

Ciblage de la voie de signalisation Wnt dans les cancers mammaires et colorectaux

Alexandra Walton

▶ **To cite this version:**

Alexandra Walton. Ciblage de la voie de signalisation Wnt dans les cancers mammaires et colorectaux. Sciences pharmaceutiques. 2019. dumas-02177560

HAL Id: dumas-02177560

https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02177560

Submitted on 9 Jul 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Faculté de Pharmacie
Aix*Marseille Université

MÉMOIRE
DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPECIALISEES
D'INNOVATION PHARMACEUTIQUE ET RECHERCHE

Soutenu le Vendredi 5 Juillet 2019

Par Mme WALTON Alexandra
Née le 28 Juin 1989 à Paris (13)

Conformément aux dispositions du décret n°2003-76
du 23 janvier 2003, tenant lieu de

THÈSE

POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

----oOo----

TITRE : Ciblage de la voie de signalisation Wnt dans les cancers mammaires et colorectaux

----oOo----

JURY :

Président : Pr. Benjamin GUILLET, PU-PH, Faculté de Pharmacie, Aix-Marseille Université

Membres : Pr. Jean-Paul BORG, PU-PH, Faculté de Pharmacie, Aix-Marseille Université (Directeur de thèse)
Pr. Maxime Lehmann, Faculté de Pharmacie de Strasbourg, Université de Strasbourg
Dr. Canonge Jean-Marie, PH, Hôpitaux de Toulouse
Dr. Avais DAULAT, Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille

Université d'Aix-Marseille – Faculté de Pharmacie – 27 bd Jean Moulin – CS 30064 - 13385 Marseille cedex 05 - France
Tél. : +33 (0)4 91 83 55 00 - Fax : +33 (0)4 91 80 26 12

Faculté de Pharmacie
Aix*Marseille Université

MÉMOIRE
DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPECIALISEES
D'INNOVATION PHARMACEUTIQUE ET RECHERCHE

Soutenu le Vendredi 5 Juillet 2019

Par Mme WALTON Alexandra
Née le 28 Juin 1989 à Paris (13)

Conformément aux dispositions du décret n°2003-76
du 23 janvier 2003, tenant lieu de

THÈSE

POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

----oOo----

TITRE : Ciblage de la voie de signalisation Wnt dans les cancers mammaires et colorectaux

----oOo----

JURY :

Président : Pr. Benjamin GUILLET, PU-PH, Faculté de Pharmacie, Aix-Marseille Université

Membres : Pr. Jean-Paul BORG, PU-PH, Faculté de Pharmacie, Aix-Marseille Université (Directeur de thèse)
Pr. Maxime Lehmann, Faculté de Pharmacie de Strasbourg, Université de Strasbourg
Dr. Canonge Jean-Marie, PH, Hôpitaux de Toulouse
Dr. Avais DAULAT, Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille

Faculté de Pharmacie
Aix*Marseille Université

27 Boulevard Jean Moulin – 13385 MARSEILLE Cedex 05
Tel. : 04 91 83 55 00 – Fax : 04 91 80 26 12

ADMINISTRATION :

Doyen :	Mme Françoise DIGNAT-GEORGE
Vice-Doyens :	M. Jean-Paul BORG, M. François DEVRED, M. Pascal RATHELOT
Chargés de Mission :	Mme Pascale BARBIER, M. David BERGE-LEFRANC, Mme Manon CARRE, Mme Caroline DUCROS, Mme Frédérique GRIMALDI
Conseiller du Doyen :	M. Patrice VANELLE
Doyens honoraires :	M. Jacques REYNAUD, M. Pierre TIMON-DAVID, M. Patrice VANELLE
Professeurs émérites :	M. José SAMPOL, M. Athanassios ILIADIS, M. Jean-Pierre REYNIER, M. Henri PORTUGAL
Professeurs honoraires :	M. Guy BALANSARD, M. Yves BARRA, Mme Claudette BRIAND, M. Jacques CATALIN, Mme Andrée CREMIEUX, M. Aimé CREVAT, M. Bernard CRISTAU, M. Gérard DUMENIL, M. Alain DURAND, Mme Danielle GARÇON, M. Maurice JALFRE, M. Joseph JOACHIM, M. Maurice LANZA, M. José MALDONADO, M. Patrick REGLI, M. Jean-Claude SARI
Chef des Services Administratifs :	Mme Florence GAUREL
Chef de Cabinet :	Mme Aurélie BELENGUER
Responsable de la Scolarité :	Mme Nathalie BESNARD

DEPARTEMENT BIO-INGENIERIE PHARMACEUTIQUE
Responsable : Professeur Philippe PICCERELLE

PROFESSEURS

BIOPHYSIQUE	M. Vincent PEYROT M. Hervé KOVACIC
GENIE GENETIQUE ET BIOINGENIERIE	M. Christophe DUBOIS
PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE, BIOPHARMACIE ET COSMETIQUE	M. Philippe PICCERELLE

MAITRES DE CONFERENCES

BIOPHYSIQUE	M. Robert GILLI Mme Odile RIMET-GASPARINI Mme Pascale BARBIER M. François DEVRED Mme Manon CARRE M. Gilles BREUZARD Mme Alessandra PAGANO
GENIE GENETIQUE ET BIOTECHNOLOGIE	M. Eric SEREE-PACHA Mme Véronique REY-BOURGAREL
PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE, BIOPHARMACIE ET COSMETOLOGIE	M. Pascal PRINDERRE M. Emmanuel CAUTURE Mme Véronique ANDRIEU Mme Marie-Pierre SAVELLI
NUTRITION ET DIETETIQUE	M. Léopold TCHIAKPE

A.H.U.

THERAPIE CELLULAIRE	M. Jérémy MAGALON

ENSEIGNANTS CONTRACTUELS

ANGLAIS	Mme Angélique GOODWIN

DEPARTEMENT BIOLOGIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Philippe CHARPIOT

PROFESSEURS

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET CLINIQUE	M. Philippe CHARPIOT
BIOLOGIE CELLULAIRE	M. Jean-Paul BORG
HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE	Mme Françoise DIGNAT-GEORGE Mme Laurence CAMOIN-JAU Mme Florence SABATIER-MALATERRE Mme Nathalie BARDIN
MICROBIOLOGIE	M. Jean-Marc ROLAIN M. Philippe COLSON
PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET ZOOLOGIE	Mme Nadine AZAS-KREDER

MAITRES DE CONFERENCES

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET CLINIQUE	Mme Dominique JOURDHEUIL-RAHMANI M. Thierry AUGIER M. Edouard LAMY Mme Alexandrine BERTAUD Mme Claire CERINI Mme Edwige TELLIER M. Stéphane POITEVIN
HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE	Mme Aurélie LEROYER M. Romaric LACROIX Mme Sylvie COINTE
MICROBIOLOGIE	Mme Michèle LAGET M. Michel DE MEO Mme Anne DAVIN-REGLI Mme Véronique ROUX M. Fadi BITTAR Mme Isabelle PAGNIER Mme Sophie EDOUARD M. Seydina Mouhamadou DIENE
PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET ZOOLOGIE	Mme Carole DI GIORGIO M. Aurélien DUMETRE Mme Magali CASANOVA Mme Anita COHEN
BIOLOGIE CELLULAIRE	Mme Anne-Catherine LOUHMEAU

A.H.U.

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE	M. Maxime LOYENS

DEPARTEMENT CHIMIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Patrice VANELLE

PROFESSEURS

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Catherine BADENS
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. Philippe GALLICE
CHIMIE MINERALE ET STRUCTURALE – CHIMIE THERAPEUTIQUE	M. Pascal RATHELOT M. Maxime CROZET
CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE	M. Patrice VANELLE M. Thierry TERME
PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOLOGIE, HOMEOPATHIE	Mme Evelyne OLLIVIER

MAITRES DE CONFERENCES

BOTANIQUE ET CRYPTOGAMIE, BIOLOGIE CELLULAIRE	Mme Anne FAVEL Mme Joëlle MOULIN-TRAFFORT
CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Catherine DEFOORT M. Alain NICOLAY Mme Estelle WOLFF Mme Elise LOMBARD Mme Camille DESGROUAS
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. David BERGE-LEFRANC M. Pierre REBOUILLON
CHIMIE THERAPEUTIQUE	Mme Sandrine FRANCO-ALIBERT Mme Caroline DUCROS M. Marc MONTANA Mme Manon ROCHE
CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE HYDROLOGIE	M. Armand GELLIS M. Christophe CURTI Mme Julie BROGGI M. Nicolas PRIMAS M. Cédric SPITZ M. Sébastien REDON
PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOLOGIE, HOMEOPATHIE	M. Riad ELIAS Mme Valérie MAHIOU-LEDDET Mme Sok Siya BUN Mme Béatrice BAGHDIKIAN

MAITRES DE CONFERENCE ASSOCIES A TEMPS PARTIEL (M.A.S.T.)

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Anne-Marie PENET-LOREC
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. Cyril PUJOL
DROIT ET ECONOMIE DE LA PHARMACIE	M. Marc LAMBERT
GESTION PHARMACEUTIQUE, PHARMACOECONOMIE ET ETHIQUE PHARMACEUTIQUE OFFICINALE, DROIT ET COMMUNICATION PHARMACEUTIQUES A L'OFFICINE ET GESTION DE LA PHARMAFAC	Mme Félicia FERRERA

A.H.U.

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	M. Mathieu CERINO

ATER

CHIMIE ANALYTIQUE	M. Charles DESMARCHELIER
CHIMIE THERAPEUTIQUE	Mme Fanny MATHIAS

DEPARTEMENT MEDICAMENT ET SECURITE SANITAIRE
Responsable : Professeur Benjamin GUILLET

PROFESSEURS	
PHARMACIE CLINIQUE	Mme Diane BRAGUER M. Stéphane HONORÉ
PHARMACODYNAMIE	M. Benjamin GUILLET
TOXICOLOGIE GENERALE	M. Bruno LACARELLE
TOXICOLOGIE DE L'ENVIRONNEMENT	Mme Frédérique GRIMALDI

MAITRES DE CONFERENCES	
PHARMACODYNAMIE	M. Guillaume HACHE Mme Ahlem BOUHLEL M. Philippe GARRIGUE
PHYSIOLOGIE	Mme Sylviane LORTET Mme Emmanuelle MANOS-SAMPOL
TOXICOCINETIQUE ET PHARMACOCINETIQUE	M. Joseph CICCOLINI Mme Raphaëlle FANCIULLINO Mme Florence GATTACECCA
TOXICOLOGIE GENERALE ET PHARMACIE CLINIQUE	M. Pierre-Henri VILLARD Mme Caroline SOLAS-CHESNEAU Mme Marie-Anne ESTEVE

A.H.U.	
PHARMACIE CLINIQUE	M. Florian CORREARD
PHARMACOCINETIQUE	Mme Nadège NEANT

CHARGES D'ENSEIGNEMENT A LA FACULTE

Mme Valérie AMIRAT-COMBRALIER, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Pierre BERTAULT-PERES, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Marie-Hélène BERTOCCHIO, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Martine BUES-CHARBIT, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Nicolas COSTE, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Sophie GENSOLLEN, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Sylvain GONNET, Pharmacien titulaire

Mme Florence LEANDRO, Pharmacien adjoint

M. Stéphane PICHON, Pharmacien titulaire

M. Patrick REGGIO, Pharmacien conseil, DRSM de l'Assurance Maladie

Mme Clémence TABELE, Pharmacien-Praticien attaché

Mme TONNEAU-PFUG, Pharmacien adjoint

M. Badr Eddine TEHHANI, Pharmacien – Praticien hospitalier

M. Joël VELLOZZI, Expert-Comptable

Mise à jour le 22 février 2018

« L'Université n'entend donner aucune approbation, ni improbation aux opinions émises dans les thèses. Ces opinions doivent être considérées comme propres à leurs auteurs. »

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier très sincèrement le professeur Benjamin GUILLET de présider mon jury et pour ses conseils lors de mon comité de thèse de sciences.

Je remercie le professeur Maxime LEHMANN et le docteur Jean Marie CANONGE d'avoir accepté de juger mon travail et de la disponibilité dont ils ont fait preuve en venant jusqu'à Marseille assister à la soutenance. Je suis très honorée de pouvoir compter sur la présence de spécialistes de différents domaines.

Je remercie le docteur Avais DAULAT de me faire la joie de participer à mon jury de thèse en tant qu'expert de la voie de signalisation Wnt.

Un immense merci au professeur Jean-Paul BORG, mon directeur de thèse, de m'avoir permis de découvrir le domaine de la recherche en Cancérologie et de m'avoir acceptée dans son équipe au Centre de Recherche en Cancérologie. Grâce à vous, j'ai beaucoup appris en termes de connaissances scientifiques, de valorisation de mes résultats, de communication orale et d'orientation de carrière. Merci pour votre disponibilité malgré votre emploi du temps chargé. Aucune de mes questions n'est restée sans réponse que ce soit sur le plan scientifique ou sur mon avenir professionnel. Merci pour votre optimisme et votre enthousiasme lors des discussions sur mon projet de recherche. Merci de m'avoir fait économiser une longue période de stress en corrigeant ma thèse en un délai record. Enfin, merci pour la confiance que vous m'avez accordée tout au long de mon internat. Cela m'a permis de prendre un peu plus confiance en moi chaque année et je vous en suis très reconnaissante.

Merci à Éric Bailly, qui codirige la thèse de sciences que je fais pendant mon internat. Tu as été indispensable à tous les résultats sur le projet VANGL2 que je présente dans cette thèse. De plus, grâce à toi, j'ai beaucoup appris scientifiquement. Mais surtout, c'est toi qui as eu la lourde tâche de m'encadrer à la paillasse lors de mes débuts au laboratoire (un peu après Tania que je remercie également). Donc je te remercie pour ta patience lors de mes innombrables étourderies, de m'avoir appris à devenir une expérimentatrice et de m'avoir enseigné le raisonnement scientifique pour désigner mes expériences avec les bons contrôles. Grâce à toi et à ce que tu m'as transmis, je prends plaisir tous les jours à désigner de la bonne façon mes expériences pour répondre à des questions scientifiques que tu m'as appris à me poser lorsque je débutais. Etant d'une nature anxieuse, jamais je ne me serais lancée dans une thèse de sciences sur VANGL2 si je n'avais pas été rassurée par le fait qu'on allait continuer de travailler ensemble sur cette protéine qui maintenant est devenue, sans aucun doute, notre protéine préférée.

Je remercie également tous les membres de l'équipe du professeur BORG, qui, sans exception, me viennent toujours en aide lorsque je les sollicite. Ainsi, merci à Michaël pour tous ses précieux conseils scientifiques qui me sont d'une grande aide et qui conditionnent souvent la tournure de mes expériences. Merci à Anne-Laure de m'avoir aidée pour la mise en page de cette thèse, d'avoir toujours pris le temps de répondre à

mes questions lors de la rédaction et de m'avoir apporté son soutien et sa gentillesse. Merci à Marie-Josée pour tous ses encouragements qui me remontent souvent le moral. Merci à Laëtitia qui m'a grandement conseillée pendant la réalisation de cette thèse et m'a fourni des documents qui m'ont été d'une grande aide. Merci à Mônica et Marta qui ont partagé leur protocole et leurs réactifs avec moi à chaque fois que je rencontrais un problème technique. Merci à Sylvie pour son travail remarquable sur les anticorps monoclonaux et pour son soutien. Merci à Kos, mon voisin de paillasse, de partager avec moi tes réactifs et de me faire rire, parfois involontairement, tous les jours. Merci à Diego pour son travail sur le xénope, c'était très enrichissant de travailler avec toi et ça me manque beaucoup. Merci à Anne-Catherine pour ses conseils. Merci à Eva pour sa bonne humeur.

Merci à Avais, qui, en plus d'être membre de mon jury, de mon équipe, est aussi devenu un de mes fidèles amis du Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille. Sans toi mon internat aurait été bien différent. Merci pour tes conseils scientifiques, pour m'avoir écoutée lorsque je doutais et pour ton amitié. Je n'arrive pas à imaginer le laboratoire sans toi mais je sais que tu sauras briller dans la nouvelle voie que tu as décidé de suivre.

Merci à ma grande amie Rania. Rania, tu es complètement indispensable pour moi au CRCM. D'ailleurs, quand tu pars en vacances j'ai le blues. Merci pour ton aide précieuse en Biologie Cellulaire, pour ton soutien, pour ton écoute etc...La liste est longue ! Je tiens beaucoup à notre amitié et je repartirai avec cette amitié lorsque je quitterai le CRCM !

Merci à Raph pour les qPCR, pour me changer les idées lors des repas à la cantine, pour les dosettes de café que tu m'offres (et que je te dérobe parfois) et d'être toujours prêt à m'aider ! Toi aussi tu égayes mon quotidien au CRCM. Je regrette que tu ne puisses pas assister à ma soutenance !

Un grand merci à Daniel Isnardon, ingénieur de la plateforme imagerie du CRCM, qui passe beaucoup de temps avec moi pour m'aider à faire des beaux films sur le trafic intracellulaire de VANGL2.

Je tiens également à remercier mes deux amies qui ont quitté le CRCM : merci à Leonor qui a fait tout son possible pour que je puisse rendre mon mémoire de Master 2 à temps. Merci à Pauline qui a fait de ma troisième année d'internat la meilleure grâce au trio que l'on formait avec Rania et aux bons moments passés toutes les trois.

Comment ne pas remercier ma famille...Pour commencer, merci à mon oncle Denis de m'avoir prêté son appartement l'année du concours de première année. L'aventure « pharma » a commencé avec toi donc je suis très heureuse que tu puisses assister à ma soutenance pour que l'on clôture cette aventure ensemble !

Merci à mon merveilleux petit frère Fabrice à qui on a mené la vie dure à chaque fois que je venais réviser mes partiels à la maison. Je sais que d'entendre sans cesse « Ne fais pas de bruit, ta sœur travaille ! » n'a pas dû être facile pour toi alors je te remercie pour tous tes efforts.

Merci à mon papa pour la relecture de ma thèse, l'organisation du pot, la confiance qu'il m'accorde dans chacun de mes choix et de me faire comprendre, quand j'en ai besoin, qu'il est fier de moi.

Merci à mon grand frère Kevin, à ma belle-sœur Camille et à leurs deux beaux enfants Margot et Jean pour les délicieux moments « cocooning » passés à Puyricard qui m'ont permis de recharger mes batteries pendant les années concours, les examens et la rédaction de cette thèse.

Un merci incommensurable à ma maman. Je pourrais écrire une deuxième thèse sur tous les remerciements que tu mérites alors je ne vais pas pouvoir tout écrire. Merci pour ton soutien sans limite, merci de me tenir compagnie tous les soirs au téléphone lors de mes retours tardifs du labo, merci de me consoler et me remettre sur pieds pendant les périodes difficiles, merci d'être fière de moi en toutes circonstances, merci pour la relecture de ma thèse, merci pour l'organisation du pot, merci pour tout ce que tu fais continuellement pour moi et pour toujours avoir cru en moi. Sans toi je n'en serais pas là car jamais je n'aurais eu la force de retourner à la Faculté de Pharmacie après avoir envisagé de la quitter la première année.

