L'ACTIVITE DES RECEPTEURS

L'activité des récepteurs de la superfamille du TGF- β peut être régulée par différentes protéines, qui peuvent favoriser ou limiter l'accès de ces cytokines à ces récepteurs (Massague and Chen 2000).

Les récepteurs accessoires

Le **betaglycane** est un composant membranaire de nature protéoglycane, également nommé récepteur de type III (**T β R-III**). Ce récepteur est généralement considéré comme un régulateur positif de la signalisation du TGF- β puisqu'il facilite la liaison des différentes isoformes de TGF- β sur le récepteur de type II.

Le betaglycane peut également agir comme un co-récepteur inhibiteur de l'ActRII en s'associant avec l'inhibine. En effet, l'inhibine associée au betaglycan entre en compétition avec l'activine pour la liaison aux récepteurs de type II : ActRII et ActRIIB (Lewis, Gray et al. 2000; Harrison, Wiater et al. 2004). Le complexe inhibine/betaglycan peut également entrer en compétition avec des molécules BMPs pour la liaison à BMPR-II empêchant ainsi la transduction du signal (Wiater and Vale 2003) (Fig. 7).

Cependant, le rôle du betaglycane est plus complexe. Ce récepteur est la cible d'un clivage protéolytique associé à l'apparition d'une forme soluble du récepteur du type III du TGF- β . Cette forme soluble sécrétée présente un rôle antagoniste contre la forme membranaire car elle se fixe et séquestre le TGF β 1 dans le milieu extracellulaire, empêchant sa fixation au T β R-II et la transmission du signal (Velasco-Loyden, Arribas et al. 2004), ce qui pourrait en faire un agent thérapeutique efficace dans les maladies impliquant un excès de TGF- β (Vilchis-Landeros, Montiel et al. 2001; Bandyopadhyay, Wang et al. 2005) (Fig. 7).

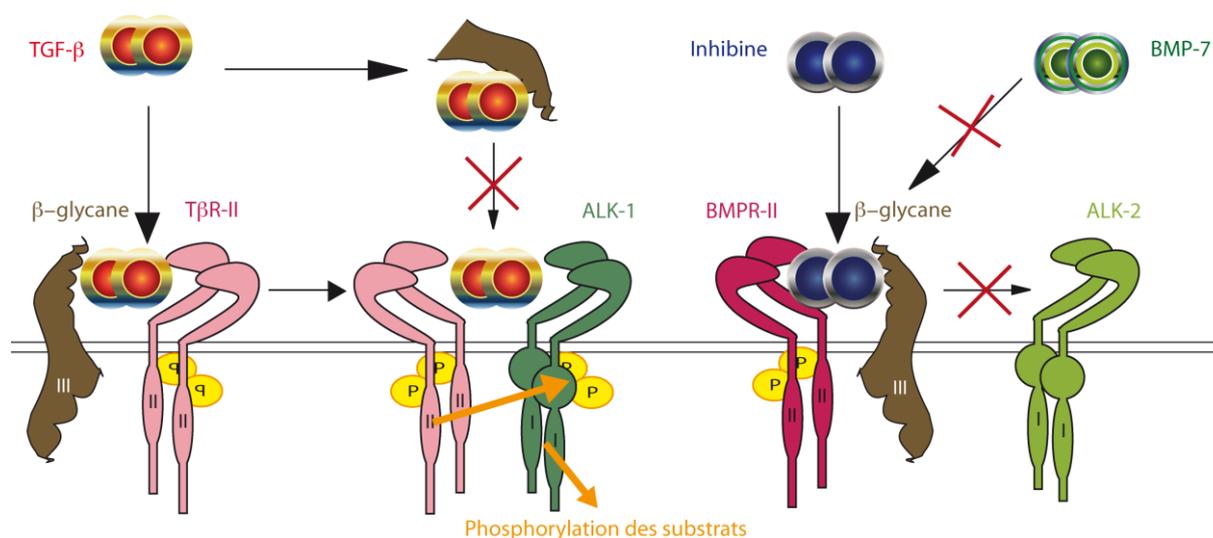


Figure 7 : Régulation par le betaglycane de l'activité des récepteurs appartenant à la superfamille du TGF- β . Le betaglycane, connu aussi comme T β R-III, régule positivement la voie de signalisation du TGF- β si il est transmembranaire. Par contre, après clivage le betaglycane régule négativement cette voie en séquestrant le TGF- β . Le betaglycane peut aussi réguler négativement les voies de signalisations des Activines et des BMPs en s'opposant à la liaison de ces cytokines à leur récepteur de type II.

Le rôle du betaglycane a été mis en évidence dans la transduction de certains effets biologiques du TGF- β , en particulier dans la **transition épithélium-mésenchyme (TEM)** et dans la migration des cellules épithéliales durant le développement cardiaque (Brown, Boyer et al. 1999).

L'**endogline** est une glycoprotéine transmembranaire, de structure très proche de celle du betaglycane, et très fortement exprimée dans les cellules endothéliales. Comme le betaglycane, elle facilite la liaison des isoformes TGF β 1 et TGF β 3 au T β RII. En revanche, elle possède une très faible affinité pour le TGF β 2 (Cheifetz, Bellon et al. 1992).

L'endogline semble être responsable de l'antagonisme existant entre BMP-7 et le TGF- β . La surexpression de l'endogline dans des cellules myoblastiques inhibe la signalisation TGF β /SMAD3, mais potentialise la signalisation BMP-7/SMAD1/SMAD5 (Schermer, Meurer et al. 2007).

Le pseudo-récepteur

Le pseudo-récepteur **BAMBI**, pour **BMP and Activin Membrane-Bound Inhibitor**, est une protéine transmembranaire dont la séquence du domaine extracellulaire est très proche de celle des récepteurs de type I, mais dont le domaine cytoplasmique ne possède pas d'activité kinase intrinsèque. BAMBI s'incorpore dans le complexe de récepteurs induits par les BMPs et empêche la phosphorylation des substrats et donc la transmission du signal induit par les BMPs. Ce mécanisme est responsable de

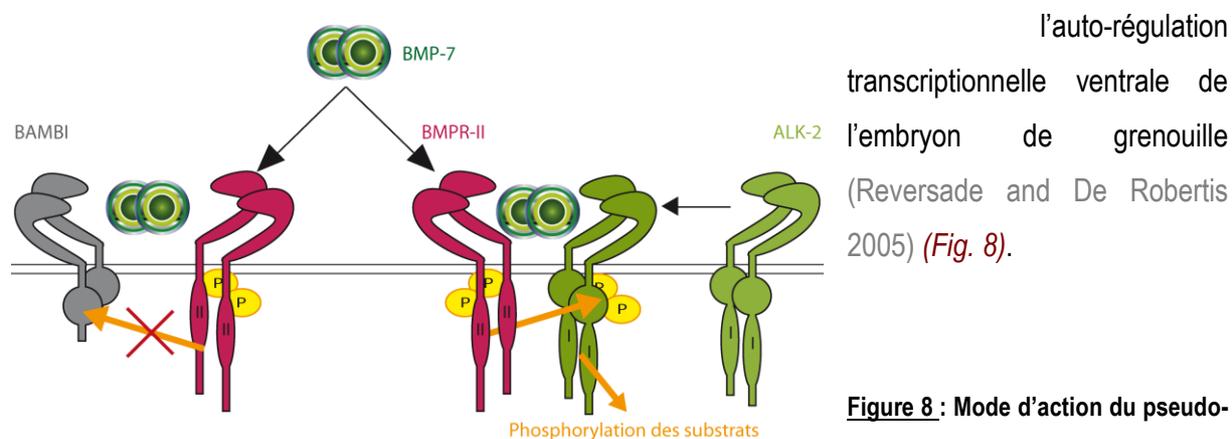


Figure 8 : Mode d'action du pseudo-récepteur BAMBI.

Les autres protéines interagissant avec les récepteurs

De nombreuses protéines cytoplasmiques interagissent avec les récepteurs du TGF- β modulant ainsi sa signalisation, telles les protéines **SARA** (**SMAD Anchor for Receptor Association**), **Dab-2** (**Disabled-2**) ou **c-PML** (**cytoplasmic-promyelocytic leukaemia**), ou négativement, telles que la protéine **STRAP** (**Serine-Threonine kinase Receptor-Associated Protein**). Elles interviennent dans la reconnaissance des récepteurs par les substrats cytoplasmiques spécifiques des récepteurs du TGF- β , les protéines SMADs.

Le rôle de ces protéines sur l'activité des récepteurs du TGF- β est peu ou pas connu dans les cas des BMPs. Bien que SARA n'interagisse pas avec SMAD1, récemment *Shi et al.* ont découvert que la protéine **endofine** aurait un rôle similaire à celui de SARA dans la signalisation des BMPs. L'endofine

se lie à SMAD1 et induit sa phosphorylation et simultanément, l'endofine déphosphoryle le récepteur de type I via son motif de liaison à des protéines phosphatases (Shi, Chang et al. 2007).

LA VOIE DE SIGNALISATION CANONIQUE DE LA SUPERFAMILLE DU TGF- β : LA VOIE SMAD

Le premier médiateur intracellulaire impliqué dans les voies de signalisation des membres de la superfamille du TGF- β a été indentifié en 1995 chez la drosophile. La protéine **MAD**, pour mother against dpp, est nécessaire à la réponse induite par la protéine dpp (decapentaplegic), l'homologue des protéines BMP-2 et BMP-4 chez les vertébrés (Sekelsky, Newfeld et al. 1995). Trois gènes homologues, **sma-2**, **sma-3** et **sma-4**, ont ensuite été identifiés chez le nématode *Caenorhabditis elegans* (Savage, Das et al. 1996).

Peu de temps après, l'identification de gènes homologues chez les vertébrés a été réalisée de manière simultanée dans différents laboratoires et les produits de ces gènes ont alors reçu plusieurs noms. En 1996, plusieurs chercheurs ont décidé d'une nomenclature commune et ont choisi d'appeler ces protéines **SMADs**, de la contraction de sma et MAD. A ce jour, 8 protéines SMAD, très conservées entre espèces, ont été isolées chez les vertébrés. Les protéines SMAD sont exprimées de manière ubiquiste dès le développement embryonnaire et jusqu'à l'âge adulte (Flanders, Kim et al. 2001; Luukko, Ylikorkala et al. 2001).

Les protéines SMAD sont classées en trois groupes : Les **R-SMADs** (Receptor Regulated SMAD) sont les SMADs phosphorylées et activées par les récepteurs de type I ; une fois activées elles forment des complexes hétérotrimériques avec des **Co-SMADs**. Le troisième groupe est celui des SMADs inhibitrices, les **I-SMADs**, qui vont inhiber la transduction du signal via les R et Co-SMADs. Les R-SMADs comprennent les SMADs 1, 2, 3, 5 et 8. Les SMADs 1, 5 et 8 sont impliquées dans la signalisation des BMPs, et les SMADs 2 et 3 dans la signalisation du TGF- β et de l'activine. Les Co-SMADs sont communes aux deux voies (BMPs et TGF- β /activine). Chez les mammifères, une seule Co-SMAD (SMAD4) a été identifiée. Les SMADs inhibitrices, SMAD 6 et 7, sont impliquées dans la régulation de la signalisation des BMPs et/ou TGF- β (Fig.9).

La signalisation canonique de BMP-7 implique donc les protéines SMAD1, SMAD5, SMAD8, SMAD4 et SMAD7. De manière très schématique, l'activation des récepteurs de type I par les récepteurs de type II liée à la fixation du BMP-7 entraîne la phosphorylation des protéines R-SMADs, qui s'associent rapidement au Co-SMAD. Ce complexe est alors transloqué dans le noyau où il régule la transcription de gènes cibles de BMP-7.

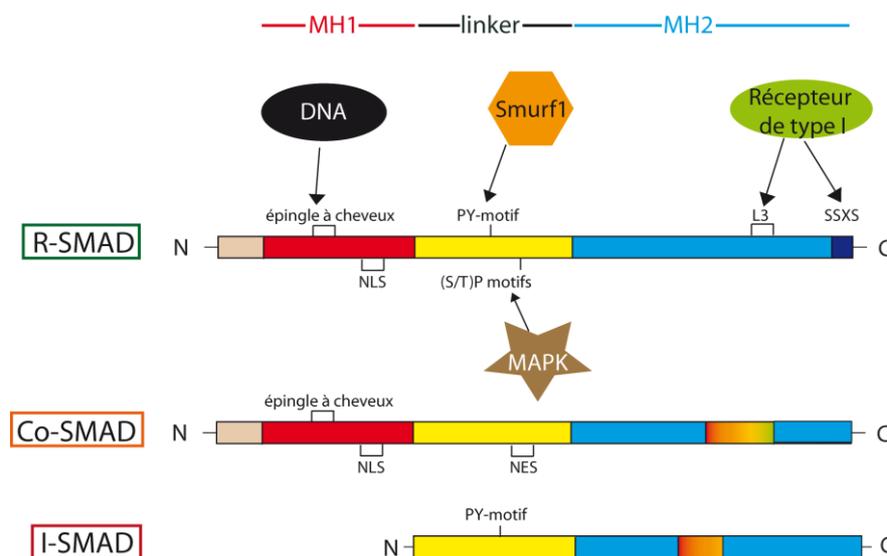


Figure 9 : Les trois sous-classes de SMADs (R-SMAD, Co-SMAD et I-SMAD) et leur structure respective. On peut noter l'absence de domaine MH1 chez les SMADs inhibitrices, ainsi que l'absence de site de phosphorylation SXS chez les Co-SMADs et I-SMADs.

Structure des R-SMADs et Co-SMADs

Les SMAD sont des protéines intracellulaires constituées de 400 à 500 acides aminés. Les protéines SMADs, à l'exception des SMADs 6 et 7, ont une structure conservée contenant : un domaine N-terminal (Mad Homology Domain-1) **MH1** et un domaine C-terminal **MH2**. Ces deux domaines sont liés par une région riche en proline de longueur variable appelée **domaine linker**.

Le domaine MH1 :

Constitué d'environ 130 acides aminés, le domaine MH1 est présent chez les R-SMADs et Co-SMADs, mais absent chez les SMADs inhibitrices 6 et 7. Les SMADs possèdent au niveau du domaine MH1, une structure en épingle à cheveux, très conservée entre les différents SMADs (R- et Co-). Cette boucle est impliquée dans la **liaison à l'ADN**. Seule SMAD2, qui possède un autre exon en amont de cette boucle, ne lie pas l'ADN. Le domaine MH1 est également impliqué dans l'interaction des SMADs avec plusieurs **facteurs de transcription**. Enfin, le domaine MH1 contient des signaux de **localisation**

nucléaire (NLS) et est donc impliqué dans la localisation nucléaire des protéines R-SMAD et Co-SMAD (Reguly and Wrana 2003).

Le domaine MH2 :

Constitué d'environ 200 acides aminés, ce domaine est impliqué dans les **interactions protéine-protéine**, que ce soit au récepteur de type I (via la boucle L3), ou à une autre SMAD (R-SMAD/Co-SMAD), ou encore à d'autres facteurs de transcription (Macias-Silva, Abdollah et al. 1996; Chen, Weisberg et al. 1997; Hata, Lo et al. 1997). Ainsi, le domaine MH2 explique la spécificité de la fonction des protéines SMADs.

L'association entre les R-SMADs et les récepteurs au BMP-7 se traduit par l'interaction entre la **boucle L3** du domaine MH2 et la boucle L45 du récepteur de type I. Cette boucle L3 est invariable au sein des protéines SMAD2 et SMAD3 d'une part et des protéines SMAD1, SMAD5 et SMAD8 d'autre part, mais diffère par deux résidus entre les deux groupes. Cette différence explique la spécificité d'interaction entre la protéine SMAD et son récepteur et donc la spécificité de signalisation de chacun des ligands (Chen, Hata et al. 1998; Lo, Chen et al. 1998).

Les R-SMAD possèdent, en C-terminal, un motif **SSXS** correspondant au site de phosphorylation du récepteur de type I (Souchelnytskyi, Tamaki et al. 1997). Cette phosphorylation est nécessaire à l'activation des R-SMADs. Les protéines Co-SMAD (SMAD4) et I-SMAD (SMAD6 et SMAD7) ne possèdent pas le motif de phosphorylation SSXS au sein de leur domaine MH2, ce qui explique que ces protéines ne soient pas phosphorylées par les récepteurs. En revanche, les I-SMADs sont capables de s'associer au récepteur de manière stable pour neutraliser l'interaction du récepteur avec les R-SMADs et de bloquer ainsi leur activation (Hayashi, Abdollah et al. 1997; Imamura, Takase et al. 1997; Nakao, Imamura et al. 1997).

Ce domaine possède une activité transcriptionnelle. Couplé à un domaine de liaison à l'ADN (Gal4), le domaine MH2 présente une activité transcriptionnelle constitutive. Par contre, en présence du domaine MH1 (protéine SMAD complète), la stimulation par les BMPs est nécessaire pour induire une activité transcriptionnelle (Liu, Hata et al. 1996).

Le domaine linker :

Le domaine linker est la région qui relie les domaines MH1 et MH2 des SMADs. Il est de longueur et de séquences variables, selon la protéine SMAD, mais il possède de nombreux motifs de régulation. Il présente notamment : *i*) des sites de phosphorylation reconnus par les **MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase)** qui peuvent être impliqués dans la régulation de la translocation nucléaire des SMADs (Kretzschmar, Doody et al. 1999) *ii*) ou le motif PY (proline-tyrosine) impliqué dans l'interaction des SMADS avec des ubiquitines ligases (**Smurfs**) et donc dans la dégradation des SMADs (Ebisawa, Fukuchi et al. 2001).

De plus, le domaine linker de SMAD4 présente une **séquence d'export nucléaire (NES)** qui en s'ajoutant à la séquence de la localisation nucléaire NLS présente dans le domaine MH1, responsable du transit constant de SMAD4 entre le cytoplasme et le noyau (Reguly and Wrana 2003).

La localisation cellulaire des SMADs

A l'état non activé, les SMADs existent sous forme de monomères dans le cytoplasme, le domaine N-terminal interagissant alors avec le domaine C-terminal pour inhiber son activité (Hata, Lo et al. 1997). Après une stimulation par les BMPs, le récepteur de type I va phosphoryler les R-SMADs au niveau de leur domaine SSXS, ce qui entraîne leur activation et une hétéro-oligomérisation avec SMAD4. Cet hétérocomplexe formant un trimère formé de deux R-SMADs et une Co-SMAD (ou formé de deux Co-SMAD et une R-SMAD) va être transloqué au noyau (*Fig. 10*).

La localisation cellulaire des SMADs, en présence ou absence de stimulation par le BMP-7, est déterminante pour l'activité transcriptionnelle de ces protéines. La localisation, cytoplasmique ou nucléaire, de chacune des protéines SMAD est longtemps restée mal définie, mais de récents travaux semblent enfin avoir permis d'éclaircir ce sujet (Schmierer and Hill 2005).

En absence de stimulation par les BMPs, la protéine SMAD4 est en transit continu entre le cytoplasme et le noyau (Pierreux, Nicolas et al. 2000; Watanabe, Masuyama et al. 2000; Xiao, Latek et al. 2003). Ce transfert incessant est lié à l'action combinée d'une séquence de localisation nucléaire NLS ; située au sein de son domaine MH1, et d'une séquence d'export nucléaire NES, présente dans son domaine linker reconnu par le récepteur de transport nucléaire CRM1. La stimulation par les BMPs,

entraînant la phosphorylation des R-SMADs et la formation de complexes hétérotrimériques avec SMAD4 ou Co-SMAD, induit alors le masquage de la séquence NES de SMAD4, favorisant son accumulation dans le noyau (Pierreux, Nicolas et al. 2000; Watanabe, Masuyama et al. 2000).

Pour le cas du TGF- β , bien que les protéines R-SMAD non phosphorylées semblent majoritairement situées dans le cytoplasme, il a récemment été démontré qu'en absence de stimulation, les R-SMADs étaient elles aussi soumises à un transit continu entre le cytoplasme et le noyau (Schmierer and Hill 2005). Suite à la fixation du TGF- β à son récepteur, les R-SMADs phosphorylées s'associent à SMAD4 pour être transloquées dans le noyau et induire la transcription de gènes cibles du TGF- β . Là encore, il a clairement été démontré que les R-SMADs effectuent un transit continu entre les deux compartiments cellulaires (Inman, Nicolas et al. 2002).

Dans le noyau, les protéines R-SMADs activées sont alors déphosphorylées, se séparent de SMAD4 et sont recyclées vers le cytoplasme par un mécanisme du transport actif, indépendamment de SMAD4. Si le récepteur est encore actif, les R-SMADs seront de nouveau phosphorylées et transloquées dans le noyau en présence de SMAD4 (Inman, Nicolas et al. 2002).

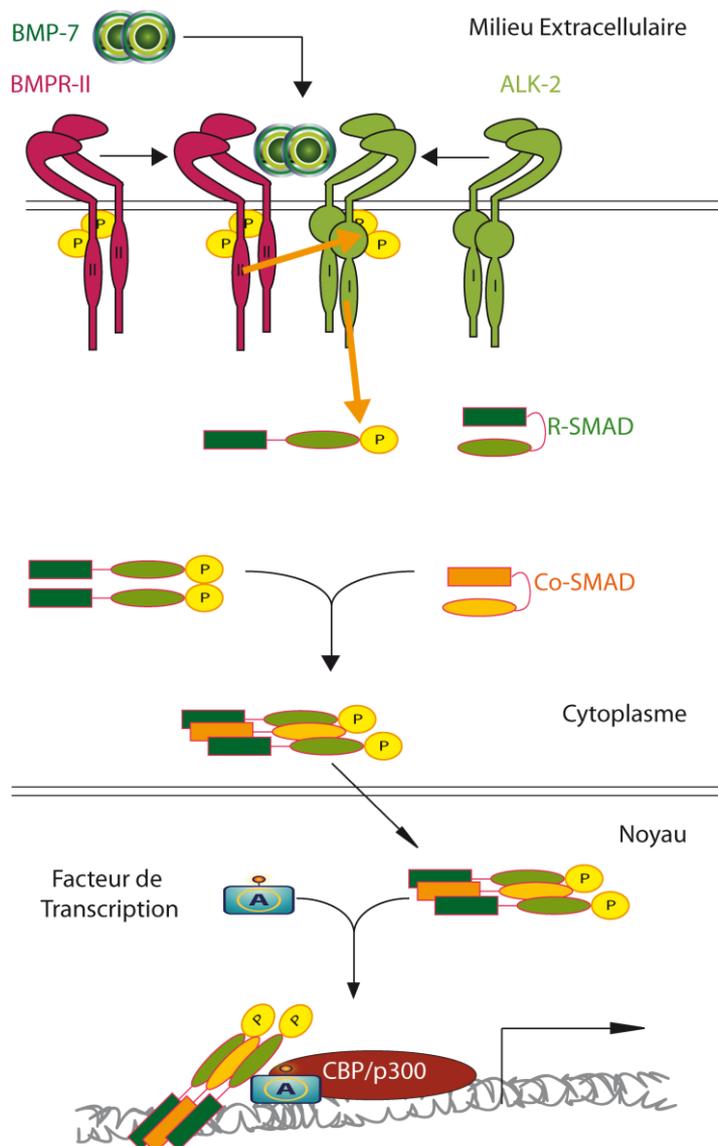


Figure 10 : Signalisation canonique de BMP-7.

Après liaison et phosphorylation de récepteurs, les protéines R-SMADs (SMAD1, SMAD5 ou SMAD8) vont être phosphorylées et activées par le récepteur de type I. Cette phosphorylation entraîne un changement de conformation de la molécule. Le complexe ensuite formé, R-SMAD/Co-SMAD va pouvoir être transloqué dans le noyau et induire ou réprimer des gènes cibles grâce à l'association avec différents facteurs de transcription.

Cependant, les SMADs non actives semblent majoritairement cytoplasmiques, alors que les SMADs actives semblent majoritairement nucléaires. Cette observation est liée au ratio entre l'export et l'import des SMADs, et leur stabilité, par exemple.

Régulation transcriptionnelle et gènes cibles

R-SMAD et Co-SMAD sont impliquées dans la régulation transcriptionnelle de gènes cibles, soit en liant directement à l'ADN, sur des éléments de réponse **SBE** dont la séquence consensus est 5'-XGXC-3' (**SMAD Binding Element**), soit en coopérant avec d'autres facteurs de transcription (*Tableau 4*). L'affinité des SMADs pour l'ADN est relativement faible et leur activité requiert souvent la présence d'autres facteurs.

Les SMADs peuvent réguler positivement ou négativement l'activité transcriptionnelle en recrutant des co-activateurs tels que **CBP/p300** possédant une activité histone acétyl-transférase, ou des co-répresseurs comme **TGIF** et **Ski/Sno** capables de lier des histones déacétylases et empêcher ainsi la transcription (Luo 2003). La balance entre les activités histones acétyl-transférases et histone déacétylases va déterminer l'intensité de la réponse à la voie SMAD activée. Par leur capacité à lier d'autres co-facteurs, les SMADs peuvent être impliquées dans la régulation de promoteurs sans s'associer à l'ADN et donc ne requièrent pas obligatoirement la présence d'un site SBE.

Gène	BRE	Mécanisme
Dlx-3	Motif GCAT	Liaison SMAD1/SMAD4
Hex	2x GCCGnCGC	Liaison SMAD1/SMAD4
	2x CAGAC (SBE)	Liaison SMAD4
Id-1	2x SBE, GGCGCC, CAGC et CGCC	Liaison SMAD5/SMAD4
Nkx2.5	multiple GTCT/AGAC, GCCGCGC	Liaison SMAD4, liaison SMAD1/5/SMAD4
Osteopontin	AGACTGTCTGGAC	Liaison SMAD1/SMAD4
SMAD6	Motif GCCGCGCC	Liaison SMAD1/SMAD4
SMAD7	SBE GTCTAGAC	Liaison SMAD2/3/5
Vent2B	Motif GCAT (SMAD1) Motif AGnC (SMAD4)	Liaison SMAD1/5

Tableau 4 : Exemple de gènes régulés par liaison directe de SMADs sur des SBE (SMAD Binding Element) (selon *Zwijsen et al, 2003*).

Dans un type cellulaire donné, la réponse transcriptionnelle à une stimulation par un ligand BMP dépend donc des récepteurs et des SMADs exprimés par ce type cellulaire, et des autres voies activées et des co-facteurs présents.

LES AUTRES VOIES DE SIGNALISATION CONTROLÉES PAR LA SUPERFAMILLE DU TGF- β

La majorité des effets biologiques des protéines appartenant à la superfamille du TGF- β est assurée par la voie des SMADs. Cependant, ces effets sont nombreux et variés, parfois même opposés, ce qui suggère fortement que la transduction du signal induit par les BMPs n'est pas transmise uniquement par la voie des SMADs.

En effet, ces protéines peuvent activer d'autres voies de signalisation. La majorité de ces voies agissent en coopération avec la voie SMADs mais elles peuvent également induire des réponses indépendantes de l'activité transcriptionnelle des SMADs (Derynck and Zhang 2003; Moustakas and Heldin 2005).

Les voies des MAPK

A notre connaissance, les relations entre BMP-7 et la signalisation des MAPK et leurs conséquences éventuelles sur les fonctions cellulaires et la pathologie sont encore très fragmentaires.

Le TGF- β induit l'activation des voies de signalisation impliquant par les **MAPK** : les kinases **ERK**, **JNK** et **p38** (Guicheux, Lemonnier et al. 2003; Hu, Wasserman et al. 2004; Reilly, Golden et al. 2005). Ces enzymes régulent de nombreuses fonctions biologiques : la prolifération, la survie ou la mort cellulaires. Elles sont activées en réponse à des nombreux stimuli selon la MAPK considérée, mais répondent au même schéma général d'activation. Un stimulus extracellulaire (UV, cytokine, facteur de croissance, ...) entraîne l'activation d'une sérine/thréonine kinase **MAPKKK (MAPK Kinase Kinase)**, qui phosphoryle et active une **MAPKK (MAPK Kinase)** qui permet l'activation de la MAPK adéquate par la double phosphorylation d'un résidu thréonine et d'un résidu tyrosine localisés dans le domaine d'activation de la protéine. Les MAPK peuvent alors activer différents facteurs de transcription ou d'autres kinases, les **MK** pour **MAPK-activated Kinase** (Chang and Karin 2001; Roux and Blenis 2004).

La voie de la MAPK/SAPK JNK

Les cytokines, les facteurs de croissance et les UV sont des stimuli capables d'activer la voie des MAPK/SAPK **JNK1**, **JNK2** et **JNK3**. Dans cette cascade de phosphorylation, les MAPKKK peuvent être les kinases **MEKK (Mitogen Extracellular-signal regulated kinase Kinase Kinase)**, **MLK**

(Mixed-Lineage protein Kinase), **ASK1 (Apoptosis Signal-regulating Kinase 1)** ou **TAK1 (TGF- β -Activated Kinase 1)**, qui activent à leur tour les MAPKK **MKK4** et **MKK7**. Le site de phosphorylation de JNK est le motif consensus **Thr-Pro-Tyr (TPY)**. Le substrat le mieux caractérisé de JNK est le facteur de transcription **c-jun**, dont la phosphorylation potentialise son activité transcriptionnelle. Les facteurs **ATF-2 (Activated Transcription Factor 2)**, **NF-AT (Nuclear Factor of Activated T-cells)** et **STAT3 (Signal Transducers and Activators of Transcription 3)** sont également des cibles de JNK. En revanche, il n'a jamais été observé de phosphorylation ou d'activation d'autres kinases en réponse à JNK (Roux and Blenis 2004).

L'activation de la kinase JNK, dans le contexte du cancer de la prostate, a été identifiée comme une autre voie de signalisation antiapoptotique induite par BMP-7, sans causer de variations significatives de la protéine apoptotique Bax ou la protéine antiapoptotique Bcl-2 (Yang, Lim et al. 2006).