Merci à mon compagnon de me supporter pendant ces périodes de stress, de supporter les weekends rythmés par mon travail et d'avoir relu ma thèse avec bienveillance. Tes encouragements et compliments sur mon mémoire m'ont mis du baume au cœur dans la dernière ligne droite. Merci également pour tes conseils, ton amour et merci de me donner confiance en moi.

Merci à ma meilleure amie Nathalie de me comprendre et de me connaitre à la perfection ; j'espère que tu seras aussi fière de moi que ce que je l'ai été de toi pour ta thèse de droit !

Enfin, merci à tous mes amis que « Pharma » m'a permis de rencontrer. Merci à Auréliane, Charlotte, Deven, Fanny, Chloé, Thomas, Alicia, Joris, Alen, Florianne, Amélie, Constance, Nagham et Celia d'avoir rendu ces années d'études si inoubliables.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS 13

LISTE DES ILLUSTRATIONS 17

Liste des figures 17

LISTE DES TABLEAUX 18

PREAMBULE 19

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION GENERALE 21

I. Les thérapies ciblées en oncologie 21

II. Concept du ciblage thérapeutique des récepteurs du développement embryonnaire 24

III. Dérèglement des voies du développement chez l'embryon et pathologies humaines congénitales 25

A. Voie de signalisation Hedgehog 25

B. Voie de signalisation Notch 27

IV. Dérégulation des voies du développement dans les cancers 29

A. Voie de signalisation Hedgehog 29

B. Voie de signalisation Notch 29

V. Essais cliniques 30

A. Essais cliniques et particularités en cancérologie 30

B. Voie de signalisation Hedgehog 31

C. Voie de signalisation Notch 35

VI. La voie de signalisation Wnt 38

A. La voie de signalisation Wnt canonique (Wnt/β caténine) 38

B. Voie de signalisation Wnt non canonique (WNT/PCP) : 40

C. Synthèse de tous les inhibiteurs de la voie Wnt en essai clinique 44

D. Dérégulation de la voie de signalisation Wnt dans les cancers mammaires et colorectaux 50

1. La voie de signalisation Wnt/ β-caténine 51

a. Croissance tumorale 51

b. Auto-renouvellement des cellules souches 51

c. Transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) 52

d. Migration cellulaire et caractère invasif des cellules tumorales 52

e. Apoptose, sénescence et résistance au traitement 53

2. La voie de signalisation Wnt/PCP 53
a. Prolifération cellulaire et auto-renouvellement des cellules souches 53
b. Transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) 54
c. Migration cellulaire et caractère invasif des cellules tumorales 54
d. Interaction entre la tumeur et le microenvironnement tumoral 55
e. Résistance au traitement 55

VII. Le cancer du sein 57
A. Physiopathologie 57
1. Organisation de la glande mammaire 57
2. Les différentes tumeurs malignes 57
a. Les adénocarcinomes in situ 58
b. Les adénocarcinomes infiltrants 58
3. Classification moléculaire 59
B. Epidémiologie 59
C. Facteurs de risque 60
1. L'âge 60
2. Les antécédents personnels de maladie 60
3. Les antécédents familiaux de cancers 60
4. Les prédispositions génétiques 60
D. Diagnostic 61
E. Traitement 61
1. Carcinome du sein *in situ* 62
2. Cancer du sein infiltrant non métastatique 62
3. Cancer du sein métastatique 63
F. Les pistes de recherche actuelles 63

VIII. Le cancer colorectal 65
A. Physiopathologie 65
1. Organisation du côlon et du rectum 65
2. Les différentes tumeurs colorectales 66
B. Épidémiologie 66
C. Facteurs de risque 67
1. L'âge 67
2. Présence de polypes 67
3. Les antécédents personnels ou familiaux 67
4. La prédisposition génétique 67
5. Le mode de vie 68
6. Maladies inflammatoires 68
D. Diagnostic 68
E. Traitement 68
F. Les pistes de recherche actuelles 69

CHAPITRE 2 : PROTEINES DE LA VOIE DE SIGNALISATION WNT/PCP ETUDIEES AU LABORATOIRE **71**

I. Généralités sur PTK7, un récepteur de la voie Wnt/PCP, dans les cancers colorectaux **71**

II. Etude moléculaire de VANGL2, un récepteur de la voie Wnt/PCP, dans les cancers du sein **74**

A. Introduction 74

B. Résultats 76

1. Caractérisation d'une nouvelle isoforme VANGL2-Long 76

2. Caractérisation du complexe VANGL2 à la membrane en condition physiologique et pathologique 84

C. Discussion 86

D. Matériels et méthodes 89

1. Biochimie 89

a. Western blot 89

b. Immunoprécipitation 90

2. Biologie cellulaire 90

a. Lignées cellulaires et culture 90

b. Transfection des cellules 91

3. Technologie Crispr/Cas 9 92

a. Biologie moléculaire 92

b. Transfection, sélection et isolation clonale des IMCD3 GFP+ 93

4. Imagerie 93

a. Immunofluorescence (Cellules fixées) 93

b. Cellules vivantes (Live) 94

CHAPITRE III : CIBLAGE DE LA VOIE DE SIGNALISATION WNT **95**

I. Thérapies ciblées en développement **95**

A. Anticorps monoclonaux non couplés (« nus ») 95

1. Principe 95

2. Vantictumab (OMP-18R5) (cible : FRIZZLED 7) 96

B. Anticorps monoclonaux couplés 97

1. Principe 97

2. PF-06647020 (PF-7020) (cible : PTK7) 98

C. Protéines de fusion 98

1. Principe 98

2. ipafricept (OMP-54F28) (cible : FRIZZLED 8) 98

D. Petites molécules 99

1. Principe 99

2. Inhibiteurs de Porcupine 99

3. Agonistes de WNT5A 100

4. Autre petite molécule : PRI 724 100

II. Nouvelles thérapies potentielles **102**

1. Oligonucléotides anti-sens. 102
2. PROTAC (proteolysis targeting chimera) 103

III. Toxicité **105**

CHAPITRE IV : CONCLUSION GENERALE **107**

BIBLIOGRAPHIE **109**

ANNEXE I **120**

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : Acide désoxyribonucléique

AMM : Autorisation de mise sur le marché

ALK : Anaplastic Lymphoma Kinase

ATU : Autorisation temporaire d'utilisation

ANSM : Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé HAS Haute Autorité de Santé

APC : Adenomatous polyposis coli

ADC : Antibody Drug Conjugate

ASCO : American Society of Clinical Oncology

ADCC : Antibody Dependant Cellular Cytotoxicity

BCR-ABL : Break- point cluster region-Abelson

BRAF : B-rapidly accelerated fibrosarcoma

BRCA1 : BReast Cancer 1

BRCA2 : BReast Cancer 2

β-CTX : Télopeptide C terminal du collagène de type I

CK1 : Caseine kinase 1

CBP : CREB binding protein

CDC : Complement Dependant Cytotoxicity

CCIS : Carcinome canalaire in situ

CCK-4 : Colon carcinoma kinase-4

CLIS : Carcinome lobulaire in situ

CCI : Carcinome canalaire infiltrant

COPII : Cytoplamic Coat Protein complex II

CrispR : Clustered RegularlyInterspaced Short Palindronic Repeats

DMT : dose maximale tolérée

DLT : toxicité dose limitante

DVL : Disheveled

DKK : DICKKOPF

EGFR : Récepteur de l'EGF

ER (ou RE) : Récepteurs aux oestrogènes

EMA : European Medicines Agency

FDA : Food and Drug Administration

5-FU : 5-fluoro-uracile

Flt 3 : Fms-like tyrosine kinase 3

FAC : fibroblaste associé au carcinome

GFP : Green fluorescent protein

GM130 : Golgi Matrix Protein of 130kDa

GSK3b : Glycogen synthase kinase 3b

HER2: Human Epidermal Growth factor Receptor 2

HRP : Horse radish peroxidase

HPE : Holoprosencéphalie

IHC : Immunohistochimie

IgG : Immunoglobuline G

JNK : Janus N-terminal Kinase

KO : Knock-out

KRAS : Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog

LMC : Leucémie Myéloïde Chronique

LT CD8 + : Lymphocytes T CD8+

MO : Morpholino-oligonucléotides

NECD : domaine extracellulaire du récepteur Notch

NFS : numération, formule sanguine

PORCN : Porcupine

PROTAC : proteolysis targeting chimera

PCP : polarité cellulaire planaire

PPS : programme personnalisé de soins

PAF : Polypose adénomateuse familiale

PDX : xénogreffes dérivés de patients

PR (ou RP) : Récepteurs à la progestérone

PLA : Proximity Ligation Assay

PDGFR-ß : Platelet-derived growth factor receptor beta

RCPG : Récepteurs couplés aux petites protéines G

RTK : Récepteur à activité tyrosine kinase

RAF : Rapidly Accelerated Fibrosarcoma

RCP : réunion de concertation pluridisciplinaire

RUSH : Retention using selective hook

RFP : Red fluorescent protein

SMO : smoothened

SFRP : Secreted Frizzled-Related Proteins

TEM : Transition épithélio-mésenchymateuse

TMA : Tissue Micro Array

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

VEGFR : Vascular Endothelial Growth Factor Receptor

WB : Western Blot

WT : Wild type

WIF : Wnt Inhibitory Factors

LISTE DES ILLUSTRATIONS

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Schéma de la voie de signalisation Hedgehog. 25
Figure 2 : Dérèglement de la voie Hedgehog chez l'embryon de poulet après administration de cyclopamine. 26
Figure 3 : Schéma de la voie de signalisation Notch. 27
Figure 4 : Signes cliniques du syndrome d'Alagille. 28
Figure 5 : Lésion d'un patient atteint de carcinome basocellulaire localement avancé avant et pendant traitement. 32
Figure 6 : Voie de signalisation Wnt/ β-caténine. 39
Figure 7 : Voie de signalisation Wnt/PCP. 41
Figure 8 : Impact de la dérégulation de VANGL2 dans le développement des vertébrés. 42
Figure 9 : Représentation schématique de la voie de signalisation Wnt/ β-caténine avec les inhibiteurs en essai clinique. 45
Figure 10 : Représentation schématique de la voie de signalisation Wnt/ PCP avec les inhibiteurs en essai clinique. 46
Figure 11 : Rôle de la voie Wnt dans la progression tumorale. 50
Figure 12 : Anatomie du sein. 57
Figure 13 : Les différents segments du côlon. 65
Figure 14 : Structure du récepteur PTK7. 71
Figure 15 : Effet pro-tumorigène de PTK7 dans un modèle de xénogreffe 73
Figure 16 : Structure de la protéine VANGL2. 74
Figure 17 : Une nouvelle isoforme de VANGL2. 75
Figure 18 : Détection de VANGL2 endogène avec l'anticorps α-VANGL2-Long. 77
Figure 19 : Localisation cellulaire de VANGL2-Long dans les cellules IMCD3. 78
Figure 20 : Illustration de la synchronisation du transport de VANGL2 (en vert) exprimée dans le système RUSH dans les IMCD3 WT en temps réel sur cellules vivantes (« Live cell imaging »). 80
Figure 21 : Illustration de la synchronisation du transport de VANGL2-Long (en vert) exprimée dans le système RUSH dans les IMCD3 WT en temps réel sur cellules vivantes (« Live cell imaging »). 81
Figure 22 : Illustration de la synchronisation du transport de VANGL2 (en vert) exprimée dans le système RUSH dans les IMCD3 KO (CrispR cas 9). 82
Figure 23 : Test de l'efficacité des MO ciblant VANGL2/ VANGL2-Long. 83

Figure 24 : Conséquences phénotypiques de l'extinction de VANGL2 ou VANGL2-Long sur des embryons de xénope. 84
Figure 25 : Conséquence de la surexpression de VANGL2 sur la composition du complexe VANGL2. 86
Figure 26 : Expérience d'Immunohistochimie (IHC) avec l'anticorps anti-VANGL2 et de PLA avec les anticorps anti-VANGL1/2..... 88
Figure 27 : Schéma de la cassure double-brin ciblée par le système CRISPR/cas9. 92
Figure 28 : Mécanisme d'action des oligonucléotides anti-sens. 102
Figure 29 : Test de l'efficacité des oligonucléotides anti-sens dirigés contre VANGL2 par WB. 103
Figure 30 : Schéma illustrant le principe de l'approche PROTAC. 104

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Exemples de thérapies ciblées ayant une AMM dans le traitement du cancer. 22
Tableau 2 : Essais cliniques des inhibiteurs de la voie Hedgehog. 35
Tableau 3 : Essais cliniques des inhibiteurs de la voie Notch. 37
Tableau 4 : Dérégulation des protéines de la voie WNT /PCP dans différents types de cancer. 44
Tableau 5 : Essais cliniques des stratégies de ciblage des protéines de la voie Wnt. 49

PREAMBULE

Les voies de signalisation (Hedgehog, WNT, Hippo, Notch) mises en jeu au cours du développement embryonnaire sont souvent réactivées par les cellules cancéreuses et contribuent à promouvoir leur prolifération et leur dissémination, rendant les tumeurs très agressives et résistantes aux traitements. Des recherches sont donc en cours pour mieux comprendre les mécanismes moléculaires à l'origine de leur contribution dans le processus tumoral, le but étant de définir des stratégies thérapeutiques capables de les moduler. Des stratégies de ciblage de certaines protéines de ces voies sont d'ailleurs en cours d'évaluation dans des essais cliniques.

Ce mémoire de D.E.S est composé de trois chapitres. Au début de mon introduction (chapitre I), je me suis intéressée à tous les essais cliniques en cours pour le ciblage de la voie Hedgehog, Notch et Wnt dans différents types de cancer. Ensuite, je me suis focalisée sur la voie Wnt et deux cancers qui posent un véritable problème de santé publique dans le monde entier : le cancer du sein et le cancer colorectal.

Le chapitre II est centré sur deux cibles thérapeutiques potentielles, deux récepteurs de la voie Wnt, respectivement dans le cancer du sein et colorectal : VANGL2 et PTK7. Lors de mon internat dans le laboratoire du professeur Jean-Paul Borg au sein de l'équipe « Signalisation, Polarité cellulaire et Cancer », j'ai travaillé sur l'étude moléculaire et le ciblage de VANGL2. Ainsi, un résumé des principaux résultats que j'ai obtenu sera présent dans ce chapitre.

Enfin, dans le chapitre III, j'ai décrit les différentes stratégies de ciblage de la voie Wnt dans le cancer du sein et colorectal, les nouvelles thérapies émergentes qui pourraient être appropriées et les conséquences de l'inhibition d'une telle voie en termes d'effets indésirables.

CHAPITRE I : INTRODUCTION GENERALE

I. LES THERAPIES CIBLEES EN ONCOLOGIE

Une **tumeur** se développe à la suite d'une **multiplication** anarchique de certaines cellules. Ce dysfonctionnement résulte d'une accumulation de mutations de l'**ADN** qui sont prises en charge par les voies de réparation de la cellule. Cependant, lorsque la cellule devient cancéreuse, elle **perd ses capacités de réparation et de contrôle du cycle cellulaire**. Elle se divise anarchiquement et finit par former une masse appelée tumeur maligne.

La plupart des médicaments de **chimiothérapie** dite classique agissent au niveau de l'ADN pour **bloquer la réplication** du génome. Les cellules qui ne peuvent plus se diviser finissent par mourir. On parle d'effet **cytotoxique**. Cependant, ces médicaments s'attaquent également aux cellules progénitrices saines qui se divisent rapidement comme les cellules du tube digestif, les cellules à l'origine des cheveux et des poils, les cellules germinales et les cellules de la moelle osseuse qui fabriquent les cellules du sang (globules blancs, globules rouges et les plaquettes). C'est la raison pour laquelle une chimiothérapie « classique » entraîne les **effets secondaires** suivants : troubles digestifs (nausées, vomissements, inflammation de la bouche ou aphtes, diarrhée ou constipation), alopécie, stérilité, asthénie, baisse des cellules du sang (leucopénie, anémie et thrombopénie).

De récentes découvertes ont mis au point de nouveaux médicaments dont la façon d'agir est différente de celle de la chimiothérapie « classique » : **les thérapies ciblées**. Ces traitements s'appuient sur le fait que la tumeur présente des anomalies moléculaires qui lui sont spécifiques. Ils s'inscrivent au sein de la **médecine personnalisée**, qui a pour objectif de proposer au patient un traitement adapté aux anomalies de sa tumeur. Les thérapies ciblées ont pour objectif de bloquer la croissance ou la propagation de la tumeur, en interférant avec des anomalies moléculaires ou avec des mécanismes qui sont à l'origine du développement ou de la **dissémination (formation de métastases)** des cellules cancéreuses.

Il existe plusieurs approches de thérapie ciblée, incluant principalement les **anticorps monoclonaux** (suffixe –mab) et les **petites molécules** (suffixe –ib dont les inhibiteurs de tyrosine kinase).

L'**essor des thérapies ciblées** a commencé dans le milieu des années 2000. En effet, en 2002, l'**imatinib (Glivec®)** a révolutionné le traitement de **la leucémie myéloïde chronique (LMC).** C'est incontestablement un progrès thérapeutique majeur de la dernière décennie en hématologie qui a transformé le pronostic de la LMC. À partir de 2006, l'utilisation du **trastuzumab (Herceptin®)** a permis de diminuer de moitié le risque de rechute pour les femmes atteintes de cancer du sein « HER2 ».

Cancer(s)	Molécule(s) prescrite(s)	Cible(s)
Leucémie myéloïde chronique et leucémie aiguë lymphoblastique	imatinib, dasatinib, nilotinib, bosutinib, ponatinib	BCR-ABL (protéine tyrosine kinase)
GIST (forme de cancer de l'estomac)	Imatinib	c-Kit (récepteur à activité tyrosine kinase) (RTK)
Cancer du sein	trastuzumab	HER 2 (RTK)
	lapatinib	EGFR (RTK), HER2 (RTK)
	bevacizumab	VEGF (ligand du RTK VEGFR)
	pertuzumab	HER2 (RTK)
Cancer gastrique	trastuzumab	HER2 (RTK)
Cancer colorectal métastatique	panitumumab	EGFR (RTK)
	cetuximab	EGFR (RTK)
Cancer du poumon	gefitinib	EGFR (RTK)
	afatinib	Récepteurs de la famille ErbB : EGFR (ErbB1), HER2 (ErbB2), ErbB3 et ErbB4
	crizotinib	ALK (RTK)
	erlotinib	EGFR (RTK)
Cancer du rein métastatique	Bevacizumab	VEGF (ligand du RTK VEGFR)
	sorafenib	RAF-kinases (protéines sérine/thréonine-kinases), c-KIT(RTK), FLT-3(RTK), VEGFR-2(RTK), VEGFR-3(RTK) et PDGFR-ß (RTK).
Mélanome cutané	vemurafenib	BRAF (Protéine sérine-thréonine kinase)
	dabrafenib	RAF-kinases (protéines sérine/thréonine-kinases)

Tableau 1 : Exemples de thérapies ciblées ayant une AMM dans le traitement du cancer.

Près de **43 thérapies ciblées** ont déjà une **autorisation de mise sur le marché** pour le traitement de cancers. Les thérapies ciblées sont souvent prescrites **en complément d'un autre traitement**, **ou associées à une chimiothérapie.**

Bien que les thérapies ciblées aient l'avantage de ne pas provoquer certains effets secondaires connus des chimiothérapies classiques, certaines molécules peuvent induire par exemple des réactions cutanées importantes, pouvant parfois entraîner l'arrêt du traitement. Il y a donc une nécessité de développer de **nouvelles molécules de thérapie ciblée** présentant moins d'effets secondaires. De plus, les anomalies moléculaires associées aux thérapies ciblées commercialisées ne sont retrouvées que chez un tiers des patients. Il faut donc **identifier de nouvelles cibles moléculaires** pour qu'un plus grand nombre de patients puissent bénéficier de ces nouveaux traitements. La majorité des thérapies ciblées en cours ciblent les protéines kinases et les récepteurs à activité tyrosine kinase (**Tableau 1**).

Le délai entre la découverte d'un nouveau traitement et sa mise sur le marché est de plusieurs années. Cependant, en France, les **essais cliniques** et les **autorisations temporaires d'utilisation (ATU)** rendent possible l'accès aux nouveaux traitements avant leur commercialisation.

II. CONCEPT DU CIBLAGE THERAPEUTIQUE DES RECEPTEURS DU DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE

Une voie de signalisation est une cascade d'évènements au sein d'une cellule impliquant plusieurs protéines de signalisation qui fonctionnent ensemble pour contrôler les fonctions biologiques cellulaires (croissance, division, différenciation, mort...). Les voies de signalisation sont déclenchées par l'interaction entre un ligand (peptides, hormones…) et un récepteur membranaire à la surface de la cellule.

Les voies de signalisation Hedgehog, WNT, Hippo, Notch sont mises en jeu au cours du **développement embryonnaire.** Elles jouent un rôle essentiel dans l'auto-renouvellement des cellules souches.

Chez l'adulte, ces voies de signalisation développementales (Hedgehog, WNT, Hippo, Notch) sont peu actives dans des conditions d'homéostasie. Cependant, elles sont **réinitialisées dans les cancers** pour permettre aux cellules tumorales de proliférer et migrer afin d'envahir d'autres tissus et pour résister aux traitements. Cela leur confère un avantage sélectif par rapport aux cellules normales. Les molécules de ces voies de signalisation étant presque exclusivement exprimées sur les cellules tumorales chez le patient adulte, elles constituent des **cibles idéales de médicaments** avec des **effets secondaires en théorie limités.**

Des stratégies de ciblage de certaines protéines de ces voies de signalisation ont d'ailleurs montré leur efficacité dans les premiers **essais cliniques de phase I et II** et **deux inhibiteurs de la voie Hedgehog ont désormais l'autorisation de mise sur le marché (AMM)** dans la prise en charge du carcinome basocellulaire.
Ces résultats encourageants soulignent l'importance des connaissances des processus biologiques fondamentaux impliqués dans l'embryogenèse et dans l'homéostasie adulte pour la conception de nouvelles stratégies thérapeutiques.

III. DEREGLEMENT DES VOIES DU DEVELOPPEMENT CHEZ L'EMBRYON ET PATHOLOGIES HUMAINES CONGENITALES

La voie de signalisation Wnt sera traitée dans la partie V.

A. VOIE DE SIGNALISATION HEDGEHOG

La voie de signalisation Hedgehog contrôle un ensemble de processus activés au cours du développement embryonnaire comme la différenciation et la prolifération cellulaire et l'organogenèse (formation et positionnement des organes).

.

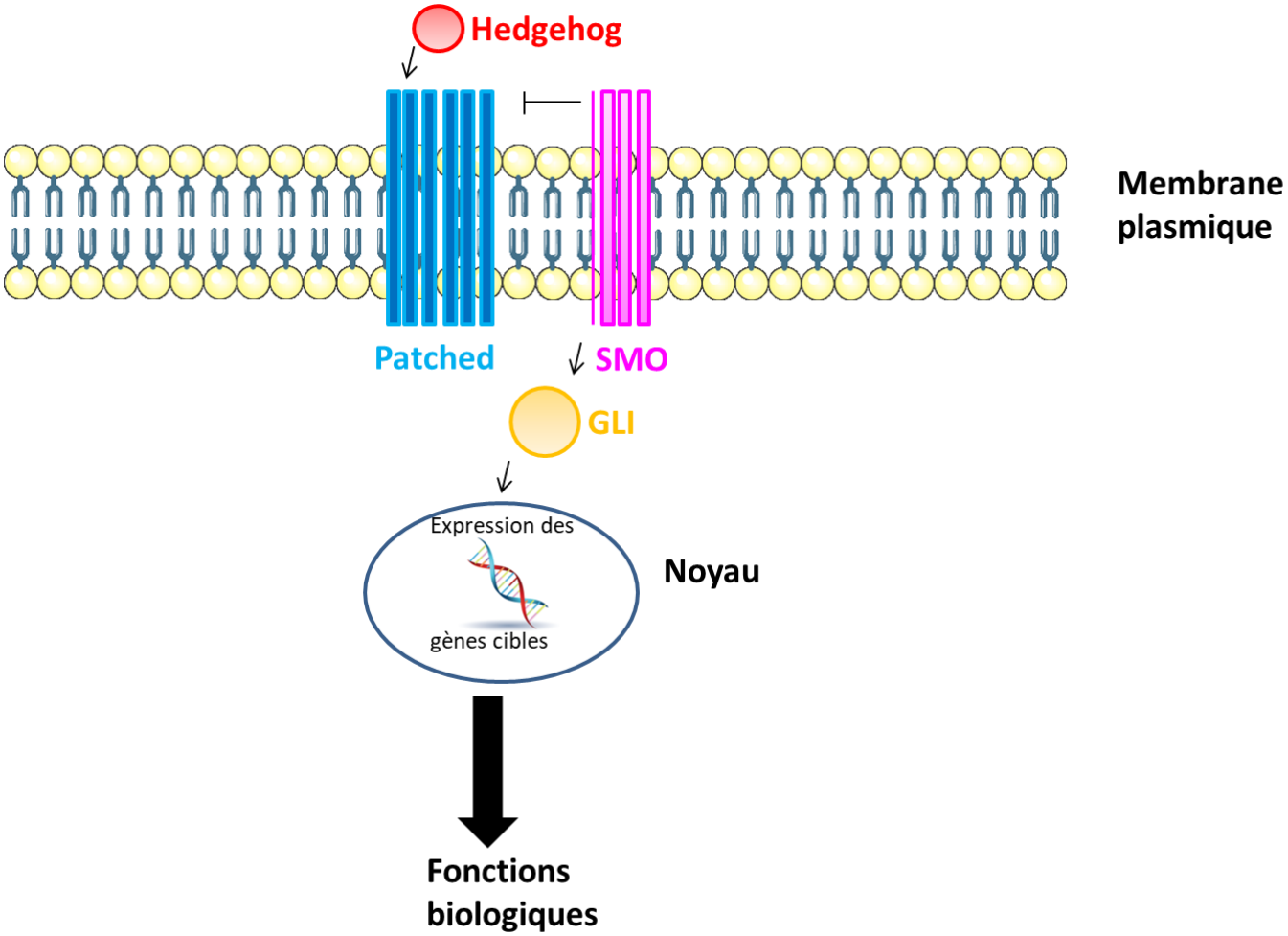


Figure 1 : Schéma de la voie de signalisation Hedgehog.

↓ : Activation

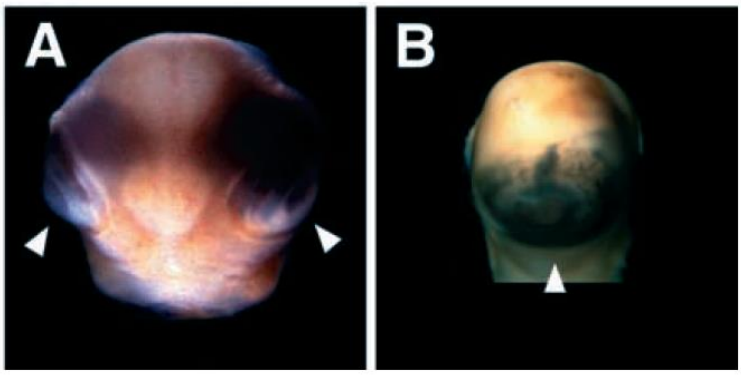
⊢ : Inhibition

Les protéines Hedgehog sont des glycoprotéines sécrétées qui se lient au récepteur transmembranaire Patched. En l'absence de Hedgehog, Patched interagit avec la protéine transmembranaire SMO (smoothened), la maintenant ainsi inactive (**Figure 1**).

La fixation de HedgeHog sur le récepteur Patched va libérer SMO et lui permettre d'induire une cascade d'événements moléculaires, en particulier la translocation nucléaire des facteurs de transcription GLI (GLI1, GLI2 et GLI3) (**Figure 1**). Ces facteurs vont induire l'expression de gènes cibles.

Des mutations congénitales conduisant à une répression constitutive du signal Hedgehog peuvent être responsables de l'apparition d'un syndrome appelé l'holoprosencéphalie (HPE)(1). Cette malformation sévère du cerveau entraîne une séparation incomplète du télencéphale et peut s'accompagner de malformations cranio-faciales très graves comme le développement d'un œil unique (cyclopie).

La cyclopamine est un alcaloïde stéroïde naturel isolé à partir de Veratrum californicum (fausse hellébore de Californie). Il s'agit d'une substance tératogène qui provoque la cyclopie en inhibant la voie de signalisation Hedgehog (2)(**Figure 2**). La cyclopamine a été appelée ainsi à la suite d'une étude du département de l'Agriculture des États-Unis. Cette étude avait conduit à l'identification de ce composé comme étant à l'origine de la naissance d'agneaux cyclopes dans une ferme de l'Idaho où des brebis avaient brouté des vératres.



Adapté de Incardona JP et al, 1998

<u>Figure 2 :</u> Dérèglement de la voie Hedgehog chez l'embryon de poulet après administration de cyclopamine.

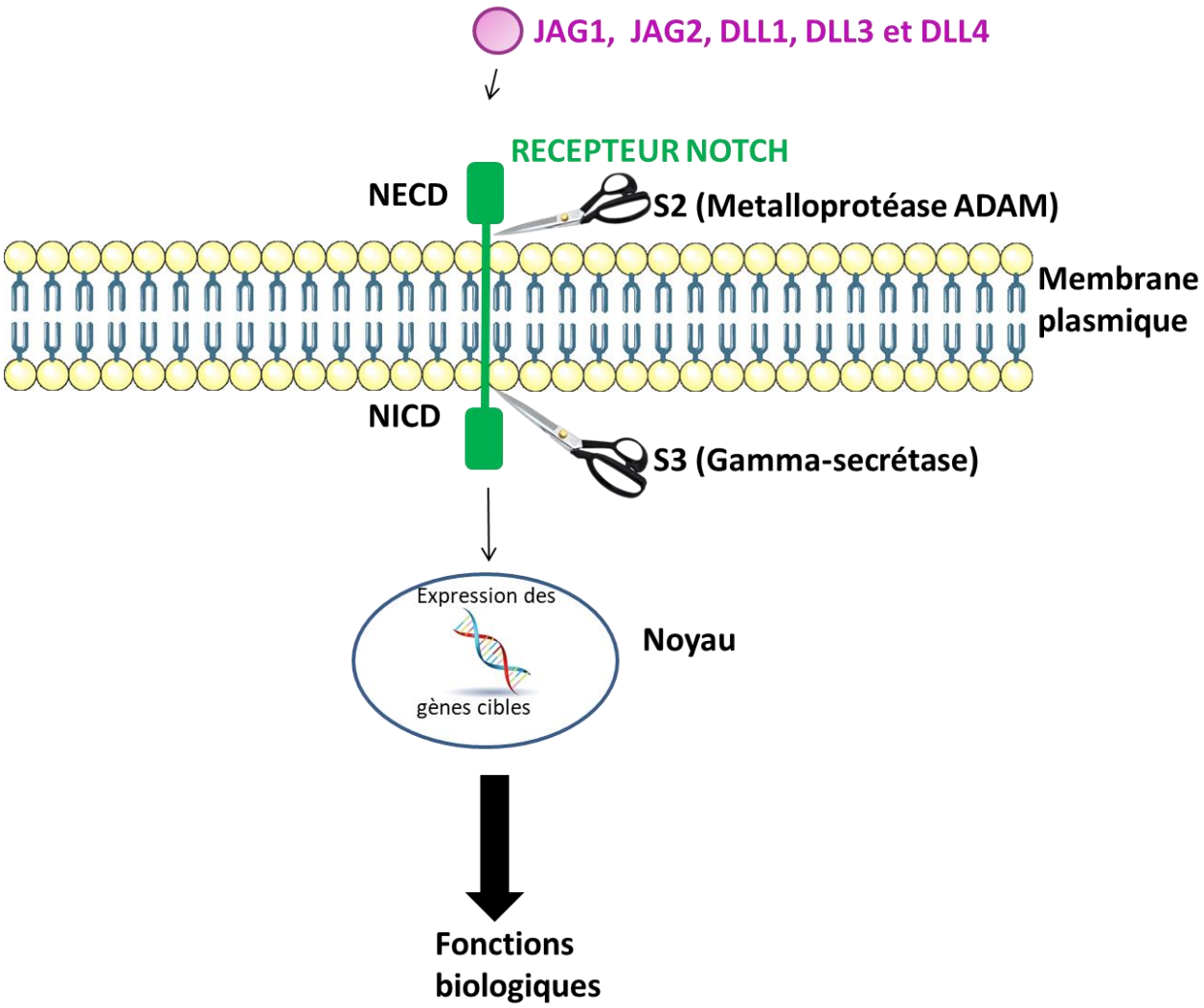
(A) Vue frontale de la tête d'un embryon de poulet de 6 jours. Les flèches indiquent les yeux bilatéraux.

(B) Vue frontale de la tête d'un embryon cyclope de 6 jours. 5 µg de cyclopamine ont été administrés à cet embryon au stade 1 de développement. La flèche indique l'unique œil au milieu.

B. VOIE DE SIGNALISATION NOTCH

La voie Notch est une voie de signalisation essentielle au développement embryonnaire et à l'homéostasie des tissus des vertébrés et des invertébrés.

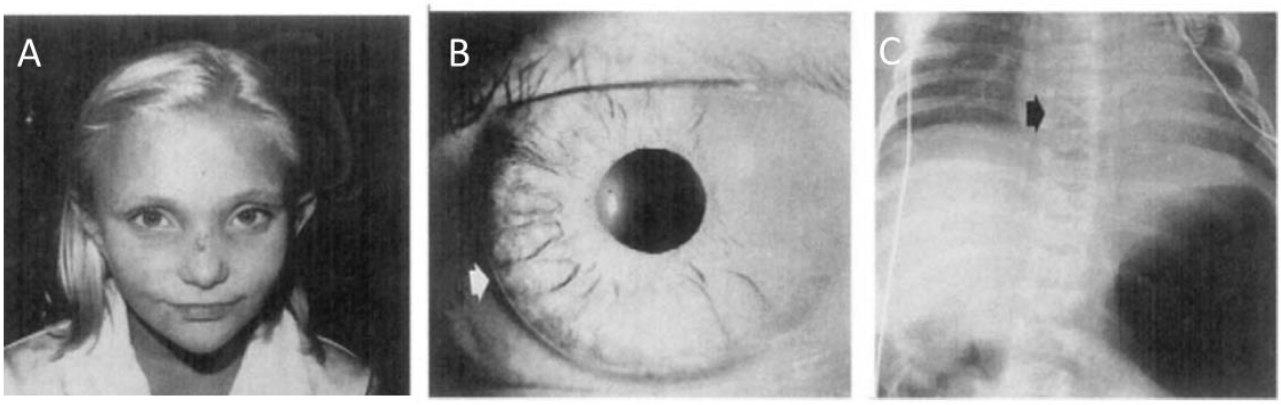
Il existe 4 récepteurs membranaires Notch chez les mammifères. Ils présentent un domaine extracellulaire (NECD), un domaine transmembranaire et un domaine intracellulaire (NICD). Ces récepteurs transmembranaires sont activés par des ligands exprimés à la surface des cellules voisines : JAG1, JAG2, DLL1, DLL3 et DLL4. Après l'interaction avec son ligand, le récepteur Notch subit une série de clivages protéolytiques consécutifs (**Figure 3**). Le premier, appelé S1, correspond au clivage réalisé par la convertase lors de la maturation du récepteur, dans l'appareil de Golgi. Le second est effectué par des protéines de la famille ADAM (métalloprotéases) : le domaine extracellulaire du récepteur Notch (NECD) est relargué. Le troisième correspond à la libération du fragment intracellulaire du récepteur (NICD) par la gamma-sécrétase. NICD migre ensuite dans le noyau pour activer la transcription de gènes cibles.



<u>Figure 3 :</u> Schéma de la voie de signalisation Notch.

Le phénotype des drosophiles mutées sur le gène *NOTCH1* a été observé en 1914 par John S. Dexter. L'allèle responsable de ce phénotype a été identifié en 1917. Le nom de « Notch » vient du phénotype de ces drosophiles, qui présentent des déchirures sur leurs ailes (« notch » signifie entaille en anglais). Chez les femelles homozygotes et les mâles hémizygotes (le gène est porté par le chromosome X), la mutation est létale au stade embryonnaire.

Ce fut l'une des premières mutations à souligner l'importance capitale de certains gènes dans le développement embryonnaire. Des mutations au niveau des gènes codant pour les récepteurs Notch ou leurs ligands sont responsables de plusieurs pathologies humaines congénitales. En effet, en 1996, des mutations dans le gène *NOTCH3* ont été retrouvées chez des individus avec le syndrome de CADASIL (*cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy*) suggérant que NOTCH3 pourrait être la protéine défective dans ce syndrome (3). Les manifestations les plus courantes du syndrome de CADASIL sont des migraines et des accidents vasculaires cérébraux, essentiellement de type ischémique et conduisant à des lésions de la substance blanche du cerveau responsables de troubles du langage, de la mémoire et de la vision. Quelques années plus tard, la responsabilité de JAG1 (ligand de NOTCH) dans le syndrome d'Alagille a été mise en évidence (4,5). Ce syndrome est caractérisé par un développement anormal du foie (cholestase chronique), des yeux (rétinopathie pigmentaire, embryotoxon postérieur), une dysmorphie faciale, une sténose des artères pulmonaires périphériques, des anomalies vertébrales (arcs vertébraux en forme de papillons) et plus rarement des reins (dysplasie rénale) (**Figure 4**).



Adapté de Linheng Li et al, 1997

<u>Figure 4 :</u> Signes cliniques du syndrome d'Alagille.

(A) Facies caractéristique d'un enfant souffrant du syndrome d'Alagille : visage triangulaire, yeux enfoncés, menton pointu, grand front.

(B) Embryotoxon postérieur (arc de coloration blanche-grisâtre autour de l'iris).

(C) Arcs vertébraux en forme de papillons

IV. DEREGULATION DES VOIES DU DEVELOPPEMENT DANS LES CANCERS

La voie de signalisation Wnt sera traitée dans la partie V.