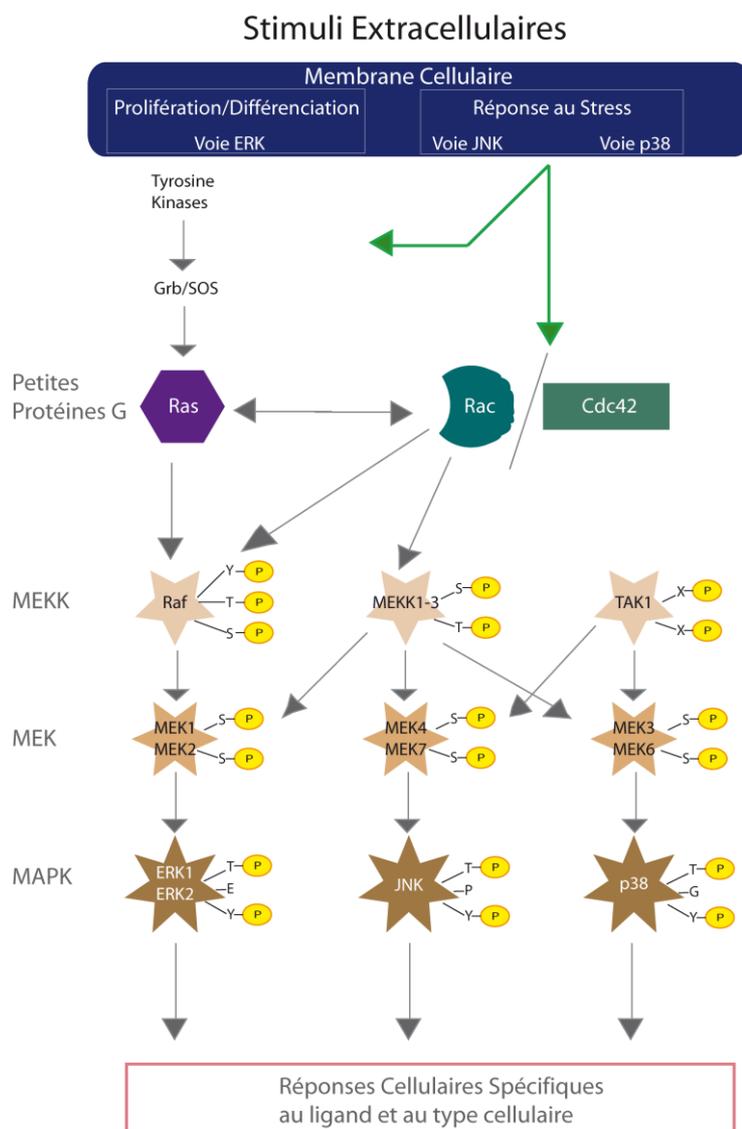


Figure 11 : Cascade d'activation des MAPKs. Réponses et interactions entre les différents membres.

La voie des MAPK ERK

Les MAPK **ERK1** et **ERK2** sont principalement activées en réponse à des facteurs de croissance, des cytokines ou à un stress osmotique. Des récepteurs présents à la surface de la cellule, comme les récepteurs couplés à des protéines G (**GPCR**) ou les récepteurs à activité tyrosine kinase, induisent alors la cascade de signalisation **Raf/MEK/ERK**. Les kinases ERK1 et ERK2 sont phosphorylées au

sein d'un motif **Thr-Glu-Tyr (TEY)** situé dans leur domaine d'activation. Elles sont ensuite capables d'activer un grand nombre de substrats : des protéines membranaires, des protéines du cytosquelette, des facteurs nucléaires, tels que **NF-AT**, **Elk-1**, **c-Fos**, **c-Myc** ou **STAT3**, mais aussi d'autres kinases, telles que **RSK**, **MNK**, et **MSK** (Roux and Blenis 2004).

L'activation de ERK par le TGF- β a été incriminée dans l'inhibition de la prolifération cellulaire en favorisant la transcription de l'inhibiteur du cycle cellulaire **p21-waf1** (Hu, Shen et al. 1999; Kivinen and Laiho 1999), l'activation de la différenciation cellulaire, et la transition épithélium-mésenchyme (Xie, Law et al. 2004; Davies, Robinson et al. 2005).

Par contre, il a été démontré récemment que l'inhibition de ERK dans le contexte du cancer colique potentialise l'arrêt du cycle cellulaire induit par BMP-2 dans des cellules non tumorales (Beck, Jung et al. 2007). D'autre part, BMP-7 contribue à la **différenciation ostéoblastique** des cellules de la moelle osseuse en induisant la transcription de gènes SMAD dépendants, mais cette action est tributaire de l'inhibition de ERK (Osyczka and Leboy 2005).

La voie de la MAPK/SAPK p38

La voie p38 est activée par de nombreux stimuli, tels que le stress, les UV, les cytokines inflammatoires ou les facteurs de croissance (Raingeaud, Gupta et al. 1995; Ono and Han 2000; Zarubin and Han 2005). A ce jour, quatre isoformes de p38 ont été décrites, les **p38 α** , **p38 β** , **p38 γ** (ou **SAPK3** ou **ERK6**) et **p38 δ** (ou **SAPK4**) (Jiang, Chen et al. 1996; Li, Jiang et al. 1996; Jiang, Gram et al. 1997). L'expression des isoformes α et β est ubiquiste alors que les isoformes γ et δ sont exprimées différemment en fonction des territoires cellulaires. Leur cinétique et leur taux d'activation ne sont pas semblables. Là encore, leurs effets biologiques peuvent être différents, voire opposés. Par exemple, il a été montré que l'isoforme β active la transcription AP-1 dépendante alors que les isoformes γ et δ l'inhibe (Pramanik, Qi et al. 2003). Les MAPKKK associées à l'activation de p38 sont les kinases **MEKK**, **ASK1** ou **TAK1**. Il s'agit des mêmes kinases qui peuvent agir en amont de la kinase JNK, ce qui explique que ces deux voies de signalisation soient souvent activées en parallèle. Elles entraînent l'activation des kinases **MKK3** et **MKK6** qui phosphorylent les différentes isoformes de p38 de manière sélective, car elles ne sont pas capables de phosphoryler les autres MAPK. MKK6 peut activer les quatre isoformes de p38 alors que MKK3 active préférentiellement les isoformes α et β . De plus, **MKK4**, qui active JNK, peut également phosphoryler p38. Le site consensus de phosphorylation des

p38 est le motif **Thr-Gly-Tyr (TGY)**. La MAPK p38 active de nombreux facteurs de transcription, tels que **ATF-2**, **NF-AT**, **MEF2 (Myocyte Enhance Factor 2)**, **Elk-2**, **p53**, **NF- κ B** ou les protéines de la famille **AP-1**, mais elle peut également phosphoryler d'autres kinases, comme la **MAPKAPK2 (MAPK Activated Protein Kinase 2)**, les **MNK1** et **MNK2 (MAPK iNteracting Kinases 1 et 2)** et les kinases **MSK1** et **MSK2 (Mitogen and Stress activated Kinase 1 et 2)** (Roux and Blenis 2004; Zarubin and Han 2005).

La MAPK p38 est impliquée dans la morphogenèse de la ramification des canaux du rein contrôlée par BMP-7 (Hu, Wasserman et al. 2004). Différentes concentrations de BMP-7 peuvent soit stimuler ou inhiber une fonction cellulaire donnée, en activant ou inhibant la phosphorylation de p38 respectivement. Cette inhibition passe par l'activation de SMAD1 qui va ensuite inhiber p38.

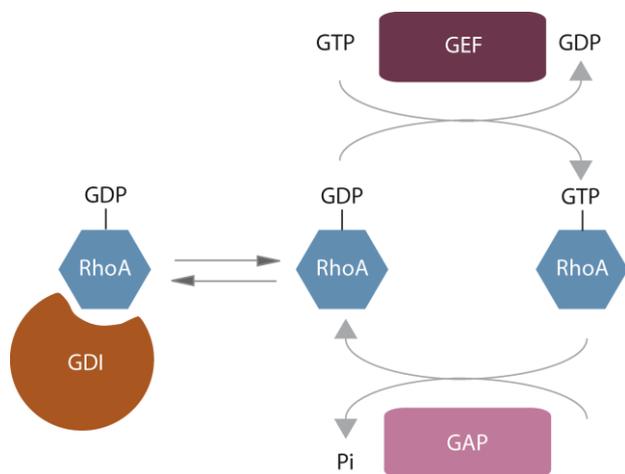
La voie des Rho GTPases

Les petites protéines G apparentées à Rho, ou RhoGTPases, constituent un sous-groupe de la superfamille des protéines Ras. Ce sont des petites protéines monomériques (20 à 30 kDa) constituées d'un domaine GTPase et de courtes extrémités N- et C-terminales. Les membres de ce sous-groupe subissent une modification post-traductionnelle consistant en l'ajout d'un motif lipidique isoprénoïde. Celui-ci facilite la localisation sub-cellulaire des RhoGTPases qui est cruciale pour l'activation de leurs effecteurs correspondants. Comme tous les membres de la superfamille des protéines Ras, les RhoGTPases sont des commutateurs moléculaires présents sous deux états fonctionnels, soit actives car liées au GTP, soit inactives car liées au GDP. Cette activation se traduit par un changement conformationnel de la protéine qui, lorsqu'elle est liée au GTP, peut interagir avec les effecteurs. Le ratio entre ces deux états, définissant l'activité de la protéine, est étroitement contrôlé par 3 types de protéines régulatrices : les **GEFs (Guanine nucleotide Exchange Factor)** qui stimulent l'échange GDP/GTP, les **GAPs (GTPase-Activating Proteins)** qui augmentent le taux intrinsèque d'hydrolyse du GTP, et les **GDIs (Guanine nucleotide Dissociation Inhibitors)** qui permettent la séquestration des protéines Rho-GDP dans le cytoplasme par interaction avec le motif lipidique (*Fig. 12*) (Wennerberg and Der 2004; Buongiorno and Bapat 2005).

La famille des RhoGTPases est divisée en 6 sous-familles selon leurs analogies de séquences, leurs motifs structuraux et leurs fonctions biologiques. On peut donc distinguer les protéines apparentées à **RhoA (RhoA, RhoB et RhoC)**, les protéines apparentées à **Rac1 (Rac1, Rac1b, Rac2, Rac3 et**

RhoG), les protéines apparentées à **Cdc42** (**Cdc42**, **G25K**, **TC10**, **TCL**, **Chp/Wrhh-2** et **Wrhh-1**), la sous-famille **Rnd** (**Rnd1**, **Rnd2** et **RhoE/Rnd3**), la sous-famille **RhoBTB** et la sous-famille **Miro**. Les protéines RhoD, Rif et TTF/RhoH ne s'intègrent dans aucune de ces 6 sous-familles. Les petites protéines G les plus étudiées et les mieux caractérisées sont les RhoGTPases RhoA, Rac1 et Cdc42. Ces protéines sont ubiquistes et jouent un rôle majeur dans la régulation de l'organisation du cytosquelette d'actine et la migration des cellules non musculaires. Elles sont également impliquées dans divers processus comme l'endocytose, la régulation transcriptionnelle, la progression du cycle et la différenciation cellulaires (Wennerberg and Der 2004; Buongiorno and Bapat 2005).

Les RhoGTPases, RhoA, Rac1 et Cdc42, régulent l'organisation du cytosquelette d'actine au cours de la motilité cellulaire, mais avec des rôles différents sur la morphologie cellulaire. La protéine RhoA induit



la contraction des filaments d'**actomyosine**, la formation des **fibres de stress** et des complexes d'**adhésion focaux**. La protéine Rac1 induit la polymérisation des filaments d'**actine** et la formation des **lamellipodes**. La protéine Cdc42 induit la formation des **filopodes** (Hall 1998; Schmitz, Govek et al. 2000; Barber and Welch 2006).

Figure 12 : Régulation de l'activité des RhoGTPases.

Dans le processus de motilité cellulaire, l'activation de la protéine RhoA est associée à l'assemblage des complexes d'adhésion focaux et à la contraction du réseau des filaments d'actomyosine pour permettant ainsi au corps cellulaire de se rétracter à l'arrière du front de migration. L'actomyosine est composée des filaments d'actine reliés entre eux par la **chaîne légère de la myosine (MLC)**. La phosphorylation de la MLC entraîne le pivotement de la tête des molécules de myosine et le coulissement des filaments d'actine, conduisant à la génération d'une force de traction. La Ser/Thr kinase **p160ROCK**, un des nombreux effecteurs activés par RhoA, joue un rôle majeur dans la stimulation du système actomyosine. Elle phosphoryle la **LIMK** qui en réponse phosphoryle et inactive la **cofilin**, conduisant à la stabilisation des filaments d'actine (Maekawa, Ishizaki et al. 1999; Sumi, Matsumoto et al. 2001). La protéine p160ROCK phosphoryle et inactive également la **phosphatase de la MLC (MLCPase)** permettant une augmentation du taux de phosphorylation de la **myosine II** (Fig.13) (Kawano, Fukata et al. 1999). Un autre effecteur de RhoA, la protéine **mDia**, est impliqué dans

l'assemblage des filaments d'actine (Uehata, Ishizaki et al. 1997; Watanabe, Kato et al. 1999). La localisation spécifique à l'arrière du front de migration semble être régulée par la protéine Rac capable d'inhiber la protéine RhoA (Sander, ten Klooster et al. 1999). Par ailleurs, la petite protéine G RhoD est décrite comme antagoniste des effets de RhoA sur le cytosquelette d'actine (Tsubakimoto, Matsumoto et al. 1999).

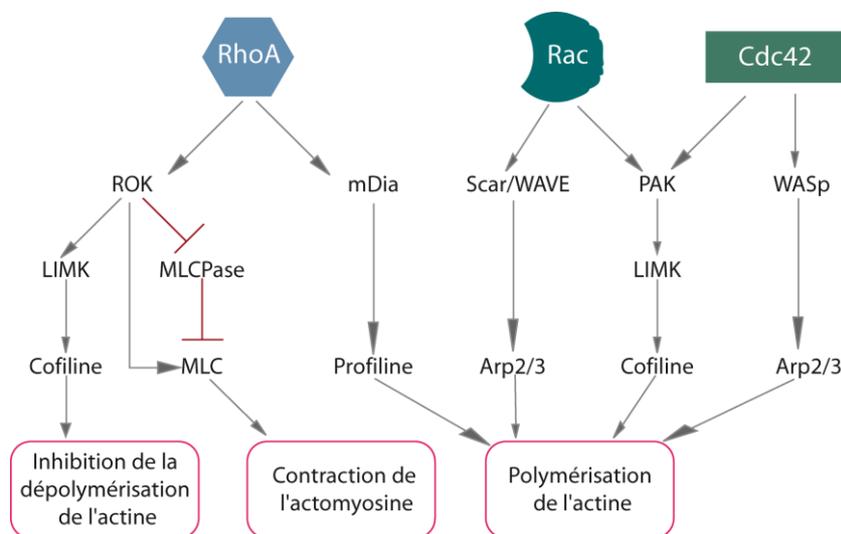


Figure 13 : Régulation du cytosquelette d'actine par les RhoGTPases.

Les protéines Rac et Cdc42 activées sont situées à l'avant de la cellule en migration où elles régulent la polymérisation des filaments d'actine et la formation des extensions membranaires. Le rôle des filopodes formés suite à l'activation des protéines Cdc42 n'est pas encore très clair. Ils seraient impliqués dans le contrôle de l'orientation de la migration (Barber and Welch 2006). Rac active la Ser/Thr kinase **p65PAK** qui régule le renouvellement « turnover » des complexes d'adhésion focaux et active la LIMK (Bagrodia and Cerione 1999). Cette GTPase active également la **PI3K** dont l'activation joue un rôle important dans la migration cellulaire (Bokoch, Vlahos et al. 1996). Les protéines Rac et Cdc42 activent la cascade **WASp/SCAR/WAVE** conduisant à la stimulation du complexe **Arp2/3** impliqué dans la polymérisation de l'actine *de novo* ou à partir des filaments pré-existants (Fig. 13) (Rohatgi, Ma et al. 1999; Rohatgi, Ho et al. 2000; Eden, Rohatgi et al. 2002). Le rôle de la kinase p65PAK dans la régulation du système actomyosine reste encore à préciser. Dans certains types cellulaires, p65PAK phosphoryle et inactive la MLC conduisant à la diminution de la myosine II phosphorylée et à une suppression de la contraction cellulaire, alors que d'autres études montrent que p65PAK phosphoryle directement la myosine II (Kiosses, Daniels et al. 1999; Sander, ten Klooster et al. 1999; Sells, Boyd et al. 1999).

Il est connu que le TGF- β peut activer les voies des RhoGTPases, telles que **RhoA**, **Rac1** et **Cdc42**, pour induire une réorganisation du cytosquelette et favoriser la transition épithélium-mésenchyme (Bhowmick, Ghiassi et al. 2001; Edlund, Landstrom et al. 2002; Maddala, Reddy et al. 2003; Buongiorno and Bapat 2005; Clements, Minnear et al. 2005). Rien n'a été décrit pour le moment concernant BMP-7 à l'exception d'une étude démontrant que la morphogenèse des dendrites nécessite l'activation de Cdc42, directement liée à l'activité de BMPRII après liaison de BMP-7 (Lee-Hoeflich, Causing et al. 2004).

Outre la voie des SMADs, BMP-7 peut induire l'activation d'autres voies de signalisation. Il est de plus en plus clairement établi que c'est l'équilibre entre l'activation de ces différentes voies de signalisation qui contrôle les effets biologiques des BMPs.

LA REGULATION NEGATIVE DE LA SIGNALISATION BMPs

L'activité des BMPs est contrôlée à plusieurs niveaux, et en particulier par ;

- 1) une série d'antagonistes capables de se lier aux BMPs directement et d'inhiber la fonction des BMPs ;
- 2) SMAD7 lie le récepteur de type I des BMPs et neutralise la phosphorylation des R-SMADs ;
- 3) **Tob**, une protéine anti-mitotique, capable de lier sélectivement SMAD1 et SMAD5, inhibe la signalisation des BMPs dans des ostéoblastes ;
- 4) **Smurf1 (SMAD Ubiquitin Regulatory Factor 1)**, une ubiquitine ligase E3, interagit avec SMAD1 et SMAD5 pour induire sa dégradation par le protéasome ;
- 5) la modulation de la voie SMAD par d'autres voies de signalisation.

Les antagonistes des BMPs

L'activité des BMPs sécrétés peut être régulée par différentes familles de protéines extracellulaires capables de lier les BMPs. De nombreux antagonistes ont été identifiés, incluant **Noggin**, **Chordin**, **Follistatine** et les protéines de la famille **DAN**. Noggin et Chordin ont été identifiés chez le Xénope, mais leurs homologues existent chez les mammifères et conservent les mêmes fonctions. Ils sont spécifiques des BMPs. Les membres de la famille DAN ont conservé une structure en « nœud de cystéine » comme les molécules BMPs (Meitinger, Meindl et al. 1993). Ces protéines ont des profils d'expression et des affinités pour les BMPs très variables. Ces facteurs sont également appelés

facteurs dorsalisants d'après leurs actions biologiques et de segmentation chez l'embryon.

Noggin est un peptide sécrété qui se lie et inactive BMP-2, BMP-4 et BMP-7. La structure de noggin et de BMP-7 a été résolue. Elle montre que noggin inhibe BMP-7 en bloquant les interfaces moléculaires entre la cytokine et ses récepteurs. Les domaines d'interaction des récepteurs de type I et II et de chaque monomère de BMP-7 interagissent avec une section **clip** spécifique à chaque monomère du dimère de noggin (Groppe, Greenwald et al. 2002), empêchant ainsi la liaison aux récepteurs.

Actuellement, sept mutations affectant le gène noggin ont été identifiées, et sont toutes impliquées dans les malformations osseuses (Gong, Krakow et al. 1999). Par ailleurs, les souris surexprimant ces antagonistes spécifiquement dans l'os sont atteintes d'ostéoporose (Devlin, Du et al. 2003; Winkler, Sutherland et al. 2003). Cet antagoniste semble spécifique de la voie des BMPs et ne lie pas le TGF- β 1. Son expression peut être régulée par les BMPs et également par le TGF- β 1 suggérant sa participation à un rétro-contrôle négatif de la voie BMPs mais également à une régulation négative via la voie du TGF- β (Gazzerro, Gangji et al. 1998).

Chordin est spécifique des BMPs et lie également BMP-2 et BMP-4 (Piccolo, Sasai et al. 1996).

La **Famille DAN** inclut entre autres DAN (Stanley, Biben et al. 1998) Gremlin (Hsu, Economides et al. 1998), Cerberus chez la Xenope (Piccolo, Agius et al. 1999) et Caronte. Caronte lie BMP-4, BMP-7 (et nodal) mais pas l'activine A (Yokouchi, Vogan et al. 1999). Ces facteurs sécrétés inhibent la signalisation BMP en se liant au ligand, les empêchant ainsi de se fixer et de stimuler leurs récepteurs spécifiques (Hsu, Economides et al. 1998; Piccolo, Agius et al. 1999). Plusieurs antagonistes peuvent interagir via des domaines similaires avec les molécules BMPs ce qui conduit à une compétition entre les antagonistes. Par exemple il y a une compétition entre Cerberus, Gremlin et Dan pour la liaison à BMP-2.

La **Follistatine** est le premier antagoniste découvert selon sa forte affinité pour l'activine (1,3- 200 pM) (Nakamura, Takio et al. 1990). Elle peut également se lier plus faiblement à des BMPs tels que BMP-7, BMP-4, et BMP-6 (Yamashita, ten Dijke et al. 1995; Fainsod, Deissler et al. 1997; Glistler, Richards et al. 2005). A la différence des autres antagonistes des BMPs, la follistatine n'entrerait pas en compétition avec les récepteurs pour la liaison du ligand, mais formerait un complexe trimérique avec les BMPs et leurs récepteurs (Iemura, Yamamoto et al. 1998).

SMAD7

Comme décrit précédemment, la signalisation de BMP-7 peut être modifiée par la protéine inhibitrice SMAD7. L'expression de SMAD7 peut être induite par la voie du TGF- β 1, BMPs et des activines, mais également par d'autres stimuli (ten Dijke, Korchynskyi et al. 2003).

L'expression de SMAD7 peut notamment être augmentée par l'**IFN- γ (Interféron gamma)** qui agit en activant la tyrosine kinase **Jak (Janus Kinase)** et par les facteurs de transcription **STAT (Signal Transducers and Activators of Transcription)** (Ulloa, Doody et al. 1999). Il a notamment été décrit que l'IFN- γ inhibait l'invasion cellulaire induite par le TGF- β dans des carcinomes gastriques (Kuga, Morisaki et al. 2003) ainsi que la réparation tissulaire induite par le TGF- β (Ishida, Kondo et al. 2004).

Le **TNF- α (Tumor Necrosis Factor alpha)** entraîne également l'expression de SMAD7 en activant le facteur de transcription **NF- κ B (Nuclear Factor Kappa B)** (Bitzer, von Gersdorff et al. 2000; Nagarajan, Chen et al. 2000). D'autres facteurs, tels que l'**EGF (Epidermal Growth Factor)**, stimulent l'expression de SMAD7 et participent ainsi à l'atténuation de la réponse à BMP-7.

Ubiquitination

Une autre voie de signalisation capable de réguler l'activité des BMPs est la dégradation de ces protéines suite à leur ubiquitination. La voie ubiquitine-protéasome est essentielle pour de nombreux processus biologiques comme la progression du cycle cellulaire, la transcription ou la transduction des signaux de manière plus générale. La formation des complexes ubiquitinylés requiert trois enzymes qui vont participer à la cascade de réactions de transfert de l'ubiquitine ; **ubiquitin-activating enzyme (E1)**, **ubiquitin-conjugating enzyme (E2)** et **ubiquitine ligase (E3)**. La spécificité de l'ubiquitination de la protéine va dépendre entièrement de E3. Plusieurs études indiquent que l'ubiquitine ligase **Smurf** régule la signalisation des BMPs en ciblant la dégradation des protéines SMAD1, SMAD5 et récepteurs de type I, par exemple (Zhu, Kavsak et al. 1999; Murakami, Watabe et al. 2003; Zhao, Qiao et al. 2003).

La régulation de la voie SMAD par des interactions avec d'autres voies de signalisation

La réponse cellulaire à BMP-7 est régulée par la translocation nucléaire des protéines SMADs. Comme nous l'avons vu précédemment, la phosphorylation des protéines R-SMAD, induite par BMP-7, est suivie de leur association avec SMAD4 et leur translocation nucléaire où elles favorisent la transcription des gènes cibles de BMP-7. D'autres kinases, activées en réponse à différents stimuli, sont également susceptibles de phosphoryler les protéines R-SMAD (Brunner, Liubin et al. 1992; Massague, Seoane et al. 2005).

Pour exemple, la stimulation cellulaire par l'**EGF**, qui induit l'activation successive de **Ras** et des Ser/Thr kinases **ERK (Extracellular-signal Regulated Kinase)**, conduit à la phosphorylation des protéines R-SMAD. Cette phosphorylation, contrairement à celle induite par le récepteur du TGF- β , n'a pas lieu au sein de leur domaine MH2, mais au niveau de motifs consensus Ps(S/T)P localisés au sein de leur domaine linker. Elle empêche alors la translocation nucléaire des SMADs et atténue donc leur action en tant que facteurs de transcription (Kretzschmar, Doody et al. 1999).

Les SMADs activées après liaison du TGF- β (SMAD2 et SMAD3) ont été étudiées en détail. En effet, une récente étude a permis de localiser précisément les sites de phosphorylation de SMAD3 par ERK. Il s'agit des résidus T178, S203 et S207, situés au sein de la région linker de SMAD3 (Matsuura, Wang et al. 2005). SMAD3 a également été décrite comme un substrat des kinases dépendantes de la **cycline G1**, et des **Cdk2** et **Cdk4**. La phosphorylation des résidus Ser212 et Thr178 situés dans le domaine linker de SMAD3 réprime ainsi la signalisation du TGF- β (Matsuura, Denissova et al. 2004). Enfin, un effet similaire de la phosphorylation de SMAD2 par la protéine **Cam kinase II (Calcium-Calmodulin-dependent protein kinase II)** a été décrit (Wicks, Lui et al. 2000).

Enfin, il a récemment été décrit que la kinase **Akt**, impliquée dans la voie de survie de la **PI3K (Phosphatidyl-Inositol 3-OH-Kinase)**, pouvait interagir avec la protéine SMAD3, indépendamment de sa phosphorylation par le récepteur du TGF- β , et la retenir dans le cytoplasme, inhibant les transcriptions dépendantes de SMAD3 et l'apoptose induite par le TGF- β (Conery, Cao et al. 2004; Remy, Montmarquette et al. 2004).

L'ensemble de ces observations démontre que la signalisation de BMP-7 est régulée de manière très fine par de nombreux mécanismes complexes (Fig 14).

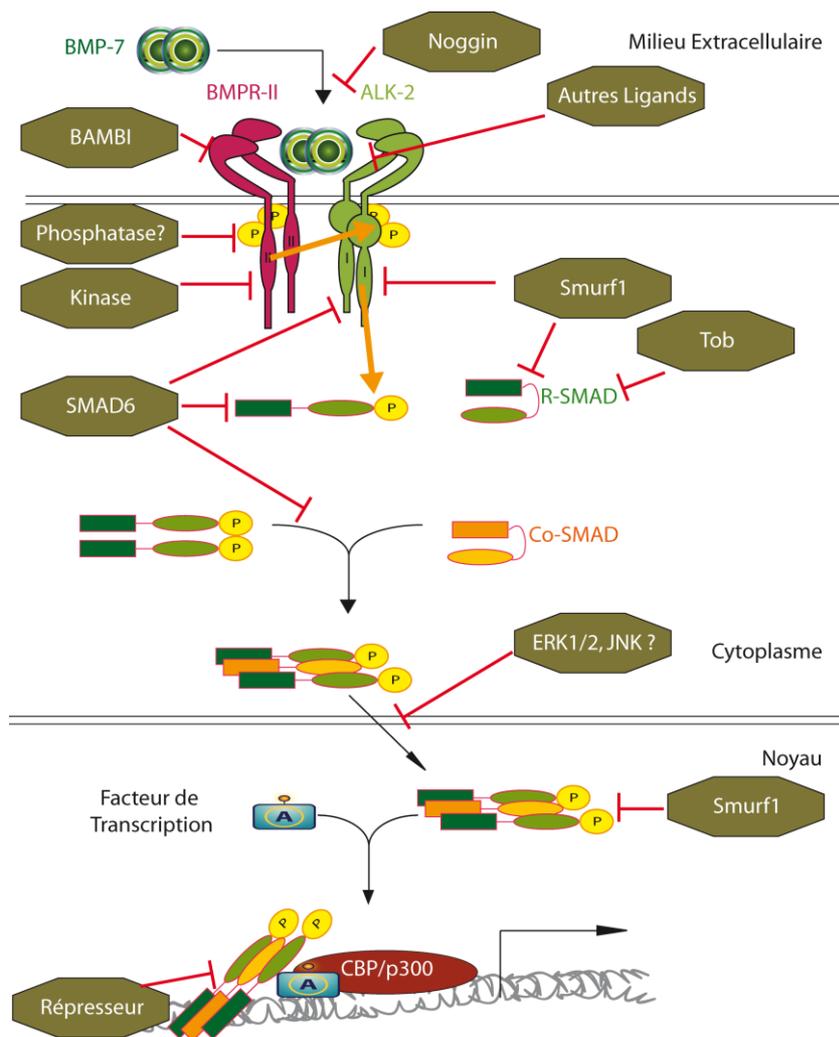


Figure 14 : Différents niveaux de contrôle négatif de la voie de signalisation de BMP-7.

EFFETS BIOLOGIQUES DU BMP-7

Le fait que le BMP-7 soit sécrété par de nombreux types cellulaires, que son action soit à la fois autocrine et paracrine, et que ses récepteurs présentent une distribution tissulaire ubiquiste permet de mieux comprendre pourquoi cette cytokine exerce des effets pléiotropiques qui varient selon le type cellulaire considéré et le contexte physio- pathologique.

La voie de signalisation impliquant BMPs, BMPRs et SMADs est importante dans le développement du cœur, du système nerveux central, du cartilage et aussi du développement osseux pendant la période post-natal. Ainsi, l'expression de BMP-7 a été observée dans le cœur, le rein, les dents, l'intestin et l'os à partir de la gastrulation et devient détectable dans l'intestin à partir des 8,5 et 9,5 jours post-coïtum (Helder, Ozkaynak et al. 1995). Les BMPs jouent un rôle important durant l'embryogenèse plus exactement, dans le « patterning » (la cartographie ou patron) du développement embryonnaire et la formation précoce du squelette. La désorganisation de la signalisation des BMPs peut affecter

l'organisation générale de l'embryon et son développement. Des mutations affectant les BMPs et ses inhibiteurs sont associées à nombreux désordres qui touchent le squelette (*Tableau 3*).

BMP-7	Souris K.O.	Mortalité survient peu de temps après la naissance. Développement rénal inachevé: Analyse histologique démontre que les cellules mésenchymales métanéphriques ne sont pas différenciées, conduisant à une absence de glomérules Défaut oculaire, qui parait avoir son origine suite à la formation de la rétine. Défauts mineurs du squelette
	BMP-7:ALK-6	Double mutante Sévère défauts du squelette appendiculaire.
ALK-3	Surexpression	Maladie de l'épithélium oral
	Souris K.O.	Non-viable Létal à E9,5 Manque de formation du mésoderme pendant la gastrulation
ALK-6	Souris K.O.	Viable Branchypodism
BMPRII	Mutations	Familial primary pulmonary hypertension: Maladie autosomale dominante rare.
SMAD1	Souris K.O.	Non-viable Mortalité survient à E10,5 Impossibilité d'implantation placentaire
SMAD5	Souris K.O.	Non-viable Mortalité survient à E10,5 Défaut de l'angiogenèse

Tableau 3 : BMP7, BMP-R et SMADs sont la cible d'altérations moléculaires (mutations).

BMP-7 contribue à la **différentiation ostéoblastique** des cellules de la moelle osseuse en induisant la transcription de gènes SMAD dépendants : cette action est tributaire de l'inhibition de ERK (Osyczka and Leboy 2005).

La **transition épithélium-mésenchyme (TEM)** est la cause de l'**arthrite rhumatoïde**. Le tissu synovial acquiert alors des caractéristiques fibroblastiques et n'est plus capable d'assurer sa fonction de régulateur de transport. L'addition de BMP-7 aux synoviocytes réprime la transcription de **α -sma (Smooth Muscle Actin)**, un marqueur des myofibroblastes, et la rémission de TEM (Steenvoorden, Tolboom et al. 2006).

L'**induction neurale** représente l'étape la plus précoce dans la détermination des cellules ectodermes. Chez les vertébrés, l'induction épidermale est en relation avec la signalisation des BMPs. Ainsi, BMP-7 peut spécifiquement induire un phénotype adrénergique du système sympathique pendant le développement des cellules neuronales (Christiansen, Coles et al. 2000). La morphogenèse dendritique a été partiellement clarifiée. BMP-7 activerait son récepteur de type II (BMPRII) lequel initie

une voie de signalisation indépendante de SMAD conduisant à l'activation de **Cdc42** et **LIMK1** (Lee-Hoeflich, Causing et al. 2004). De plus, une étude montre que BMP-7 est un agent protecteur contre la mort neuronale chez les rats après induction de l'**ischémie cérébrale** par hypoxie (Perides, Jensen et al. 1995).

Pendant la **reproduction**, les **oestrogènes** sont connus pour exercer une action anti-apoptotique. Une étude a démontré que BMP-7 induit une action apoptotique dans les oviductes, et que les oestrogènes inhibent la transcription de BMP-7 (Monroe, Jin et al. 2000).

La MAPK **p38** est impliquée dans la morphogénèse de la ramification rénale contrôlée par BMP-7 (Hu, Wasserman et al. 2004). En fonction des concentrations de BMP-7 considérées, cette cytokine active ou inhibe la phosphorylation de p38. Cette inhibition passe par l'activation de SMAD1 qui va ensuite inhiber p38. BMP-7 a aussi démontré son rôle protecteur dans les **maladies rénales chroniques**, son opposition au TGF- β dans la TEM en induisant la E-cadhérine, permettant ainsi la réversion de la pathologie (Zeisberg, Hanai et al. 2003).

Une réversion quasi-totale a été aussi observée dans l'**intestin** des rats après inflammation induite par le TNBS (acide TriNitroBenzeneSulfonique). En effet, l'injection de BMP-7 chez ces rats induit la diminution de cytokines inflammatoires comme **IL-6 (InterLeukine 6)**, **TNF- β (Tumor Necrosis Factor Beta)**, **ICAM-1 (InterCellular Adhesion Molecule 1)** et le TGF- β . De manière spectaculaire, les coupes histologiques révèlent un tissu presque normal après le traitement par BMP-7 (Maric, Poljak et al. 2003).

UTILISATION CLINIQUE DE BMP-7

Les membres de la famille de BMPs possèdent un fort potentiel thérapeutique. BMP-2 et BMP-7 ont reçu l'approbation de la « **Food and Drug Administration** » (**FDA**) pour leur utilisation clinique chez l'homme. Dans les opérations de greffe de cartilage artificiel, BMP-7 s'est avéré hautement efficace en protégeant le cartilage de l'invasion des fibroblastes par induction transcriptionnelle du collagène de type IV (Kaps, Bramlage et al. 2002).

De même, BMP-7 a été récemment utilisé dans le traitement des maladies chroniques du rein avec des résultats remarquables. Dans des modèles murins, BMP-7 compense la déplétion des glomérules suite

à la sclérose. Cette étude a permis d'enregistrer BMP-7 dans **Ortho Biotech Products**, une entreprise du groupe **Johnson & Johnson** (Zeisberg, Hanai et al. 2003).

BMP-7 AU COURS DE LA PROGRESSION TUMORALE

Les travaux impliquant BMP-7 dans la tumorigenèse sont très rares et récents. Certains mécanismes semblent être communs pour le TGF- β et BMP-7, selon l'état d'avancement des tumeurs, et le statut fonctionnel de SMAD4.

LE ROLE SUPPRESSEUR DE TUMEURS DE BMP-7

Une étude montre que BMP-7 s'oppose à l'EM induit par le TGF- β dans les **adénocarcinomes de l'oesophage** (Rees, Onwuegbusi et al. 2006). D'autre part, le rôle de BMP-7 dans les **adénocarcinomes de la prostate** a été clarifié. Au début de la progression cancéreuse de la prostate, il a été constaté une perte d'expression fréquente de ALK-3, ALK-6 et BMPRII (Kim, Lee et al. 2000), une expression de BMP-7 androgène-dépendante (Masuda, Fukabori et al. 2004) et que les cellules bénignes BPH-1, après ajout de BMP-7 exogène, présentent un arrêt du cycle cellulaire en G1 (Yang, Zhong et al. 2005).

LE ROLE PROMOTEUR DE TUMEURS

Dans le **cancer du sein**, le nombre de copies du gène *bmp-7* est significativement augmenté, ainsi que son expression dans 71% des tumeurs (Alarmo, Rauta et al. 2006). BMP-7 a été aussi décrit comme étant fortement surexprimé dans les **mélanomes malins** (Rothhammer, Poser et al. 2005).

BMP-7 induit la TEM et inhibe l'apoptose dans les **carcinomes de la prostate** via l'activation de JNK, SMAD5 et la transcription de survivine (Yang, Zhong et al. 2005; Yang, Lim et al. 2006). Les patients atteints d'un cancer de la prostate présentent 70% de risque de lésion osseuse métastatique. L'expression de BMP-7 dans ces métastases osseuses est significativement élevée (Masuda, Fukabori et al. 2003). La présence de BMP-7 induit la transcription du **VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)**, la différenciation ostéoblastique (Dai, Kitagawa et al. 2004), et selon les types cellulaires BMP-7 induit l'invasion de la matrice extracellulaire (Feeley, Gamradt et al. 2005; Feeley, Krenek et al. 2006).

Après l'étape de prolifération et d'expansion, les cellules cancéreuses entrent en hypoxie. Cette hypoxie va induire la transcription du VEGF et l'**angiogenèse**. Plusieurs études mettent en évidence le pouvoir angiogénique de BMP-7 via la transcription du VEGF, en synergie avec le FGF et le TGF- β 1 (Yeh and Lee 1999; Ramoshebi and Ripamonti 2000; Ripamonti 2005).

III. CANCER DU COLON

ASPECTS CLINIQUES

En France, le cancer est la **seconde** cause de mortalité après les maladies cardiovasculaires. Les cancers du côlon (CC) et du rectum représentent 15% des tumeurs malignes. On dénombre près de 33.500 nouveaux cas chaque année et la mortalité imputée aux cancers colorectaux est d'environ 16.000 décès par an. Il s'agit de la **deuxième** cause de décès par cancers après le cancer du poumon chez l'homme et le cancer du sein chez la femme, en raison notamment de leur découverte tardive. Le taux de survie brute à 5 ans est estimé à 41%. Ces chiffres font de ce cancer un véritable problème de santé publique associé à des stratégies de dépistage invasives (coloscopies) permettant la détection des lésions précancéreuses et des lésions asymptomatiques.

On peut classer la population en trois groupes : risque moyen, élevé et très élevé.

Sujets à risque moyen : sont concernés les individus de plus de 50 ans des deux sexes. Chez les personnes âgées de 45 à 74 ans, un programme de dépistage basé sur le test Hémocult® (recherche de la présence d'un saignement occulte dans les selles), répété tous les deux ans, et suivi d'une coloscopie en cas de positivité, peut diminuer la mortalité du CC de 15 à 18% ;

Sujets à risque élevé : ce groupe comprend les cas familiaux sporadiques (apparentés au premier degré de sujets atteints d'un CC et ne correspondant pas à une forme héréditaire), les sujets ayant des antécédents personnels d'adénomes de plus de 1 cm de diamètre ou de cancer colorectal, ou de maladies inflammatoires de l'intestin (rectocolite ulcéro-hémorragique ou maladie de Crohn) ;

Sujets à risque très élevé : dans 1 à 5% des cas , le CC survient dans un contexte d'agrégation familiale, évoquant le rôle d'un facteur génétique. Les maladies prédisposant au CC sont les maladies héréditaires, dont la transmission est autosomique dominante (près d'un sujet sur deux est atteint), à forte pénétrance (plus de 90% des sujets atteints d'une mutation constitutionnelle présentent un CC), et à expression variable. Actuellement, deux maladies associées aux gènes majeurs de susceptibilité du CC ont été identifiées : la **Polypose Adénomateuse Familiale (FAP)** et le **syndrome de Lynch** ou syndrome **HNPCC (Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer)**.

FAP

La polypose adénomateuse familiale représente moins de 1% du CC. Elle est caractérisée par le développement de plusieurs centaines de polypes adénomateux tapissant la muqueuse intestinale. Les techniques de génétique moléculaire permettent de rechercher, à partir de leucocytes du sang circulant, la mutation constitutionnelle délétère située sur le bras long du chromosome 5. Cette mutation concerne le gène suppresseur de tumeur **apc (Adenomatous Polyposis Coli)** codant la protéine cytoplasmique **APC** qui forme un complexe avec les protéines **axine**, **GSK3 β** et la **β -caténine**, conduisant à la dégradation de cette dernière. La perte de la fonction APC entraîne une accumulation cytoplasmique de la β -caténine qui est alors transloquée dans le noyau où elle stimule la transcription de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire et la résistance à l'apoptose (comme les gènes codant la **cycline D** et **c-Myc**). Plus de 300 mutations du gène *apc* ont été identifiées, associées au développement de tumeurs desmoïdes et d'une polypose du tractus digestif, ainsi qu'à des formes cliniques particulièrement sévères avec une transformation maligne des adénomes précoces (environ dix ans plus tôt) par rapport aux CC sporadiques.

HNPCC

Le syndrome HNPCC ou syndrome de Lynch représente 1 à 5% des CC. Ces cancers sont parfois précédés d'adénomes qui ont pour caractéristique d'être souvent de petite taille, peu nombreux, présentant un aspect plat et des signes de dysplasie sévère. Le syndrome est actuellement défini par les critères d'Amsterdam au nombre de trois : i) trois parents au moins sont atteints de CC dont l'un est uni aux deux autres par un lien de parenté au premier degré, ii) le diagnostic a été porté avant l'âge de 50 ans, iii) deux générations successives sont atteintes. Ces cancers sont le siège d'altérations génétiques dues à une **instabilité des loci microsatellites (MSI)**. Dans 50 à 70% de ces familles, une mutation est identifiable sur les chromosomes 2, 3 ou 7 (gènes ***mlh-1***, ***mlh-2***, ***pms-1*** et ***pms-2***). Si cette mutation est détectée chez un sujet atteint, on peut alors proposer le diagnostic génétique aux sujets asymptomatiques de la famille.

Les causes du CC ne sont encore que partiellement connues. Cependant, la connaissance des facteurs étiologiques est nécessaire à la mise en place d'une politique de prévention. Outre le facteur génétique prédisposant à la FAP et au syndrome de Lynch, la responsabilité de l'environnement dans le développement du CC est aujourd'hui un fait établi. Les études épidémiologiques suggèrent que parmi

les facteurs d'environnement, l'alimentation joue un rôle essentiel dans l'étiologie de ces cancers, soit comme initiateur, soit comme promoteur, soit comme inhibiteur de la carcinogenèse. Le rôle protecteur des **légumes** et le rôle délétaire d'un **apport calorique** élevé et de la **sédentarité** sont les faits les mieux établis. Ils interviennent probablement à une phase d'initiation-promotion de la carcinogenèse et pendant la transformation maligne de l'adénome, en association aux altérations moléculaires familiales ou acquises. Les **sucres** et les **hydrates de carbone** sont des facteurs de risque dans les pays d'Europe latine comme le rôle péjoratif des graisses, de la viande rouge. Le rôle des fibres alimentaires est encore controversée.

Des données récentes en France et en Amérique du Nord suggèrent que le **tabac** est un facteur d'apparition des adénomes et l'**alcool** un facteur d'augmentation de leur taille. Différentes études indiquent que les **vitamines anti-oxydantes** (bétacarotène, vitamine E, et vitamine C) n'interviennent ni dans l'apparition, ni dans l'augmentation de taille, ni dans la transformation des adénomes en cancer (Clapper, Chang et al. 2001). De plus, des études épidémiologiques et cliniques démontrent que le **calcium** et la **vitamine D** sont capables de modifier et d'inhiber le développement des tumeurs coliques (Lamprecht and Lipkin 2003). Dans leur ensemble, les données disponibles ne sont pas encore très précises, même si elles permettent d'établir les bases d'un régime potentiellement protecteur.

CARCINOGENESE COLIQUE

LA MUQUEUSE COLIQUE NORMALE

La muqueuse du côlon est tapissée par 10 millions de cryptes environ, composées chacune de plusieurs milliers de cellules épithéliales et d'un compartiment de cellules souches progénitrices. Ces cellules souches sont localisées à la base des cryptes et se divisent au sein d'un pool en auto-renouvellement constant. Selon des signaux encore mal connus, des cellules en division échappent à ce compartiment, migrent et se différencient le long de la crypte vers la surface de la muqueuse où elles desquament par apoptose. Chaque jour, environ 10 milliards de cellules sont libérées dans la lumière du côlon et sont remplacées. Chaque division cellulaire frénétique représente un risque de cancer d'erreurs très important, du fait des événements mutationnels pouvant se produire durant la réplication de l'ADN et la ségrégation des chromosomes (Rajagopalan, Nowak et al. 2003).

ASPECT HISTOLOGIQUE DU CC

L'évolution du CC est relativement bien caractérisée et ce pour deux raisons : ces tumeurs se développent sur une période en majorité supérieure à 10 ans, selon des étapes bien définies. De plus, le côlon est relativement accessible par endoscopie, ce qui facilite la reconnaissance des étapes de la carcinogenèse précédant le carcinome invasif. La carcinogenèse du CC peut être caractérisée en trois étapes histologiques (Fig. 15).

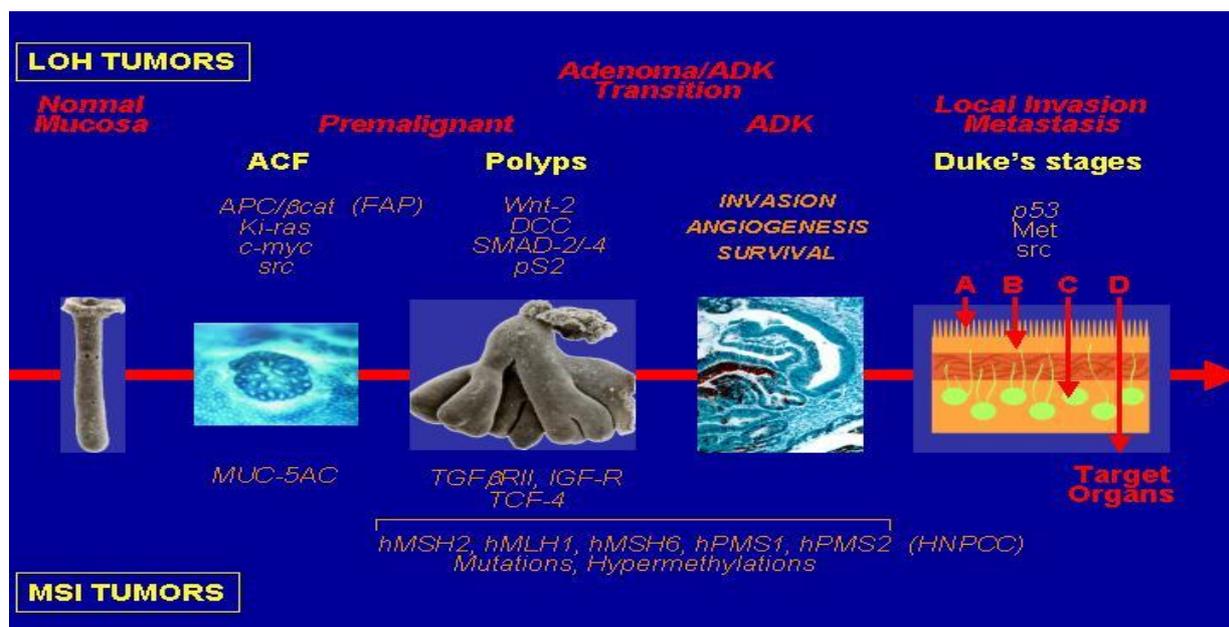


Figure 15 : Progression du cancer du côlon selon Fearon & Vogelstein. Principaux facteurs génétiques et épigénétiques impliqués dans la cancérogenèse colorectale.

Les lésions hyperplasiques

L'hyperprolifération des cellules épithéliales coliques mène à la dilatation, à l'élongation et à la fission des cryptes. Si cette lésion touche un ensemble de cryptes, la muqueuse montre une surélévation polypoïde. C'est la **crypte aberrante (ACF, Aberrant Crypt Foci)** ou polype précancéreux. Les cellules constituant l'ACF sont dysplasiques, caractérisées par un noyau hyperchromatique et par la perte de la polarité de la muqueuse.

Les lésions adénomateuses

À partir des ACF, plus spécifiquement celles présentant une dysplasie, se développe l'**adénome**. La majorité des adénomes se développent sous forme de lésions polypoïdes pédiculées à la surface de la muqueuse. On parle par conséquent de **polypes**. Ce terme n'est pas tout à fait correct car on trouve dans le côlon plusieurs lésions polypoïdes (les polypes hyperplasiques, juvéniles et inflammatoires) dont uniquement les adénomes (issus de polypes dysplasiques) sont de nature pré-néoplasique. Les adénomes sont des lésions fréquentes (un tiers des sujets de plus de 65 ans sont atteints) parmi lesquels seuls 10% atteignent 1 cm de diamètre. Les gros adénomes constituent les véritables lésions précancéreuses, car environ un quart d'entre eux deviennent des cancers. La prévalence des adénomes est estimée à 15% entre 50 et 59 ans et à 33% entre 70 et 75 ans. Environ 60 à 80% des CC siègent et évoluent sur un adénome.

Les carcinomes

Ce sont les lésions ayant un haut degré de dysplasie et associées à une croissance infiltrante. On estime que la durée de la séquence adénome-adénocarcinome est d'environ 9 ans, avec des extrêmes allant de 2 à 20 ans. L'extension loco-régionale de la tumeur dans la paroi digestive (sous-muqueuse, musculuse, séreuse) est déterminante pour le pronostic. Cette extension est codifiée par la classification de **Dukes** et la classification **TNM (Tumor Nodes Metastasis)** (*Tableau 5*). Les facteurs déterminants dans ces classifications sont, mises à part les métastases à distance, la profondeur de l'infiltration dans la paroi digestive et la présence de métastases ganglionnaires. Les métastases du CC se font par ordre de fréquence, dans les ganglions (50%), le foie (26%), les os (6%), les poumons (5%), le péritoine (4%) et le cerveau (2%).

Stade	TNM			Astler et Coller (Dukes Modifié)
0	Tis	N0	M0	A
I	T1	N0	M0	B1
	T2	N0	M0	B1
II	T3	N0	M0	B2
	T4	N0	M0	B3
III	T1-T2	N1-3	M0	C1
	T3	N1-3	M0	C2
	T4	N1-3	M0	C3
IV	Tout T	Tout N	M1	D

Tableau 5: Correspondances entre les classifications. T= Tumeur Primaire. N= Envahissement Ganglionnaire. M= Métastase

BASES GENETIQUES DU CC

La carcinogenèse colique est la résultante d'une accumulation d'altérations géniques au niveau de plusieurs proto-oncogènes et de gènes suppresseurs de tumeur, selon une chronologie selon une chronologie relativement fidèle pour certains éléments.

Un modèle de carcinogenèse moléculaire associé aux trois étapes histologiques principales a été proposé en 1990 par le groupe de Vogelstein (Fearon and Vogelstein 1990) (*Fig. 15*). La progression des tumeurs coliques débute avec une cellule épithéliale ayant acquis une altération génique lui conférant des avantages de prolifération et de survie. Cette altération peut être la résultante d'une mutation génétique ou d'une régulation épigénétique telle qu'une hypo- ou hyperméthylation du promoteur d'un gène donné. Cette cellule donne naissance à une population clonale qui, au fil des générations, acquiert de nouvelles altérations géniques lui conférant un phénotype malin caractérisé par la capacité d'invasion. Ce processus tumoral est renforcé par l'instabilité génomique se traduisant par la perte ou gain de larges portions de chromosomes (**LOH, Loss of Heterozygosity**). La transition de l'épithélium colique normal à l'adénome pré-cancéreux puis au carcinome invasif suit une séquence d'événements mutationnels relativement bien définie. Il est généralement admis que le CC est initié par l'inactivation du gène suppresseur de tumeur **apc** (protéine impliquée dans l'adhésion cellulaire, la transcription et la ségrégation/stabilité des chromosomes. Cette mutation précoce est présente dans 85% des CC. Le proto-oncogène **K-ras**, muté dans 60% des CC, code une petite protéine G qui contrôle la prolifération cellulaire. A ce stade, 10 à 20% des adénomes progressent en carcinomes suite à l'accumulation de mutations dans les gènes suppresseurs de tumeurs codant les **E-cadhérines** (glycoprotéine membranaire assurant les interactions cellules-cellules), **SMAD4**, **DCC** (récepteur transmembranaire pour la nétrine- : la protéine DCC induit l'apoptose en absence de nétrine), **p53** (protéine pro-apoptotique), l'activation des oncogènes **src**, **met** et du récepteur du facteur de croissance **R-EGF** (Kinzler and Vogelstein 1996; Terdiman 2000; Markowitz, Dawson et al. 2002; Kerr 2003; Rajagopalan, Nowak et al. 2003; Rodrigues, De Wever et al. 2007).

TRAITEMENT DU CANCER DU COLON

PRONOSTIC

Seulement 4 à 5% des CC sont diagnostiqués fortuitement à un stade asymptomatique en coloscopie, soit dans le cadre du dépistage du cancer lui-même, soit à l'occasion d'une exploration demandée pour une autre cause. La gravité du CC est d'autant plus grande que le sujet est jeune (bien qu'après 70 ans, le taux de résécabilité est moindre et la mortalité opératoire supérieure). Le degré d'extension tumorale en profondeur est le facteur pronostique primordial. Les métastases sont présentes dans 15 à 20% des cas au moment du diagnostic. Lorsqu'elles existent, le pronostic dépend alors de l'étendue des lésions hépatiques et de l'état fonctionnel du parenchyme sain restant. Lorsqu'une métastase hépatique est inopérable, la survie n'est que de 28% à 1 an et nulle à 5 ans. Si une métastase unique est réséquée, la survie peut atteindre 40% à 5 ans.

THERAPEUTIQUE

Le traitement curatif du CC est **essentiellement chirurgical**. L'exérèse colique est possible dans 70% des cas quelle que soit la localisation. Le taux de survie à 5 ans après chirurgie curative est de l'ordre de 50%. La chirurgie est encore possible dans certains cas de métastases limitées en nombre (métastases hépatiques ou pulmonaires). Des traitements complémentaires à la chirurgie permettent de diminuer notablement le risque de récurrence et la mortalité par cancer. En fonction du stade de la tumeur au moment du diagnostic, différents types de chimiothérapie peuvent être appliqués : i) la chimiothérapie d'induction ou néo-adjuvante est administrée dès que le diagnostic de cancer est établi. Elle est effectuée après confirmation du diagnostic histologique par biopsie et permet d'agir immédiatement sur des métastases, occultes ou mesurables, et facilite souvent le geste chirurgical en diminuant le volume de la tumeur primitive, ii) la chimiothérapie adjuvante est administrée après un traitement chirurgical locorégional chez des patients porteurs d'un cancer à fort potentiel métastatique et permet de traiter des métastases occultes, iii) en cas de tumeur évoluée ou des métastases inopérables, la chimiothérapie palliative peut être proposée aux patients pour améliorer la qualité de vie et parfois prolonger la survie.

La base des traitements de chimiothérapie adjuvante et palliative du CC associe deux produits dont l'efficacité se potentialise : le **5-fluorouracil (5-FU)** : Aducril®, Fluorouracil Roche®, Efudex®, Fluoroplex®) et l'**acide folinique** (ou **leucovorin** : Leucovorin Calcium®, Wellcovorin®). Le 5-FU est un analogue de bases pyrimidiques. L'atome de fluor, qui dans le 5-FU remplace un atome d'hydrogène sur le noyau pyrimidine, a un volume voisin de celui de l'hydrogène, mais une réactivité chimique très différente, ce qui entraîne des perturbations métaboliques dans la biosynthèse des acides nucléiques. L'administration parallèle de l'acide folinique permet de renforcer l'activité du 5-FU en formant avec le **5-dFUMP** (un des métabolites du 5-FU) un complexe qui inhibe la thymidylate synthase et la formation de thymidine nécessaire à la construction de l'ADN. Deux autres molécules sont utilisées au cours de certains protocoles cliniques en combinaison avec le 5-FU et l'acide folinique, l'**oxaliplatine** et l'**irinotécan**. L'oxaliplatine (Eloxatin®), composé d'un atome de platine complexé avec l'oxalate et le diaminocyclohexane, inhibe la synthèse de l'ADN par formation de ponts intra-brins entre deux guanines adjacentes. L'irinotécan (ou **CPTII** : Camptosar®) est un inhibiteur de la topoisomérase I, enzyme nécessaire à la réplication de l'ADN.

Les nouvelles connaissances sur les mécanismes moléculaires et des éléments de la signalisation oncogénique dans la progression des CC ont permis l'émergence de nouvelles stratégies thérapeutiques qui s'orientent principalement vers des thérapies ciblées, visant essentiellement les cellules tumorales. Dans les traitements des CC à un stade avancé, deux stratégies se distinguent actuellement :

Les molécules anti-angiogéniques

L'angiogenèse tumorale est une étape clé de la carcinogenèse. Elle est nécessaire à l'accroissement du volume de la tumeur, sa survie et à la dissémination des cellules cancéreuses vers les tissus périphériques. Le **VEGF** est un facteur de croissance pro-angiogénique. Il agit sur les cellules endothéliales et permet la formation et la croissance de vaisseaux sanguins alimentant la masse tumorale en oxygène et nutriments. Le **bevacizumab** (Avastin®, anticorps monoclonal humanisé recombinant dirigé contre le VEGF), en combinaison avec les molécules de chimiothérapie classique, augmente la survie de patients atteints d'un CC métastaté (Hurwitz, Fehrenbacher et al. 2004). D'autres molécules anti-angiogéniques en cours d'analyse ciblent l'activité **tyrosine-kinase des récepteurs VEGF (SU5416)**.

Les molécules ciblant la signalisation de l'EGF

Les **EGF-R** sont sur-exprimés dans de nombreux CC, conduisant à une augmentation de la prolifération cellulaire, de l'agressivité des tumeurs et à un mauvais pronostic. Le **Cetuximab** (Erbix® un anticorps monoclonal) en combinaison avec la chimiothérapie classique permet de retarder la progression tumorale. L'inhibiteur de l'activité **tyrosine-kinase du EGF-R** (Iressa®) est utilisé dans le traitement des cancers du poumon non à petites cellules.

D'autres molécules anti-cancéreuses sont en cours de développement clinique comme les inhibiteurs de **farnésyl-transférases** (FTI, ces composés bloquent la modification post-traductionnelle de farnésylation, étape d'activation indispensable à certaines GTPases monomériques dont Ras et Rho) et les inhibiteurs des **histones déacétylases** (HDAC, les histones acétylases permettent l'accès à l'ADN de la machinerie transcriptionnelle en participant à l'ouverture de la chromatine, tandis que le HDAC sont des répresseurs). La protéine inductible **cyclooxygénase-2 (COX-2)** est actuellement au centre d'une stratégie chimiopréventive du CC. Les adénomes coliques présentent des taux d'expression élevés de cette protéine qui, avec son isoforme non-inductible COX-1, permet la formation des **prostaglandines** (Stack and DuBois 2001). L'inactivation du gène *cox-2* chez la souris entraîne une remarquable diminution du nombre d'adénomes intestinaux (Oshima, Dinchuk et al. 1996) et l'utilisation de drogues de la famille des **anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)** inhibant l'activité de COX-2 (**aspirine** et **celecoxib**) induit la déplétion d'adénomes coliques au cours d'essais cliniques chez l'homme (Stack and DuBois 2001). L'utilisation chronique de drogues anti-COX-2 est associée à une diminution du risque de CC et le potentiel préventif de ces drogues est actuellement évalué au sein d'études cliniques.

Par ailleurs, les nouvelles techniques comme les puces à ADN et la protéomique, associées à la PCR quantitative en temps réel, permettent la quantification de cibles moléculaires potentielles ou établies, pouvant ainsi constituer un facteur pronostique et l'identification de nouvelles cibles moléculaires contre le CC.