A. VOIE DE SIGNALISATION HEDGEHOG

Ces dernières années, l'**implication de la voie Hedgehog dans la cancérogenèse** a été mise en évidence. En effet, des mutations de certains de ses composants ont été documentées dans le médulloblastome (tumeur cérébrale maligne la plus fréquente de l'enfant)(6), dans les carcinomes basocellulaires (cancers les plus fréquents de l'adulte qui représentent la majorité des cancers cutanés) (7) et dans le rhabdomysosarcome (tumeur maligne des tissus mous, tumeur mésenchymateuse la plus fréquente chez l'enfant et l'adolescent) (8). De façon non surprenante, étant donné ces récentes découvertes, les composants de la voie de signalisation Hedgehog ont émergé comme des cibles prometteuses pour les thérapies ciblées (9).

B. VOIE DE SIGNALISATION NOTCH

Le rôle important de la voie de signalisation Notch dans le développement embryonnaire est connu depuis plus de 100 ans, mais son rôle dans l'oncogenèse n'est soupçonné que depuis une vingtaine d'années avec l'identification d'un réarrangement chromosomique impliquant le locus NOTCH1 dans un sous-groupe de leucémies lymphoblastiques aigües(10). Depuis, de nombreuses études ont démontré que la signalisation Notch exerce une **activité oncogénique** également dans les tumeurs solides. En effet, des mutations des gènes de la famille Notch (*NOTCH1, NOTCH2, NOTCH3, NOTCH4, JAG1, JAG2, DLL1, DLL3, DLL4)* sont fréquemment retrouvées dans de très nombreuses tumeurs solides (cancers de prostate, du pancréas, du poumon, du sein, du col utérin, du côlon, de l'estomac, du rein, de la thyroïde, ORL, glioblastomes, mélanomes, hépatocarcinomes, etc.) (11,12).

V. ESSAIS CLINIQUES

La voie de signalisation Wnt sera traitée dans la partie V.

A. ESSAIS CLINIQUES ET PARTICULARITES EN CANCEROLOGIE

De manière générale, l'objectif d'un essai clinique portant sur un médicament est d'évaluer la sécurité et l'efficacité de ce dernier chez des volontaires sains ou malades tout en suivant les bonnes pratiques cliniques (BPC) (norme internationale relative à la bioéthique s'appliquant aux essais cliniques réalisés sur des humains). Le médicament pourra obtenir une autorisation de mise sur le marché (AMM) si son efficacité est prouvée, et s'il est sans danger pour le patient et peut être utilisé en toute sécurité. La majorité des essais en cancérologie concerne les nouveaux traitements, associations de médicaments et/ou modalités d'administration.

En cancérologie, comme dans les autres domaines, l'évaluation clinique de la sécurité et de l'efficacité d'un nouveau médicament se déroule en **quatre phases.**

La **phase I (50 personnes maximum)** est menée sur un **petit groupe** de volontaires, sains ou malades en fonction de la molécule évaluée. En oncologie, **les sujets volontaires doivent être atteints d'une pathologie cancéreuse,** il n'y a pas de volontaire sain**.** Ils doivent être informés, volontaires et en bon état général (sans défaillance viscérale) avec une espérance de vie supérieure à 3 mois. Le nombre de patients est légèrement plus petit que pour les autres domaines. Leur pathologie cancéreuse doit être au-delà de toutes ressources thérapeutiques connues.

Il s'agit de tester la molécule pour la première fois chez l'homme (le médicament étudié a démontré au préalable son potentiel réel pour le traitement de la maladie ciblée dans des tests précliniques effectués sur des cellules issues de malades ou sur des modèles animaux), afin d'observer comment le médicament est transformé et éliminé par le corps **(pharmacocinétique)** et d'évaluer sa **toxicité**. La phase I permet de déterminer la **dose maximale tolérée** et le schéma d'administration. La dose maximale tolérée (DMT) est la dose qui induit moins de 25-30 % de toxicité sévère. Les effets secondaires sévères correspondent à la toxicité dose limitante (DLT) : neutropénie, thrombopénie, diarrhée de grade 3, ... Il existe également des études dites de phase Ib. En oncologie, il s'agit d'études d'association du traitement à l'essai avec d'autres molécules. En oncologie, la phase I permet également d'orienter les essais de phase II vers l'inclusion de patients dont la tumeur est susceptible de répondre au produit grâce à une évaluation préliminaire de la pharmacodynamie et de l'efficacité du médicament en développement.

La **phase II (une centaine de patients)** se déroule chez des volontaires malades. En oncologie, les sujets inclus dans une étude de phase II sont atteints d'une pathologie précise, sans défaillance viscérale, et **aucune thérapeutique éprouvée ne peut leur être proposée.** L'objectif est de déterminer la **tolérance et l'efficacité** de la molécule. Cette phase permet de déterminer la **dose minimale efficace** pour laquelle les effets indésirables sont inobservables ou minimes et un bénéfice thérapeutique est observé. Dans un second temps,

cette dose sera administrée à un nombre de malades plus grand compris entre 100 et 300 (phase 2b). En cancérologie, les causes d'échec de développement clinique d'un nouveau médicament sont majoritairement des problèmes au niveau de l'efficacité. Pour évaluer l'efficacité en cancérologie lors des essais de phase II le critère de jugement principal est la **survie sans progression** (intervalle de temps entre la date de début d'un essai thérapeutique et la date de première progression ou le décès, quelle que soit sa cause).

La **phase III (des centaines à des milliers de patients)** permet d'évaluer l'**intérêt thérapeutique du médicament,** de savoir s'il y a une amélioration du rapport bénéfice/risque par rapport aux autres traitements**.** Les volontaires sont le plus souvent répartis en deux groupes par tirage au sort afin de comparer l'efficacité du candidat médicament à un traitement de référence (s'il en existe un) ou à un placebo. Ce sont des études « randomisées ». En cancérologie, **le nouveau traitement est toujours comparé au traitement de référence.** Pour évaluer l'efficacité en cancérologie lors des essais de phase III le critère de jugement principal est la **survie globale** (intervalle de temps entre la date de début d'un essai thérapeutique et la date de décès, quelle que soit sa cause).

A l'issue de ces essais, et en fonction de leurs résultats, les autorités sanitaires (« Food and Drug Administration » ou FDA pour les Etats-Unis ; la « European Medicines Agency (EMA) » pour l'Europe ; l' « Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé (ANSM) » pour la France) délivrent (ou non) une autorisation de mise sur le marché (AMM) au médicament testé.

La **phase IV** permet de suivre l'utilisation du médicament à long terme, dans des conditions réelles d'utilisation, afin de détecter des effets indésirables rares, des complications tardives ou encore des biais de prescription ou un mauvais usage. On parle de **pharmacovigilance**.

L'essor de la médecine personnalisée a exigé une adaptation de la recherche clinique. Ainsi, de nouveaux types d'essais adaptés (les **essais « panier »** et les **essais «parapluie »)** sont menés. Ils ont pour but de démontrer l'efficacité d'un traitement dans chaque type de cancer où une même anomalie moléculaire est retrouvée. En effet, la seule présence d'une anomalie moléculaire n'est pas suffisante pour prédire la réponse à un traitement.

Parmi les nombreuses molécules en cours d'essai clinique qui ciblent les composants des voies du développement embryonnaire, **deux molécules sont commercialisées** : le Vismodégib (ERIVEDGE®) et le sonidégib (ODOMZO®). Il s'agit de deux inhibiteurs de la voie Hedgehog (inhibiteurs de SMO).

B. VOIE DE SIGNALISATION HEDGEHOG

La cible moléculaire préférentielle de la voie Hedgehog est **SMO**. Il existe un nombre important de petites molécules inhibitrices de SMO (de compositions chimiques distinctes) en essai clinique (**Tableau 2**). Ce n'est qu'en septembre 2009 que pour la première fois une étude clinique de phase I utilisant le **Vismodégib** dans les carcinomes basocellulaires a été publiée (13). Le Vismodégib a été approuvé par la FDA en janvier 2012 et

possède l'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) en France depuis octobre 2013. Il est indiqué dans le traitement des patients adultes atteints de **carcinome basocellulaire** métastatique symptomatique et de carcinome basocellulaire localement avancé pour lequel la chirurgie ou la radiothérapie ne sont pas appropriées.

Lorsque cela est possible, le traitement des carcinomes basocellulaires est **chirurgical.** Cependant, dans les formes avancées, l'acte chirurgical est inapproprié en raison d'une morbidité importante en particulier lorsqu'elle touche un organe fonctionnel tel que l'œil, le nez ou les oreilles. Environ les deux tiers des cancers cutanés non mélanocytaires dans les pays occidentaux sont des carcinomes basocellulaires et la voie HH est activée dans plus de 90 % des cas.

Les résultats de l'étude de phase II, étude qui a conduit à l'autorisation de cette molécule par la FDA, montrent que le Vismodégib représente une innovation thérapeutique majeure pour les carcinomes basocellulaires localement avancés (14)(**Figure 5**). En effet, sur 33 patients atteints de carcinome basocellulaire métastatique, 30 % des patients ont répondu au traitement. Sur 63 patients atteints de carcinome basocellulaire localement avancé, le taux de réponse au traitement a été de 43% avec une réponse complète pour 13 patients (21 %).



Adapté de A Sekulic et al, 2012

<u>Figure 5 :</u> Lésion d'un patient atteint de carcinome basocellulaire localement avancé avant et pendant traitement.

Lésion sur le cuir chevelu et le front d'une patiente de 68 ans. Aucune cellule cancéreuse résiduelle n'a été détectée dans l'échantillon de biopsie obtenu la semaine 16. Cette patiente a eu une réponse complète au traitement. Pour éviter une morbidité importante, aucun traitement chirurgical n'a été effectué. La radiothérapie a été contrindiquée pour cette patiente pour éviter d'endommager le cerveau.

Quant au **Sonidégib** (ODOMZO®), il a été approuvé par la Food and Drug Administration (FDA) en juillet 2015 (15). Il a l'AMM dans le traitement des patients adultes présentant un carcinome basocellulaire localement avancé qui ne relève pas d'une chirurgie curative ou d'une radiothérapie. Le Sonidégib est une alternative au Vismodégib dans cette indication. Il n'existe pas d'étude comparative (HAS, avis de la CT du 08 Juin 2016).

Composé	**Cancer**	**Association**	**Essai clinique**	**Identifiant clinicaltrials.gov et Référence**
TAK-441 (Inhibiteur de SMO)	Carcinomes basocellulaires		Phase 1 terminée	NCT01204073 (16)
LEQ506 (Inhibiteur de SMO)	Tumeurs solides avancées		Phase 1 terminée	NCT01106508 (17)
Itraconazole (Inhibiteur de SMO)	Carcinomes basocellulaires		Phase 2 terminée	NCT01108094 (18)
PF-04449913 (Inhibiteur de SMO)	Leucémie aiguë		Phase 2	NCT01841333
	Syndromes myélodysplasiques	azacitidine	Phase 2	NCT02367456
	Leucémie aiguë myéloblastique	Administré seul ou avec de faibles doses de cytosine arabinoside ou avec daunorubicin et cytarabine	Phase 1	NCT02038777
			Phase 2 terminée	NCT01546038 (19)
	Tumeurs solides		Phase 1 terminée	NCT01286467 (20)
	Myélofibrose		Phase 2 stoppée	NCT02226172
	Tumeurs hématologiques		Phase 1 terminée	NCT00953758 (21)
	Leucémie myélomonocytaire chronique, syndromes myélodysplasiques		Phase 2	NCT01842646
LY2940680 (inhibiteur de SMO)	Cancer du poumon à petites cellules	carboplatine et etoposide	Phase 2 stoppée (changement de stratégie clinique)	NCT01722292 (22)

Saridegib (Inhibiteur de SMO)	Myélofibrose		Phase 2 terminée	NCT01371617 (23)
	Cancer du pancréas métastatique	gemcitabine	Phase 1 terminée	NCT01130142
	Tumeurs solides avancées		Phase 1 terminée	NCT00761696 (24)
	Cancer du pancréas	FOLFIRNOX	Phase 1 terminée	NCT01383538 (25)
	Cancer de la tête et du cou	cetuximab	Phase 1 terminée	NCT01255800 (26)
	Chondrosarcome avec métastases		Phase 2 terminée	NCT01310816
BMS-833923 (Inhibiteur de SMO)	Tumeurs solides		Phase 1 terminée	NCT01413906 (27)
	Leucémie myéloïde chronique	dasatinib	Phase 1 terminée	NCT00670189 (28)
	Cancer du poumon à petites cellules	carboplatine et etoposide	Phase 1 terminée	NCT01218477
	Cancer de l'œsophage et cancer de l'estomac	cisplatine et capecitabine	Phase 1 terminée	NCT00927875
	Myélome multiple	Administré seul ou avec lenalidomide et dexamethasone ou avec bortezomib	Phase 1 terminée	NCT00909402
	Leucémie	Administré avec dasatinib (par rapport au dasatinib seul)	Phase 2 terminée	NCT02100371
Vitamin D3 (Inhibiteur de SMO)	Carcinomes basocellulaires	Administré avec diclofenac (par rapport à la vitamin D3 seul ou au diclofenac seul)	Phase 2 terminée	NCT01358045 (29)

Arsenic trioxide (Inhibiteur des facteurs de transcription GLI)	Neuroblastome avancé		Phase 2 terminée	NCT00024258
	Gliome	Administré avec du temozolomide en combinaison avec de la radiothérapie	Phase 1 terminée	NCT00720564

Tableau 2 : Essais cliniques des inhibiteurs de la voie Hedgehog.

Malgré l'efficacité clinique non discutable des inhibiteurs de SMO, des **résistances acquises** ont été observées chez les patients (30),(31)**.** Ces résistances sont dues à des mutations du récepteur SMO qui empêche la liaison de la molécule inhibitrice au récepteur, entraînant ainsi une activation constitutive de ce dernier (32). Elles peuvent également être dues à une activation d'une voie de signalisation différente de la voie Hedhegog (33).

Il est donc important que les laboratoires de recherche élucident quelle autre voie de signalisation peut être activée lors d'une résistance aux inhibiteurs de SMO afin d'élaborer une stratégie thérapeutique ciblant les deux voies de façon concomitante. Il existe d'ores et déjà un essai clinique, aux résultats encourageants, de Sonidegib avec un inhibiteur (Buparlisib) d'une autre voie de signalisation (voie PI3K-Mtor) qui a été retrouvée activée dans des tumeurs résistantes au Sonidegib (identifiant clinicaltrials.gov NCT02303041).

C. VOIE DE SIGNALISATION NOTCH

La cible moléculaire préférentielle de la voie Notch est **la gamma-secrétase**. Il existe un important développement de drogues de type **« inhibiteurs de gamma-secrétase » (GSI) (Tableau 3).** Ces molécules bloquent le clivage membranaire de NOTCH et donc le relargage du fragment intracellulaire du récepteur (NICD) l'empêchant ainsi de migrer dans le noyau et d'activer la transcription de gènes-cibles. D'autres molécules sont également en cours de développement. Elles inhibent directement le récepteur ou son ligand.

Composé	Cancer	Association	Essai clinique	Identifiant clinicaltrials.gov et Référence
RO4929097 (Inhibiteur de gamma sécrétase)	Tumeurs solides localement avancées ou métastatiques		Phase I terminée	NCT00532090 (34)
	Carcinome épithélial de l'ovaire en rechute résistant aux sels de platine		Phase II terminée	NCT01175343 (31)
	Mélanome métastatique		Phase II stoppée mais terminée administrativement	NCT01120275 (32)
	Gliomes	bevacizumab	Phase I stoppée	NCT01189240 (37)
PF-03084014 (Inhibiteur de gamma sécrétase)	Fibromatoses desmoïdes symptomatiques et progressives après au moins une ligne de traitement.		Phase II	NCT01981551 Congrès de l'American Society of Clinical Oncology (ASCO) en juin 2015
	Carcinome mammaire triple négatif	docetaxel	Phase I stoppée à cause d'un changement de stratégie dans le développement de PF-03084014 et non dû à un problème de toxicité/efficacité.	NCT01876251 (38)
MK-0752 (Inhibiteur de gamma sécrétase)	Tumeurs solides avancées		Phase I terminée	NCT00106145 (39)
LY3039478 (Inhibiteur de gamma sécrétase)	Tumeurs solides localement avancées ou métastatiques		Phase I	ASCO 2015

OMP-59R5 (tarextumab, anticorps monoclonal ciblant NOTCH2 et NOTCH3)	Tumeurs solides localement avancées ou métastatiques		Phase I terminée	NCT01277146
OMP-21M18 (demcizumab, anticorps mono-clonal anti-Dll4)	Tumeurs solides avancées		Phase I terminée	NCT00744562 (40)
	Cancer du poumon non à petites cellules	carboplatin et permetrexed	Phase I terminée	NCT01189968
	Cancer colorectal métastatique	FOLFIRI	Phase I terminée	NCT01189942
	Cancer du pancréas	Gemcitaine +/- Abraxane ®	Phase I terminée	NCT 01189929
REGN421(SAR153192) (énoticumab, Anticorps mono-clonal anti-Dll4)	Tumeurs solides avancées		Phase I terminée	NCT00871559 (41)

<u>Tableau 3 :</u> Essais cliniques des inhibiteurs de la voie Notch.

Le développement de certains GSI est actuellement interrompu à cause d'un manque de spécificité. Les anticorps monoclonaux semblent plus spécifiques mais ne sont pas non plus dénués d'effets secondaires. Leur activité en monothérapie semble faible d'où l'émergence d'études en combinaison avec des drogues de chimiothérapie cytotoxique.

Dans le but de trouver un inhibiteur de la voie Notch avec un meilleur profil en termes de toxicité et d'efficacité, OncoMed Pharmaceuticals développe actuellement un anticorps monoclonal bispécifique ciblant Dll4 et VEGF (OMP-305B83) pour les patients avec des tumeurs solides (phase I terminée, identifiant clinicaltrials.gov NCT02298387).