IV. MECANISMES MOLECULAIRES ET CELLULAIRES DE LA PROGRESSION TUMORALE

DE LA CELLULE NORMALE A LA CELLULE CANCEREUSE

Dans la majorité des cas, le cancer est issu d'une lésion irréversible de l'ADN au niveau d'un gène conférant à la cellule normale des capacités de la prolifération continue et de résistance à l'apoptose. Nous avons vu que cette altération génique peut être héréditaire, ou acquise lors de la synthèse de l'ADN ou sous l'action de facteurs initiateurs, les carcinogènes (radiations, agents chimiques, agents infectieux). La population cellulaire qui en résulte (expansion clonale) accumule au fil des générations des mutations qui, associées à une instabilité génomique, conduisent à la sélection de clones engagés dans le processus tumoral (Ponder 2001). Ces altérations géniques se traduisent par l'activation (gain de fonction, **oncogènes**) ou à la neutralisation (perte de fonction, **gènes suppresseurs de tumeurs**) de gènes majeurs et conduisent à la transformation progressive de la cellule normale vers la cellule hautement tumorale. Les cellules cancéreuses diffèrent des cellules normales par l'acquisition de six propriétés : l'auto-suffisance en facteurs de croissance, l'insensibilité aux signaux d'arrêt de la prolifération, des déficits de réparation de l'ADN, l'échappement à l'apoptose, un potentiel de réplication illimité, une angiogenèse continue et un potentiel invasif et métastatique (Hanahan and Weinberg 2000).

- i) toutes les cellules dépendent de l'action de signaux mitogéniques pour proliférer. Ces signaux sont transmis à la cellule *via* les récepteurs membranaires se liant à différentes classes de molécules comme les hormones, les facteurs de croissance, les composants de la matrice extracellulaire (**MEC**) et les molécules d'adhésion cellule-cellule. Les cellules cancéreuses présentent une dépendance très réduite aux facteurs de croissance exogènes. Ces cellules s'affranchissent de ces signaux en sécrétant leurs propres facteurs de croissance et en surexprimant les récepteurs associés, créant ainsi une boucle autocrine. Cette surexpression peut également entraîner une activation constitutive de ces récepteurs, indépendamment des ligands. De plus, différentes perturbations touchant des éléments de signalisation intra-cellulaire et les intégrines membranaires contribuent à cette autosuffisance. Environ 50% des cancers colorectaux présentent une mutation de l'oncogène *ras* conduisant à l'activation continue de la voie de signalisation mitogénique des MAPK.

- ii) les signaux anti-prolifératifs sont nécessaires au maintien de la quiescence cellulaire et à l'homéostasie tissulaire. Les cellules transformées ne répondent plus à ces signaux de contrôle et présentent des perturbations au niveau du cycle cellulaire.
- iii) L'expansion d'une population cellulaire est régie par un équilibre entre les signaux prolifératifs, anti-prolifératifs, pro-apoptotiques et anti-apoptotiques. Les cellules cancéreuses présentent des altérations de facteurs pro-apoptotiques (la protéine p53, à l'origine d'une voie de signalisation pro-apoptotique, est mutée dans plus de la moitié des cancers) et la capacité de proliférer en absence d'adhésion au substrat (résistance à l'anoïkis).
- iv) Les cellules normales, après un certain nombre de doublements, arrêtent de proliférer et entrent en sénescence. Ce mécanisme est assuré par le raccourcissement progressif des télomères à chaque cycle cellulaire. Les télomères sont composés de plusieurs milliers de répétitions d'une courte séquence de six paires de base à l'extrémité des chromosomes. Ce raccourcissement est attribué à l'incapacité des ADN polymérases à répliquer intégralement l'extrémité 3' des chromosomes durant chaque phase S. Ces chromosomes ne sont alors plus protégés et fusionnent à leurs extrémités. Les cellules tumorales surexpriment les télomérases et maintiennent les télomères au-delà de la taille critique permettant ainsi une multiplication infinie des cellules (immortalisation).
- v) Toutes les cellules d'un tissu se trouvent à une distance comprise entre 100 et 200 μm d'un capillaire sanguin ce qui leur permet de disposer des apports en oxygène et nutriments. La prolifération continue des cellules cancéreuses aboutit à l'augmentation de la masse tumorale nécessitant l'induction d'un réseau vasculaire de novo (on parle du « switch angiogénique »). L'angiogénèse tumorale conduit à la formation de vaisseaux dilatés, excessivement branchés et relativement non fonctionnels, conduisant à un apport d'oxygène hétérogène, à une hypoxie secondaire et à la nécrose. Les cellules cancéreuses expriment des facteurs pro-angiogéniques et surexpriment des protéases matricielles favorisant l'accessibilité des cellules endothéliales à la masse tumorale.
- vi) L'invasion et la métastase sont deux phénomènes reliés mais distincts. L'invasion c'est l'infiltration des cellules tumorales dans les tissus avoisinants et la métastase est

caractérisée par la progression et l'envahissement des cellules tumorales vers les tissus périphériques, à distance du foyer tumoral. L'acquisition des propriétés invasives et métastatiques par les cellules cancéreuses représente un événement crucial dans la progression des cancers et leur pronostic. On distingue donc : l'invasion locale, la compétence métastatique, la formation de la niche métastatique, l'implantation et la survie dans l'organe cible, et la virulence métastatique responsable du caractère létal des tumeurs solides humaines. Nous allons détailler ces étapes dans le paragraphe suivant.

PROGRESSION DES TUMEURS VERS LA METASTASE

La gravité des cancers est en majorité directement corrélée au degré d'extension de la tumeur primaire dans les tissus avoisinants et périphériques. Dans la plupart des cas, les patients avec une tumeur localisée bénéficient d'un pronostic très favorable après exérèse chirurgicale ou radiothérapie. L'envahissement métastatique est le facteur pronostique déterminant dans le traitement et la survie des patients. Bien que les bases génétiques de la tumorigenèse puissent varier en fonction des différents types de cancers, les mécanismes moléculaires et cellulaires nécessaires à l'envahissement métastatique sont généralement similaires pour l'ensemble des tumeurs solides. Le processus métastatique est composé d'étapes successives. La prolifération des cellules transformées conduit à la formation d'une masse tumorale croissante, nécessitant la néoformation d'une vascularisation (angiogenèse tumorale) pour l'acheminement de l'oxygène et des nutriments. Certaines de ces cellules (sélection clonale) acquièrent un phénotype invasif défini par un remaniement des molécules d'adhésion cellule-cellule et cellule-matrice, l'expression et la sécrétion de protéases matricielles et une mobilité directionnelle. Les cellules invasives dégradent alors la matrice extracellulaire environnante et envahissent le tissu dans lequel elles se trouvent. La colonisation tumorale des tissus périphériques est l'étape clé du processus métastatique et fait intervenir la pénétration des cellules cancéreuses dans les vaisseaux lymphatiques ou sanguins (intravasation), leur survie dans la circulation, l'arrêt au niveau d'un tissu cible et la sortie des cellules cancéreuses dans le tissu hôte. Le processus aboutit à la formation de micrométastases, pouvant être dormantes pendant plusieurs années, évoluant par la suite en macrométastases (*Fig 16*) (Chambers, Groom et al. 2002; Timar, Csuka et al. 2002; Bogenrieder and Herlyn 2003; Pantel and Brakenhoff 2004; Bockhorn, Jain et al. 2007; Eccles and Welch 2007).

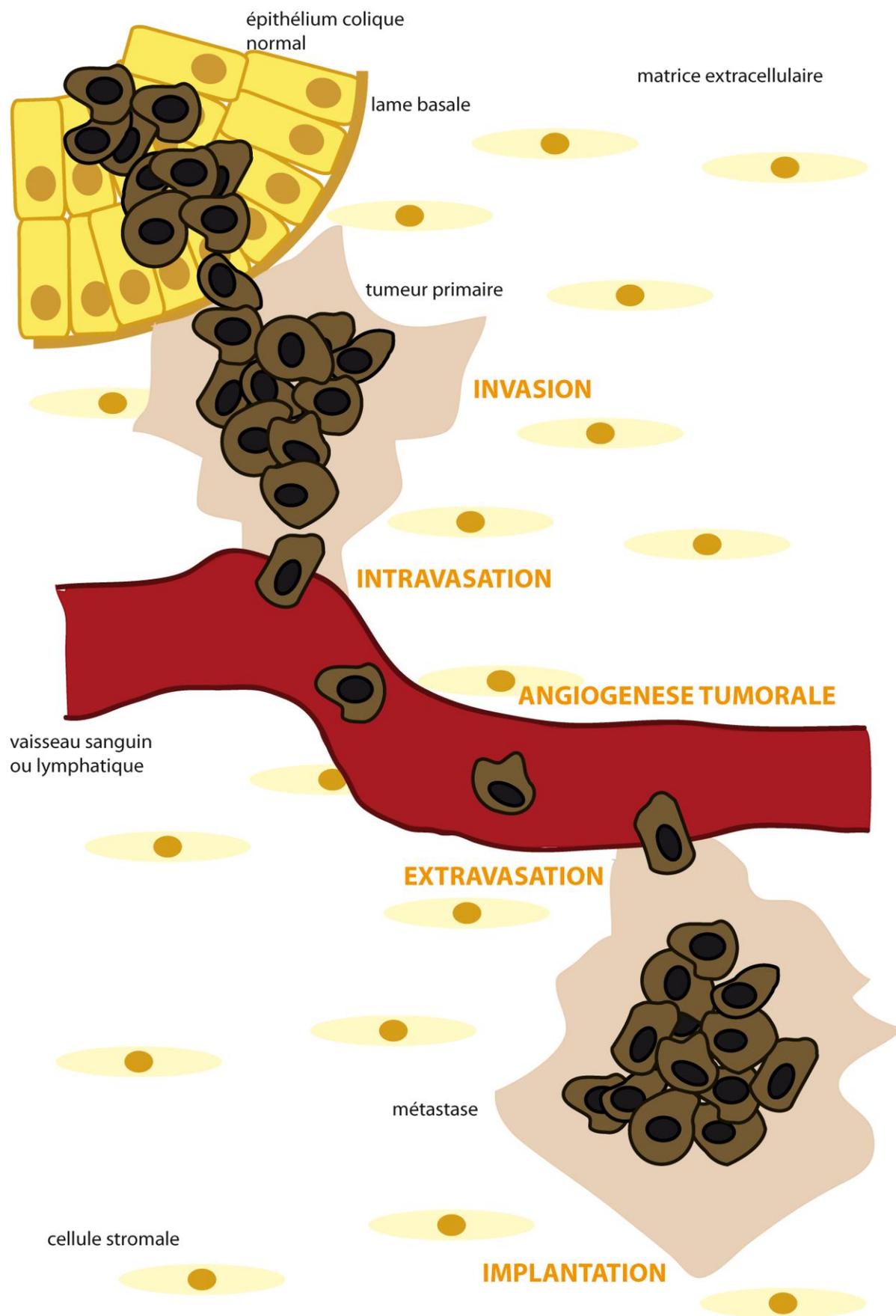


Figure 16 : Cascade métastatique

ANGIOGENESE TUMORALE

La **vasculogénèse** intervient pendant l'embryogenèse mais également chez l'adulte, au cours de processus physiologiques comme la réparation des lésions et l'ovulation. L'angiogenèse joue un rôle primordial dans la progression des cancers et le développement des métastases. **L'angiogenèse** est le développement de nouveaux vaisseaux sanguins à partir d'un réseaux vasculaire pré-existant. En effet, elle est nécessaire à la croissance de la masse tumorale, à sa progression en cancer invasif et au développement des micrométastases dormantes ou évolutives en macrométastases cliniquement détectables.

La vasculogénèse et l'angiogenèse sont étroitement régulées par la balance entre l'action de facteurs inducteurs ou inhibiteurs. Chez l'adulte sain, le réseau vasculaire est quiescent. Au cours des processus physiologiques tels que la réparation des lésions tissulaires, la vasculogénèse aboutit à la formation de nouveaux vaisseaux qui arrivent rapidement à la maturation et deviennent stables. Au contraire, l'angiogenèse tumorale présente un déséquilibre de la balance en faveur des facteurs pro-angiogéniques sécrétés par les cellules cancéreuses (EGF, FGF, TGF- α et VEGF), conduisant à la formation et à la croissance continue de nouveaux vaisseaux sanguins qui échappent aux signaux de quiescence. Il en résulte un réseau vasculaire tumoral profondément chaotique instable avec des capillaires de formes irréguliers et tortueux, favorisant la formation de régions hémorragiques évoluant par fois vers la nécrose.

Le processus angiogénique des tumeurs nécessite la participation active des cellules cancéreuses, des cellules endothéliales de proximité mais également des composants du micro-environnement tumoral. Les cellules épithéliales cancéreuses sécrètent des facteurs pro-angiogéniques (dont le principal représentant est le VEGF) qui diffusent à proximité des cellules endothéliales des capillaires pré-existant et les activent par chimiotactisme entraînant leur prolifération et migration vers le foyer tumoral. Elles produisent également des métalloprotéases permettant la dégradation de la membrane basale et de la matrice extracellulaire avoisinante, libérant ainsi des facteurs angiogéniques et chimio-attractants séquestrés dans cette matrice et permettant une meilleure accessibilité aux cellules endothéliales. En réponse, les cellules endothéliales activées peuvent alors migrer et former le nouveau réseau vasculaire irriguant la tumeur (Bergers and Benjamin 2003; Carmeliet 2003; Bockhorn, Jain et al. 2007).

Hypoxie

Le principal facteur initiateur de l'angiogenèse tumorale est l'hypoxie, définie par la présence au sein de la masse tumorale de régions où l'apport de l'oxygène aux cellules par simple diffusion est insuffisant. Le facteur de transcription **HIF-1 α (Hypoxia Inducible Factor 1 alpha)** joue un rôle majeur dans la réponse des cellules cancéreuses à l'hypoxie. Dans les conditions normales d'oxygénation des cellules, la protéine HIF-1 α est hydroxylée sur deux résidus proline permettant son interaction avec l'ubiquitine ligase (VHL)-E3 qui cible alors le complexe vers la dégradation par le protéasome. En situation de faible oxygénation des cellules cancéreuses, HIF-1 α échappe à la protéolyse et peut se fixer sur les éléments de réponses **HRE** présents sur les promoteurs de gènes codant les protéines clés du processus angiogénique. Il a été également rapporté que l'expression de HIF-1 α peut être régulée par des facteurs de croissance (insuline, IGF-1, EGF- et des oncogènes *src* et *ras*) (Semenza 2002; Pugh and Ratcliffe 2003; Mazure, Brahimi-Horn et al. 2004; Keith and Simon 2007).

VEGF

Le VEGF est le régulateur principal de la vasculogenèse (angiogenèse physiologique) et de l'angiogenèse pathologique des tumeurs, par exemple. Le VEGF joue un rôle majeur dans la formation du réseau vasculaire de l'embryon. Chez l'adulte, il est nécessaire à la croissance de l'os et aux fonctions ovariennes et endométriales. Dans le contexte de l'angiogenèse tumorale, il est sécrété par les cellules cancéreuses et il constitue un facteur de prolifération, de survie et chimiotactique pour les cellules endothéliales, selon le dogme. Il augmente également la perméabilité vasculaire. La famille du VEGF comprend plusieurs membres dont le prototype est le **VEGF A**. L'épissage alternatif d'exons du transcrite codant le VEGF A engendre 4 isoformes dont la plus représentée est le **VEGF165**. Ce facteur de croissance est sécrété, mais une quantité importante de la protéine est retenue à la surface cellulaire et dans la matrice extracellulaire. Ainsi, les enzymes de protéolyse de la matrice ont un rôle majeur dans la biodisponibilité du VEGF. Par ailleurs, le clivage de VEGF par la plasmine permet la formation d'un produit bioactif constitué des 110 premiers acides aminés de la partie N-terminale. Le VEGF transmet son signal à la cellule via son interaction avec ses deux récepteurs membranaires **Flt-1 (VEGF-R1)** et **KDR (VEGF-R2)**. KDR permet la transmission de signaux de prolifération, de survie et de migration. Par contre, Flt-1 aurait plutôt une action inhibitrice en séquestrant le VEGF, empêchant ainsi sa liaison à KDR. Cependant, Flt-1 permet l'induction de l'expression de métalloprotéases matricielles et la sécrétion paracrine de facteurs de croissance. La transcription du VEGF est induite par l'hypoxie,

via le système HIF, par des facteurs de croissance (TGF- α , TGF- β , IGF-1, FGF, PDGF), par des cytokines inflammatoires (IL-1, IL-6), et des oncogènes (formes mutées de *ras*, dérégulation de la voie de Wnt). L'expression des transcrits du VEGF est augmentée dans de nombreux types de tumeurs humaines (Ferrara, Gerber et al. 2003; Ferrara, Hillan et al. 2004; Mitra, Mikolon et al. 2006).

L'angiogenèse constitue une étape clé du développement métastatique. Ainsi, différentes stratégies thérapeutiques anti-angiogéniques sont actuellement à l'étude, particulièrement contre le système HIF (études en cours) et le système VEGF. La stratégie anti-VEGF est maintenant validée en oncologie clinique. Plusieurs molécules sont proposées, dont les inhibiteurs de l'activité tyrosine-kinase des VEGF-Rs, les récepteurs solubles et les anticorps monoclonaux dirigés contre le VEGF. L'anticorps monoclonal **Bevacizumab** (Avastin®) a été approuvé le 26 février 2004 par la FDA comme traitement de première ligne (en association avec un schéma IFL, Irinotécan/5-FU/Leucovorin) des cancers du colôn métastasés (Kerbel and Folkman 2002; Giaccia, Siim et al. 2003; Brown and Wilson 2004).

MICRO-ENVIRONNEMENT TUMORAL

L'homéostasie tissulaire est la résultante d'interactions coordonnées entre les cellules épithéliales et les composants du tissu conjonctif, comme les fibroblastes, les cellules endothéliales et immunitaires et les macromolécules de la matrice extracellulaire (collagènes, protéoglycanes, glycosaminoglycanes...).

Le stroma tumoral est un acteur majeur dans l'initiation et la progression tumorales. Sa composition cellulaire et moléculaire est directement corrélée au stade d'avancement de la tumeur. Les interactions entre les cellules cancéreuses et leur micro-environnement font intervenir les adhésions intercellulaires, les adhésions cellule-matrice mais également l'action de protéases matricielles.

Au cours de la progression néoplasique, les interactions entre les cellules cancéreuses et les composants du stroma de la tumeur engendrent la formation d'un micro-environnement présentant des propriétés particulières. Ainsi, la MEC subit un remaniement de sa composition avec la synthèse des protéines pro-invasives, comme les glycoprotéines tenascine-C et SPARC, par les cellules cancéreuses et stromales (Mackie, Chiquet-Ehrismann et al. 1987; Mackie, Halfter et al. 1988; Porte, Chastre et al. 1995; Porte, Triboulet et al. 1998; Massi, Franchi et al. 1999; Tanaka, Yamazaki et al. 2000; Bradshaw and Sage 2001; Yamanaka, Kanda et al. 2001). La composante cellulaire de ce micro-environnement est également sujette à des remaniements. Les cytokines et les facteurs de croissance sécrétés par les

cellules cancéreuses stimulent la trans-différentiation des fibroblastes du stroma en myofibroblastes qui, à leur tour, sécrètent différents facteurs stimulant la croissance, l'angiogénèse et l'invasion tumorales (De Wever and Mareel 2003). Les leucocytes du sang, les plaquettes sanguines infiltrant la tumeur sous l'attraction d'un gradient chimiotactique de chimiokines sécrétées par les cellules cancéreuses, contribuent également au processus invasif par la sécrétion de protéases matricielles et de facteurs transformants.

Interactions cellule-cellule : Ig-CAM et cadhérines

La perte de jonctions intercellulaires est un événement clé dans la progression tumorale. Elle participe au processus de dispersion cellulaire définie comme la capacité d'une cellule épithéliale à se séparer de ses voisines (dissociation cellulaire ou **scattering**) et à migrer dans la matrice environnante (motilité et invasion cellulaires).

Les **Ig-CAM** sont des récepteurs d'adhésion de la superfamille des immunoglobulines. Elles sont constituées d'une partie extracellulaire contenant plusieurs domaines Ig-like ainsi que des motifs fibronectine de type III, d'une région transmembranaire et d'une queue cytoplasmique interagissant avec différentes molécules de signalisation et des protéines du cytosquelette (*Fig. 17*). Les Ig-CAM permettent l'ancrage des cellules entre elles par des interactions homophiliques (deux Ig-CAM identiques) ou hétérophiliques (deux Ig-CAM différentes). Elles peuvent également interagir avec les macromolécules matricielles. Un des membres les plus étudiés de la famille des Ig-CAM est la **N-CAM**. Elle a été caractérisée dans les neurones, mais elle est également exprimée dans différents types cellulaires dont les cellules épithéliales et musculaires. Dans les carcinomes coliques, l'expression de la N-CAM est fortement diminuée et cette perte est corrélée à un mauvais pronostic (Cavallaro and Christofori 2001; Cavallaro and Christofori 2004).

Les **cadhérines** sont les constituants principaux des jonctions adhérentes. Ce sont des glycoprotéines transmembranaires interagissant entre elles par leur domaine extracellulaire et par des liaisons homophiliques afin d'assurer l'adhésion entre deux cellules adjacentes. Le domaine intracellulaire des cadhérines interagit avec différentes caténines pour former le complexe cytoplasmique d'adhésion cellulaire (*Fig. 17*). Ce complexe est composé des **caténines β** et **γ** qui se lient directement à l'extrémité C-terminale des cadhérines, la **p120caténine** qui se lie sur plusieurs sites de la queue

cytoplasmique des cadhérines, et de l' α -caténine qui permet la liaison du complexe au cytosquelette d'actine.

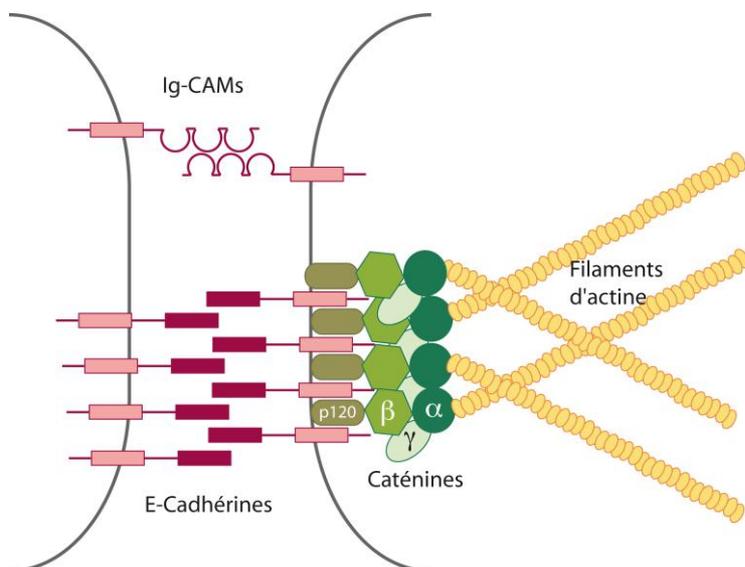


Figure 17 : Adhésions cellule-cellule.

La **E-cadhérine**, le prototype de la famille des cadhérines, est le régulateur majeur du maintien de la polarité cellulaire et de l'intégrité des épithéliums. La E-cadhérine est un gène suppresseur de tumeur et sa perte constitue un prérequis essentiel à l'invasion tumorale. Les mécanismes

impliqués dans la perte de cette protéine d'adhésion au cours de la progression tumorale peuvent être de nature génétique ou épigénétique. Dans la majorité des cas, la E-cadhérine est inhibée au niveau transcriptionnel par l'action d'agents répresseurs mais également par hyperméthylation de son promoteur. Elle est également la cible de protéases matricielles qui clivent son extrémité extracellulaire générant une forme soluble de la protéine. Sa phosphorylation, ainsi que celles de la β - et γ - et p120-caténines, par des protéines à activité tyrosine-kinase (EGF-R, c-MET, FGF-R, src) conduisent à la dissociation du complexe d'adhésion. En plus de son rôle dans l'adhésion cellulaire, la E-cadhérine est aussi une molécule de signalisation importante dans l'acquisition du phénotype invasif. La E-cadhérine peut s'associer au EGF-R et l'activer de façon indépendante du ligand, permettant le recrutement de la PI3-K et l'activation de la cascade des MAPK. La fonctionnalité de la E-cadhérine est directement corrélée à la voie de signalisation Wnt via l'activité transcriptionnelle de la β -caténine et l'expression de gènes déterminant la progression tumorale. Enfin, elle interagit avec les différents membres de la famille des petites protéines G apparentées à Rho (RhoA, Rac1 et Cdc42) qui jouent un rôle central dans l'organisation du cytosquelette d'actine et la mobilité cellulaire (Nollet, Berx et al. 1999; Cavallaro and Christofori 2004).

Interactions cellule-MEC : Intégrines

Les **intégrines** constituent une large famille de protéines trans-membranaires. Ces récepteurs forment des hétérodimères composés de deux sous-unité α et β . On dénombre actuellement 18 sous-unités α .

et 8 sous-unités β , générant 24 types d'intégrines pourvues de spécificités et de propriétés différentes. Les intégrines servent de point d'ancrage de la cellule au substrat. Ces protéines d'adhésion lient différents composants de la MEC. Certaines sont spécifiques d'un ligand ($\alpha 5\beta 1$ ne lie que la fibronectine), alors que d'autres ont une spécificité plus large ($\alpha v\beta 3$ se lie à la vitronectine, à la fibronectine, au fibrinogène...). Une majorité d'intégrines reconnaît la séquence tripeptidique **RGD** portée par les protéines matricielles. De plus, les intégrines sont des éléments clé de la signalisation à l'interface entre le micro-environnement et les cellules. Elles sont impliquées dans la prolifération, la survie et la migration cellulaires, mais également l'angiogenèse tumorale. Les intégrines n'ont pas d'activité enzymatique intrinsèque mais activent les cascades de signalisation intracellulaires en se regroupant entre elles et en recrutant diverses protéines adaptatrices (**Grb2, Cas...**) et effectrices (**FAK, src, shc...**) au sein de complexes d'adhésion focaux (Jin and Varner 2004; Mitra and Schlaepfer 2006).

Il a été récemment rapporté que l'augmentation de l'expression de l'intégrine $\alpha v\beta 3$ est étroitement associée à l'acquisition du phénotype invasif (Felding-Habermann, Fransvea et al. 2002). De même, l'expression de l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ augmente le pouvoir invasif et métastatique de cellules des carcinomes mammaires (Mercurio, Rabinovitz et al. 2001). Du fait du rôle majeur des intégrines dans l'acquisition du phénotype invasif, différents inhibiteurs (anticorps et peptides inhibiteurs) sont au stade du développement clinique.

FAK

FAK (Focal Adhesion Kinase) est une protéine particulièrement importante dans la transmission du signal émis par les intégrines et la MEC. Elle est localisée préférentiellement au niveau des complexes d'adhérence (ou adhésions focales). FAK est impliquée dans le contrôle de plusieurs processus cellulaires comme la migration et la survie. Parmi les autres protéines de ces complexes, on retrouve les protéines du cytosquelette telles que l'**actine**, la **paxilline**, la **taline**, et des protéines participant au remaniement du cytosquelette, comme la **PI3-kinase (Phosphatidylinositol 3-Kinase)** et **P130CAS (protéine de 130 kDa associée à Crk)**. L'ensemble de ces protéines forme ainsi de larges échafaudages (« scaffolds ») et domaines moléculaires localisés sous la membrane plasmique (Mitra and Schlaepfer 2006).

D'autres stimuli induisent l'activation de FAK en dehors des intégrines, comme les facteurs de croissance, les neuropeptides, ou l'activation des récepteurs couplés aux protéines G. Toutefois, le

mode de régulation essentiel est réalisé par l'interaction intégrines-MEC. La protéine FAK est surexprimée dans différentes lignées cancéreuses coliques (Jones, Brunton et al. 2000; van Nimwegen and van de Water 2007).

FAK est une protéine d'un poids moléculaire de 125 kDa, de structure très conservée au sein des espèces. Son gène est localisé sur le chromosome 8. Elle ne possède ni région transmembranaire ni domaines SH2 ou SH3 (Src homology regions 2 and 3). Elle est divisée en trois domaines, un domaine amino-terminal et un domaine carboxy-terminal délimitant un domaine central portant l'activité catalytique (Schaller, Borgman et al. 1992). La région **FAT (Focal Adhesion Targeting)**, située dans le domaine carboxy-terminal est nécessaire pour sa localisation dans le complexe d'adhérence par l'intermédiaire de liaisons avec la taline et la paxilline. La taline, médiateur de l'activation de FAK par les intégrines, permet l'interaction avec le réseau de filaments d'actine nécessaire pour l'activation de FAK (Chen, Appeddu et al. 1995). En utilisant la cytochalasine D, qui bloque le réseau des filaments d'actine, des études ont confirmé que l'intégrité du cytosquelette d'actine est nécessaire à la phosphorylation de FAK en réponse aux stimuli initiaux (Schaller, Hildebrand et al. 1994). Le domaine amino-terminal contient une séquence homologue à celle des protéines du groupe **4.1/ERM (ezrine, radixine et moésine)** correspondant au domaine **FERM** impliqué dans les interactions avec les domaines cytoplasmiques des récepteurs transmembranaires (Schaller 2001). Même si les fonctions de cette réponse ne sont pas déterminées avec certitude, des fonctions similaires à celles décrites pour d'autres protéines ont été proposées, avec notamment un rôle pour la transmission des signaux dépendants de facteurs de croissance et d'hormones (Sieg, Hauck et al. 2000). Le domaine amino-terminal semble pouvoir lier FAK à la sous-unité β des intégrines mais cette liaison ne semble pas indispensable pour l'activation de FAK par les intégrines (Shen and Schaller 1999).

La Transduction de FAK : Activation et Interaction Protéiques de FAK

La protéine FAK activée va subir une phosphorylation en cascade de résidus tyrosine. C'est d'abord l'autophosphorylation du résidu **tyrosine 397** qui est le témoin de son activation (Schaller, Hildebrand et al. 1994). La mutation au niveau de ce résidu entraîne l'incapacité pour FAK d'avoir une activité biologique. Cette phosphorylation libère un site de liaison de forte affinité pour des protéines contenant un **domaine SH2**. Les kinases de la famille **src, Fyn** et **c-src**, vont être recrutées et activées sur ce site. Elles vont phosphoryler d'autres résidus tyrosine dans le domaine catalytique (**Y407, Y576** et **Y577**) ainsi que dans la région carboxy-terminale (**Y861** et **Y925**). Les phosphorylations des tyrosines Y576 et 577 par c-src augmentent l'activité enzymatique de FAK et permettent la création de nouveaux

sites de liaison pour d'autres effecteurs (Calalb, Polte et al. 1995; Eide, Turck et al. 1995). L'activation de FAK et de c-src est donc le point central du signal de transduction.

Si l'autophosphorylation du résidu 397 est reconnue comme le témoin de l'activation de FAK, il a été décrit dans les cellules épithéliales que FAK pouvait être retrouvée sous forme phosphorylée à l'état basal mais avec une répartition intracellulaire diffuse et non plus focale, sous-membranaire. Lors de la migration cellulaire, on ne retrouve pas d'augmentation majeure de la phosphorylation de Tyr397 mais plutôt une redistribution de toutes les autres formes phosphorylées sur tyrosine de FAK au niveau des complexes d'adhérence (Nakamura, Yano et al. 2001; Mitra and Schlaepfer 2006). Si l'activation de FAK est généralement liée aux intégrines, il existe d'autres modèles où son activation est réalisée par d'autres mécanismes. Par exemple, dans les plaquettes sanguines, son activation semble indépendante des intégrines mais nécessite plutôt une régulation par les flux intracellulaires du calcium et l'activation de la PKC (protein kinase C) (Achison, Elton et al. 2001).

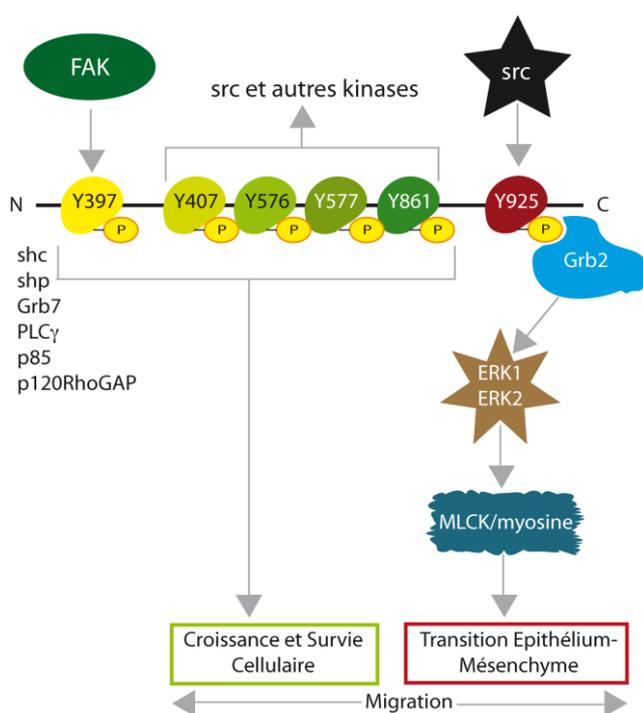


Figure 18 : Régulation de l'activité de FAK par ses différents sites de phosphorylation.

Après son activation, FAK phosphorylée libère plusieurs sites de fixation pour des protéines contenant des domaines SH2. Ces sites vont permettre le recrutement successif de protéines du complexe (Fig. 18). Dans un second temps, les différentes protéines vont subir à leur tour une activation entraînant la mise en route de cascades de voies régulatrices intracellulaires importantes comme ERK/MAPK, PI3-kinase et les réarrangements du cytosquelette (Fig. 19).

Les protéines de la super famille des **MAPK** participent à des mécanismes cellulaires majeurs pour transcrire un signal extracellulaire en une réponse cellulaire. Trois membres de la famille sont particulièrement importants: **ERK**, la protéine **p38** et **JNK**. Ces protéines sont impliquées dans la transcription de gènes par l'activation de protéines nucléaires telles que **c-Myc** et **c-Jun**. Au moins 25 cibles ont été trouvées intervenant dans divers programmes cellulaires telles que la division et la

prolifération. La régulation de ces voies dépend essentiellement de la coopération entre les messages activateurs des facteurs de croissance et de l'adhérence (Schaeffer and Weber 1999; Howe, Aplin et al. 2002; Mon, Ito et al. 2006). FAK est reliée à la paxilline par sa région FAT, qui est nécessaire et suffisante pour la liaison et dont l'intégrité est indispensable pour l'activation de la paxilline. Elle permet de stabiliser les interactions protéiques dans le complexe et facilite l'activation de certaines d'entre elles (Schaller, Hildebrand et al. 1994; Schaller and Parsons 1995). Par l'intermédiaire de PAK (p21-activated serine-threonine kinase) elle participe à l'activation des ERK/MAPK kinases.

Dans différents modèles cellulaires, la voie de **Ras** est une voie importante pour l'activation de ERK. La phosphorylation de la **tyrosine 925** de FAK forme un site de liaison pour le complexe **Grb2-Sos** (Schlaepfer, Hanks et al. 1994; Mitra, Mikolon et al. 2006). **Grb2** est une protéine adaptatrice qui, en se liant à **Sos**, va permettre l'activation de Ras enclenchant la cascade des MAP-kinases. Le domaine carboxy terminal de FAK, riche en résidus proline, permet des interactions avec des protéines par leurs **domaines SH3**. **p130Cas** ou **Cas (Crk-Associated Substrate)** se lie au niveau de la première séquence riche en proline (**PxxP718**) (Polte and Hanks 1995). Cas fait partie de la famille des protéines adaptatrices, comme Grb2. Elle se lie par une liaison SH2/SH3 avec la protéine Crk (Vuori, Hirai et al. 1996). Ce complexe, renforcé par la paxilline, transmet un signal activateur pour une autre protéine de la famille de Ras, Rac1, aboutissant à une activation de **PAK** puis de ERK (Klemke, Leng et al. 1998; Mitra, Mikolon et al. 2006; Mitra and Schlaepfer 2006). p130Cas est aussi impliquée dans l'activation de la voie de JNK (*Fig. 19*).

Il est clairement démontré que l'adhérence et les facteurs de croissance sont étroitement impliqués dans la transmission de signaux de migration et de prolifération. Les facteurs de croissance peuvent régler l'activité des complexes d'adhérence. Cette régulation par les facteurs de croissance est due essentiellement à une **potentialisation de la transmission** des signaux intracellulaires par la voie de ERK. Cet effet passe non seulement par une augmentation de l'activation de ERK mais aussi, et peut-être surtout, permet de favoriser la migration de ERK vers le noyau (Howe, Aplin et al. 2002). Inversement, les complexes peuvent contrôler les signaux déclenchés par les facteurs de croissance en passant notamment par une régulation de l'expression des récepteurs ou des substrats.

La deuxième séquence riche en proline (PxxP881) de FAK permet la liaison de deux **GAP (GTPase Activating Protein)**, une GAP pour **Rho** et **ASAP1**, une GAP pour des **Arf (ADP-Ribosylation Factors)** et de **Graf (GTPase Regulator Associated with FAK)**. Rho activée induit la contractilité des filaments d'actine et participe à l'activation de FAK en favorisant l'assemblage des complexes

d'adhérence. Par un rétro-contrôle négatif, FAK, par l'intermédiaire de Graf, va inhiber Rho, aboutissant secondairement à un remodelage de la structure des complexes d'adhérence. Ces différentes données suggèrent donc que FAK peut régler le renouvellement de l'adhérence focale en modulant l'activité de Rho (Schaller 2001; Mitra and Schlaepfer 2006).

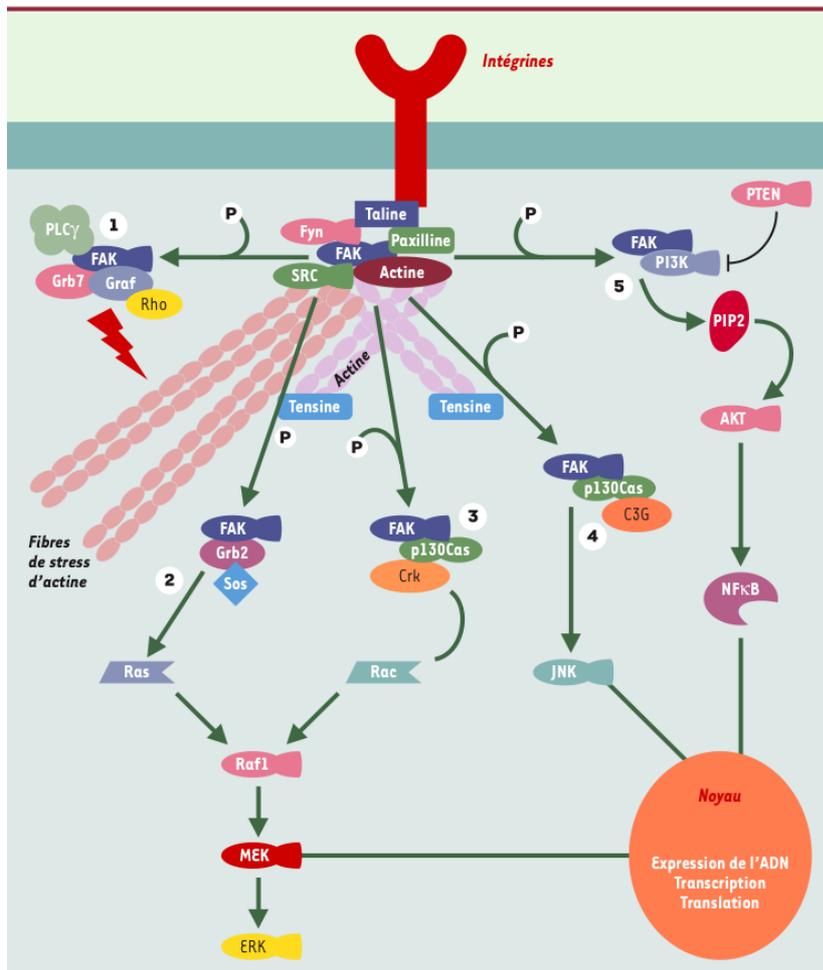


Figure 19 : Les voies de signalisation de l'adhérence focale.

Le schéma simplifié propose un résumé des interactions entre les protéines du complexe d'adhérence et les voies de signalisation sous-jacentes. FAK est initialement activée par l'intermédiaire d'intégrines et/ou de facteurs de croissance. Cette activation va permettre la liaison et l'activation de plusieurs protéines. (1) Graf, Grb7, PLC- γ . vont participer au remaniement du cytosquelette d'actine, engendrant ainsi un cycle de migration et d'adhérence cellulaires avec pour chaque étape une restructuration et une déstructuration des complexes d'adhérence. p130Cas, Grb2, PI3-kinase vont secondairement participer à l'activation en cascade de plusieurs voies intracellulaires, la voie de Erk (2 et 3), la voie de JNK (4) et la voie de la PI3-kinase (5). Elles vont permettre in fine de régler plusieurs processus vitaux pour la cellule comme la survie, la prolifération et la migration cellulaires en favorisant l'activation de facteurs de transcription.

La coopération entre adhérence et facteurs de croissance semble intervenir dans les processus d'**angiogenèse** au niveau des cellules endothéliales, comme au niveau des cellules musculaires lisses. Dans les **cellules endothéliales**, il existe en effet une coopération étroite entre les intégrines et le **VEGFR-2 (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2)** passant par l'intermédiaire de FAK (Soldi, Mitola et al. 1999). Cette coopération est nécessaire pour une migration coordonnée de ces cellules (Qi and Claesson-Welsh 2001). De même, dans les cellules musculaires lisses vasculaires, l'activation de FAK potentialise l'activation de ERK par le **PDGF (Platetelet Derived Growth Factor)** favorisant la prolifération et la migration (Hauck, Hsia et al. 2000). Parallèlement à son action sur la migration cellulaire, de nombreuses études ont montré clairement la participation de FAK dans les processus du développement tumoral (Mon, Ito et al. 2006; van Nimwegen and van de Water 2007).

Protéases matricielles

La MEC du micro-environnement tumoral constitue un support structural et un élément de signalisation essentiel à la migration des cellules cancéreuses. Au cours de la progression néoplasique, cette matrice subit de profonds remaniements dans sa composition macromoléculaire via la synthèse et la sécrétion de différentes protéines matricielles par les cellules cancéreuses et les cellules du stroma, mais également à travers la protéolyse de ces macromolécules. Les enzymes de dégradation des composants de la matrice sont en majorité représentées par les **métalloprotéases matricielles (MMP)**. Les autres enzymes de protéolyse de la matrice sont les **sérines protéases tissulaires** (l'**uPA**, la **thrombine** et la **plasmine**), la famille des protéines **ADAM**, les **héparanases** et les **cathépsines**.

Les **MMP** constituent une large famille d'endopeptidases dont les membres sont regroupés en 8 classes en fonction de leur structure. Cinq classes sont des MMP sécrétées et les trois autres sont des MMP membranaires. Ces protéases montrent des spécificités plus ou moins larges pour les différentes macromolécules matricielles. Les MMP sont synthétisées sous la forme de précurseurs inactifs (pro-MMP) et sont activées après sécrétion dans le milieu extracellulaire par d'autres MMP ou des sérines protéases. L'activité des MMP est également régulée par un processus d'endocytose faisant intervenir la **α 2-macroglobuline** et les récepteurs membranaires « **scavenger** » ainsi que les protéines inhibitrices **TIMP**.

Les MMP dégradent les macromolécules de la MEC facilitant ainsi la migration des cellules. Ce clivage peut également générer des fragments protéiques pourvus d'une activité biologique (**laminine5**, **collagène IV**), le relargage de facteurs de croissance complexés à des protéines chaperones et de signalisation (**IGF-BP**) ou réguler la biodisponibilité de facteurs de croissance retenus par le réseau macromoléculaire de la matrice. De plus, les MMP ont pour autres substrats des précurseurs de facteurs de croissance lié à la membrane plasmique (TGF- β), des récepteurs aux facteurs de croissance (FGF-R, EGF-R, c-Met) et des molécules d'adhésion cellulaires (E-cadhérines, intégrines).

L'expression et l'activité des MMP sont augmentées dans la majorité des cancers et sont directement corrélées à la progression des tumeurs dans le processus métastatique. Cette augmentation est la résultante de la variation du taux de transcription des MMP par l'activation d'oncogènes ou la perte de gènes suppresseurs de tumeur. Certaines MMP sont synthétisées par les cellules cancéreuses alors

que d'autres sont en majeure partie produites par les cellules du stroma. Par la diversité de leurs substrats, les MMP régulent différentes fonctions cellulaires essentielles à la carcinogenèse telles que la prolifération, la survie, la migration et l'angiogenèse. L'inhibition pharmacologique de la synthèse ou de l'activité des MMP constitue donc une stratégie thérapeutique anti-cancéreuse prometteuse. De nombreuses drogues anti-MMP sont en développement dans les essais cliniques (Egeblad and Werb 2002; Bogenrieder and Herlyn 2003).

MIGRATION ET INVASION CELLULAIRES

L'acquisition du phénotype invasif est un événement déterminant pour la dissémination, locale et à distance, des cellules tumorales et la formation de métastases. Elle permet aux cellules de franchir à deux reprises (intra et extravasation) l'endothélium des vaisseaux lymphatiques ou sanguins et de migrer jusqu'aux tissus cibles où elles vont s'implanter. Les mécanismes moléculaires de la migration et de l'invasion cellulaires sont identiques à ceux mis en jeu au cours de situations physiologiques comme l'embryogenèse et la réparation tissulaire. Différents facteurs activateurs de la migration cellulaire interviennent au cours de la carcinogenèse. Certaines chimiokines, facteurs de croissance, et

fragments protéiques de la MEC issus de la dégradation enzymatique sont des molécules pro-migratoires. La migration cellulaire est un processus dynamique nécessitant la régulation rapide et précise de l'adhésion cellulaire, via les complexes d'adhésion focaux, la polymérisation et de la contraction des filaments d'actomyosine (Fig. 20). Ce processus peut être décomposé en cinq étapes :

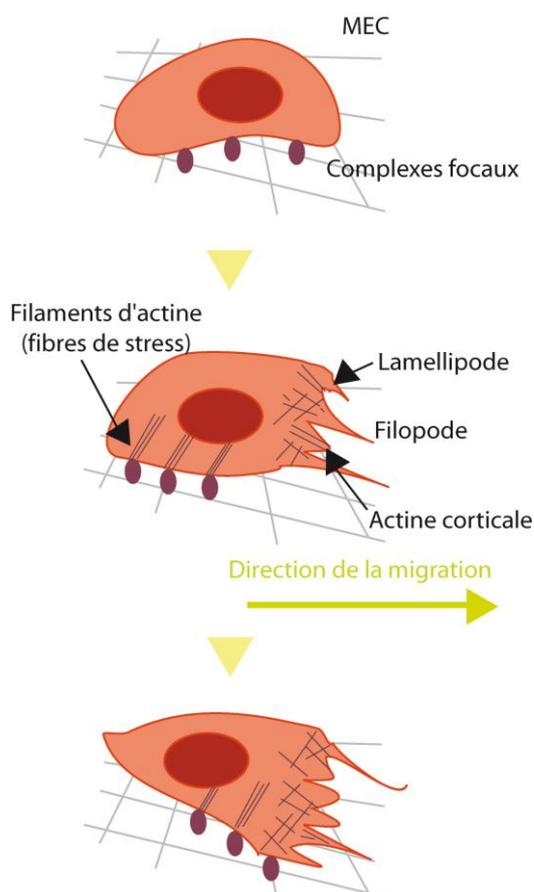


Figure 20 : Structures associées à la migration cellulaire. La migration cellulaire comporte dans un premier temps la formation des prolongements membranaires (lamellipodes et filopodes) et des filaments d'actine (actomyosine contractile). Dans un deuxième temps la cellule forme des complexes d'adhésion au niveau du front de migration. On assiste alors au désassemblage des complexes à l'arrière de la cellule et à la rétraction du corps cellulaire, via la contraction des filaments d'actomyosine.

- i) La cellule se polarise et émet à l'avant des prolongements membranaires de type lamellipodes, filopodes et pseudopodes. Ces prolongements sont la résultante de la polymérisation de l'actine et de son assemblage en filaments et sont régulés par la voie de signalisation des petites protéines G, Rac1 et Cdc42. Il existe des variants d'épissage de Rac1, Rac1b, qui sont associés à la synthèse de la protéine Rac1b constitutivement active (Jordan, Brazao et al. 1999).
- ii) Ces prolongements membranaires entrent en contact avec les composants de la MEC par les intégrines. Plusieurs intégrines se regroupent et forment des complexes focaux composés des molécules adaptatrices, des molécules de signalisation et permettant le couplage au cytosquelette d'actine. Dans cette étape interviennent l'oncogène *src* et la kinase des adhésions focales, FAK.
- iii) Le regroupement des intégrines permet le recrutement de métalloprotéinases de surface ou solubles capables de dégrader les macromolécules matricielles à proximité de la surface cellulaire procurant ainsi l'espace nécessaire à la migration.
- iv) Parallèlement au développement des complexes d'adhésion, l'actine se polymérise sous la forme des filaments qui s'allongent et forment un réseau sous l'action de protéines de liaison comme l' α -actinine et la myosine II. Le réseau d'actine localisé à la bordure des cellules est appelé actine corticale et celui situé dans le corps de la cellule, fibres de stress. Cette quatrième étape fait intervenir la contraction des filaments d'actomyosine permettant le rétrécissement du corps cellulaire et l'établissement d'une tension mécanique sur les adhésions cellulaires situées au pôle arrière. La myosine II est la principale protéine motrice des cellules non musculaires eucaryotes. Elle est régulée par la voie de signalisation de la petite protéine G RhoA.
- v) La dernière étape est la dissociation des complexes d'adhésion situés à l'arrière de la cellule tandis que ceux qui sont situés à l'avant restent fonctionnels. Les mécanismes mettant en jeu lors de cette étape restent encore à préciser (Friedl and Wolf 2003).

Afin de rentrer dans le processus de migration, les cellules cancéreuses doivent opérer des changements morphologiques et fonctionnels regroupés sous le terme de transition **épithélium-mésenchyme (TEM)**. Les cellules ayant subi la TEM doivent réprimer la transcription de gènes codant

des molécules d'adhésion intercellulaires, et convertir le cytosquelette de type épithélial à un type fibroblastique. La TEM entraîne alors la dispersion cellulaire définie par la dissociation des cellules et l'acquisition de la mobilité cellulaire. Les facteurs inducteurs de la TEM incluent l'activation d'oncogènes, les facteurs de croissance, certaines cytokines et certains composants de la MEC, consécutivement à une reprogrammation complexe de l'expression génique (Thiery 2002).

DISSEMINATION ET ENVAHISSEMENT METASTATIQUE

Le processus métastatique est caractérisé par i) la dissémination des cellules cancéreuses à partir du foyer tumoral *via* la circulation lymphatique et/ou systémique, ii) l'implantation des cellules dans un organe, iii) leur survie pour former des micrométastases et leur prolifération conduisant à l'émergence de macrométastases cliniquement détectables. Bien que ce processus fasse l'objet de nombreuses études, les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués restent encore à préciser.

Des études comparatives montrent que la plupart des cellules constituant la tumeur primaire présentent un potentiel métastatique. Les deux voies de dissémination des cellules tumorales sont la circulation lymphatique et la circulation sanguine. Pour certains types de tumeurs, il existe une forte corrélation entre la présence de ganglions lymphatiques envahis et celle de métastases à distance, conduisant à la recherche systématique de ces ganglions comme critère diagnostique et pronostique. On peut distinguer deux modèles de dissémination métastatique.

Dans le **premier modèle**, les cellules néoplasiques empruntent la circulation lymphatique et vont former des métastases tandis que le reste des cellules circulantes meurent. Les cellules de ces métastases ganglionnaires vont ensuite entreprendre la circulation lymphatique ou sanguine pour former des métastases secondaires. Dans ce cas, la métastase tumorale est dépendante de la présence de ganglions lymphatiques envahis. Dans le **second modèle**, les cellules néoplasiques empruntent exclusivement la circulation systémique pour former des métastases à distance, donc sans atteinte ganglionnaire.

Quel que soit le modèle de dissémination, les cellules des métastases à distance peuvent à leur tour se disséminer et former des foyers métastatiques secondaires. La détection des cellules tumorales disséminées constitue donc un facteur pronostique très important. Les deux principales approches techniques utilisées sont l'**immunocytochimie** à l'aide d'anticorps dirigés contre des marqueurs

spécifiques des cellules tumorales (la cytokératine pour les tumeurs épithéliales), et la **PCR** permettant l'identification d'altérations géniques associées spécifiquement aux cellules cancéreuses (formes mutées de l'oncogène *src*). La recherche de ces cellules s'effectue dans le **sang périphérique** et dans la **moelle osseuse** qui constituerait un réservoir où les cellules cancéreuses disséminées subiraient une adaptation en vue de la colonisation de différents organes.

L'implantation et la colonisation des cellules néoplasiques disséminées constituent les ultimes étapes du processus métastatique. Chaque type de cancer présente des sites préférentiels d'implantation métastatique. Les patients atteints d'un cancer du côlon développent principalement des **métastases hépatiques**. Le choix de ce site spécifique par les cellules cancéreuses semble être déterminé par des facteurs anatomiques, la formation de niches pré-métastatiques par les cellules médullaires, et par des complémentarités de survie et de virulence entre les cellules cancéreuses et le microenvironnement métastatique (cas des chemokines et de CXCR4, par exemple).

Les cellules cancéreuses coliques quittant leur foyer primaire sont détectées dans le système veineux portal et vont atteindre en premier lieu les capillaires sinusoides irriguant le foie. Ces capillaires ont un petit diamètre (entre 3 et 8 μm) et sont adaptés à la circulation des hématies (7 μm de diamètre) qui sont des cellules hautement déformables. Les cellules cancéreuses, avec un diamètre plus important (20 μm ou plus), restent donc bloquées au niveau de ces capillaires par contrainte mécanique. À cette étape, la colonisation de l'organe par les cellules cancéreuses ne peut avoir lieu que sous l'influence de **facteurs environnementaux favorables** à la migration et à la prolifération cellulaires. Le micro-environnement de l'organe à coloniser est souvent constitué de nouvelles protéines matricielles, de ligands, de cellules stromales et d'un contexte physico-chimique particulier (spécifique) de celui de la tumeur primaire.

Les **chimiokines** jouent un rôle majeur dans l'implantation et la colonisation d'un organe déterminé par les cellules tumorales. Elles permettent d'attirer ces cellules sur le lieu d'implantation par un gradient de concentration et d'activer, *via* leurs récepteurs à sept domaines transmembranaires, la transcription de gènes cibles impliqués dans la prolifération, la survie, l'adhésion et l'invasion cellulaires et l'angiogenèse. Quand la métastase atteint une taille critique pour son oxygénation, elle recrute un réseau vasculaire *via* l'angiogenèse mais également dans certains cas par mimétisme vasculaire, défini comme la formation de canaux drainant le flux sanguin, dépourvus d'un endothélium, et formés par les cellules tumorales (Chambers, Groom et al. 2002; Balkwill 2004; Pantel and Brakenhoff 2004; Vander Griend and Rinker-Schaeffer 2004).

En plus de l'activation d'oncogènes et la perte de gènes suppresseurs de tumeurs, l'acquisition du potentiel métastatique requiert des **altérations génétiques** et **épigénétiques** additionnelles. Les gènes codant des protéines permettant l'inhibition de la formation de métastases sans aucun effet sur la croissance de la tumeur primaire sont désignés **gènes suppresseurs de métastases (GSM)**. Ces GSM ont été caractérisés par leur déplétion dans les cellules métastatiques par rapport aux cellules tumorales non-métastatiques, à l'aide de techniques comme le Differential Display, l'hybridation soustractive ou les puces à ADN. La validation de la fonction de gènes suppresseurs de métastases se fait expérimentalement par ré-expression de ces gènes à un niveau physiologique dans les cellules. Dans les modèles expérimentaux animaux, cette ré-expression ne doit pas avoir d'impact sur la croissance de la tumeur primaire et doit réduire significativement la formation de métastases. Actuellement, 8 MSG ont été décrits, ouvrant une nouvelle voie de stratégie thérapeutique anti-cancéreuse, mais nécessitant préalablement la consolidation de modèles expérimentaux *in vivo* de métastases (Steeg 2003; Rodrigues, De Wever et al. 2007).

ÉTAT DE LA QUESTION

Nous avons vu que de nombreuses altérations génétiques et moléculaires caractérisent la cellule tumorale dans les cancers colorectaux sporadiques et familiaux. Ainsi, la transformation maligne procède selon une succession d'étapes résultant de l'accumulation séquentielle d'évènements oncogéniques. La transformation tumorale est caractérisée par la capacité des cellules cancéreuses à envahir le stroma tumoral sous-jacent et le mur intestinal à la transition adénome-carcinome. L'acquisition de pouvoir invasif par les cellules cancéreuses représente donc l'étape critique responsable de la dissémination métastatique des cancers solides, orchestrée par l'angiogenèse tumorale.

Notre attention s'est portée sur BMP-7, une cytokine appartenant à la superfamille du TGF- β , qui, comme tous les membres de cette superfamille, exerce ses effets biologiques par l'intermédiaire de la voie de signalisation canonique SMAD.

Historiquement le TGF- β a toujours été considéré comme le membre principal de la superfamille du TGF- β capable de contrôler la croissance des cellules épithéliales coliques. Cependant, quelques données viennent appuyer l'idée que d'autres membres de cette superfamille peuvent exercer des effets très importants (Dai, Bansal et al. 1999; Sirard, Kim et al. 2000; Fink, Swinler et al. 2001). Les BMPs sont connus pour jouer un rôle dans le développement tissulaire. Mais peu de travaux ont vraiment examiné la signification de la signalisation des BMPs dans le cancer. Plusieurs groupes ont démontré que la signalisation des BMPs régule la croissance des cellules épithéliales (Pouliot and Labrie 2002; Hardwick, Van Den Brink et al. 2004). Plusieurs études récentes suggèrent que les BMPs sont impliquées dans la progression de la cancérogenèse colique :

1. Tout d'abord, environ 35% des cancers de côlon métastatiques présentent une forme mutée de **SMAD4** (Miyaki, Iijima et al. 1999), ce qui implique que la signalisation des activines et des BMPs devrait être altérée, à l'instar de celle du TGF- β dans les cancers du côlon et du pancréas ;
2. Des mutations germinales sont présentes dans le gène codant le récepteur de type I des BMPs (**ALK-3**) chez des patients atteints d'une polypose juvénile, qui est une prédisposition au cancer du côlon. Les travaux réalisés en 2001 par *Howe et al.* et par *Zhou et al.* ont permis d'évaluer la présence des mutations dans *alk-3* chez environ 38% des patients. Tous les cas présentant une mutation sur ALK-3 étaient des patients observés chez LOH (Howe, Bair et al. 2001; Zhou, Woodford-Richens et al. 2001). Ces auteurs sont les premiers à impliquer les

BMPs dans la progression néoplasique des cellules épithéliales. En 2004, Haramis *et al.* ont démontré que l'inhibition de la signalisation de BMP à l'aide un knock-out conditionnel de ALK-3 avait comme résultat la formation des nombreuses cryptes ectopiques qui miment l'histopathologie intestinale de la polypose juvénile (Haramis, Begthel *et al.* 2004). Nous avons vu que cette polypose présente souvent une mutation germinale sur SMAD4 (Howe, Roth *et al.* 1998) dans 20 – 50% des cas (Woodford-Richens, Rowan *et al.* 2001) ;

3. Selon Jung *et al.* les cancers colorectaux MSI présentent dans 83% des cas une mutation du gène codant le récepteur de type II de BMP-7 et des activines, **ActR-II** (Jung, Doctolero *et al.* 2004) ;
4. BMP-7 a été impliquée dans la progression d'autres **cancers épithéliaux** de la prostate ou du sein (*voir section BMP-7 et cancer*) (Kim, Lee *et al.* 2000; Dai, Kitagawa *et al.* 2004; Masuda, Fukabori *et al.* 2004; Alarmo, Rauta *et al.* 2006; Yang, Lim *et al.* 2006). Le groupe de Beck *et al.* en 2006 a abordé la question du rôle potentiel de BMP-7 dans la cancérogenèse colique, en indiquant que cette cytokine n'a pas d'effet sur la réparation des tapis cellulaires épithéliaux lésés *in vitro* « woundhealing », la survie ou la progression du cycle cellulaire (Beck, Jung *et al.* 2006) ;
5. Des études de liaisons récepteurs- ligands « binding assays » ont démontré la liaison spécifique de BMP-7 dans l'intestin de rats. De manière intéressant, BMP-7 entraîne la réversion de la réaction induite par le TNBS, l'acide trinitrobenzenesulfonique (Maric, Poljak *et al.* 2003).