VI. LA VOIE DE SIGNALISATION WNT

A. LA VOIE DE SIGNALISATION WNT CANONIQUE (WNT/B CATENINE)

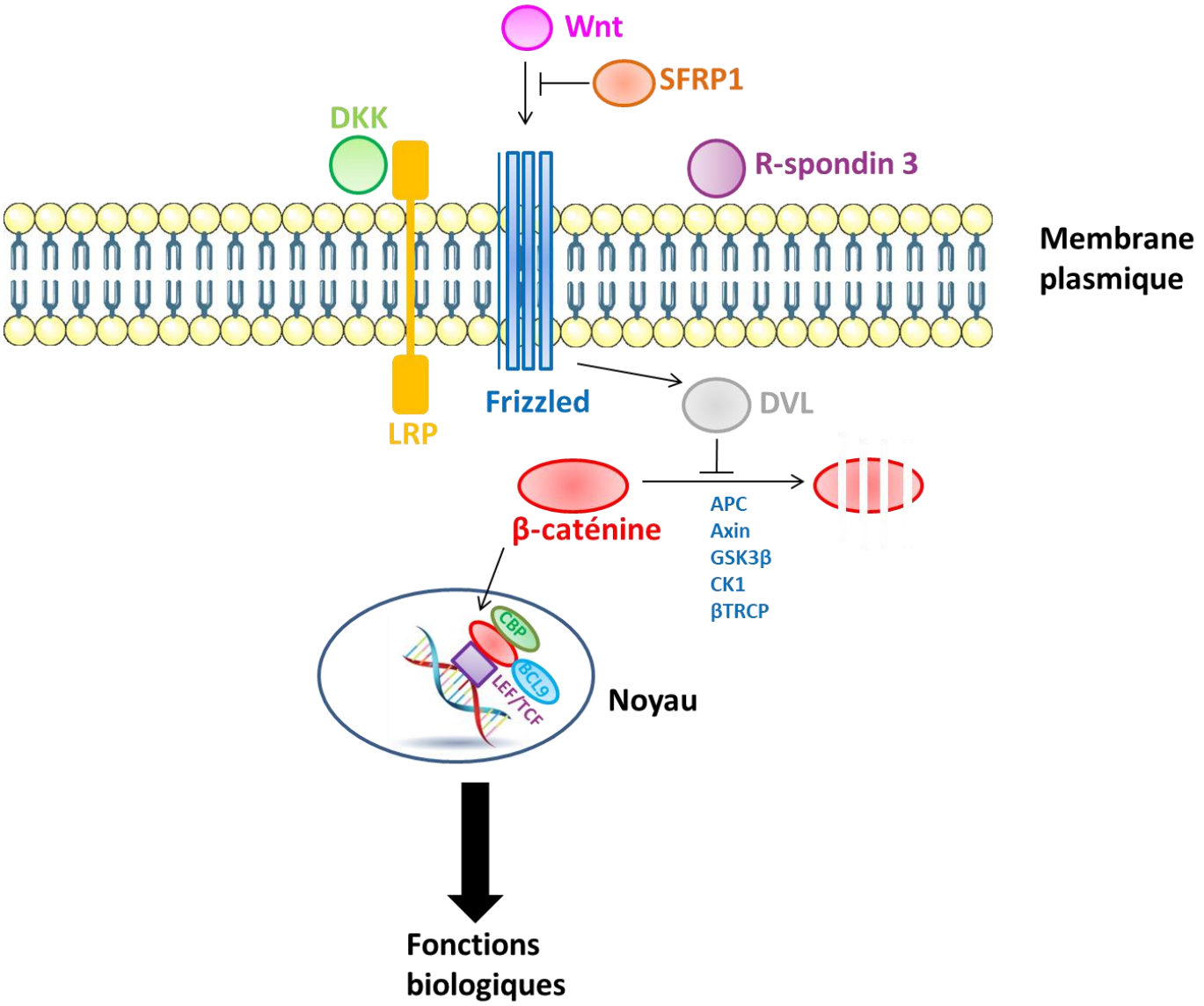
Comme la voie de signalisation Notch et Hedgehog, la voie Wnt intervient à différents stades du développement embryonnaire en participant de façon majeure aux processus de différenciation cellulaire et à l'organogenèse. La découverte de la voie Wnt date de plus de 40 avec l'identification du gène *wingless* chez la **drosophile (*Drosophila melanogaster*)**(42).

Parmi les récepteurs de la voie Wnt, on compte des récepteurs couplés aux petites protéines G (RCPG) et des récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK). Les ligands de la voie Wnt sont des glycoprotéines sécrétées au nombre de 19. La voie Wnt se divise en deux voies de signalisation : la voie β-caténine-dépendante également appelée **voie canonique** ou voie **Wnt/β-caténine** et la voie β-caténine-indépendante (**voie non canonique**). Cette dernière est elle-même sous-divisée en deux voies : la voie Wnt/Calcium et la **voie Wnt/Polarité planaire (PCP).** Contrairement à la voie Wnt non canonique, la voie Wnt/β-caténine est très bien caractérisée au niveau moléculaire et en ce qui concerne son rôle dans les pathologies humaines. Les deux voies utilisent des ligands et récepteurs différents mais certains composés sont communs aux deux voies.

La voie Wnt β-caténine a pour effet de **stabiliser le cofacteur de transcription β-caténine.**

En l'absence de Wnts : **β-caténine est associée à un complexe de destruction** composé d'adenomatous polyposis coli (APC), glycogen synthase kinase 3b (GSK3b), axin et caseine kinase 1 (CK1). β-caténine est phosphorylée par GSK3β et CK1 ce qui entraîne son ubiquitinylation par βTRCP et ainsi sa dégradation par le protéasome. En l'absence de β-caténine, des corépresseurs de la transcription (histones désacétylases) se lient au facteur de transcription LEF/TCF empêchant la transcription des gènes cibles de la voie Wnt β-caténine.

En présence de Wnts : Les ligands de la voie Wnt tels que WNT3A et WNT1 se lient au récepteur FRIZZLED et au corécepteur LRP entraînant la transduction d'un signal à travers la membrane plasmique. Ce signal conduit à l'activation de Disheveled (DVL) qui va inhiber le complexe de destruction de β-caténine entraînant l'accumulation de β-caténine dans le cytoplasme. **β-caténine entre ensuite dans le noyau** où elle va se lier à TCF/LEF déplaçant ainsi les corépresseurs de la transcription et recrutant des coactivateurs (histones acétyltransférases : CREB binding protein (CBP) et BCL9). Les gènes cibles de la voie Wnt canonique peuvent ainsi être exprimés (**Figure 6**). La voie Wnt/β-caténine est étroitement contrôlée, en particulier par un inhibiteur extracellulaire appelé DICKKOPF (DKK) et par R-spondin 3 qui est un activateur de la voie.



<u>Figure 6 :</u> Voie de signalisation Wnt/ β-caténine.

L'implication de la voie Wnt/ β-caténine dans la **cancérogenèse** a largement été décrite. Plus particulièrement, le lien entre sa sur-activation et le développement de **cancers colorectaux** (je développerai cette notion dans la partie V.D.). En effet, des **mutations d'APC (80%),** β-caténine (10 %) ou AXIN, permettant une activation constitutive de la voie, ont été retrouvées dans plus de 90 % des cancers colorectaux (43) y compris dans certains cancers héréditaires (mutation d'APC dans la polypose adénomateuse familiale qui peut progresser en cancer colorectal).

Cependant, la voie Wnt est également impliquée dans d'autres types de cancer. Le premier lien entre la voie Wnt et le cancer a été fait en 1982 dans un modèle souris (44) : les auteurs ont trouvé que l'activation de int1 (Wnt-1), par l'insertion d'un rétrovirus dans le locus *Wnt1*, entraînait des **tumeurs mammaires**. Quelques années plus tard, Int-1 fut reconnu comme un orthologue du ligand Wingless décrit chez la drosophile et renommé Wnt-1 (45). Wnt 1 fut défini plus tard comme une protéine oncogénique chez l'humain et son

implication dans la voie Wnt / β-caténine fut découverte. Grâce au progrès dans le domaine du séquençage et la compréhension des mutations somatiques présentes dans différents types de cancer (46,47), de nombreuses mutations au niveau des gènes codant pour les protéines centrales de la voie Wnt / β-caténine ont pu être identifiées dans plusieurs types de tumeurs (médulloblastome, carcinome hépatocellulaire, cancer de l'estomac et cancer colorectal)(48–51). De plus, des études montrent qu'un niveau élevé de β-caténine dans le noyau, donc une augmentation de l'activité de la voie Wnt/ β-caténine, est associé à un **mauvais pronostique** dans le cancer du sein, colorectal, de la prostate, de l'œsophage, de la surrénale ainsi que dans le glioblastome, le mélanome, le carcinome hépatocellulaire et la leucémie myéloïde aiguë (52).

B. VOIE DE SIGNALISATION WNT NON CANONIQUE (WNT/PCP) :

La voie de signalisation Wnt non canonique est divisée en deux branches : la voie Wnt/Calcium (voie non décrite dans cette thèse) et la voie **Wnt/Polarité planaire cellulaire (PCP)**.

Les molécules de la voie WNT/PCP sont des récepteurs : FRIZZLED, **VANGL1 et 2, PTK7**, ROR et des protéines cytoplasmiques : DISHEVELLED (DVL) et PRICKLE. La liaison de WNT au récepteur FRIZLED conduit à l'activation de la protéine cytoplasmique DVL entraînant l'activation de petites protéines G (Cdc42, Rac1, RhoA) impliquées dans le **remodelage du cytosquelette d'actine, dans la contractilité cellulaire et dans l'activation de JNK (Figure 7)**. JNK va ensuite phosphoryler les facteurs de transcription c-JUN et ATF2 et ainsi permettre la transcription de gènes cibles qui demeurent inconnus à ce jour (53). En effet, par opposition à la voie WNT canonique, les **évènements transcriptionnels et les gènes cibles de la voie WNT/PCP sont peu décrits**, ce qui rend son étude difficile et limite notre capacité à mesurer son activité.

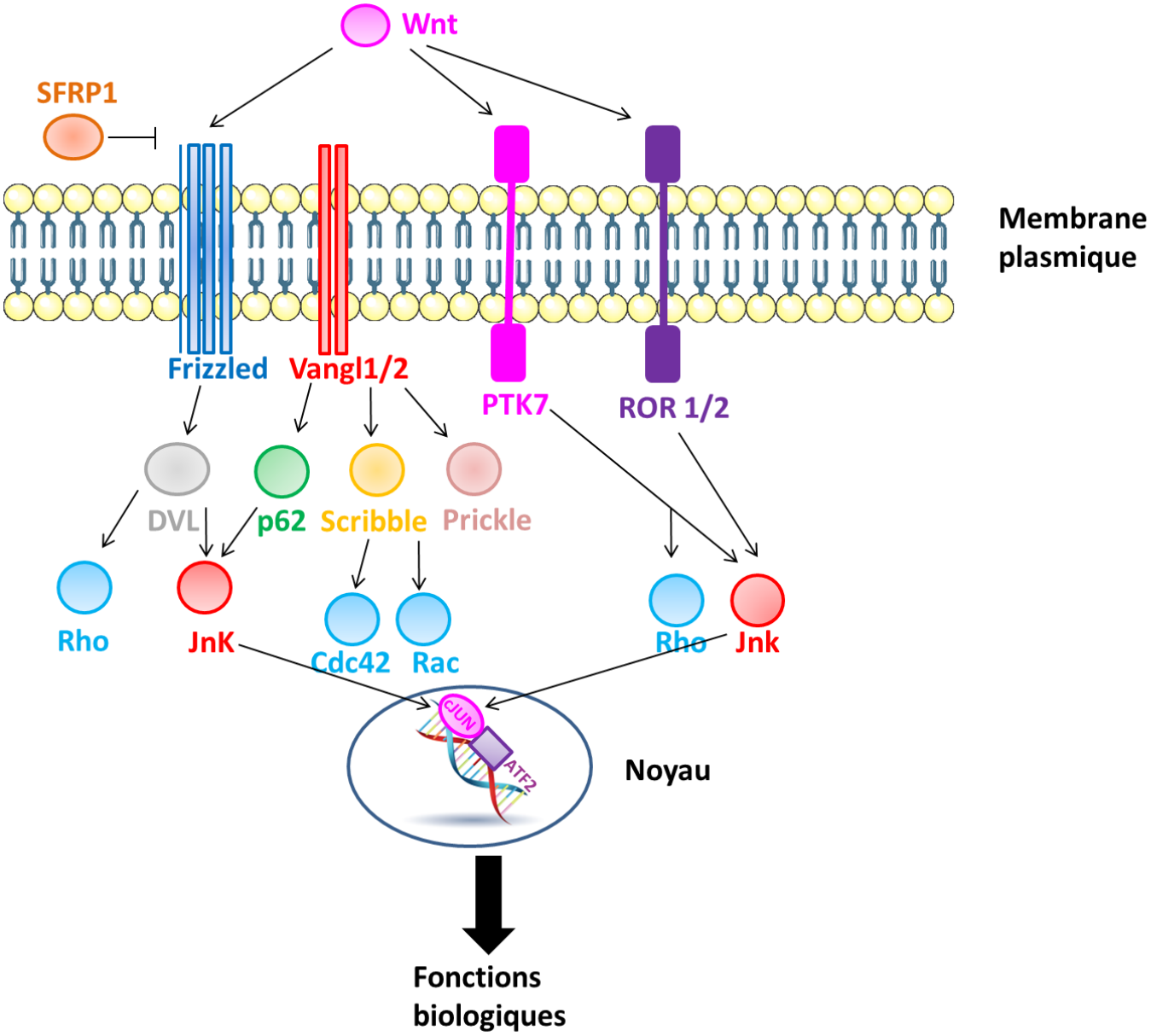


Figure 7 : Voie de signalisation Wnt/PCP.

Parmi les ligands Wnt, **WNT-5A, WNT-7, et WNT-11** sont connus pour favoriser la voie Wnt/PCP. **FRIZZLED-3, -6, et -7** favorisent également la voie Wnt/PCP. A l'inverse, les récepteurs FRIZZLED-1 et -4 sont généralement utilisés par la voie Wnt canonique.

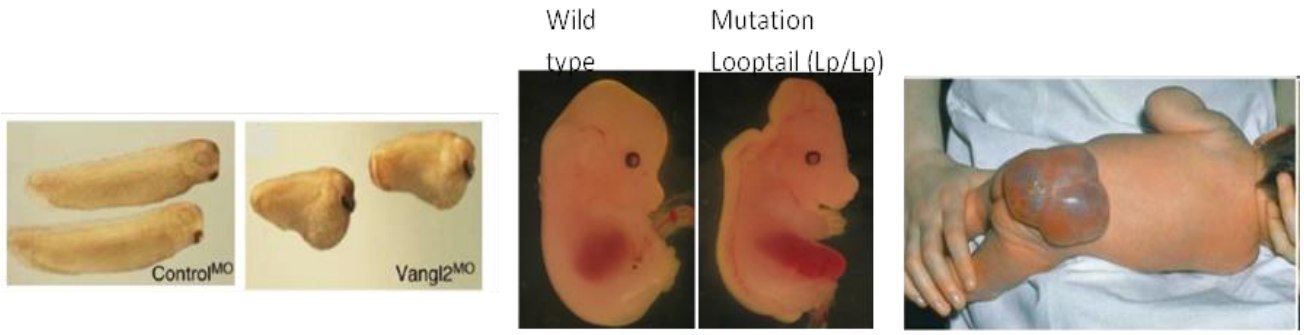
La voie Wnt canonique et la voie Wnt/PCP partagent un certain nombre de composants (Dishevelled, PTK7 et RYK). Cependant, la plupart des composants de la voie Wnt/PCP tels que PRICKLE agissent comme **inhibiteurs de la voie Wnt canonique** (43,54).

La voie de signalisation WNT/PCP, initialement décrite chez la drosophile (Drosophila melanogaster)(55), est **très conservée chez les eucaryotes multicellulaires** et sert à la **polarisation** de nombreux tissus épithéliaux. Ces épithéliums ont en effet la propriété de se polariser le long d'un axe orienté perpendiculairement à celui de la polarité apico-basale, définissant ainsi la polarité planaire.

Un gène de la PCP chez la drosophile a souvent plusieurs paralogues chez les vertébrés. Par exemple, les gènes *van-gogh* et *prickle 1* ont deux (*Vangl1 et Vangl2*) et quatre (*Prickle1-4*) paralogues respectivement. L'expression de ces molécules **dès les premiers stades de l'embryogenèse** et la **conservation** de leur organisation moléculaire et fonctionnelle, de la mouche à l'homme, attestent de **l'importance capitale** de ces protéines en **physiologie.**

Le rôle central de la PCP dans le développement des vertébrés est très bien mis en évidence par l'impact dramatique que peut avoir un défaut d'expression de ses protéines centrales sur l'embryon : **anomalies de fermeture du tube neural** et formation anormale de l'axe de l'organisme pendant la gastrulation (56).

Par exemple, chez le xénope, le déficit de **VANGL2** conduit à un défaut d'élongation de l'axe de l'‘embryon (57). Chez la souris, la mutation ponctuelle « looptail » du gène *Vangl2* entraîne à l'état homozygote un **cranioraschischisis (forme la plus sévère des anomalies du tube neural)** (56,58). Chez l'homme, le déficit de VANGL1 ou de VANGL2 se manifeste par **des anomalies développementales** similaires à celles de la souris (Figure 8) (59,60).



<u>Figure 8 :</u> Impact de la dérégulation de VANGL2 dans le développement des vertébrés ; de gauche à droite : embryon de xénope (élimination de l'expression de Vangl2 par un morpholino-oligonucléotide), souris mutante (mutation Looptail dans le gène VANGL2 conduisant à un craniorachischisis) et homme (mutation VANGL2 conduisant à un sévère spina bifida).

Des mutations au niveau des gènes codant pour les protéines centrales de la PCP entraînent également d'autres maladies génétiques humaines comme des **pathologies rénales** et des **ciliopathies (**groupe de maladies causées par le dysfonctionnement des cils primaires ou des cils mobiles) (53,61,62)**.**

La voie WNT/PCP, y compris son implication dans la cancerogénèse, est moins bien caractérisée que la voie WNT canonique. Cependant, des études récentes montrent que la **surexpression de certaines protéines de la voie Wnt/PCP est observée dans plusieurs cancers**. Cette surexpression est, le plus souvent, associée à un **mauvais pronostic** (**Tableau 4**).

Type de cancer	Gène	Caractéristique	Référence
Sein	WNT-5A	Augmentation de la tumorigenèse	(63,64)
	WNT-11	Augmentation de la tumorigenèse	(65)
	WNT-7A	Augmentation de la tumorigenèse	(66)
	FRIZZLED-7	Augmentation de la tumorigenèse	(67)
	VANGL-1	Augmentation de la tumorigenèse	(68)
	VANGL-2	Augmentation de la tumorigenèse	(69)
	SCRIBBLE	Augmentation de la tumorigenèse	(68)
	PRICKLE-1	Augmentation de la tumorigenèse	(70)
	PTK-7	Augmentation de la tumorigenèse et de la résistance au traitement	(71)
	ROR2	Augmentation de la tumorigenèse	(72)
Ovaire	FRIZZLED-7	Augmentation de la tumorigenèse	(73)
Carcinome épidermoïde	WNT-5A	Augmentation de la tumorigenèse	(74)
	VANGL-1	Augmentation de la tumorigenèse	(75)
Neuroblastome	VANGL-2	Diminution de la tumorigenèse	(76)
	PRICKLE-1	Diminution de la tumorigenèse	(76)
Mélanome	WNT-5A	Augmentation de la tumorigenèse et de la résistance au traitement	(77–80)
	FRIZZLED-7	Augmentation de la tumorigenèse et de la résistance au traitement	(78,81)
	ROR2	Augmentation de la tumorigenèse	(82)
	ROR1	Augmentation de la tumorigenèse	(83)

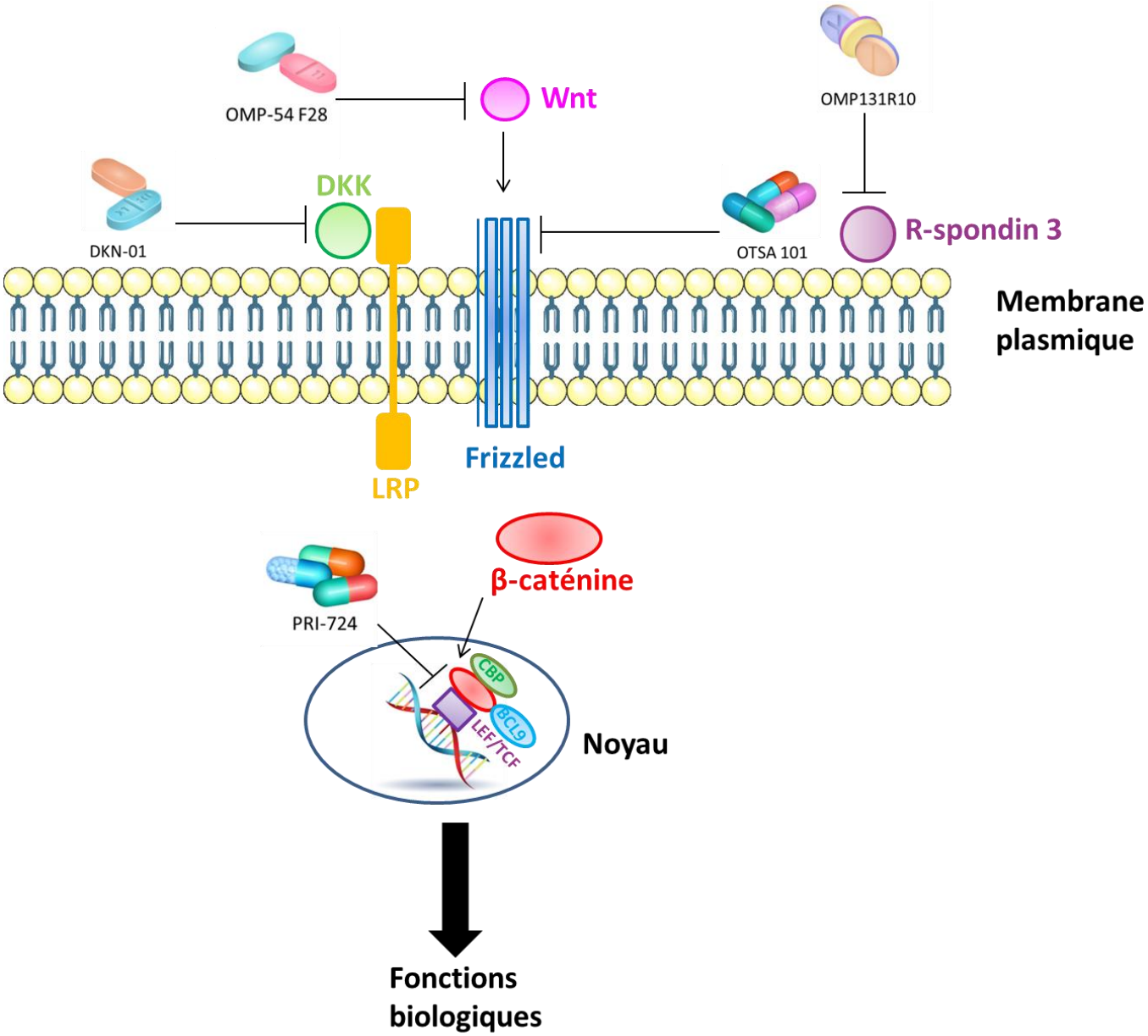
Cancer colorectal	PTK7	Augmentation de la tumorigenèse	(84)
	ROR2	Augmentation de la tumorigenèse	(85)
	WNT-5A	Augmentation de la tumorigenèse	(86)
	WNT-5A	Augmentation de la tumorigenèse	(87)
Estomac	WNT-5A	Augmentation de la tumorigenèse	(88)
Prostate	WNT-5A	Augmentation de la résistance au traitement	(89)
Thyroïde	WNT-5A	Supresseur de tumeur	(90)
Leucémie lymphoïde chronique	PRICKLE1	Augmentation de la tumorigenèse	(91)
	VANGL2	Augmentation de la tumorigenèse	(91)
	FRIZZLED-3	Augmentation de la tumorigenèse	(91)
	FRIZZLED-7	Augmentation de la tumorigenèse	(91)
	ROR1	Augmentation de la tumorigenèse	(92)
	WNT5-A	Supresseur de tumeur	(93)
Leucémie myéloïde aigüe	PTK7	Augmentation de la tumorigenèse	(94)
Leucémie lymphoïde aigüe	PTK7	Augmentation de la tumorigenèse	(95)

Tableau 4 : Dérégulation des protéines de la voie WNT /PCP dans différents types de cancer.

Adapté de Trends in Cancer, Daulat et al 2017

C. SYNTHESE DE TOUS LES INHIBITEURS DE LA VOIE WNT EN ESSAI CLINIQUE

Des **stratégies de ciblage** de certaines protéines de la voie de signalisation Wnt (**anticorps monoclonaux couplés ou non, petites molécules chimiques**) ont montré leur **efficacité dans les premiers essais cliniques** de phase I et II (**Figure 9 et 10**, **Tableau 5**). Certaines stratégies seront détaillées dans le chapitre III.



<u>Figure 9 :</u> Représentation schématique de la voie de signalisation Wnt/ β-caténine avec les inhibiteurs en essai clinique (cf Tableau 5).

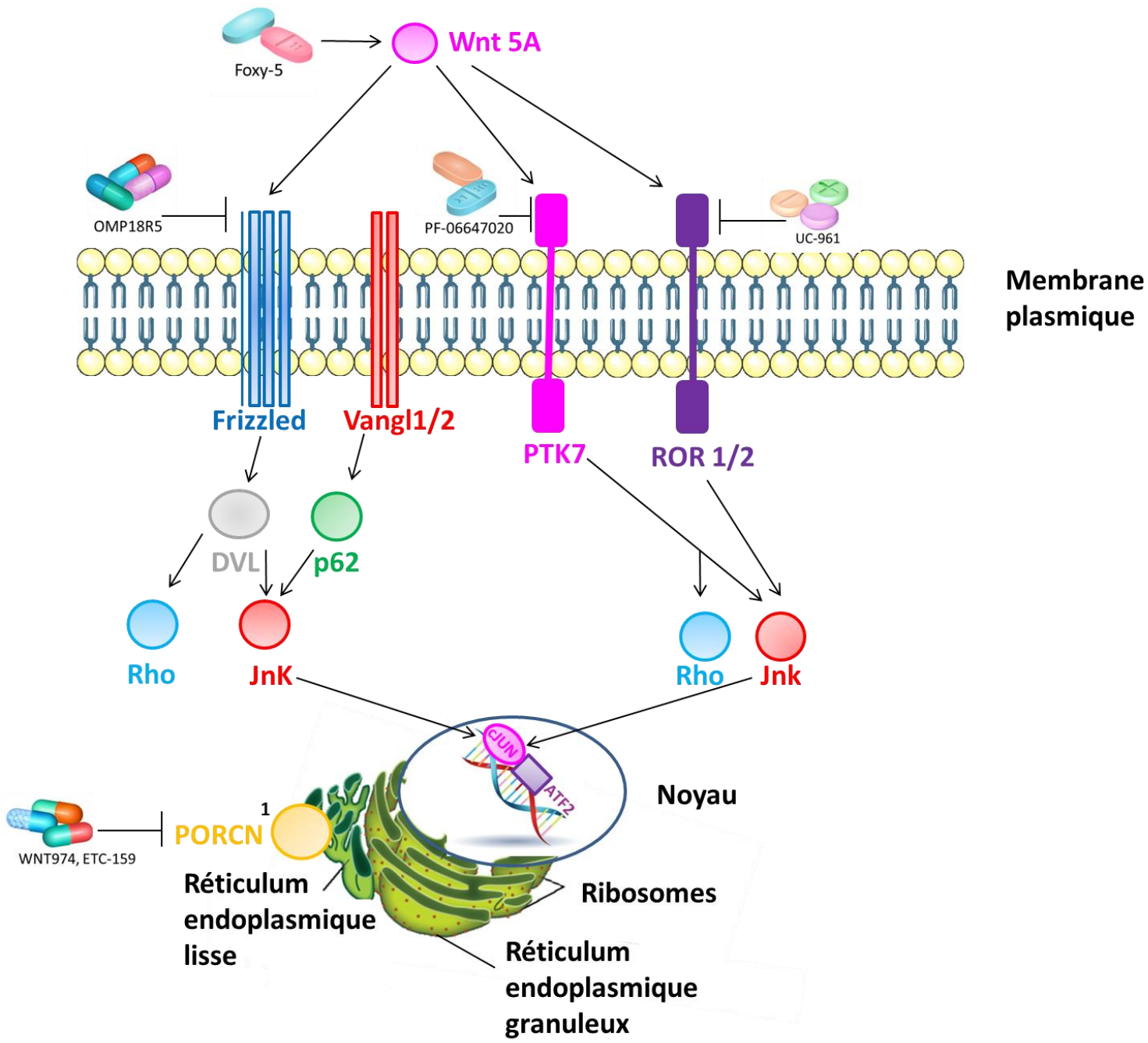


Figure 10 : Représentation schématique de la voie de signalisation Wnt/ PCP avec les inhibiteurs en essai clinique (cf Tableau 5).

1 : Porcupine (PORCN) est une enzyme (acyltransférase) du réticulum endoplasmique nécessaire à la maturation des ligands Wnts (palmitylation) leur permettant ainsi d'être fonctionnels.

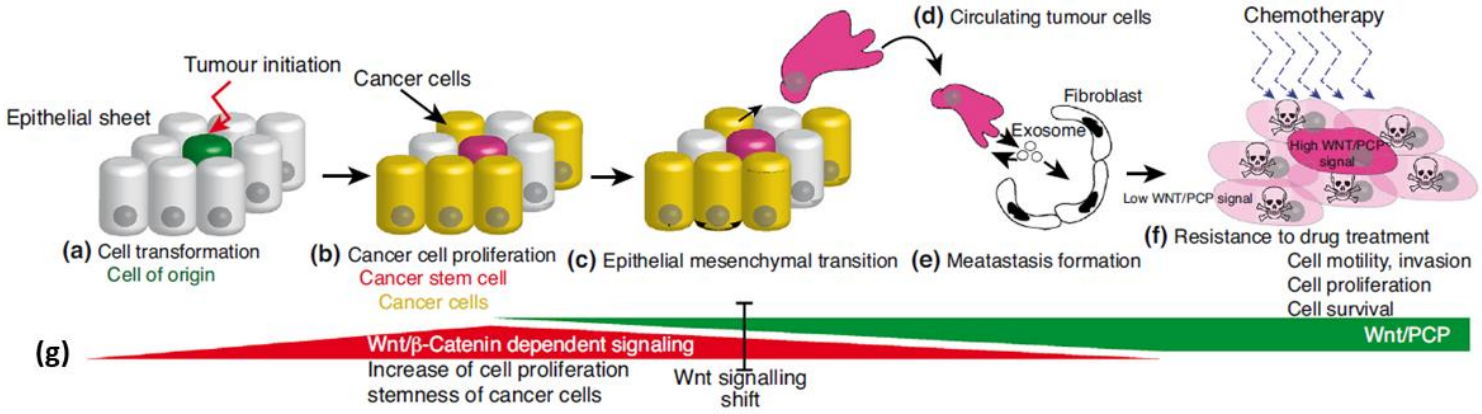
Composé	Cancer	Association	Essais cliniques	Identifiant clinicaltrials.gov et Référence
OMP-54 F28 (Ipafricept/ Inhibiteur de Wnt : protéine de fusion)	Tumeurs solides		Phase I terminée	NCT01608867 (96)
	Carcinome hépatocellulaire	Sorafenib	Phase I terminée	NCT02069145
	Cancer de l'ovaire,	Paclitaxel Carboplatine	Phase I terminée	NCT02092363 (97)
	Cancer du pancréas	Nab-paclitaxel Gemcitabine	Phase I terminée	NCT02050178 (97)
OMP131R10 (Inhibiteur de R-spondin 3 (activateur de la voie Wnt canonique)	Cancer colorectal métastatique R-spondin 3 positif	FOLFIRI	Phase I terminée	NCT02482441
OTSA 101 (inhibiteur de FRIZZLED-10 : anticorps couplé au radioélément yttrium90)	Sarcome synovial	Pas d'association	Phase I stoppée (comptabilisation trop lente)	NCT01469975 (98)

PRI-724 (Inhibiteur de l'interaction entre le facteur de transcription LEF/TCF et l'histone acétyltransférase CBP)	Cancer du pancréas	Gemcitabine	Phase I terminée	NCT01764477 (99)
	Leucémie myéloïde aigüe (LAM) et chronique (LMC)		Phase I terminée (LAM) Phase II terminée (LMC)	NCT01606579
	Tumeurs solides		Phase I terminée à cause d'un nombre de patients trop faible au sein de l'essai	NCT01302405
	Cancer colorectal	Bevacizumab Oxaliplatin: Fluorouracil	Phase II stoppée (problème d'approvisionnement de l'inhibiteur)	NCT02413853
DKN-01 (inhibiteur de DKK1)	Myélome multiple	Pas d'association	Phase I terminée	NCT01457417 (100)
Foxy-5 (Agoniste de WNT-5A)	Cancer du sein, colon, et de la prostate		Phase I terminée	NCT02655952 (101)
WNT974 (inhibiteur de porcupine)	Cancer colorectal avec mutation de BRAF	LGX818 (inhibiteur de BRAF) et cetuximab	Phase I terminée (WNT974); Phase II terminée (LGX818)	NCT02278133
	Carcinome à cellules squameuses, cancer de la tête et du cou		Phase II stoppée avant le recrutement des patients	NCT02649530

ETC-159 (Inhibiteur de porcupine)	Tumeurs solides	Pembrolizumab	Phase I	NCT02521844
PF-06647020 (inhibiteur de PTK7)	Tumeurs solides avancées	Fluconazole	Phase I	NCT02222922 ASCO 2018
OMP18R5 (vantictumab/inhibiteur de FRIZZLED-7)	Cancer du poumon non à petites cellules	docetaxel	Phase I terminée	NCT01957007
	Cancer du sein métastatique	paclitaxel	Phase I terminée	NCT01973309
	Cancer du pancréas	nab-paclitaxel gemcitabine	Phase I terminée	NCT02005315
	Tumeurs solides		Phase I terminée	NCT01345201 (102)
UC-961 (Cirmtuzumab/inhibiteur de ROR1)	Leucémie Lymphoïde chronique (rechute ou réfractaire aux traitements)		Phase I terminée	NCT02222688 (103)

Tableau 5 : Essais cliniques des stratégies de ciblage des protéines de la voie Wnt. Vert : inhibiteurs de la voie Wnt/β-caténine. Bleu : inhibiteurs de la voie Wnt/PCP.

D. DEREGULATION DE LA VOIE DE SIGNALISATION WNT DANS LES CANCERS MAMMAIRES ET COLORECTAUX



<u>Figure 11</u> : Rôle de la voie Wnt dans la progression tumorale.

Adapté de Daulat et al 2017.

(a) : La cellule d'origine (en vert) se transforme en cellule souche cancéreuse. La voie de signalisation Wnt n'est **pas suffisante** pour **initier la tumorigenèse.** Elle participe à la formation de tumeurs, lorsqu'elle est suractivée, en coopération avec des **oncogènes** ou des **gènes suppresseurs de tumeurs**.

(b) : La cellule souche cancéreuse (en rose) commence à proliférer grâce à l'activation de la voie Wnt/ β caténine.

(c) et (d) : Après avoir acquis des propriétés promigratoires et invasives grâce à l'activation de la voie Wnt/PCP, les cellules quittent la tumeur primaire.

(e) Les cellules tumorales circulantes envahissent les organes voisins ce qui conduit à la formation de métastases. Le microenvironnement tumoral est assuré grâce à l'activation de fibroblastes par des exosomes sécrétés par la cellule cancéreuse. Ces fibroblastes sécréteront à leur tour des exosomes.

(f) Les cellules avec un signal WNT/PCP fort résistent à la chimiothérapie.

(g) La voie WNT/β caténine intervient surtout lors des premières étapes de la progression tumorale conférant aux cellules des **propriétés prolifératives et assurant l'auto-renouvellement des cellules souches**. Elle peut être inhibée par des composés de la voie WNT/PCP. Au cours de la progression tumorale, un changement de voie de signalisation Wnt se produit : la voie WNT/PCP prend le dessus et contribue à la progression tumorale en augmentant la **migration cellulaire, le caractère invasif des cellules tumorales et la résistance au traitement.** Cependant, la voie Wnt/ β caténine peut également agir lors des dernières étapes de la progression tumorale et inversement, la voie Wnt/PCP peut intervenir lors des premières étapes.

1. La voie de signalisation Wnt/ β-caténine

a. Croissance tumorale

Les ligands Wnt ont un rôle crucial dans la prolifération des cellules cancéreuses mammaires et colorectales.

Plusieurs gènes codant pour les ligands Wnt sont exprimés dans la glande mammaire murine après la naissance pour permettre son développement. La surexpression de Wnt1, qui n'est pas exprimée normalement dans la glande mammaire, entraîne une hyperplasie des cellules mammaires murines du coussin adipeux (104).

Certains ligands Wnt peuvent **favoriser ou inhiber** la croissance tumorale d'une manière dépendante du contexte. Une explication possible est que les **ligands Wnt activent différentes voies de signalisation selon le contexte cellulaire** (52). En effet, la stabilisation de β-caténine altère le profil transcriptionnel de beaucoup de gènes cibles d'une manière tissu/cellule spécifique en partie car β-caténine interagit directement avec d'autres facteurs de transcription qui sont exprimés différemment suivant les cancers.

La voie de signalisation WNT canonique est aussi régulée par plusieurs protéines sécrétées comme des **WIF (Wnt Inhibitory Factors) et des SFRP (Secreted Frizzled-Related Proteins)** qui peuvent entrer en compétition avec les ligands Wnt et les déplacer de leurs récepteurs. Dans certaines lignées cellulaires cancéreuses, particulièrement celles qui nécessitent une stimulation autocrine de WNT telles que les lignées de cellules de myélome (105) ou certaines lignées de cellules cancéreuses mammaires (106,107), une augmentation de la quantité de SFRP **atténue la croissance tumorale**. Les autres types cellulaires ne semblent pas être sensibles aux changements de niveau d'expression de SFRP et, dans certains contextes, SFRP peut même favoriser la croissance tumorale. Contrairement aux effets de SFRP sur certaines lignées cellulaires de cancer du sein (106,107), SFRP1 n'a pas d'effet sur la croissance de xénogreffes de cellules de cancer du sein SUM1315 (108). Ainsi, la sensibilité des lignées cellulaires aux changements de niveau d'expression de SFRP varie en fonction de la lignée cellulaire.

b. Auto-renouvellement des cellules souches

La voie de signalisation Wnt/ β-caténine contribue à la maintenance et à la différenciation d'une variété de cellules progénitrices multipotentes dans les embryons en développement et chez l'adulte. Par analogie, plusieurs études montrent que la voie Wnt/ β-caténine contribue à la progression tumorale à travers la maintenance d'une subpopulation de cellules cancéreuses très tumorigéniques : **les cellules souches cancéreuses**.