J'ai initié cette recherche en Septembre 2002, suite à la mise en évidence dans le laboratoire des transcrits de BMP-7 dans la lignée colorectale humaine PC/AA/C1 issue d'un adénome colique prélevé chez un patient porteur d'une polypose familiale FAP. Cette observation à laquelle j'ai participé lors de mon stage de recherche de Master M2 nous a conduit à émettre l'hypothèse selon laquelle BMP-7 pourrait exercer un rôle local, soit paracrine ou autocrine au niveau de la loge des cryptes épithéliales coliques et pendant la progression des tumeurs colorectales humaines ou de leurs métastases. Pour toutes ces raisons, nous avons caractérisé l'expression et le rôle fonctionnel de BMP-7 et de ses récepteurs putatifs dans les cryptes coliques humaines morphologiquement normales, dans différentes lignées cellulaires cancéreuses épithéliales coliques, et dans les tumeurs colorectales humaines. Nous avons exploré le rôle potentiel de BMP-7 sur le pouvoir invasif, migratoire et la dissémination de cellules épithéliales coliques et rénales. En tenant compte du statut de SMAD4 dans nos lignées, nous démontrons que ce processus migratoire et invasif est indépendant de la voie de signalisation SMAD. Ensuite, nous avons cherché à identifier ces voies des signalisations SMAD -indépendantes activées par BMP-7 dans le contexte de la progression tumorale.

RESULTATS - COMMENTAIRE D'ARTICLE

ARTICLE I

L'ACTION PROINVASIVE DE BMP-7 DANS DES CELLULES CANCEREUSES COLIQUES HUMAINES EST DEPENDANTE DE ERK, RAC ET JNK, MAIS INDEPENDANTE DE SMAD4 ET SRC.

Quand cette étude a été initiée, il n'existait aucune information quant à l'expression de BMP-7 dans l'intestin humain. Un seul article récent montrait la biodisponibilité de BMP-7 dans l'intestin chez les rats et son impact sur l'inflammation (Maric, Poljak et al. 2003).

Dans un premier temps, nous avons analysé l'expression de BMP-7 et de ses récepteurs dans les différentes lignées cellulaires épithéliales coliques, adénomateuses ou cancéreuses, et dans des cryptes coliques histologiquement normales, préparées à partir des marges de la pièce opératoire chez un patient porteur d'une tumeur colorectale. Nous avons montré par RT-PCR que BMP-7 est exprimé de manière ubiquiste et que l'expression de ses récepteurs est variable selon les lignées. À partir des coupes histologiques issues des patients, nous avons montré par immunohistochimie la présence de BMP-7 dans la muqueuse colique normale, dans les cryptes aberrantes issues des sigmoïdites, dans des adénomes dysplasiques de haut grade, et dans 9 /12 (56.2%) des carcinomes coliques.

Ensuite nous avons déterminé si la présence de BMP-7 exogène pourrait induire la dispersion cellulaire ou « scattering ». Nous avons ainsi démontré que cette cytokine induit le scattering de façon dose-dépendante dans les cellules rénales MDCK, transfectées avec une isoforme de src sensible à la température (ts.src). Sachant que l'invasion de la muqueuse et de la paroi intestinale est une des premières étapes du processus métastatique, nous avons utilisé les expériences d'invasion de collagène de type I pour démontrer que BMP-7 induit l'invasion de façon dose-dépendante dans les lignées cellulaires rénales HEK293T et MDCK/AZ, adénomateuse colorectale PC/AA/C1, et de carcinomes coliques HCT8/S11, HT29, SW48 et SW480. Cette réponse est observée avec de faibles concentrations de BMP-7, selon une EC50 de 1 ng/ml. Ce pouvoir invasif est indépendant de SMAD4 dans les cellules SW480. Nous avons démontré que la voie de signalisation SMAD4 est intacte dans les cellules HCT8/S11 mais invalidée dans les cellules SW480, à l'aide des promoteurs-rapporteurs SBE (SMAD Binding Element).

Nous avons analysé les relations entre ce pouvoir invasif et l'oncogène src. Le pouvoir invasif de BMP-7 n'est pas dépendant de src dans les cellules MDCKts.src, soit à la température permissive de 35°C pour l'activation de src, soit à la température non permissive 40°C. Nous observons simplement une additivité entre ces deux voies BMP-7 et src (à 35°C), mais pas de potentialisation ou d'interaction négative. Cette observation a été confirmée en comparant la lignée adénomateuse non invasive PC/AA/C1 et sa variante PCmsrc, transfectée par l'oncogène c- src muté constitutivement activé. Afin de conclure sur cette question, j'ai établi et caractérisé la lignée HCT8/S11 exprimant de manière stable le variant dominant négatif de c-src (DNsrc). Après validation de la lignée (RT-PCR et WB) nous avons

démonstré que ce DNsrc bloque le pouvoir invasif de l'EGF et du TGF- α qui est dépendant de l'oncogène src. Cependant, ce DNsrc ne bloque pas le pouvoir invasif de BMP-7.

Nous nous sommes intéressés ensuite au rôle des adhésions focales dans l'invasion et le « scattering » induits par BMP-7. Nous avons regardé l'état de phosphorylation globale de la protéine FAK après ajout exogène de BMP-7, et nous avons constaté une phosphorylation et déphosphorylation cyclique. Cette phosphorylation cyclique pourrait correspondre à l'assemblage et désassemblage des adhésions focales pendant la migration de la cellule. Ensuite, nous avons regardé le statut de phosphorylation de la tyr925 de FAK car cette kinase est impliquée dans les processus invasifs et la transition épithélium-mésenchyme. Nous avons montré que BMP-7 induit la phosphorylation de cette tyrosine dans des cellules SMAD4 proficientes (HCT8/S11) que dans les cellules SMAD4 déficientes (SW480). Parallèlement cette tyr925 de FAK est aussi fortement activée par l'EGF après 30 minutes. Nous avons aussi regardé l'activation des MAPK après ajout exogène de BMP-7. BMP-7 active ERK1/2 et JNK dans les cellules HCT8/S11 et SW480, mais n'active pas la MAPK /SAPK p38.

Nous avons vu dans l'Introduction que la migration cellulaire n'est pas seulement dépendante des adhésions focales. Les petites protéines G jouent un rôle incontestable dans création de filopodes, lamellipodes et fibres de stress, qui vont à son tour modeler le cytosquelette d'actine afin de faire avancer la cellule vers le front de migration. Dans le laboratoire, nous avons validé un ensemble de lignées HCT8/S11 exprimant des formes dominantes négatives des petites protéines G (RhoA, Rac et Cdc42). Ces modèles ont donc été testés pour l'invasion du collagène de type I induite par BMP-7. Les résultats obtenus montrent que le pouvoir proinvasif de BMP-7 est dépendant de Rac1 et Cdc42. Les expériences d'immunoprécipitation « pulldown » ont ensuite été réalisées, ce qui nous a permis de conclure que BMP-7 inhibe RhoA à 5 minutes et active Rac1 15 minutes après l'addition de la cytokine.

En conclusion, cet article montre que BMP-7 et ses récepteurs sont exprimés dans l'épithélium intestinal humain chez l'adulte et que cette cytokine va induire le « scattering » et l'invasion cellulaires. Nos résultats suggèrent fortement que cette voie de signalisation proinvasive de BMP-7 est SMAD-et src- indépendante mais converge avec des voies de signalisation impliquant FAK, les Rho-GTPases Rac1 et RhoA, responsables de la mobilité cellulaire.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Des progrès spectaculaires ont été accomplis récemment dans la compréhension de la signalisation du TGF- β et sur le rôle majeur de cette cytokine dans le développement et la progression des cancers. Cependant, les informations concernant les BMP et leur signalisation dans le domaine des processus inflammatoires et la progression des tumeurs solides humaines ne sont encore que très fragmentaires. Des travaux récents suggèrent que BMP-7 exercerait un rôle protecteur sur les processus inflammatoires et la réparation de la muqueuse digestive (Maric, Poljak et al. 2003).

Les résultats obtenus lors de mon stage doctoral suggèrent que BMP-7 se comporte comme un agent de progression des tumeurs colorectales humaines en induisant plusieurs fonctions cellulaires associées à la cancérogenèse, et tout particulièrement, la dissémination cellulaire (scattering) et l'invasion d'un élément de la matrice extracellulaire, le collagène de type I. L'invasion locale de la membrane basale et de la matrice extracellulaire constitue la signature de la carcinogenèse colique et de ses étapes précoces. Ce processus permet la croissance des cellules cancéreuses et de leur stroma, l'émission de signaux angiogéniques, et la cascade métastatique responsables du caractère létal des cancers. En accord avec cette réponse fonctionnelle sur le scattering et l'invasion, nous démontrons que la signalisation associée à BMP-7 initie ou dépend directement d'un ensemble de voies de signalisation inhérentes aux récepteurs de la superfamille TGF- β /BMP, et à d'autres cascades impliquant la mobilité et l'invasion cellulaires.

I. BMP-7, UN PUISSANT AGENT INDUCTEUR DE L'INVASION CELLULAIRE ET DU « SCATTERING »

Tout d'abord nous avons montré que BMP-7 est une cytokine très puissante pour induire l'invasion cellulaire (potency EC50=1ng/ml) dans plusieurs lignées cellulaires adénomateuses et cancéreuses coliques. Nous avons aussi démontré la présence et la sécrétion de BMP-7 dans différentes lignées cellulaires coliques, les cryptes coliques normales et dysplasiques (ACF), des adénomes et des carcinomes colorectaux chez l'homme. En conséquence, le BMP-7 sécrété par les cellules épithéliales du côlon serait donc capable d'activer de façon autocrine ou paracrine, des voies de signalisation conduisant à l'invasion de la lame basale et la matrice extracellulaire. Nous avons ainsi dévoilé quelques voies oncogéniques impliquées dans la signalisation de BMP-7. Cette cytokine va exercer son action par l'activation de FAK, ERK1/2, JNK et des RhoGTPases.

LA TYR925 DE FAK

La phosphorylation globale et « cyclique » de la protéine FAK par BMP-7 observée dans notre étude est cohérente avec l'idée de l'assemblage et du démontage des plaques d'adhésions focales observés pendant la mobilité cellulaire et le « scattering ». Nous avons montré que BMP-7 induit la phosphorylation de la tyr925 de FAK. Ce site de phosphorylation partagé par l'oncogène src est impliqué dans la survie cellulaire, l'angiogenèse et les signaux conduisant à des protubérances cytoplasmiques pendant la mobilité cellulaire (Brunton, Avizienyte et al. 2005). La phosphorylation de ce motif tyr925 de FAK va induire des inter-connections fonctionnelles, un « crosstalk », avec d'autres voies de signalisation, comme les MAPK. En effet, le motif tyr925 de FAK permet son assemblage à Grb2 : FAK va alors induire l'activation de ERK1/2, ou la cascade Grb2 / SOS / Ras / Raf, et enfin l'angiogenèse via le VEGF sécrété par les cellules cancéreuses, selon le dogme maintenant bien établi (Mitra, Mikolon et al. 2006). En accord avec notre modèle, il a déjà été montré que BMP-7 induit l'angiogenèse et la transcription du gène codant le VEGF (Ramoshebi and Ripamonti 2000; Dai, Kitagawa et al. 2004). Selon ce modèle, on pourrait suggérer que BMP-7 utilise l'activation de FAK, la phosphorylation en tyr925 de FAK pour induire dans un premier temps la migration et l'invasion cellulaires, et dans un deuxième temps l'angiogenèse en activant la transcription du gène codant le VEGF.

Nous avons par ailleurs démontré que cette tyr925 de FAK est également activée par un autre facteur clé de la progression des tumeurs, l'EGF et ses récepteurs EGF-R. En effet, l'EGF est lui aussi capable d'induire l'invasion cellulaire et un ensemble de fonctions associées à la transformation maligne des cellules épithéliales du côlon, dont l'angiogenèse (Rodrigues, Attoub et al. 2003).

LES RHOGTPASES

La formation de lamellipodes induits par BMP-7 dans nos expériences de « scattering » est cohérente avec l'activation de Rac1 par BMP-7 observée dans nos expériences de co-précipitation de PAK-1. Il est connu que l'activation de la petite protéine G Rac1 abouti à la formation de lamellipodes. Nous avons remarqué une forte inhibition de RhoA après 5 minutes d'exposition à BMP-7 et une activation de Rac1 après 15 minutes. Cette régulation réciproque entre les niveaux d'activation de RhoA et de Rac1 a déjà été décrite. Plus particulièrement, il a été proposé que l'inhibition de RhoA constitue un signal permissif pour l'activation de Rac1 (Nguyen, De Wever et al. 2005). L'utilisation des lignées HCT8/S11 qui expriment des formes dominantes négatives de ces trois RhoGTPases nous a permis de valider ces

résultats. En effet, nous avons observé que l'invasion du collagène de type I est compromise par les formes DN-Rac1 et DN-Cdc42. Cependant aucun effet sur l'invasion induite par BMP-7 n'est observé par l'expression de la forme DN-RhoA, ce qui conforte notre interprétation.

L'activation de Rac1 donne suite à une cascade d'activation qui se traduit par l'invasion et la motilité cellulaires via l'activation de JNK, de MKK6 et la transcription de gènes cibles. Pendant l'invasion et la motilité cellulaires, la régulation dynamique et la réorganisation du cytosquelette d'actine sollicitent l'activation séquentielle et la dépolymérisation de l'actine d'une façon spatio-temporelle. Les résultats de cette thèse sont cohérents avec des études antérieures qui démontrent que la sérine kinase LIMK1 interagit avec le BMPRII activé par BMP-7. Ce récepteur activé entre en synergie avec Cdc42 qui va à son tour activer LIMK1 (Lee-Hoeflich, Causing et al. 2004). LIMK1 a été décrit comme régulateur du cytosquelette d'actine en interagissant avec la coffiline, un facteur de dépolymérisation de l'actine (Wang, Mouneimne et al. 2006). En plus, la stabilisation des filaments d'actine par LIMK1 est aussi régulé par Rho et Rac via leur effecteurs respectifs ROCK, PAK1 et PAK4 (p21 Activated Kinase) (Edwards, Sanders et al. 1999; Maekawa, Ishizaki et al. 1999; Dan, Kelly et al. 2001).

II. L'ACTIVITE PRO-INVASIVE DE BMP-7 EST DETERMINEE PAR DES VOIES DE SIGNALISATION SMAD-INDEPENDANTES

Nous avons observé dans notre étude que BMP-7 est capable d'induire l'invasion du collagène par les cellules SW480 qui présentent une déficience pour le facteur de signalisation SMAD4. En accord avec cette observation, ces mêmes cellules SW480 sont incapables d'induire l'activation transcriptionnelle des promoteurs BRE-1 et I-BRE par BMP-7 ou ALK-2. Ces éléments de réponse sont localisés dans la région promotrice du gène *smad7*. Comme j'ai déjà présenté dans l'introduction de cette thèse, SMAD4 est indispensable à la formation des complexes SMADs. Nous confirmons ainsi que BMP-7 agit par une voie indépendante des facteurs de transcription SMAD, et en particulier SMAD4, dans ce modèle SMAD4 déficient. De plus, nous observons que des cellules du côlon et du rein SMAD4 proficientes sont invasives en présence de BMP-7. Nous avons aussi remarqué que de fortes concentrations de BMP-7 (25ng/ml) sont nécessaires pour induire l'activation du promoteur BRE-1 dans des cellules HEK293T, alors que des concentrations relativement faibles (0,5 à 5ng/ml) suffisaient pour induire l'invasion dépendante de BMP-7. Il existerait donc une dissociation entre les mécanismes responsables de la réponse invasive « immédiate » et de la réponse transcriptionnelle « différée » en fonction des concentrations de cytokine BMP-7 disponibles à la surface de la cellule cible et en fonction de la

persistance du signal. Ce schéma s'intègre dans le contexte des interactions entre les cellules épithéliales normales, cancéreuses et du micro-environnement du stroma des muqueuses et des tumeurs malignes, des processus inflammatoires et de l'angiogenèse tumorale.

En effet, le site I-BRE qui se trouve dans le premier intron a été décrit pour être plus sensible aux faibles concentrations de BMPs. Dans ce site, le complexe SMAD1/SMAD4 ne lie pas directement l'ADN et utilise la protéine GATA comme co-facteur. À des fortes concentrations de BMPs, l'expression de SMAD7 est régulée par BRE-1, qui se trouve dans la région promotrice du gène. Le complexe SMAD1/SMAD4 dans ce cas lie directement l'ADN (Benchabane and Wrana 2003). Il a été décrit que SMAD7 inhibe la signalisation SMAD-dépendante du TGF- β et des BMPs, et qu'elle a une action antagoniste de la signalisation de la β -caténine. Ceci suggère que l'activation de la voie SMAD par BMP-7 peut inhiber la signalisation du TGF- β et de Wnt. (Han, Li et al. 2006).

Nos résultats démontrent donc que BMP-7 induit l'invasion par un mécanisme SMAD4-indépendant, et ce, dans les cellules SMAD-4 déficientes et SMAD-proficientes possédant une voie de signalisation SMAD-4 fonctionnelle. Ce résultat démontre donc que la voie SMAD-dépendante n'exerce pas un effet négatif contre la voie SMAD-indépendante initiée par BMP-7, pendant la période de 24h fixée dans la test d'invasion, in vitro.

Les rôles antagonistes entre le TGF- β et BMP-7 dans la transition épithélium-mésenchyme sont peut-être la conséquence de l'effet divergent de ces deux cytokines sur la régulation des gènes *Id2/Id3* qui jouent un rôle clé dans la régulation de la prolifération et de la différenciation cellulaires, mais qui exercent aussi des fonctions transformantes convergentes associées à l'invasion tumorale (Kowanetz, Valcourt et al. 2004).

La perversion de la voie canonique SMAD-dépendante de BMP-7 intervient déjà lors des étapes précoces de la cancérogenèse colique. Des mutations dans les gènes *smad4* et *alk-3* ont été découverts chez des patients atteints de JPS (Juvenile Polyposis Syndrome) (Howe, Roth et al. 1998; Howe, Bair et al. 2001). Plusieurs facteurs impliqués dans la signalisation des BMPs sont délétés chez les patients atteints. Cette pathologie se caractérise par la formation de cryptes ectopiques, de polypes hamartomateux et par des réactions inflammatoires sévères. Ce bilan implique donc un risque dramatiquement plus élevé pour ces personnes de développer un cancer du côlon (Howe, Roth et al. 1998). De plus, l'inactivation de la signalisation des activines, via des mutations de ActR-II, a lieu dans

la plupart des tumeurs coliques MSI (Jung, Doctolero et al. 2004). Cette situation est le miroir des altérations moléculaires observées dans la signalisation du récepteur T β RII du TGF- β et du complexe SMAD2 /SMAD4, respectivement observées dans les cancers du côlon HNPCC, les cancers sporadiques MSI, et les cancers du côlon présentant l'instabilité chromosomique LOH.

III. BMP-7 POSSEDE LE STATUT D'UN AGENT AUTOCRINE ET PARACRINE

L'expression et la sécrétion de BMP-7 par les cellules cancéreuses coliques et dans les tumeurs colorectales humaines sont associées à notre inventaire du répertoire des récepteurs des BMPs dans des cellules normales et transformées. Cette co-expression plaide fortement en faveur du statut autocrine et paracrine de BMP-7 sur les cellules cancéreuses elles-mêmes et sur les cellules du stroma tumoral ou normal dans la muqueuse digestive. En accord avec cette déclaration, nous avons observé que les myofibroblastes humains expriment les récepteurs spécifiques de type I et de type II de BMP-7. Ce type cellulaire est maintenant considéré comme le partenaire des cellules tumorales dans la cohorte des cellules accompagnant les cancéreuses invasives pendant la cascade métastatique (De Wever, Westbroek et al. 2004). Les myofibroblastes exposés au TGF- β (1ng/ml) sont capables d'envahir le collagène de type I. Par contre, nous avons observé que BMP-7 (20ng/ml) n'induit pas cette réponse, suggérant que cette cytokine est associée à d'autres fonctions cellulaires dans ce schéma, comme la prolifération ou la survie cellulaires, par exemple.

Des études récentes montrent que l'expression de BMP-2, de BMP-4 et de BMP-7 augmente considérablement dans les cancers de la prostate présentant des métastases osseuses synchrones, dans les cancers mammaires caractérisés par des invasions ductales et lobulaires, et dans des mélanomes malins (Schwalbe, Sanger et al. 2003; Masuda, Fukabori et al. 2004; Rothhammer, Poser et al. 2005; Yang, Zhong et al. 2005; Alarmo, Rauta et al. 2006). Dans ces maladies, l'amplification du gène *bmp-7* est fréquemment observée, ainsi que l'augmentation de la stabilité du transcrit, et la maturation de la protéine par clivage du pro-domaine. Ainsi, on peut proposer que l'expression et la sécrétion de BMP-7 jouent un rôle important dans la dissémination des cellules tumorales et le ciblage métastatique spécifique à certains tissus. Le cancer du côlon est souvent associé à des métastases dans le foie, les poumons ou le cerveau. Le cancer du côlon avec des métastases dans l'os est rare, avec une incidence de 4-6%. D'une autre part, les métastases osseuses sont beaucoup plus fréquentes dans des cancers de la prostate (95%), du sein (65-75%) et du poumon (30%).

Il n'existe qu'un nombre très limité d'études attribuant un rôle transformant à BMP-7. Ces résultats très récents ont été rapportés dans la littérature pendant le développement de nos propres recherches et la publication de nos travaux correspondant à cette thèse. Le rôle péjoratif de BMP-7 se base sur la capacité de cette cytokine à induire la TEM, la motilité, l'invasion, la survie, la métastase osseuse ou encore l'angiogenèse via l'activation autocrine du promoteur du VEGF (Dai, Kitagawa et al. 2004; Yang, Zhong et al. 2005). Par contre, une étude publiée en 2006 montre que de fortes concentrations de BMP-7 (50ng/ml) induisent par une voie SMAD-indépendante un effet suppresseur contre la croissance de cellules cancéreuses humaines coliques (Beck, Jung et al. 2006). De plus, la réversion par BMP-7 de la TEM induite par le TGF- β a été observée à des concentrations de BMP-7 supérieures à 100ng/ml.

L'ensemble de ces informations et notre publication (Grijelmo, Rodrigue et al. 2007) démontre la dualité fonctionnelle de BMP-7, c'est à dire le rôle bénéfique ou péjoratif de BMP-7 sur la progression tumorale. Cette dualité va dépendre étroitement du contexte dans lequel l'action de BMP-7 va s'exercer. En particulier les paramètres suivants vont particulièrement influencer la réponse cellulaire à BMP-7, concrètement : i) le niveau de production, de sécrétion de cette cytokine et sa concentration au niveau local (cellules cancéreuses et autres types cellulaires composant le stroma tumoral) ou périphérique (circulation systémique, organes cibles de la métastase, ii) le type et le grade de la tumeur (en fonction du « statut oncogénique des tumeurs »), iii) le contexte cellulaire et les boucles de régulation exercées par d'autres cytokines au niveau du stroma tumoral ; iv) le statut des voies SMAD-dépendantes et indépendantes dans les cellules cancéreuses, car on ne peut pas exclure l'implication de la voie SMAD-dépendante in vivo.

Cette situation est certainement beaucoup plus complexe si l'on considère la diversité et la multiplicité des hétérodimères des récepteurs et ligands de la famille BMP et d'autres cytokines membres de la superfamille du TGF- β /BMP-7. Par exemple, l'hétérodimère BMP-2 /BMP-7 a en effet une activité plus forte que les homodimères respectifs (Israel, Nove et al. 1996). Notamment, dans le contexte du cancer du poumon, BMP-2 a été décrit comme un facteur stimulant la migration cellulaire, l'invasion tumorale, l'angiogenèse et la remodelage de la matrice (Langenfeld and Langenfeld 2004).

IV. BMP-7, UNE CYTOKINE ANTI-INFLAMMATOIRE ?

Nous avons observé que la cytokine BMP-7 est exprimée au niveau de l'épithélial colorectal humain normal, préférentiellement à la surface apicale des cryptes et de la muqueuse colique. Ces résultats sont cohérents avec une autre étude qui montre que cette localisation est associée à l'expression des récepteurs BMPs, des SMADs (en incluant leurs formes phosphorylées) et de son antagoniste noggin (Hardwick, Van Den Brink et al. 2004). Cette localisation préférentielle de BMP-7 dans les cellules épithéliales coliques contraste avec l'expression de BMP-4 dans le stroma du grêle (Haramis, Begthel et al. 2004).

BMP-7 pourrait donc jouer un double rôle de médiateur autocrine sur les cellules cancéreuses elles-mêmes et d'agent paracrine sur les interactions épithélium-stroma dans des tumeurs solides, dans la fibrose rénale chronique, et l'épithélium intestinal normal. Cette interprétation est conforme à des observations obtenues chez la souris suite à des applications systémiques de BMP-7 et leur impact sur l'intestin et le rein (Maric, Poljak et al. 2003; Zeisberg, Hanai et al. 2003). Ces auteurs ont observé que la cytokine BMP-7 prévient et reverse l'inflammation et les altérations de la muqueuse et s'oppose à la TEM induite par le TGF- β .

Nous avons observé que le traitement des cellules HCT8/S11 avec BMP-7 réprime l'activité de RhoA. Cette réponse est en premier lieu liée à l'inhibition de l'axe RhoA /ROCK, et en second lieu à la prévention et au blocage de la fibrose et de l'inflammation dans le contexte de la maladie du Crohn et des colites expérimentales (Kataoka, Egashira et al. 2002; Segain, Raingeard de la Bletiere et al. 2003).

En tenant compte de ces observations, notre étude apporte un nouveau regard sur le rôle bénéfique potentiel de BMP-7 dans le contexte de la protection de la muqueuse digestive, la réparation des blessures, et la réversion des inflammations transitoires. Cependant, le rôle bénéfique de BMP-7 pourrait être perverti ou neutralisé pendant les maladies inflammatoires chroniques (maladie de Crohn, sigmoïdites ou des colites). Cette proposition est bien soutenue par nos résultats qui montrent que BMP-7 est associé à des fonctions transformantes majeures, indésirables, comme la capacité d'induire la dissémination et l'invasion cellulaires, et ce par l'intermédiaire de réseaux de signalisation complexes, indépendants de SMAD4 et de src in vitro.

En conclusion, cette thèse suggère que la cytokine BMP-7 exercerait des fonctions diamétralement opposées :1) bénéfiques, pendant les étapes précoces des maladies inflammatoires et néoplasiques (arrêt de la croissance, apoptose) ; 2) délétaires, et pendant les situations d'inflammation chronique et les étapes précoces et tardives de la progression néoplasique (croissance, survie, invasion, angiogenèse, métastase). Ainsi, les altérations moléculaires ou la perte des éléments appartenant aux voies de signalisation **SMAD -dépendantes** et **-indépendantes**, contrôlées par BMP-7 et ses récepteurs, ajoutés à la perte de fonctions suppresseurs de tumeurs dans la muqueuse colique prédisposent et permettent la progression des lésions précancéreuses. Sans doute l'incidence élevée des mutations du gène *smad4* observées dans les cancers colorectaux serait la cause principale de cette commutation, « switch », entre les fonctions bénéfiques et péjoratives de BMP-7 in vivo.

V. LES PERSPECTIVES DE CE TRAVAIL

EFFET DE SMAD4 ET DE BMP-7 SUR LA CROISSANCE TUMORALE CHEZ LA SOURIS NUDE

Le fait de restituer SMAD4 dans la lignée colique SMAD4 déficiente, SW480, devrait nous donner des informations sur l'impact éventuel de la voie SMAD4-dépendante in vivo sur la formation, la croissance des tumeurs colorectales chez la souris, et la formation de métastases. BMP-7 serait ajouté de façon régulière aux souris.

VALIDATION DU RECEPTEUR BMPRII COMME RESPONSABLE DE LA VOIE SMAD-INDEPENDANTE

Afin de vérifier l'hypothèse selon laquelle le récepteur de type II est responsable de la voie de signalisation SMAD-indépendante mise en évidence dans notre étude, je propose de déléter la queue cytoplasmique du BMPRII. C'est cette région, en effet, qui est supposée être en amont de cette voie de signalisation (FAK, JNK, ERK). En effet, cette construction devrait se comporter comme un dominant négatif du BMPRII résident et/ou des assemblages fonctionnels BMPRII/ALK-2. Une fois le BMPRII délété et le vecteur inséré dans les cellules épithéliales coliques, des expériences similaires à celles présentés dans cette thèse pourront être faites. Si la queue cytoplasmique du BMPRII est en effet responsable de cette voie de signalisation, les relations entre BMP-7 et l'activation des MAPKs, ou de la phosphorylation de FAK devraient être interrompues.

EFFET DE BMP-7 SUR LES PROMOTEURS DE SMAD7 ET LES VOIES MAPK-DEPENDANTES

Les résultats acquis dans cette thèse concernent l'effet de BMP-7 et de la surexpression d'ALK-2 sur l'activité du promoteur du gène *smad7*. Je propose d'analyser, dans les cellules SMAD4 proficients et déficients, l'effet de BMP-7, d'ALK-2 (QD et KR) et du vecteur BMPRII avec la queue cytoplasmique délété, sur l'activité du promoteur du gène *smad7* mais aussi sur l'activité du promoteur d'un gène régulé exclusivement par ERK1/2 ou JNK. Il sera alors possible d'établir un modèle de la signalisation en aval des récepteurs BMP-7, selon le type de récepteur, et le statut de SMAD4. Tout d'abord, nous pourrions vérifier les résultats in vitro (lignées cellulaires et effets sur la signalisation et le transcriptome) et dans un deuxième temps in vivo chez la souris nude.

MISE EN EVIDENCE DES CONNEXIONS ENTRE BMP-7 ET DU VEGF PAR LES CELLULES CANCEREUSES : IMPACT SUR L'ANGIOGENESE

Sur des cellules HUVEC, l'ajout de BMP-7 induit l'angiogénèse, comme nous avons observé dans le laboratoire. Il serait pertinent d'exposer ces cellules HUVEC aux anticorps anti-VEGF après ajout de BMP-7 dans le milieu. De cette façon, nous serions capables de répondre à la question de savoir si BMP-7 induit aussi l'angiogénèse via l'expression du gène VEGF dans les cellules endothéliales : Si cet effet est indépendant du VEGF, ces résultats ouvriraient de nouvelles voies de recherche afin d'identifier les mécanismes responsables.

EFFET DE BMP-7 SUR RHO : UBIQUITINATION ET SMURF1

Lors des expériences de pull-down des RhoGTPases, nous avons remarqué que le niveau des protéines RhoA, Cdc42 et Rac1 augmente de façon considérable. Certaines études montrent que RhoA est dégradé par le protéasome, via Smurf1 (Bryan, Cai et al. 2005; Wang, Ogunjimi et al. 2006). Nous avons vu dans l'introduction que les BMPs peuvent induire l'ubiquitination de certaines protéines via l'activation de Smurf1 (Zhu, Kavsak et al. 1999; Murakami, Watabe et al. 2003). Inversement, la mono-ubiquitination peut être considérée aujourd'hui comme une protection contre la dégradation des protéines par le protéasome. Nous avons étudié l'accumulation de RhoA induite par BMP-7, mais nous avons pas obtenu à ce jour de résultats suffisamment reproductibles et concluants. Les premières estimations laissent penser que la monoubiquitination de RhoA serait induite par BMP-7.