L'activation de la voie Wnt/ β-caténine dans les progéniteurs situés au niveau des **cryptes de la muqueuse du côlon** entraîne l'initiation de tumeurs colorectales. En effet, la perte d'APC dans ces progéniteurs entraîne l'apparition de tumeurs chez la souris. Cependant, la délétion de APC dans des cellules qui ne sont pas des progéniteurs n'induit aucune tumeur (109).

La voie Wnt/ β-caténine participe également à l'auto-renouvellement des **cellules souches mammaires** cancéreuses et normales. Cette voie de signalisation peut influencer les populations de progéniteurs dans la glande mammaire d'une façon qui favorise la tumorigenèse (52).

c. Transition épithélio-mésenchymateuse (TEM)

La TEM est un **processus physiologique** réversible impliquant la transition de cellules épithéliales polarisées vers des cellules mésenchymateuses qui ont la capacité d'être très mobiles. Ce processus intervient naturellement durant le **développement embryonnaire** mais également dans les tumeurs entraînant une **augmentation du pouvoir invasif des cellules tumorales** et leur **résistance au traitement**. Elle est contrôlée par un programme transcriptionnel sous la dépendance d'un grand nombre de voies de signalisation(110).

Plusieurs études montrent que l'activation de la voie Wnt/ β-caténine peut initier la TEM. L'expression de WNT1 est suffisante pour induire des caractéristiques de la TEM dans une lignée cellulaire de cancer du sein appelé MCF7 : une régulation positive de l'expression de SNAI1 (facteur de transcription important pour l'organogénèse et impliqué dans la TEM des cellules cancéreuses) et une régulation négative de l'expression de E-cadhérine (molécule d'adhérence cellule-cellule présente dans les cellules épithéliales)(111).
De plus, l'expression de **DKK1** (inhibiteur de la voie de signalisation Wnt /β-caténine) **inhibe la TEM** dans des lignées cellulaires de cancer colorectal (112).

d. Migration cellulaire et caractère invasif des cellules tumorales

La voie de signalisation Wnt/ β-caténine contribue également à la progression du cancer en **favorisant la migration** des cellules cancéreuses. Cependant, dans certains contextes cellulaires, cette voie peut également **inhiber leur migration**.

De nombreuses études ont montré que les antagonistes sécrétés de la voie Wnt/ β-caténine, tel que DKK1 et SFRPs, ralentissent la mobilité des cellules cancéreuses et bloquent leur caractère invasif (113).

L'activation de la voie Wnt/ β-caténine entraîne une augmentation de la migration cellulaire et du caractère invasif des cellules tumorales car elle favorise la TEM mais aussi car elle régule d'autres facteurs qui permettent la progression métastatique. En effet, elle **régule les métalloprotéinases** de la matrice extracellulaire et d'autres facteurs nécessaires à la régulation de la matrice extracellulaire (43).

e. *Apoptose, sénescence et résistance au traitement*

Les ligands Wnts ont un rôle crucial dans la **survie** des cellules cancéreuses mammaires et colorectales. La voie Wnt/ β-caténine a un rôle très important dans l'initiation de la tumorigenèse mais elle permet également aux tumeurs de **persister**. Dans certains types cellulaires, un ligand WNT **empêche la sénescence** des cellules. Par exemple, la perte de WNT2 dans les fibroblastes entraîne une augmentation des marqueurs de sénescence (114). De même, la stimulation par WNT3A ou l'inhibition de GSK3β (kinase qui régule négativement la voie Wnt/ β-caténine **Figure 6**) retardent la sénescence des fibroblastes (114). Pour éviter la sénescence, les cellules cancéreuses peuvent avoir recours à plusieurs solutions, dont l'activation de la voie Wnt/β-caténine (115).

La voie Wnt/β-caténine permet également aux tumeurs **d'échapper à l'apoptose** quand elles sont challengées par des **agents de chimiothérapie** ou par d'autres toxines (116–123).

2. La voie de signalisation Wnt/PCP

a. *Prolifération cellulaire et auto-renouvellement des cellules souches*

Une récente étude sur une large cohorte de patients atteints de cancer colorectal métastatique a montré qu'une augmentation de l'expression du ligand de la voie Wnt/PCP **WNT5A améliore leur pronostic vital** (86). Dans cette étude, les xénogreffes de cellules de cancer colorectal HCT116 surexprimant WNT5A sont **moins prolifératives** et moins tumorigéniques que lorsque WNT5A n'est pas surexprimé. Le rôle de **suppresseur de tumeur de WNT5A** est dû à **l'inhibition de la voie WNT canonique** (124).

Cependant, dans d'autres études, WNT5A est décrit comme un **marqueur de mauvais pronostic** pour les patients atteints de cancer colorectal ou gastrique car il augmenterait la migration des cellules cancéreuses et leur pouvoir invasif (88,125). De même, la diminution de l'expression des récepteurs de la voie WNT/PCP **PTK7 et VANGL1/2 diminue la prolifération des cellules de cancer du côlon et du sein** respectivement (68,69,84,126).

La protéine SCRIBBLE joue un rôle indispensable dans la **polarité apico-basale** et se comporte comme un **gène suppresseur de tumeur chez la drosophile** car son inhibition entraîne une prolifération incontrôlée des cellules (127). Chez les vertébrés, SCRIBBLE est également un acteur de la voie WNT/PCP en plus de son rôle pour maintenir la polarité apicobasale (128). Sa fonction **de gène suppresseur de tumeur est conservée dans le cancer du sein** et de la prostate par l'inhibition de la voie MAPK et Hippo qui, dans certaines

conditions, favorisent la **prolifération des cellules cancéreuses et les capacités d'auto-renouvellement des cellules souches cancéreuses** (129–132).

Quant au récepteur **PTK7,** il a récemment été décrit comme **marqueur de cellules souches cancéreuses** pour le cancer du côlon et certaines tumeurs hématologiques (133,134).

b. Transition épithélio-mésenchymateuse (TEM)

Des études récentes ont attribué à SCRIBBLE un rôle direct dans la TEM en condition normale (135) et pathologique (tumorale) (136).

Récemment, une élévation du niveau d'expression de WNT5A, WNT5B et FRIZZLED-2 a été observée dans plusieurs types de cancer métastatique (foie, poumon, côlon et sein) exprimant des marqueurs de l'EMT. Dans cette étude, FRIZZLED-2 induit la TEM et des métastases. C'est pourquoi les auteurs proposent de cibler FRIZZLED-2 chez les patients avec des tumeurs présentant des niveaux élevés de WNT5a/WNT5b et FRIZZLED-2 (137).

c. Migration cellulaire et caractère invasif des cellules tumorales

Le rôle de la voie de signalisation Wnt/PCP dans la dissémination tumorale a été démontré par de multiples études *in vitro* et *in vivo* (65,69,70,77,80,84,126,130,138).

Des résultats récents de mon équipe montrent que **PRICKLE1 et VANGL2 sont surexprimées dans les cancers du sein triple négatif de mauvais pronostic** (sous type de cancer du sein très agressif que je décrirai dans le chapitre I. VI) (69,70).

PRICKLE1, qui est un partenaire de VANGL2 (139), est impliquée dans la **dynamique des adhésions focales** (70,138,140), ce qui explique son rôle dans la migration des cellules cancéreuses. Les adhésions focales sont des complexes protéiques dynamiques d'ancrage à la matrice extracellulaire, qui se désassemblent lorsque la cellule acquiert des propriétés migratoires pour se reformer au niveau du front de migration de la cellule. Dans les cancers du sein triple négatif, PRICKLE1 agit entre autres sur la protéine AKT pour assurer le renouvellement des adhésions focales (70). La protéine AKT est impliquée dans une voie de signalisation permettant la survie cellulaire (en inhibant l'apoptose) mais a également un rôle primordial dans la progression tumorale et la dissémination métastatique (141).

Depuis les premières observations indiquant que le ligand WNT5a est surexprimé dans les cancers du sein invasifs (63,64), d'autres molécules de la voie WNT/PCP ont été proposées comme **marqueurs d'agressivité des cancers du sein**. C'est le cas de deux autres ligands de la voie Wnt/PCP, WNT7a et WNT11 (65,66), de

certains récepteurs (FRIZZLED2 et 7, VANGL2) (69,137) et de protéines adaptatrices (SCRIBBLE, PRICKLE) (24,26).

Cependant, dans les cellules de **neuroblastome et de fibrosarcome**, *PRICKLE1* et *VANGL2* agissent comme deux **gènes suppresseurs de tumeurs** (76,143). Ainsi, il est important de noter que le rôle des protéines de la **voie Wnt/PCP dans le cancer dépend du contexte cellulaire.**

Quant à PTK7, son rôle de marqueur de mauvais pronostic dans le cancer du côlon, dû à sa capacité à augmenter le risque de métastase, sera développé dans le chapitre III.

d. Interaction entre la tumeur et le microenvironnement tumoral

Les **exosomes** sont des vésicules de 30-150 nm qui permettent le transfert de protéines, de lipides et de matériel génétique. Elles jouent un rôle clef dans la **communication entre les cellules cancéreuses et leur microenvironnement** (144).

Le microenvironnement tumoral est l'environnement autour d'une tumeur, comprenant les vaisseaux sanguins environnants, les cellules immunitaires, les fibroblastes (appelés « fibroblastes associés aux carcinomes » (FAC)), les molécules de signalisation et la matrice extracellulaire.

Des études récentes ont mis en évidence que l'influence de la voie Wnt/PCP sur les FAC augmente le risque de métastases dans le cancer du sein. En effet, il a été montré que les exosomes produits par les FAC sont internalisés par les cellules cancéreuses mammaires, rechargés en WNT-11 relâchés puis internalisés de nouveau. Cette boucle autocrine entraîne l'invasion et la migration des cellules cancéreuses mammaires par le biais de VANGL1, Dishevelled et PRICKLE1 (65). Inversement, les cellules cancéreuses mammaires peuvent sécréter WNT-7A qui active les FAC grâce à une signalisation dépendante de TGF-β entraînant une augmentation du caractère invasif des cellules tumorales mammaires (66).

Ainsi, la voie Wnt/PCP joue un rôle important dans la communication entre les FAC et la tumeur pour augmenter la mobilité cellulaire, l'invasion des cellules cancéreuses et **maintenir un microenvironnement tumoral propice à la formation de métastases.**

e. Résistance au traitement

La voie Wnt/PCP peut intervenir dans la résistance au traitement par des mécanismes variés soit directement ou indirectement (par exemple, par le biais de sa participation à l'EMT). La surexpression de **PTK7** est associée à une résistance à la **chimiothérapie à base d'anthracycline** chez les patientes atteintes de cancer du sein (71) (cf chapitre II). Cependant, le mécanisme sous-jacent est pour le moment inconnu.

Le rôle de WNT5a dans la résistance au traitement a été décrit pour le mélanome (78,83) et le cancer de la prostate (89). Cependant, sa contribution dans la résistance au traitement du cancer du sein et colorectal n'a pas encore été investiguée. Il reste également à élucider si d'autres molécules de la voie Wnt/PCP contribuent à la résistance au traitement de ces deux cancers meurtriers.

Identifier les récepteurs de la voie WNT/PCP nécessaires à **l'échappement des tumeurs à l'apoptose** est une première étape. Plusieurs études montrent d'ores et déjà un rôle important de **ROR1** dans la survie des cellules cancéreuses. En effet, la diminution de l'expression de ROR1 induit l'apoptose des cellules cancéreuses mammaires (145,146). Bloquer l'activité de **FRIZZLED 7** peut également induire l'apoptose des cellules de cancer du sein et de colon (67,147–149)

VII. LE CANCER DU SEIN

A. PHYSIOPATHOLOGIE

1. Organisation de la glande mammaire

Chaque sein, appelé aussi **glande mammaire**, contient quinze à vingt lobes glandulaires (séparés par du tissu graisseux) et du tissu de soutien qui contient des vaisseaux sanguins et lymphatiques, des fibres et de la graisse. Les vaisseaux lymphatiques conduisent la lymphe au niveau des ganglions axillaires, situés sous le bras.

Chaque **lobe** est constitué de **lobules** capables de produire le lait en période d'allaitement. Les **canaux galactophores** transportent le lait vers le mamelon, situé au centre d'une zone pigmentée appelée l'**aréole**. Le sein repose sur le muscle grand pectoral.

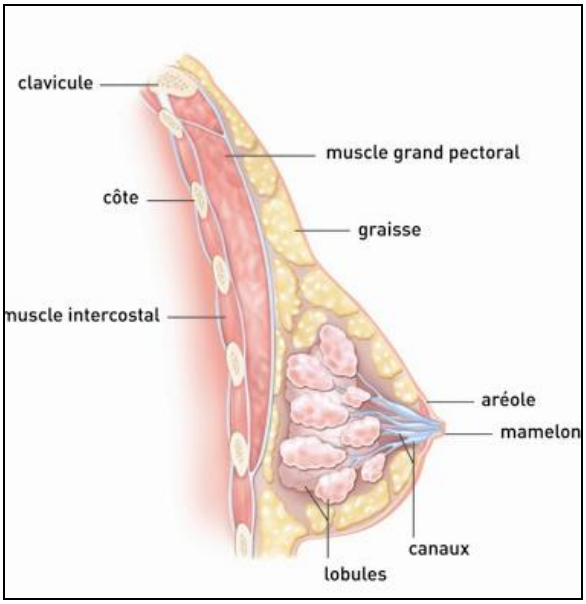


Figure 12 : Anatomie du sein (source : Institut national du cancer (INCa)).

La glande mammaire se développe et fonctionne sous l'influence des hormones sexuelles fabriquées par les ovaires en quantité variable tout au long de la vie : les **œstrogènes et la progestérone.**

2. Les différentes tumeurs malignes

Les cellules cancéreuses qui composent les tumeurs malignes présentent diverses anomalies par rapport à des cellules normales : forme et taille différentes, contours irréguliers, etc...

Les cancers du sein les plus fréquents **(95 %)** sont des **adénocarcinomes**. Ils se développent à partir des cellules épithéliales (=carcinome) de la glande mammaire (=adéno). Il existe d'autres types rares de cancer du sein (carcinome inflammatoire, tumeur phyllode du sein, sarcome du sein, lymphome du sein). Les adénocarcinomes naissent le plus souvent à partir **des cellules des canaux** et plus rarement à partir des cellules des lobules. On distingue les **adénocarcinomes *in situ*** (lorsque les cellules cancéreuses se trouvent uniquement à l'intérieur des canaux ou des lobules sans que la tumeur ait franchi la membrane basale qui les entoure) et les **cancers invasifs ou infiltrants.**

a. Les adénocarcinomes in situ

Les cancers du sein *in situ* représentent **25% des cas**. Le traitement se limite généralement à une **intervention chirurgicale.**

Le **carcinome canalaire *in situ* (CCIS) est le plus fréquent** : huit cancers *in situ* sur dix sont des cancers canalaires *in situ*. Il s'agit d'une forme précoce de cancer du sein, mais qui doit néanmoins être prise en charge à ce stade car, il peut devenir invasif s'il n'est pas traité à temps.

Le **carcinome lobulaire *in situ* (CLIS)** est plus rare. Il représente 10 à 15% des cancers du sein *in situ*. Il est considéré comme un facteur de risque de développer un cancer du sein et non comme un cancer à proprement parler. La majorité des femmes qui ont un CLIS ne développent pas de cancer du sein. Sa prise en charge est différente des autres cancers du sein. La plupart du temps, le CLIS ne se voit pas à la mammographie et ne cause pas de symptômes.

b. Les adénocarcinomes infiltrants

Lorsque les cellules cancéreuses ont infiltré le tissu qui entoure les canaux et les lobules, on parle de cancer ou carcinome infiltrant. Le **carcinome canalaire infiltrant (CCI) est le cancer du sein le plus fréquent : il représente 70 à 80% des cancers du sein diagnostiqués**.
10% des carcinomes infiltrants sont des carcinomes lobulaires infiltrants (CLI). Ils sont essentiellement observés chez des femmes entre 45 et 55 ans. Il existe également des formes plus rares de carcinomes infiltrants (carcinome médullaire, carcinome mucineux, carcinome tubuleux, carcinome papillaire).

Les carcinomes infiltrants peuvent se propager vers **les ganglions** ou vers d'autres parties du corps ; s'il n'est pas pris en charge à temps, il s'agit du **cancer du sein métastatique**. Les ganglions le plus souvent atteints par les cellules du cancer du sein sont les **ganglions axillaires**.

3. Classification moléculaire

Le cancer du sein est une maladie hétérogène d'un point de vue moléculaire et comprend **cinq sous-types majeurs luminal A, luminal B, HER 2 +, basal et normal.** Cette hétérogénéité permet d'orienter la prise en charge des patients. Par ailleurs, ces cinq sous-types présentent des caractéristiques cliniques et pronostiques différentes.

Le cancer du sein basal est un **sous-type très agressif**, représentant **10-20 %** des cancers du sein. Il est associé à un **mauvais pronostic** ainsi qu'à une tendance accrue à former des métastases (150). Ce cancer est aussi appelé **cancer du sein triple négatif** en raison de l'absence d'expression de marqueurs que sont le récepteur de facteur de croissance de type 2 (Human epidermal growth factor 2 ou HER2), le récepteur d'hormones à l'œstrogène (ER) et le récepteur de la progestérone (PR).

En raison de l'absence de récepteurs hormonaux et d'expression d'HER2, les patientes atteintes de ce type de cancer du sein ne peuvent bénéficier de traitements hormonaux ou de **thérapies ciblées** et sont traitées par de la chimiothérapie standard. Malgré les nouvelles approches thérapeutiques telles que l'optimisation d'agents cytotoxiques standards ou le test de nouvelles molécules comme les inhibiteurs de l'EGFR ou de la poly-ADP-ribose-polymérase-1, il y a une **nécessité d'identification de nouvelles cibles thérapeutiques pour ce sous-type de cancer particulièrement agressif**.

B. EPIDEMIOLOGIE

Le cancer du sein est le cancer **le plus fréquent** chez la femme en France, comme dans de nombreux pays à niveau de vie élevé tels que les États-Unis et les pays de l'Union européenne. C'est également le cancer avec le **taux de mortalité** le plus important chez la femme. Les cancers du sein **« hormonodépendants »**, positifs pour les récepteurs hormonaux, sont les formes les plus fréquentes.

Le cancer du sein peut aussi apparaitre chez l'homme mais c'est extrêmement rare (incidence inférieure à 1%).

Selon une étude de l'Institut National du Cancer, par an, on dénombre 58 968 nouveaux cas de cancer du sein chez la femme et 11 883 décès avec près de 80% des cancers du sein qui se développent après 50 ans.1 femme sur 8 sera touchée par un cancer du sein au cours de sa vie. Détecté à un stade précoce, il peut être guéri dans 99 % des cas.

C. FACTEURS DE RISQUE

Le cancer du sein est une **maladie multifactorielle.** Cependant, il existe encore des incertitudes quant à la réelle implication de ces facteurs de risque dans la maladie. Les quatre principaux facteurs de risque de cancer du sein sont: l'âge, les antécédents personnels de maladie, les antécédents familiaux de cancers et les prédispositions génétiques.