ARTICLES PRESENTES EN ANNEXE

ARTICLE II

ACTIVATION DE L'ECHAFAUDAGE MOLECULAIRE FAK/SRC ET DE LA
CASCADE DE SIGNALISATION P130CAS/JNK PAR LES INTEGRINES α 1
PENDANT L'INVASION DU COLLAGENE DE TYPE I PAR LES CELLULES
COLORECTALES HUMAINES HCT8/S11

La tyrosine kinase src est impliquée dans des multiples voies de transduction et dans des processus cellulaires telles que la prolifération, l'adhésion, la motilité ou encore la survie (Alper and Bowden 2005). L'activation oncogénique de la tyrosine kinase src est observé régulièrement dans les étapes précoces et tardives de la progression cancéreuse, de l'adénome au adénocarcinome métastatique (Talamonti, Roh et al. 1993). L'invasion locale de la matrice extracellulaire environnante par les cellules cancéreuses est médiée principalement par les intégrines et par d'autres molécules d'adhésion de la paroi vasculaire. En accord avec le modèle, après liaison du ligand, la protéine FAK va s'associer avec plusieurs sous-unités des intégrines, et s'activer par phosphorylation de sa tyr397. La phosphorylation de cette première tyrosine permet la liaison avec src. Le complexe moléculaire FAK(tyr397)/src va permettre l'activation de plusieurs cibles moléculaires. Par exemple l'activation de la paxilline à travers de la phosphorylation des tyr576 et 577 de FAK, résultant en une hyperphosphorylation de la paxilline et une augmentation de l'activation de p130Cas, ayant toutes les deux comme but une augmentation de l'expression, de la production et de la sécrétion des metalloprotéinases MMP-2 et MMP-9, ou encore l'activation la cascade de MAPKs à travers la phosphorylation de la tyr925 de FAK, ou l'activation de JNK médiée par p130Cas/Rac à travers de la phosphorylation de la tyr861 de FAK (Schlaepfer, Jones et al. 1998; Hsia, Mitra et al. 2003).

Dans l'**article II**, nous avons utilisé l'éther lipide analogue synthétique ET-18-OMe pour induire l'invasion cellulaire en passant par l'activation du src endogène dans les cellules humaines cancéreuses coliques HCT8/S11, afin d'explorer les mécanismes moléculaires impliqués dans cette réponse pro-invasive (Steelant, Goeman et al. 2001; Van Slambrouck and Steelant 2007).

Dans un premier temps, nous avons vérifié que l'invasion induite par l'ET-18-OMe à besoin de l'activité de l'oncogène src. Pour cela nous avons testé l'invasion sur collagène de type I dans de cellules HCT8/S11 et dans ses variantes dominante négative de src, HCT8/S11-DNsrc, après ajout exogène du ET-18-OMe. Nous avons démontré que les cellules HCT8/S11-DNsrc ne sont plus invasives après 24h d'exposition au ET-18-OMe. Nous avons ensuite vérifié par Western Blot la phosphorylation de src après ajout d'ET-18-OMe dans ce deux modèles cellulaires.

Après nous avons regardé le statut de la tyrosine kinase FAK. A l'aide des anticorps reconnaissant des résidus de tyrosine spécifiques, nous avons pu montrer que l'ET-18-OMe phosphoryle la tyr397, la tyr576 et la tyr861 mais pas la tyr925 dans les cellules HCT8/S11 et que ces phosphorylations sont dépendantes de l'activité de src.

De la même façon, nous nous sommes intéressés aux différentes voies de signalisations qu'émergent des différents sites de phosphorylation de FAK. C'est ainsi que nous démontrions que l'ET-18-OMe va induire la activation de p130Cas et de JNK via la phosphorylation de la tyr861 de FAK. Comme l'activation de JNK est souvent lié à une régulation de MMPs, nous avons voulu regarder le statut de MMP-2 et MMP-9 dans les cellules HCT8/S11. Nous avons constaté une forte induction de l'expression de MMP-2 et MMP-9 après ajout d'ET-18-OMe. Tous ces activations et inductions sont dépendantes de l'activité de src.

Sachant que src et FAK sont des médiateurs critiques pour la signalisation des intégrines, nous avons voulu savoir si l'activation de src et FAK par l'ET-18-OMe implique une des intégrines en particulier. De façon étonnant, l'activation de ET-18-OMe semble passer par le « clustering » des intégrines $\alpha 1$. Nous avons vérifié cela en immunoprécipitant l'intégrine $\alpha 1$ et en regardant par Western Blot la présence et statut de src, FAK, p130Cas et JNK dans des cellules HCT8/S11 et HCT8/S11-DNsrc après ajout exogène d'ET-18-OMe.

En conclusion, nous avons montré que la molécule ET-18-OMe induit sélectivement le « clustering » des intégrines $\alpha 1$, suivi par une association et activation de c-src, FAK, p130Cas et JNK, et la sécrétion des MMP-2 et MMP-9 actives.

ARTICLE III

LE VEGF INDUIT L'INVASION DES CELLULES COLORECTALES HUMAINES : REVERSION DE L'INVASION CELLULAIRE ET DE LA CROISSANCE TUMORALE PAR L'INHIBITEUR DES RECEPTEURS DU VEGF ZD4190

Nous avons vu dans l'Introduction que le VEGF est un puissant facteur mitogène pour les cellules endothéliales et un inducteur majeur de l'angiogenèse tumorale. L'épissage alternatif de l'ARNm du VEGF donne lieu à la synthèse de six isoformes du VEGF, dont l'isoforme majoritaire est le **VEGF165**. Le VEGF agit sur l'endothélium vasculaire par l'intermédiaire de ses récepteurs VEGFR-1 (**Flt-1**) et VEGFR-2 (**KDR**) (Neufeld, Cohen et al. 1999). Les **neuropiline-1** (np-1) et **neuropiline-2** (np-2) ont été caractérisées dans le système nerveux central comme les récepteurs des sémaphorines de classe 3 impliquées dans la guidance axonale (Bagri and Tessier-Lavigne 2002). Les neuropilines sont également capables de lier VEGF165 au niveau endothélial (Gluzman-Poltorak, Cohen et al. 2000). Cependant, l'extrémité intracytoplasmique très courte de ces récepteurs ne leur permet pas, a priori, d'activer les voies de signalisation intracellulaires. Les neuropilines exercent leurs effets en s'associant à d'autres récepteurs membranaires, comme la plexine qui transmet les signaux induits par les sémaphorines 3, ou encore les VEGFR. Ainsi, la neuropiline-1 lie Flt-1 et KDR et la neuropiline-2 lie Flt-1 sur les cellules endothéliales (Fuh, Garcia et al. 2000; Gluzman-Poltorak, Cohen et al. 2001). Des résultats récents ont également démontré la présence des VEGFR et des neuropilines dans des cellules épithéliales du tractus gastro-intestinal (von Marschall, Cramer et al. 2000; Cohen, Gluzman-Poltorak et al. 2001; Tian, Song et al. 2001; Hansel, Wilentz et al. 2004).

Dans cet article III, nous démontrons que les récepteurs et co-récepteurs Flt-1 et neuropilines np-1 et np-2 sont exprimés dans les cellules cancéreuses humaines HCT8/S11 et HT29 issues d'adénocarcinomes coliques. Dans ces lignées, le VEGF165 et la sémaphorine 3A (Sema3A) induisent l'invasion cellulaire, par un mécanisme impliquant la voie de signalisation de la MAPK p42/44, ainsi que la voie Rho/ROCK. L'invasion de fragments du cœur de poulet par les cellules HCT8/S11 induite par le VEGF165 est également inhibée par le ZD4190. Par contre, cet inhibiteur pharmacologique des récepteurs du VEGF Flt-1 et KDR n'a pas d'effet sur les effets invasifs de la Sema3A. Enfin, l'administration quotidienne de ZD4190 à des souris athymiques inhibe fortement la croissance des tumeurs HCT8/S11 xénogreffées.

L'ensemble de ces résultats conforte l'idée selon laquelle le VEGF sécrété par les cellules tumorales au sein de la tumeur primaire agit sur les cellules endothéliales pour induire l'angiogenèse tumorale et assurer la survie et la croissance des tumeurs, mais agit également sur les cellules tumorales elles-mêmes, pour induire l'invasion tumorale. Cette boucle autocrine VEGF pourrait aussi constituer un signal de survie pour les cellules cancéreuses au niveau de la tumeur primaire, dans la circulation systémique et lymphatique, et dans les sites secondaires métastatiques.

REFERENCES

- Achison, M., C. M. Elton, et al. (2001). "Integrin-independent tyrosine phosphorylation of p125(fak) in human platelets stimulated by collagen." *J Biol Chem* **276**(5): 3167-74.
- Alarmo, E. L., J. Rauta, et al. (2006). "Bone morphogenetic protein 7 is widely overexpressed in primary breast cancer." *Genes Chromosomes Cancer* **45**(4): 411-9.
- Alper, O. and E. T. Bowden (2005). "Novel insights into c-Src." *Curr Pharm Des* **11**(9): 1119-30.
- Bagri, A. and M. Tessier-Lavigne (2002). "Neuropilins as Semaphorin receptors: in vivo functions in neuronal cell migration and axon guidance." *Adv Exp Med Biol* **515**: 13-31.
- Bagrodia, S. and R. A. Cerione (1999). "Pak to the future." *Trends Cell Biol* **9**(9): 350-5.
- Balkwill, F. (2004). "Cancer and the chemokine network." *Nat Rev Cancer* **4**(7): 540-50.
- Bandyopadhyay, A., L. Wang, et al. (2005). "Systemic administration of a soluble betaglycan suppresses tumor growth, angiogenesis, and matrix metalloproteinase-9 expression in a human xenograft model of prostate cancer." *Prostate* **63**(1): 81-90.
- Barber, M. A. and H. C. Welch (2006). "PI3K and RAC signalling in leukocyte and cancer cell migration." *Bull Cancer* **93**(5): E44-52.
- Beck, S. E., B. H. Jung, et al. (2007). "BMP-induced growth suppression in colon cancer cells is mediated by p21(WAF1) stabilization and modulated by RAS/ERK." *Cell Signal*.
- Beck, S. E., B. H. Jung, et al. (2006). "Bone morphogenetic protein signaling and growth suppression in colon cancer." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **291**(1): G135-45.
- Benchabane, H. and J. L. Wrana (2003). "GATA- and Smad1-dependent enhancers in the Smad7 gene differentially interpret bone morphogenetic protein concentrations." *Mol Cell Biol* **23**(18): 6646-61.
- Bergers, G. and L. E. Benjamin (2003). "Tumorigenesis and the angiogenic switch." *Nat Rev Cancer* **3**(6): 401-10.
- Bhowmick, N. A., M. Ghiassi, et al. (2001). "Transforming growth factor-beta1 mediates epithelial to mesenchymal transdifferentiation through a RhoA-dependent mechanism." *Mol Biol Cell* **12**(1): 27-36.
- Bitzer, M., G. von Gersdorff, et al. (2000). "A mechanism of suppression of TGF-beta/SMAD signaling by NF-kappa B/RelA." *Genes Dev* **14**(2): 187-97.
- Bockhorn, M., R. K. Jain, et al. (2007). "Active versus passive mechanisms in metastasis: do cancer cells crawl into vessels, or are they pushed?" *Lancet Oncol* **8**(5): 444-8.
- Bogenrieder, T. and M. Herlyn (2003). "Axis of evil: molecular mechanisms of cancer metastasis." *Oncogene* **22**(42): 6524-36.
- Bokoch, G. M., C. J. Vlahos, et al. (1996). "Rac GTPase interacts specifically with phosphatidylinositol 3-kinase." *Biochem J* **315** (Pt 3): 775-9.
- Bradshaw, A. D. and E. H. Sage (2001). "SPARC, a matricellular protein that functions in cellular differentiation and tissue response to injury." *J Clin Invest* **107**(9): 1049-54.
- Brown, C. B., A. S. Boyer, et al. (1999). "Requirement of type III TGF-beta receptor for endocardial cell transformation in the heart." *Science* **283**(5410): 2080-2.
- Brown, J. M. and W. R. Wilson (2004). "Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment." *Nat Rev Cancer* **4**(6): 437-47.
- Brunner, A. M., M. N. Lioubin, et al. (1992). "Site-directed mutagenesis of glycosylation sites in the transforming growth factor-beta 1 (TGF beta 1) and TGF beta 2 (414) precursors and of cysteine residues within mature TGF beta 1: effects on secretion and bioactivity." *Mol Endocrinol* **6**(10): 1691-700.
- Brunton, V. G., E. Avizienyte, et al. (2005). "Identification of Src-specific phosphorylation site on focal adhesion kinase: dissection of the role of Src SH2 and catalytic functions and their consequences for tumor cell behavior." *Cancer Res* **65**(4): 1335-42.
- Bryan, B., Y. Cai, et al. (2005). "Ubiquitination of RhoA by Smurf1 promotes neurite outgrowth." *FEBS Lett* **579**(5): 1015-9.
- Buongiorno, P. and B. Bapat (2005). "Rho GTPases and cancer." *Prog Mol Subcell Biol* **40**: 29-53.
- Calalb, M. B., T. R. Polte, et al. (1995). "Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase at sites in the catalytic domain regulates kinase activity: a role for Src family kinases." *Mol Cell Biol* **15**(2): 954-63.
- Carmeliet, P. (2003). "Angiogenesis in health and disease." *Nat Med* **9**(6): 653-60.
- Cavallaro, U. and G. Christofori (2001). "Cell adhesion in tumor invasion and metastasis: loss of the glue is not enough." *Biochim Biophys Acta* **1552**(1): 39-45.
- Cavallaro, U. and G. Christofori (2004). "Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer." *Nat Rev Cancer* **4**(2): 118-32.
- Chambers, A. F., A. C. Groom, et al. (2002). "Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites." *Nat Rev Cancer* **2**(8): 563-72.
- Chang, L. and M. Karin (2001). "Mammalian MAP kinase signalling cascades." *Nature* **410**(6824): 37-40.
- Cheifetz, S., T. Bellon, et al. (1992). "Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells." *J Biol Chem* **267**(27): 19027-30.
- Chen, H. C., P. A. Appeddu, et al. (1995). "Interaction of focal adhesion kinase with cytoskeletal protein talin." *J Biol Chem* **270**(28): 16995-9.

- Chen, X., E. Weisberg, et al. (1997). "Smad4 and FAST-1 in the assembly of activin-responsive factor." *Nature* **389**(6646): 85-9.
- Chen, Y. G., A. Hata, et al. (1998). "Determinants of specificity in TGF-beta signal transduction." *Genes Dev* **12**(14): 2144-52.
- Christiansen, J. H., E. G. Coles, et al. (2000). "Molecular control of neural crest formation, migration and differentiation." *Curr Opin Cell Biol* **12**(6): 719-24.
- Clapper, M. L., W. C. Chang, et al. (2001). "Chemoprevention of colorectal cancer." *Curr Opin Oncol* **13**(4): 307-13.
- Clements, R. T., F. L. Minnear, et al. (2005). "RhoA and Rho-kinase dependent and independent signals mediate TGF-beta-induced pulmonary endothelial cytoskeletal reorganization and permeability." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **288**(2): L294-306.
- Cohen, T., Z. Gluzman-Poltorak, et al. (2001). "Neuroendocrine cells along the digestive tract express neuropilin-2." *Biochem Biophys Res Commun* **284**(2): 395-403.
- Conery, A. R., Y. Cao, et al. (2004). "Akt interacts directly with Smad3 to regulate the sensitivity to TGF-beta induced apoptosis." *Nat Cell Biol* **6**(4): 366-72.
- Cui, Y., F. Jean, et al. (1998). "BMP-4 is proteolytically activated by furin and/or PC6 during vertebrate embryonic development." *Embo J* **17**(16): 4735-43.
- Dai, J., Y. Kitagawa, et al. (2004). "Vascular endothelial growth factor contributes to the prostate cancer-induced osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic protein." *Cancer Res* **64**(3): 994-9.
- Dai, J. L., R. K. Bansal, et al. (1999). "G1 cell cycle arrest and apoptosis induction by nuclear Smad4/Dpc4: phenotypes reversed by a tumorigenic mutation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(4): 1427-32.
- Dan, C., A. Kelly, et al. (2001). "Cytoskeletal changes regulated by the PAK4 serine/threonine kinase are mediated by LIM kinase 1 and cofilin." *J Biol Chem* **276**(34): 32115-21.
- Davies, M., M. Robinson, et al. (2005). "Induction of an epithelial to mesenchymal transition in human immortal and malignant keratinocytes by TGF-beta1 involves MAPK, Smad and AP-1 signalling pathways." *J Cell Biochem* **95**(5): 918-31.
- De Wever, O. and M. Mareel (2003). "Role of tissue stroma in cancer cell invasion." *J Pathol* **200**(4): 429-47.
- De Wever, O., W. Westbroek, et al. (2004). "Critical role of N-cadherin in myfibroblast invasion and migration in vitro stimulated by colon-cancer-cell-derived TGF-beta or wounding." *J Cell Sci* **117**(Pt 20): 4691-703.
- Derynck, R. and Y. E. Zhang (2003). "Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling." *Nature* **425**(6958): 577-84.
- Devlin, R. D., Z. Du, et al. (2003). "Skeletal overexpression of noggin results in osteopenia and reduced bone formation." *Endocrinology* **144**(5): 1972-8.
- Ebisawa, T., M. Fukuchi, et al. (2001). "Smurf1 interacts with transforming growth factor-beta type I receptor through Smad7 and induces receptor degradation." *J Biol Chem* **276**(16): 12477-80.
- Eccles, S. A. and D. R. Welch (2007). "Metastasis: recent discoveries and novel treatment strategies." *Lancet* **369**(9574): 1742-57.
- Eden, S., R. Rohatgi, et al. (2002). "Mechanism of regulation of WAVE1-induced actin nucleation by Rac1 and Nck." *Nature* **418**(6899): 790-3.
- Edlund, S., M. Landstrom, et al. (2002). "Transforming growth factor-beta-induced mobilization of actin cytoskeleton requires signaling by small GTPases Cdc42 and RhoA." *Mol Biol Cell* **13**(3): 902-14.
- Edwards, D. C., L. C. Sanders, et al. (1999). "Activation of LIM-kinase by Pak1 couples Rac/Cdc42 GTPase signalling to actin cytoskeletal dynamics." *Nat Cell Biol* **1**(5): 253-9.
- Egeblad, M. and Z. Werb (2002). "New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression." *Nat Rev Cancer* **2**(3): 161-74.
- Eide, B. L., C. W. Turck, et al. (1995). "Identification of Tyr-397 as the primary site of tyrosine phosphorylation and pp60src association in the focal adhesion kinase, pp125FAK." *Mol Cell Biol* **15**(5): 2819-27.
- Fainsod, A., K. Deissler, et al. (1997). "The dorsalizing and neural inducing gene follistatin is an antagonist of BMP-4." *Mech Dev* **63**(1): 39-50.
- Fearon, E. R. and B. Vogelstein (1990). "A genetic model for colorectal tumorigenesis." *Cell* **61**(5): 759-67.
- Feeley, B. T., S. C. Gamradt, et al. (2005). "Influence of BMPs on the formation of osteoblastic lesions in metastatic prostate cancer." *J Bone Miner Res* **20**(12): 2189-99.
- Feeley, B. T., L. Krenek, et al. (2006). "Overexpression of noggin inhibits BMP-mediated growth of osteolytic prostate cancer lesions." *Bone* **38**(2): 154-66.
- Felding-Habermann, B., E. Fransvea, et al. (2002). "Involvement of tumor cell integrin alpha v beta 3 in hematogenous metastasis of human melanoma cells." *Clin Exp Metastasis* **19**(5): 427-36.
- Feng, X. H. and R. Derynck (1997). "A kinase subdomain of transforming growth factor-beta (TGF-beta) type I receptor determines the TGF-beta intracellular signaling specificity." *Embo J* **16**(13): 3912-23.
- Ferrara, N., H. P. Gerber, et al. (2003). "The biology of VEGF and its receptors." *Nat Med* **9**(6): 669-76.

- Ferrara, N., K. J. Hillan, et al. (2004). "Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer." Nat Rev Drug Discov **3**(5): 391-400.
- Fink, S. P., S. E. Swinler, et al. (2001). "Transforming growth factor-beta-induced growth inhibition in a Smad4 mutant colon adenoma cell line." Cancer Res **61**(1): 256-60.
- Flanders, K. C., E. S. Kim, et al. (2001). "Immunohistochemical expression of Smads 1-6 in the 15-day gestation mouse embryo: signaling by BMPs and TGF-betas." Dev Dyn **220**(2): 141-54.
- Friedl, P. and K. Wolf (2003). "Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms." Nat Rev Cancer **3**(5): 362-74.
- Fuh, G., K. C. Garcia, et al. (2000). "The interaction of neuropilin-1 with vascular endothelial growth factor and its receptor flt-1." J Biol Chem **275**(35): 26690-5.
- Gazzerro, E., V. Gangji, et al. (1998). "Bone morphogenetic proteins induce the expression of noggin, which limits their activity in cultured rat osteoblasts." J Clin Invest **102**(12): 2106-14.
- Giaccia, A., B. G. Siim, et al. (2003). "HIF-1 as a target for drug development." Nat Rev Drug Discov **2**(10): 803-11.
- Glister, C., S. L. Richards, et al. (2005). "Bone morphogenetic proteins (BMP) -4, -6, and -7 potently suppress basal and luteinizing hormone-induced androgen production by bovine theca interna cells in primary culture: could ovarian hyperandrogenic dysfunction be caused by a defect in thecal BMP signaling?" Endocrinology **146**(4): 1883-92.
- Gluzman-Poltorak, Z., T. Cohen, et al. (2000). "Neuropilin-2 is a receptor for the vascular endothelial growth factor (VEGF) forms VEGF-145 and VEGF-165 [corrected]." J Biol Chem **275**(24): 18040-5.
- Gluzman-Poltorak, Z., T. Cohen, et al. (2001). "Vascular endothelial growth factor receptor-1 and neuropilin-2 form complexes." J Biol Chem **276**(22): 18688-94.
- Gong, Y., D. Krakow, et al. (1999). "Heterozygous mutations in the gene encoding noggin affect human joint morphogenesis." Nat Genet **21**(3): 302-4.
- Gray, A. M. and A. J. Mason (1990). "Requirement for activin A and transforming growth factor-beta 1 pro-regions in homodimer assembly." Science **247**(4948): 1328-30.
- Grijelmo, C., C. Rodrigue, et al. (2007). "Proinvasive activity of BMP-7 through SMAD4 /src -independent and ERK/ Rac /JNK -dependent signaling pathways in colon cancer cells." Cell Signal.
- Groppe, J., J. Greenwald, et al. (2002). "Structural basis of BMP signalling inhibition by the cystine knot protein Noggin." Nature **420**(6916): 636-42.
- Guicheux, J., J. Lemonnier, et al. (2003). "Activation of p38 mitogen-activated protein kinase and c-Jun-NH2-terminal kinase by BMP-2 and their implication in the stimulation of osteoblastic cell differentiation." J Bone Miner Res **18**(11): 2060-8.
- Hall, A. (1998). "Rho GTPases and the actin cytoskeleton." Science **279**(5350): 509-14.
- Han, G., A. G. Li, et al. (2006). "Smad7-induced beta-catenin degradation alters epidermal appendage development." Dev Cell **11**(3): 301-12.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." Cell **100**(1): 57-70.
- Hansel, D. E., R. E. Wilentz, et al. (2004). "Expression of neuropilin-1 in high-grade dysplasia, invasive cancer, and metastases of the human gastrointestinal tract." Am J Surg Pathol **28**(3): 347-56.
- Haramis, A. P., H. Begthel, et al. (2004). "De novo crypt formation and juvenile polyposis on BMP inhibition in mouse intestine." Science **303**(5664): 1684-6.
- Hardwick, J. C., G. R. Van Den Brink, et al. (2004). "Bone morphogenetic protein 2 is expressed by, and acts upon, mature epithelial cells in the colon." Gastroenterology **126**(1): 111-21.
- Harrison, C. A., E. Wiater, et al. (2004). "Modulation of activin and BMP signaling." Mol Cell Endocrinol **225**(1-2): 19-24.
- Hata, A., R. S. Lo, et al. (1997). "Mutations increasing autoinhibition inactivate tumour suppressors Smad2 and Smad4." Nature **388**(6637): 82-7.
- Hauck, C. R., D. A. Hsia, et al. (2000). "Focal adhesion kinase facilitates platelet-derived growth factor-BB-stimulated ERK2 activation required for chemotaxis migration of vascular smooth muscle cells." J Biol Chem **275**(52): 41092-9.
- Hayashi, H., S. Abdollah, et al. (1997). "The MAD-related protein Smad7 associates with the TGFbeta receptor and functions as an antagonist of TGFbeta signaling." Cell **89**(7): 1165-73.
- Helder, M. N., E. Ozkaynak, et al. (1995). "Expression pattern of osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) in human and mouse development." J Histochem Cytochem **43**(10): 1035-44.
- Howe, A. K., A. E. Aplin, et al. (2002). "Anchorage-dependent ERK signaling--mechanisms and consequences." Curr Opin Genet Dev **12**(1): 30-5.
- Howe, J. R., J. L. Bair, et al. (2001). "Germline mutations of the gene encoding bone morphogenetic protein receptor 1A in juvenile polyposis." Nat Genet **28**(2): 184-7.
- Howe, J. R., S. Roth, et al. (1998). "Mutations in the SMAD4/DPC4 gene in juvenile polyposis." Science **280**(5366): 1086-8.
- Hsia, D. A., S. K. Mitra, et al. (2003). "Differential regulation of cell motility and invasion by FAK." J Cell Biol **160**(5): 753-67.

- Hsu, D. R., A. N. Economides, et al. (1998). "The *Xenopus* dorsalizing factor Gremlin identifies a novel family of secreted proteins that antagonize BMP activities." *Mol Cell* **1**(5): 673-83.
- Hu, M. C., D. Wasserman, et al. (2004). "p38MAPK acts in the BMP7-dependent stimulatory pathway during epithelial cell morphogenesis and is regulated by Smad1." *J Biol Chem* **279**(13): 12051-9.
- Hu, P. P., X. Shen, et al. (1999). "The MEK pathway is required for stimulation of p21(WAF1/CIP1) by transforming growth factor-beta." *J Biol Chem* **274**(50): 35381-7.
- Hurwitz, H., L. Fehrenbacher, et al. (2004). "Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer." *N Engl J Med* **350**(23): 2335-42.
- Iemura, S., T. S. Yamamoto, et al. (1998). "Direct binding of follistatin to a complex of bone-morphogenetic protein and its receptor inhibits ventral and epidermal cell fates in early *Xenopus* embryo." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(16): 9337-42.
- Imamura, T., M. Takase, et al. (1997). "Smad6 inhibits signalling by the TGF-beta superfamily." *Nature* **389**(6651): 622-6.
- Inman, G. J., F. J. Nicolas, et al. (2002). "Nucleocytoplasmic shuttling of Smads 2, 3, and 4 permits sensing of TGF-beta receptor activity." *Mol Cell* **10**(2): 283-94.
- Ishida, Y., T. Kondo, et al. (2004). "The essential involvement of cross-talk between IFN-gamma and TGF-beta in the skin wound-healing process." *J Immunol* **172**(3): 1848-55.
- Israel, D. I., J. Nove, et al. (1996). "Heterodimeric bone morphogenetic proteins show enhanced activity in vitro and in vivo." *Growth Factors* **13**(3-4): 291-300.
- Jiang, Y., C. Chen, et al. (1996). "Characterization of the structure and function of a new mitogen-activated protein kinase (p38beta)." *J Biol Chem* **271**(30): 17920-6.
- Jiang, Y., H. Gram, et al. (1997). "Characterization of the structure and function of the fourth member of p38 group mitogen-activated protein kinases, p38delta." *J Biol Chem* **272**(48): 30122-8.
- Jin, H. and J. Varnier (2004). "Integrins: roles in cancer development and as treatment targets." *Br J Cancer* **90**(3): 561-5.
- Jones, R. J., V. G. Brunton, et al. (2000). "Adhesion-linked kinases in cancer; emphasis on src, focal adhesion kinase and PI 3-kinase." *Eur J Cancer* **36**(13 Spec No): 1595-606.
- Jordan, P., R. Brazao, et al. (1999). "Cloning of a novel human Rac1b splice variant with increased expression in colorectal tumors." *Oncogene* **18**(48): 6835-9.
- Jung, B., R. T. Doctolero, et al. (2004). "Loss of activin receptor type 2 protein expression in microsatellite unstable colon cancers." *Gastroenterology* **126**(3): 654-9.
- Kaps, C., C. Bramlage, et al. (2002). "Bone morphogenetic proteins promote cartilage differentiation and protect engineered artificial cartilage from fibroblast invasion and destruction." *Arthritis Rheum* **46**(1): 149-62.
- Kataoka, C., K. Egashira, et al. (2002). "Important role of Rho-kinase in the pathogenesis of cardiovascular inflammation and remodeling induced by long-term blockade of nitric oxide synthesis in rats." *Hypertension* **39**(2): 245-50.
- Kawabata, M., A. Chytil, et al. (1995). "Cloning of a novel type II serine/threonine kinase receptor through interaction with the type I transforming growth factor-beta receptor." *J Biol Chem* **270**(10): 5625-30.
- Kawano, Y., Y. Fukata, et al. (1999). "Phosphorylation of myosin-binding subunit (MBS) of myosin phosphatase by Rho-kinase in vivo." *J Cell Biol* **147**(5): 1023-38.
- Keith, B. and M. C. Simon (2007). "Hypoxia-inducible factors, stem cells, and cancer." *Cell* **129**(3): 465-72.
- Kerbel, R. and J. Folkman (2002). "Clinical translation of angiogenesis inhibitors." *Nat Rev Cancer* **2**(10): 727-39.
- Kerr, D. (2003). "Clinical development of gene therapy for colorectal cancer." *Nat Rev Cancer* **3**(8): 615-22.
- Kim, I. Y., D. H. Lee, et al. (2000). "Expression of bone morphogenetic protein receptors type-IA, -IB and -II correlates with tumor grade in human prostate cancer tissues." *Cancer Res* **60**(11): 2840-4.
- Kinzler, K. W. and B. Vogelstein (1996). "Lessons from hereditary colorectal cancer." *Cell* **87**(2): 159-70.
- Kiosses, W. B., R. H. Daniels, et al. (1999). "A role for p21-activated kinase in endothelial cell migration." *J Cell Biol* **147**(4): 831-44.
- Kivinen, L. and M. Laiho (1999). "Ras- and mitogen-activated protein kinase kinase-dependent and -independent pathways in p21Cip1/Waf1 induction by fibroblast growth factor-2, platelet-derived growth factor, and transforming growth factor-beta1." *Cell Growth Differ* **10**(9): 621-8.
- Klemke, R. L., J. Leng, et al. (1998). "CAS/Crk coupling serves as a "molecular switch" for induction of cell migration." *J Cell Biol* **140**(4): 961-72.
- Koenig, B. B., J. S. Cook, et al. (1994). "Characterization and cloning of a receptor for BMP-2 and BMP-4 from NIH 3T3 cells." *Mol Cell Biol* **14**(9): 5961-74.
- Kowanzet, M., U. Valcourt, et al. (2004). "Id2 and Id3 define the potency of cell proliferation and differentiation responses to transforming growth factor beta and bone morphogenetic protein." *Mol Cell Biol* **24**(10): 4241-54.

- Kretzschmar, M., J. Doody, et al. (1999). "A mechanism of repression of TGFbeta/ Smad signaling by oncogenic Ras." *Genes Dev* **13**(7): 804-16.
- Kuga, H., T. Morisaki, et al. (2003). "Interferon-gamma suppresses transforming growth factor-beta-induced invasion of gastric carcinoma cells through cross-talk of Smad pathway in a three-dimensional culture model." *Oncogene* **22**(49): 7838-47.
- Lamprecht, S. A. and M. Lipkin (2003). "Chemoprevention of colon cancer by calcium, vitamin D and folate: molecular mechanisms." *Nat Rev Cancer* **3**(8): 601-14.
- Langenfeld, E. M. and J. Langenfeld (2004). "Bone morphogenetic protein-2 stimulates angiogenesis in developing tumors." *Mol Cancer Res* **2**(3): 141-9.
- Lee-Hoeflich, S. T., C. G. Causing, et al. (2004). "Activation of LIMK1 by binding to the BMP receptor, BMPRII, regulates BMP-dependent dendritogenesis." *Embo J* **23**(24): 4792-801.
- Lewis, K. A., P. C. Gray, et al. (2000). "Betaglycan binds inhibin and can mediate functional antagonism of activin signalling." *Nature* **404**(6776): 411-4.
- Li, Z., Y. Jiang, et al. (1996). "The primary structure of p38 gamma: a new member of p38 group of MAP kinases." *Biochem Biophys Res Commun* **228**(2): 334-40.
- Liu, F., A. Hata, et al. (1996). "A human Mad protein acting as a BMP-regulated transcriptional activator." *Nature* **381**(6583): 620-3.
- Lo, R. S., Y. G. Chen, et al. (1998). "The L3 loop: a structural motif determining specific interactions between SMAD proteins and TGF-beta receptors." *Embo J* **17**(4): 996-1005.
- Luo, K. (2003). "Negative regulation of BMP signaling by the ski oncoprotein." *J Bone Joint Surg Am* **85-A Suppl 3**: 39-43.
- Luukko, K., A. Ylikorkala, et al. (2001). "Developmentally regulated expression of Smad3, Smad4, Smad6, and Smad7 involved in TGF-beta signaling." *Mech Dev* **101**(1-2): 209-12.
- Macias-Silva, M., S. Abdollah, et al. (1996). "MADR2 is a substrate of the TGFbeta receptor and its phosphorylation is required for nuclear accumulation and signaling." *Cell* **87**(7): 1215-24.
- Macias-Silva, M., P. A. Hoodless, et al. (1998). "Specific activation of Smad1 signaling pathways by the BMP7 type I receptor, ALK2." *J Biol Chem* **273**(40): 25628-36.
- Mackie, E. J., R. Chiquet-Ehrismann, et al. (1987). "Tenascin is a stromal marker for epithelial malignancy in the mammary gland." *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**(13): 4621-5.
- Mackie, E. J., W. Halfter, et al. (1988). "Induction of tenascin in healing wounds." *J Cell Biol* **107**(6 Pt 2): 2757-67.
- Maddala, R., V. N. Reddy, et al. (2003). "Growth factor induced activation of Rho and Rac GTPases and actin cytoskeletal reorganization in human lens epithelial cells." *Mol Vis* **9**: 329-36.
- Maekawa, M., T. Ishizaki, et al. (1999). "Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase." *Science* **285**(5429): 895-8.
- Maric, I., L. Poljak, et al. (2003). "Bone morphogenetic protein-7 reduces the severity of colon tissue damage and accelerates the healing of inflammatory bowel disease in rats." *J Cell Physiol* **196**(2): 258-64.
- Markowitz, S. D., D. M. Dawson, et al. (2002). "Focus on colon cancer." *Cancer Cell* **1**(3): 233-6.
- Massague, J. and Y. G. Chen (2000). "Controlling TGF-beta signaling." *Genes Dev* **14**(6): 627-44.
- Massague, J., J. Seoane, et al. (2005). "Smad transcription factors." *Genes Dev* **19**(23): 2783-810.
- Massi, D., A. Franchi, et al. (1999). "Osteonectin expression correlates with clinical outcome in thin cutaneous malignant melanomas." *Hum Pathol* **30**(3): 339-44.
- Masuda, H., Y. Fukabori, et al. (2004). "Expression of bone morphogenetic protein-7 (BMP-7) in human prostate." *Prostate* **59**(1): 101-6.
- Masuda, H., Y. Fukabori, et al. (2003). "Increased expression of bone morphogenetic protein-7 in bone metastatic prostate cancer." *Prostate* **54**(4): 268-74.
- Matsuura, I., N. G. Denissova, et al. (2004). "Cyclin-dependent kinases regulate the antiproliferative function of Smads." *Nature* **430**(6996): 226-31.
- Matsuura, I., G. Wang, et al. (2005). "Identification and characterization of ERK MAP kinase phosphorylation sites in Smad3." *Biochemistry* **44**(37): 12546-53.
- Mazure, N. M., M. C. Brahimi-Horn, et al. (2004). "HIF-1: master and commander of the hypoxic world. A pharmacological approach to its regulation by siRNAs." *Biochem Pharmacol* **68**(6): 971-80.
- Meitinger, T., A. Meindl, et al. (1993). "Molecular modelling of the Norrie disease protein predicts a cystine knot growth factor tertiary structure." *Nat Genet* **5**(4): 376-80.
- Mercurio, A. M., I. Rabinovitz, et al. (2001). "The alpha 6 beta 4 integrin and epithelial cell migration." *Curr Opin Cell Biol* **13**(5): 541-5.
- Mitra, S. K., D. Mikolon, et al. (2006). "Intrinsic FAK activity and Y925 phosphorylation facilitate an angiogenic switch in tumors." *Oncogene* **25**(44): 5969-84.
- Mitra, S. K. and D. D. Schlaepfer (2006). "Integrin-regulated FAK-Src signaling in normal and cancer cells." *Curr Opin Cell Biol* **18**(5): 516-23.
- Miyaki, M., T. Iijima, et al. (1999). "Higher frequency of Smad4 gene mutation in human colorectal cancer with distant metastasis." *Oncogene* **18**(20): 3098-103.
- Mon, N. N., S. Ito, et al. (2006). "FAK signaling in neoplastic disorders: a linkage between

- inflammation and cancer." Ann N Y Acad Sci **1086**: 199-212.
- Monroe, D. G., D. F. Jin, et al. (2000). "Estrogen opposes the apoptotic effects of bone morphogenetic protein 7 on tissue remodeling." Mol Cell Biol **20**(13): 4626-34.
- Moustakas, A. and C. H. Heldin (2005). "Non-Smad TGF-beta signals." J Cell Sci **118**(Pt 16): 3573-84.
- Murakami, G., T. Watabe, et al. (2003). "Cooperative inhibition of bone morphogenetic protein signaling by Smurf1 and inhibitory Smads." Mol Biol Cell **14**(7): 2809-17.
- Nagarajan, R. P., F. Chen, et al. (2000). "Repression of transforming-growth-factor-beta-mediated transcription by nuclear factor kappaB." Biochem J **348 Pt 3**: 591-6.
- Nakamura, K., H. Yano, et al. (2001). "Different modes and qualities of tyrosine phosphorylation of Fak and Pyk2 during epithelial-mesenchymal transdifferentiation and cell migration: analysis of specific phosphorylation events using site-directed antibodies." Oncogene **20**(21): 2626-35.
- Nakamura, T., K. Takio, et al. (1990). "Activin-binding protein from rat ovary is follistatin." Science **247**(4944): 836-8.
- Nakao, A., T. Imamura, et al. (1997). "TGF-beta receptor-mediated signalling through Smad2, Smad3 and Smad4." Embo J **16**(17): 5353-62.
- Neufeld, G., T. Cohen, et al. (1999). "Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors." Faseb J **13**(1): 9-22.
- Nguyen, Q. D., O. De Wever, et al. (2005). "Commutators of PAR-1 signaling in cancer cell invasion reveal an essential role of the Rho-Rho kinase axis and tumor microenvironment." Oncogene **24**(56): 8240-51.
- Nollet, F., G. Berx, et al. (1999). "The role of the E-cadherin/catenin adhesion complex in the development and progression of cancer." Mol Cell Biol Res Commun **2**(2): 77-85.
- Ono, K. and J. Han (2000). "The p38 signal transduction pathway: activation and function." Cell Signal **12**(1): 1-13.
- Oshima, M., J. E. Dinchuk, et al. (1996). "Suppression of intestinal polyposis in Apc delta716 knockout mice by inhibition of cyclooxygenase 2 (COX-2)." Cell **87**(5): 803-9.
- Osyczka, A. M. and P. S. Leboy (2005). "Bone morphogenetic protein regulation of early osteoblast genes in human marrow stromal cells is mediated by extracellular signal-regulated kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signaling." Endocrinology **146**(8): 3428-37.
- Pantel, K. and R. H. Brakenhoff (2004). "Dissecting the metastatic cascade." Nat Rev Cancer **4**(6): 448-56.
- Perides, G., F. E. Jensen, et al. (1995). "Neuroprotective effect of human osteogenic protein-1 in a rat model of cerebral hypoxia/ischemia." Neurosci Lett **187**(1): 21-4.
- Persson, U., H. Izumi, et al. (1998). "The L45 loop in type I receptors for TGF-beta family members is a critical determinant in specifying Smad isoform activation." FEBS Lett **434**(1-2): 83-7.
- Piccolo, S., E. Agius, et al. (1999). "The head inducer Cerberus is a multifunctional antagonist of Nodal, BMP and Wnt signals." Nature **397**(6721): 707-10.
- Piccolo, S., Y. Sasai, et al. (1996). "Dorsoventral patterning in Xenopus: inhibition of ventral signals by direct binding of chordin to BMP-4." Cell **86**(4): 589-98.
- Pierreux, C. E., F. J. Nicolas, et al. (2000). "Transforming growth factor beta-independent shuttling of Smad4 between the cytoplasm and nucleus." Mol Cell Biol **20**(23): 9041-54.
- Polte, T. R. and S. K. Hanks (1995). "Interaction between focal adhesion kinase and Crk-associated tyrosine kinase substrate p130Cas." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(23): 10678-82.
- Ponder, B. A. (2001). "Cancer genetics." Nature **411**(6835): 336-41.
- Porte, H., E. Chastre, et al. (1995). "Neoplastic progression of human colorectal cancer is associated with overexpression of the stromelysin-3 and BM-40/SPARC genes." Int J Cancer **64**(1): 70-5.
- Porte, H., J. P. Triboulet, et al. (1998). "Overexpression of stromelysin-3, BM-40/SPARC, and MET genes in human esophageal carcinoma: implications for prognosis." Clin Cancer Res **4**(6): 1375-82.
- Pouliot, F. and C. Labrie (2002). "Role of Smad1 and Smad4 proteins in the induction of p21WAF1,Cip1 during bone morphogenetic protein-induced growth arrest in human breast cancer cells." J Endocrinol **172**(1): 187-98.
- Pramanik, R., X. Qi, et al. (2003). "p38 isoforms have opposite effects on AP-1-dependent transcription through regulation of c-Jun. The determinant roles of the isoforms in the p38 MAPK signal specificity." J Biol Chem **278**(7): 4831-9.
- Pugh, C. W. and P. J. Ratcliffe (2003). "The von Hippel-Lindau tumor suppressor, hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) degradation, and cancer pathogenesis." Semin Cancer Biol **13**(1): 83-9.
- Qi, J. H. and L. Claesson-Welsh (2001). "VEGF-induced activation of phosphoinositide 3-kinase is dependent on focal adhesion kinase." Exp Cell Res **263**(1): 173-82.
- Raingaud, J., S. Gupta, et al. (1995). "Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine." J Biol Chem **270**(13): 7420-6.
- Rajagopalan, H., M. A. Nowak, et al. (2003). "The significance of unstable chromosomes in

- colorectal cancer." *Nat Rev Cancer* **3**(9): 695-701.
- Ramoshebi, L. N. and U. Ripamonti (2000). "Osteogenic protein-1, a bone morphogenetic protein, induces angiogenesis in the chick chorioallantoic membrane and synergizes with basic fibroblast growth factor and transforming growth factor-beta1." *Anat Rec* **259**(1): 97-107.
- Rees, J. R., B. A. Onwuegbusi, et al. (2006). "In vivo and In vitro Evidence for Transforming Growth Factor- β 1-Mediated Epithelial to Mesenchymal Transition in Esophageal Adenocarcinoma." *Cancer Res* **66**(19): 9583-90.
- Reguly, T. and J. L. Wrana (2003). "In or out? The dynamics of Smad nucleocytoplasmic shuttling." *Trends Cell Biol* **13**(5): 216-20.
- Reilly, G. C., E. B. Golden, et al. (2005). "Differential effects of ERK and p38 signaling in BMP-2 stimulated hypertrophy of cultured chick sternal chondrocytes." *Cell Commun Signal* **3**(1): 3.
- Remy, I., A. Montmarquette, et al. (2004). "PKB/Akt modulates TGF-beta signalling through a direct interaction with Smad3." *Nat Cell Biol* **6**(4): 358-65.
- Reversade, B. and E. M. De Robertis (2005). "Regulation of ADMP and BMP2/4/7 at opposite embryonic poles generates a self-regulating morphogenetic field." *Cell* **123**(6): 1147-60.
- Ripamonti, U. (2005). "Bone induction by recombinant human osteogenic protein-1 (hOP-1, BMP-7) in the primate *Papio ursinus* with expression of mRNA of gene products of the TGF-beta superfamily." *J Cell Mol Med* **9**(4): 911-28.
- Rodrigues, S., S. Attoub, et al. (2003). "Selective abrogation of the proinvasive activity of the trefoil peptides pS2 and spasmodic polypeptide by disruption of the EGF receptor signaling pathways in kidney and colonic cancer cells." *Oncogene* **22**(29): 4488-97.
- Rodrigues, S., O. De Wever, et al. (2007). "Opposing roles of netrin-1 and the dependence receptor DCC in cancer cell invasion, tumor growth and metastasis." *Oncogene*.
- Rohatgi, R., H. Y. Ho, et al. (2000). "Mechanism of N-WASP activation by CDC42 and phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate." *J Cell Biol* **150**(6): 1299-310.
- Rohatgi, R., L. Ma, et al. (1999). "The interaction between N-WASP and the Arp2/3 complex links Cdc42-dependent signals to actin assembly." *Cell* **97**(2): 221-31.
- Rosenzweig, B. L., T. Imamura, et al. (1995). "Cloning and characterization of a human type II receptor for bone morphogenetic proteins." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(17): 7632-6.
- Rothhammer, T., I. Poser, et al. (2005). "Bone morphogenetic proteins are overexpressed in malignant melanoma and promote cell invasion and migration." *Cancer Res* **65**(2): 448-56.
- Roux, P. P. and J. Blenis (2004). "ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions." *Microbiol Mol Biol Rev* **68**(2): 320-44.
- Sander, E. E., J. P. ten Klooster, et al. (1999). "Rac downregulates Rho activity: reciprocal balance between both GTPases determines cellular morphology and migratory behavior." *J Cell Biol* **147**(5): 1009-22.
- Savage, C., P. Das, et al. (1996). "Caenorhabditis elegans genes sma-2, sma-3, and sma-4 define a conserved family of transforming growth factor beta pathway components." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(2): 790-4.
- Schaeffer, H. J. and M. J. Weber (1999). "Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers." *Mol Cell Biol* **19**(4): 2435-44.
- Schaller, M. D. (2001). "Biochemical signals and biological responses elicited by the focal adhesion kinase." *Biochim Biophys Acta* **1540**(1): 1-21.
- Schaller, M. D., C. A. Borgman, et al. (1992). "pp125FAK a structurally distinctive protein-tyrosine kinase associated with focal adhesions." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(11): 5192-6.
- Schaller, M. D., J. D. Hildebrand, et al. (1994). "Autophosphorylation of the focal adhesion kinase, pp125FAK, directs SH2-dependent binding of pp60src." *Mol Cell Biol* **14**(3): 1680-8.
- Schaller, M. D. and J. T. Parsons (1995). "pp125FAK-dependent tyrosine phosphorylation of paxillin creates a high-affinity binding site for Crk." *Mol Cell Biol* **15**(5): 2635-45.
- Schnerer, O., S. K. Meurer, et al. (2007). "Endoglin differentially modulates antagonistic TGF-beta and BMP-7 signaling." *J Biol Chem*.
- Schlaepfer, D. D., S. K. Hanks, et al. (1994). "Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase." *Nature* **372**(6508): 786-91.
- Schlaepfer, D. D., K. C. Jones, et al. (1998). "Multiple Grb2-mediated integrin-stimulated signaling pathways to ERK2/mitogen-activated protein kinase: summation of both c-Src- and focal adhesion kinase-initiated tyrosine phosphorylation events." *Mol Cell Biol* **18**(5): 2571-85.
- Schmierer, B. and C. S. Hill (2005). "Kinetic analysis of Smad nucleocytoplasmic shuttling reveals a mechanism for transforming growth factor beta-dependent nuclear accumulation of Smads." *Mol Cell Biol* **25**(22): 9845-58.
- Schmitz, A. A., E. E. Govek, et al. (2000). "Rho GTPases: signaling, migration, and invasion." *Exp Cell Res* **261**(1): 1-12.
- Schwalbe, M., J. Sanger, et al. (2003). "Differential expression and regulation of bone morphogenetic protein 7 in breast cancer." *Int J Oncol* **23**(1): 89-95.

- Segain, J. P., D. Raingeard de la Bletiere, et al. (2003). "Rho kinase blockade prevents inflammation via nuclear factor kappa B inhibition: evidence in Crohn's disease and experimental colitis." Gastroenterology **124**(5): 1180-7.
- Sekelsky, J. J., S. J. Newfeld, et al. (1995). "Genetic characterization and cloning of mothers against dpp, a gene required for decapentaplegic function in *Drosophila melanogaster*." Genetics **139**(3): 1347-58.
- Sells, M. A., J. T. Boyd, et al. (1999). "p21-activated kinase 1 (Pak1) regulates cell motility in mammalian fibroblasts." J Cell Biol **145**(4): 837-49.
- Semenza, G. L. (2002). "Involvement of hypoxia-inducible factor 1 in human cancer." Intern Med **41**(2): 79-83.
- Shen, Y. and M. D. Schaller (1999). "Focal adhesion targeting: the critical determinant of FAK regulation and substrate phosphorylation." Mol Biol Cell **10**(8): 2507-18.
- Shi, W., C. Chang, et al. (2007). "Endofin acts as a Smad anchor for receptor activation in BMP signaling." J Cell Sci **120**(Pt 7): 1216-24.
- Sieg, D. J., C. R. Hauck, et al. (2000). "FAK integrates growth-factor and integrin signals to promote cell migration." Nat Cell Biol **2**(5): 249-56.
- Sirard, C., S. Kim, et al. (2000). "Targeted disruption in murine cells reveals variable requirement for Smad4 in transforming growth factor beta-related signaling." J Biol Chem **275**(3): 2063-70.
- Soldi, R., S. Mitola, et al. (1999). "Role of alphavbeta3 integrin in the activation of vascular endothelial growth factor receptor-2." Embo J **18**(4): 882-92.
- Souchelnytskyi, S., K. Tamaki, et al. (1997). "Phosphorylation of Ser465 and Ser467 in the C terminus of Smad2 mediates interaction with Smad4 and is required for transforming growth factor-beta signaling." J Biol Chem **272**(44): 28107-15.
- Stack, E. and R. N. DuBois (2001). "Role of cyclooxygenase inhibitors for the prevention of colorectal cancer." Gastroenterol Clin North Am **30**(4): 1001-10.
- Stanley, E., C. Biben, et al. (1998). "DAN is a secreted glycoprotein related to *Xenopus cerberus*." Mech Dev **77**(2): 173-84.
- Steeg, P. S. (2003). "Metastasis suppressors alter the signal transduction of cancer cells." Nat Rev Cancer **3**(1): 55-63.
- Steelant, W. F., J. L. Goeman, et al. (2001). "Alkyllysophospholipid 1-O-octadecyl-2-O-methylglycerophosphocholine induces invasion through episialin-mediated neutralization of E-cadherin in human mammary MCF-7 cells in vitro." Int J Cancer **92**(4): 527-36.
- Steenvoorden, M. M., T. C. Tolboom, et al. (2006). "Transition of healthy to diseased synovial tissue in rheumatoid arthritis is associated with gain of mesenchymal/fibrotic characteristics." Arthritis Res Ther **8**(6): R165.
- Sumi, T., K. Matsumoto, et al. (2001). "Specific activation of LIM kinase 2 via phosphorylation of threonine 505 by ROCK, a Rho-dependent protein kinase." J Biol Chem **276**(1): 670-6.
- Suzuki, A., E. Kaneko, et al. (1997). "Mesoderm induction by BMP-4 and -7 heterodimers." Biochem Biophys Res Commun **232**(1): 153-6.
- Talamonti, M. S., M. S. Roh, et al. (1993). "Increase in activity and level of pp60c-src in progressive stages of human colorectal cancer." J Clin Invest **91**(1): 53-60.
- Tanaka, M., T. Yamazaki, et al. (2000). "Clinical significance of tenascin-C expression in osteosarcoma: tenascin-C promotes distant metastases of osteosarcoma." Int J Mol Med **5**(5): 505-10.
- ten Dijke, P., O. Korchynskiy, et al. (2003). "Controlling cell fate by bone morphogenetic protein receptors." Mol Cell Endocrinol **211**(1-2): 105-13.
- ten Dijke, P., H. Yamashita, et al. (1994). "Identification of type I receptors for osteogenic protein-1 and bone morphogenetic protein-4." J Biol Chem **269**(25): 16985-8.
- Terdiman, J. P. (2000). "Genomic events in the adenoma to carcinoma sequence." Semin Gastrointest Dis **11**(4): 194-206.
- Thiery, J. P. (2002). "Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression." Nat Rev Cancer **2**(6): 442-54.
- Tian, X., S. Song, et al. (2001). "Vascular endothelial growth factor: acting as an autocrine growth factor for human gastric adenocarcinoma cell MGC803." Biochem Biophys Res Commun **286**(3): 505-12.
- Timar, J., O. Csuka, et al. (2002). "Molecular pathology of tumor metastasis. II. Molecular staging and differential diagnosis." Pathol Oncol Res **8**(3): 204-19.
- Tsubakimoto, K., K. Matsumoto, et al. (1999). "Small GTPase RhoD suppresses cell migration and cytokinesis." Oncogene **18**(15): 2431-40.
- Uehata, M., T. Ishizaki, et al. (1997). "Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension." Nature **389**(6654): 990-4.
- Ulloa, L., J. Doody, et al. (1999). "Inhibition of transforming growth factor-beta/SMAD signalling by the interferon-gamma/STAT pathway." Nature **397**(6721): 710-3.
- Urist, M. R. (1965). "Bone: formation by autoinduction." Science **150**(698): 893-9.
- van Nimwegen, M. J. and B. van de Water (2007). "Focal adhesion kinase: a potential target in cancer therapy." Biochem Pharmacol **73**(5): 597-609.
- Van Slambrouck, S. and W. F. Steelant (2007). "Clustering of monosialyl-Gb5 initiates downstream signalling events leading to

- invasion of MCF-7 breast cancer cells." *Biochem J* **401**(3): 689-99.
- Vander Griend, D. J. and C. W. Rinker-Schaeffer (2004). "A new look at an old problem: the survival and organ-specific growth of metastases." *Sci STKE* **2004**(216): pe3.
- Velasco-Loyden, G., J. Arribas, et al. (2004). "The shedding of betaglycan is regulated by pervanadate and mediated by membrane type matrix metalloprotease-1." *J Biol Chem* **279**(9): 7721-33.
- Vilchis-Landeros, M. M., J. L. Montiel, et al. (2001). "Recombinant soluble betaglycan is a potent and isoform-selective transforming growth factor-beta neutralizing agent." *Biochem J* **355**(Pt 1): 215-22.
- Vitt, U. A., S. Y. Hsu, et al. (2001). "Evolution and classification of cystine knot-containing hormones and related extracellular signaling molecules." *Mol Endocrinol* **15**(5): 681-94.
- von Marschall, Z., T. Cramer, et al. (2000). "De novo expression of vascular endothelial growth factor in human pancreatic cancer: evidence for an autocrine mitogenic loop." *Gastroenterology* **119**(5): 1358-72.
- Vuori, K., H. Hirai, et al. (1996). "Introduction of p130cas signaling complex formation upon integrin-mediated cell adhesion: a role for Src family kinases." *Mol Cell Biol* **16**(6): 2606-13.
- Wang, H. R., A. A. Ogunjimi, et al. (2006). "Degradation of RhoA by Smurf1 ubiquitin ligase." *Methods Enzymol* **406**: 437-47.
- Wang, W., G. Mouneimne, et al. (2006). "The activity status of cofilin is directly related to invasion, intravasation, and metastasis of mammary tumors." *J Cell Biol* **173**(3): 395-404.
- Watanabe, M., N. Masuyama, et al. (2000). "Regulation of intracellular dynamics of Smad4 by its leucine-rich nuclear export signal." *EMBO Rep* **1**(2): 176-82.
- Watanabe, N., T. Kato, et al. (1999). "Cooperation between mDia1 and ROCK in Rho-induced actin reorganization." *Nat Cell Biol* **1**(3): 136-43.
- Wennerberg, K. and C. J. Der (2004). "Rho-family GTPases: it's not only Rac and Rho (and I like it)." *J Cell Sci* **117**(Pt 8): 1301-12.
- Wiater, E. and W. Vale (2003). "Inhibin is an antagonist of bone morphogenetic protein signaling." *J Biol Chem* **278**(10): 7934-41.
- Wicks, S. J., S. Lui, et al. (2000). "Inactivation of smad-transforming growth factor beta signaling by Ca(2+)-calmodulin-dependent protein kinase II." *Mol Cell Biol* **20**(21): 8103-11.
- Winkler, D. G., M. K. Sutherland, et al. (2003). "Osteocyte control of bone formation via sclerostin, a novel BMP antagonist." *Embo J* **22**(23): 6267-76.
- Woodford-Richens, K. L., A. J. Rowan, et al. (2001). "Comprehensive analysis of SMAD4 mutations and protein expression in juvenile polyposis: evidence for a distinct genetic pathway and polyp morphology in SMAD4 mutation carriers." *Am J Pathol* **159**(4): 1293-300.
- Wrana, J. L., H. Tran, et al. (1994). "Two distinct transmembrane serine/threonine kinases from *Drosophila melanogaster* form an activin receptor complex." *Mol Cell Biol* **14**(2): 944-50.
- Xiao, Z., R. Latek, et al. (2003). "An extended bipartite nuclear localization signal in Smad4 is required for its nuclear import and transcriptional activity." *Oncogene* **22**(7): 1057-69.
- Xie, L., B. K. Law, et al. (2004). "Activation of the Erk pathway is required for TGF-beta1-induced EMT in vitro." *Neoplasia* **6**(5): 603-10.
- Yamanaka, M., K. Kanda, et al. (2001). "Analysis of the gene expression of SPARC and its prognostic value for bladder cancer." *J Urol* **166**(6): 2495-9.
- Yamashita, H., P. ten Dijke, et al. (1995). "Osteogenic protein-1 binds to activin type II receptors and induces certain activin-like effects." *J Cell Biol* **130**(1): 217-26.
- Yang, S., M. Lim, et al. (2006). "Bone morphogenetic protein 7 protects prostate cancer cells from stress-induced apoptosis via both Smad and c-Jun NH2-terminal kinase pathways." *Cancer Res* **66**(8): 4285-90.
- Yang, S., C. Zhong, et al. (2005). "Diverse biological effect and Smad signaling of bone morphogenetic protein 7 in prostate tumor cells." *Cancer Res* **65**(13): 5769-77.
- Yeh, L. C. and J. C. Lee (1999). "Osteogenic protein-1 increases gene expression of vascular endothelial growth factor in primary cultures of fetal rat calvaria cells." *Mol Cell Endocrinol* **153**(1-2): 113-24.
- Yokouchi, Y., K. J. Vogan, et al. (1999). "Antagonistic signaling by Caronte, a novel Cerberus-related gene, establishes left-right asymmetric gene expression." *Cell* **98**(5): 573-83.
- Zarubin, T. and J. Han (2005). "Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway." *Cell Res* **15**(1): 11-8.
- Zeisberg, M., J. Hanai, et al. (2003). "BMP-7 counteracts TGF-beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and reverses chronic renal injury." *Nat Med* **9**(7): 964-8.
- Zhao, M., M. Qiao, et al. (2003). "E3 ubiquitin ligase Smurf1 mediates core-binding factor alpha1/Runx2 degradation and plays a specific role in osteoblast differentiation." *J Biol Chem* **278**(30): 27939-44.
- Zhou, X. P., K. Woodford-Richens, et al. (2001). "Germline mutations in BMPR1A/ALK3 cause a subset of cases of juvenile polyposis syndrome and of Cowden and Bannayan-Riley-Ruvalcaba syndromes." *Am J Hum Genet* **69**(4): 704-11.
- Zhu, H., P. Kavsak, et al. (1999). "A SMAD ubiquitin ligase targets the BMP pathway and affects embryonic pattern formation." *Nature* **400**(6745): 687-93.