1. L'âge

L'âge est le facteur de risque principal. Le risque de cancer du sein chez les jeunes femmes est peu élevé. Ainsi, il est recommandé que toutes les femmes âgées de 50 à 74 ans réalisent une mammographie tous les deux ans dans le cadre du dépistage organisé du cancer du sein. Le risque est maximal entre 65 et 74 ans.

2. Les antécédents personnels de maladie

Les antécédents de cancer du sein *:* une femme qui a eu un cancer du sein a un risque 3 à 4 fois plus élevé de développer un nouveau cancer du sein qu'une femme du même âge. Le risque de récidive du cancer au niveau du sein traité n'est également pas à exclure.

Mastopathie bénigne : les mastopathies associées à la prolifération du tissu mammaire, comme les hyperplasies, font augmenter le risque de cancer du sein.

Exposition à des radiations médicales : une irradiation du thorax peut augmenter le risque de cancer du sein suivant la dose totale reçue et l'âge de la femme.

3. Les antécédents familiaux de cancers

20 à 30% des cancers du sein se manifestent chez des femmes ayant des antécédents familiaux de cancers du sein.

Il est cependant difficile de déterminer si cette prédisposition familiale est due au hasard, à un mode de vie ou à un facteur héréditaire.

4. Les prédispositions génétiques

5 à 10% des cancers du sein sont **héréditaires** (attribuable à une mutation génétique). La recherche a permis d'identifier quelques mutations génétiques favorisant la survenue de cancers du sein mais tous les gènes

incriminés ne sont pas encore connus. Elles concernent, en grande majorité, les gènes **BRCA1** (pour BReast Cancer 1) et BRCA2 (pour BReast Cancer 2). Le fait d'être porteur d'une mutation sur l'un de ces gènes augmente le risque de développer un cancer du sein et de l'ovaire. Ces deux gènes participent à la réparation des dommages de l'ADN. Un **dépistage génétique** permet de mettre en évidence les mutations sur ces deux gènes.

D'autres facteurs ont également été identifiés : certains **traitements hormonaux** en cas de prise de longue durée (contraceptifs oraux (CO), traitement hormonal substitutif de la ménopause (THM), la consommation de **tabac**, la consommation **d'alcool, le surpoids**, peu ou pas d'**activité physique,** la **puberté précoce**, la **ménopause tardive** et **l'absence de grossesse** ou les **grossesses tardives.**

D. DIAGNOSTIC

Lorsqu'une personne présente des **symptômes** (une boule dans un sein, des ganglions durs au niveau de l'aisselle, des modifications de la peau du sein et du mamelon, un changement de la taille ou de la forme du sein), un certain nombre d'examens doivent être réalisés avant de poser le diagnostic de cancer du sein.

Les examens à réaliser sont : un examen clinique des seins (palpation), une mammographie des deux seins souvent associée à une échographie, une IRM mammaire peut également être réalisée et, le plus important, un **examen anatomopathologique des tissus prélevés** (biopsie percutanée le plus souvent). C'est l'examen anatomopathologique qui établit le diagnostic de cancer du sein. A l'issue de ces différents examens, si les résultats laissent soupçonner la présence de métastases, d'autres examens d'imagerie peuvent être réalisés (radiographie du thorax, scintigraphie osseuse, scanner, échographie abdominale, IRM).

E. TRAITEMENT

Différents types de traitements peuvent être utilisés : la **chirurgie**, la **radiothérapie**, l'**hormonothérapie**, la **chimiothérapie** et les **thérapies ciblées.** Il arrive parfois qu'un seul type de traitement soit nécessaire. Dans d'autres cas, une association de traitements est utile pour mieux maîtriser la maladie. Par exemple, la réalisation d'une chirurgie et l'utilisation ensuite, comme **traitement adjuvant**, de la chimiothérapie ou de la radiothérapie.

Le choix des traitements dépend de la taille de la tumeur, de l'endroit où elle est située dans le sein, de son stade au moment du diagnostic, de son grade (degré d'agressivité) et du statut des récepteurs hormonaux ou de HER2.

Une proposition de traitement est établie par des médecins d'au moins trois spécialités différentes dans le cadre d'une **réunion de concertation pluridisciplinaire (RCP)** en s'appuyant sur des recommandations de

bonne pratique. Lorsque le patient a donné son accord sur cette proposition de traitement, ses modalités sont décrites dans un **programme personnalisé de soins (PPS)**. Il peut également être proposé au patient de **participer à un essai clinique.**

1. Carcinome du sein *in situ*

Le traitement d'un carcinome canalaire *in situ* (CCIS) repose principalement sur un **traitement locorégional** :

- une **tumorectomie** (chirurgie mammaire conservatrice du sein qui consiste à retirer la tumeur et une petite quantité des tissus qui l'entourent de façon à conserver la plus grande partie du sein) suivie d'une **radiothérapie.** Dans certains cas, l'intervention peut être accompagnée d'une exérèse **du ganglion sentinelle** (ganglion(s) lymphatique(s) le(s) plus proche(s) de la tumeur). Le délai de mise en route de la radiothérapie après la chirurgie ne doit pas dépasser 12 semaines.
- Ou une **mastectomie** (chirurgie non conservatrice du sein qui consiste à enlever dans son intégralité le sein dans lequel se situe la tumeur). Selon les cas, l'intervention est accompagnée ou non d'une exérèse du ganglion sentinelle.

La prise en charge des cancers lobulaires *in situ* (CLIS) est basée sur une **surveillance régulière**.

2. Cancer du sein infiltrant non métastatique

Le traitement d'un cancer du sein infiltrant repose principalement sur un **traitement locorégional :**

-Une **mastectomie partielle (chirurgie conservatrice)** incluant une chirurgie des ganglions, complétée d'une radiothérapie.

-Ou une **mastectomie (chirurgie non conservatrice)** incluant une chirurgie des ganglions et au besoin complétée d'une radiothérapie.

Ce traitement principal peut être complété en fonction de la présence ou non de **facteurs de risque de récidive** (la taille de la tumeur, son grade, le nombre de ganglions lymphatiques atteints, le caractère hormonodépendant ou non de la tumeur et la surexpression de la protéine HER2 ou non).

En présence de facteurs de risque de récidive, les traitements complémentaires sont les suivants : une **radiothérapie** de la glande mammaire, des aires ganglionnaires ou de la paroi thoracique (suivant le type de chirurgie réalisée au préalable), complétée d'une **chimiothérapie** (associée à une thérapie ciblée si la tumeur est HER2 positive) ou d'une hormonothérapie si la tumeur est hormono-sensible. **La chimiothérapie est le plus souvent réalisée avant la radiothérapie (au maximum 5 semaines avant la radiothérapie et 3 à 6 semaines après la chirurgie)** car certains médicaments de chimiothérapie entraînent des effets secondaires plus importants lorsqu'ils sont administrés après la radiothérapie. Enfin, un **délai maximum de 6 mois** ne doit pas

être dépassé entre la chirurgie et le début de la radiothérapie. Si une hormonothérapie est indiquée, elle démarre à l'issue de la radiothérapie.

Plusieurs molécules de chimiothérapie peuvent être utilisées, généralement **en association.** En l'absence de contre-indications, la chimiothérapie est réalisée avec des molécules appartenant à la **classe des anthracyclines et des taxanes (le plus souvent : 4 à 6 cures espacées de 21 jours par voie IV).** Une thérapie ciblant le récepteur HER2 n'est indiquée **qu'en association avec une chimiothérapie**, **sans anthracycline,** et en cas de surexpression significative de HER2 (déterminée par immunohistochimie et par hybridation in situ). Des **facteurs de croissance hématopoïétiques** peuvent également être indiqués. En cas de tumeur hormono-sensible, il est habituel d'administrer l'hormonothérapie après la chimiothérapie et la radiothérapie si elles sont indiquées. Le plus souvent, elle comprend les molécules suivantes : le **tamoxifène** (SERM : inhibition compétitive des récepteurs aux œstrogènes) et **les inhibiteurs de l'aromatase** (inhibition de la synthèse des œstrogènes par blocage de l'enzyme aromatase). Les inhibiteurs de l'aromatase sont **contre indiqués chez la femme non ménopausée**.

Dans certains cas, la tumeur est trop volumineuse pour être opérée d'emblée. L'intervention chirurgicale est donc précédée d'un **traitement médical néoadjuvant** (chimiothérapie ou hormonothérapie en cas de tumeur hormonosensible).

3. Cancer du sein métastatique

Le traitement principal d'un cancer du sein métastatique est un **traitement systémique**, à base de médicaments (**chimiothérapie, thérapie ciblée, et/ou hormonothérapie lorsque la tumeur est hormonosensible).** Dans certaines situations, une chirurgie et/ou une radiothérapie de la tumeur ou des métastases sont associées au traitement médicamenteux.

Les thérapies ciblées s'attaquent aux cellules cancéreuses qui se sont détachées de la tumeur originelle (cellules métastasiques). Les plus fréquemment utilisées agissent sur le récepteur HER2 : **trastuzumab (Herceptine®), pertuzumab (Perjeta®)** ou sur **l'angiogenèse : bevacizumab (Avastin®)**.

F. LES PISTES DE RECHERCHE ACTUELLES

L'objectif de la recherche actuelle, et un des enjeux majeurs des années à venir, est de pouvoir personnaliser le meilleur traitement possible pour chaque patiente : un traitement bien supporté et adapté à la tumeur.

L'hormonothérapie et les thérapies ciblées ont permis de grands progrès dans la prise en charge des patientes atteintes de cancer du sein. Des **recherches** sont en cours pour **découvrir de nouvelles cibles thérapeutiques** et améliorer les molécules déjà disponibles.

Par exemple, l'équipe du professeur Jean-Paul Borg a récemment montré que le gène ***VANGL2*** est surexprimé dans les **cancers du sein de type basal**. Cette surexpression est corrélée à un mauvais pronostic car la protéine VANGL2 est dotée de fonctions promigratoires ainsi que d'une capacité à promouvoir la croissance tumorale (69). Ainsi, **VANGL2 est une cible thérapeutique potentielle dans le cancer du sein de type basal**. (cf chapitre II).

Les chercheurs travaillent également sur la **mise au point d'ADC** (Antibody Drug Conjugate), des molécules qui associent thérapie ciblée anti-Her2 et chimiothérapie (cf chapitre III). Une molécule est déjà commercialisée (Kadcyla ®), et d'autres sont en cours de développement.

Beaucoup de recherches sont également en cours dans le domaine de l**'immunothérapie.** Le principe est d'empêcher les cellules cancéreuses de développer des mécanismes leur permettant de ne pas être détruites par le système immunitaire. C'est une approche prometteuse pour les patientes atteintes d'un cancer triple négatif ou un cancer non hormono-dépendant. Cependant, les chercheurs doivent identifier un marqueur permettant de savoir à l'avance quelles patientes répondent le mieux à ces nouveaux traitements.

VIII. LE CANCER COLORECTAL

A. PHYSIOPATHOLOGIE

1. Organisation du côlon et du rectum

Le **côlon** et le **rectum**, situés entre l'intestin grêle et l'anus, forment le **gros intestin** qui correspond à la dernière partie du tube digestif. Les aliments sont digérés dans l'estomac et l'intestin grêle. L'organisme en extrait les éléments nutritifs utiles à son fonctionnement puis les déchets alimentaires sont ensuite transmis au côlon sous forme liquide.

Le côlon absorbe l'eau de ces déchets jusqu'à obtenir des selles semi-solides. Le rôle du colon est également d'absorber certaines vitamines et de maintenir l'équilibre hydrique. Les selles passent ensuite dans le rectum avant d'être évacuées par le sphincter anal.

Le rectum est de forme cylindrique et mesure entre 15 et 18 cm de long. Le côlon mesure 1,5m. Il se divise en **4 segments :** le **côlon droit ascendant** (il est situé du côté droit du corps et commence par le cæcum qui relie le côlon à l'intestin grêle), le **côlon transverse** (il traverse la partie supérieure de l'abdomen et relie le côlon droit au côlon gauche), le **côlon gauche descendant** (il longe le côté gauche du corps et se prolonge vers le bas jusqu'au côlon sigmoïde), le **côlon sigmoïde** (dernière portion du côlon).

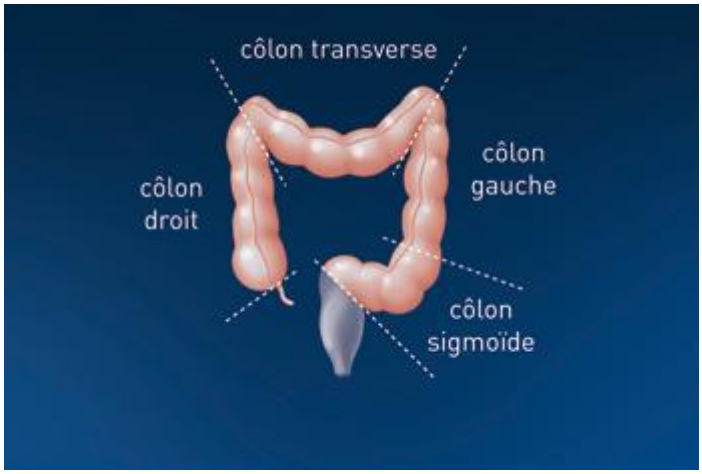


Figure 13 : Les différents segments du côlon (source : Institut national du cancer (INCa)).

La paroi du côlon (tout comme celle du rectum) est constituée de quatre couches différentes qui se superposent : la **muqueuse** (couche la plus interne) repliée sur elle-même pour former des cryptes et abritant différentes glandes (glandes à mucus, glandes de Lieberkühn, etc.), la **sous-muqueuse**, la **musculeuse** (deux couches de muscles), la **couche séreuse** (couche externe) qui constitue une partie du péritoine.

2. Les différentes tumeurs colorectales

Les tumeurs colorectales se développent généralement à partir de la **muqueuse** tapissant les parois du côlon et du rectum et s'étendent ensuite aux autres couches au fur et à mesure qu'elles se développent. Leur **dénomination dépend de leur position**.

Il s'agit de cancer du côlon lorsque la tumeur est située à plus de 15 cm de l'entrée du rectum. Environ **40 %** des cancers colorectaux touchent le **rectum** et **60 %** le **côlon**. Lorsqu'elle est située à moins de 15 cm de l'entrée du rectum, il s'agit de cancer du rectum.

La forme la plus répandue des cancers colorectaux est appelée **adénocarcinome** : le plus souvent la tumeur colorectale se développe à partir des **glandes de Lieberkühn** qui tapissent l'intérieur de la paroi du côlon et du rectum. Il existe d'autres adénocarcinomes rares comme les adénocarcinomes mucineux ou colloïdes et les adénocarcinomes dits à cellules en bague à chaton.

Par ailleurs, il existe d'autres formes histologiques de tumeurs différentes des adénocarcinomes mais elles sont beaucoup plus rares : tumeurs carcinoïdes (elles se développent à partir de cellules nerveuses digestives, qui sécrètent des hormones ou des neurotransmetteurs), sarcomes, lymphomes, mélanomes (tumeurs qui se développent à partir des mélanocytes du rectum).

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

Le cancer colorectal met plusieurs années à se former. Il part habituellement de **polypes** (excroissances charnues) tapissant la muqueuse. Si les polypes sont généralement bénins, certains peuvent devenir cancéreux au cours d'un **long processus de 9-10 ans**.

Des cellules cancéreuses peuvent ensuite se détacher de la tumeur pour aller envahir d'autres parties du corps : les ganglions lymphatiques proches de la tumeur, le foie ou les poumons notamment.

Le côlon et le rectum sont parfois envahis par des métastases issues de cancers situés dans l'ovaire, la prostate, l'estomac ou le sein.

B. ÉPIDEMIOLOGIE

Le cancer colorectal est l'un des cancers les plus répandus dans les pays industrialisés. En France, chez l'homme, ce cancer se place en **troisième position** derrière ceux de la prostate et du poumon. Chez la femme, il occupe la **seconde place**, derrière le cancer du sein.

Selon une étude de l'Institut National du Cancer, par an, on dénombre 44 872 nouveaux cas et 17 684 décès avec comme âge moyen au diagnostic: 71 ans chez l'homme et 75 ans chez la femme. Ce cancer est la **deuxième cause de décès** par cancer en France.

C. FACTEURS DE RISQUE

Les causes exactes du développement d'un cancer du côlon sont mal connues. Cependant, divers facteurs de risque ont été identifiés.

1. L'âge

Le risque de développer un cancer colorectal **augmente après 50 ans**. Un cancer colorectal précoce (avant 40 ans) est lié à des causes génétiques. Ainsi, tous les hommes et femmes âgés de 50 à 74 ans sont invités chaque année à réaliser un test de recherche de sang dans les selles (invisible à l'œil nu) dans le cadre du **dépistage** du cancer colorectal mis en place par les autorités de santé.

2. Présence de polypes

La présence de **polypes adénomateux** sur la paroi du côlon et du rectum accroît le risque de cancer colorectal. Bien que tous les polypes ne se transforment pas en cancer, **les retirer** est un moyen efficace de prévenir l'apparition d'un cancer colorectal.

3. Les antécédents personnels ou familiaux

Le risque est multiplié par trois si la personne a déjà eu un cancer colorectal ou un adénome de plus d'un centimètre ou si un parent du premier degré a été atteint d'un cancer colorectal. Cette prédisposition n'est pas forcément d'origine héréditaire (risque génétique non encore identifié). Elle peut être la conséquence de l'exposition à une même substance cancérigène, d'habitudes alimentaires ou de style de vie.

4. La prédisposition génétique

Un facteur génétique est impliqué dans deux formes de cancers colorectaux : la **polypose adénomateuse familiale (PAF)** (mutation du **gène APC** ou du gène MYH) et le syndrome de Lynch (anomalies sur des gènes codants pour des protéines de réparation de l'ADN). Ces **cancers héréditaires représentent moins de 5 %** de l'ensemble des cancers colorectaux : 1 % pour la PAF et 3 % pour le syndrome de Lynch.

5. Le mode de vie

Le mode de vie influe également sur le risque de cancer colorectal. Les facteurs de risque liés au mode de vie les plus fréquents : une alimentation trop calorique, une consommation importante de viande rouge, une alimentation riche en graisses animales, la consommation d'alcool, la consommation de tabac, l'inactivité physique et le surpoids. Il a été estimé qu'un changement de mode de vie pourrait éviter près de 70 % des cancers colorectaux dans les pays occidentaux.

6. Maladies inflammatoires

Deux maladies chroniques augmentent le risque d'avoir un cancer colorectal : la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique (appelée aussi colite ulcéreuse).

D. DIAGNOSTIC

Le diagnostic du cancer colorectal se réalise en deux étapes : un **bilan diagnostique** pour repérer la lésion, suivi d'un **bilan d'extension** pour évaluer la propagation du cancer aux organes proches et/ou lointains.

Le bilan diagnostique comprend une exploration du côlon et du rectum, par **coloscopie** (introduction dans le côlon d'un tube souple muni d'une caméra vidéo et d'une pince à prélèvements) et la **confirmation de la présence d'une tumeur cancéreuse grâce à une biopsie** réalisée au cours de la coloscopie. Un toucher rectal permet également de repérer une tumeur si elle est située à moins de 8 cm de l'anus.

Les principaux examens du bilan d'extension sont : un **examen anatomopathologique** afin de déterminer si les ganglions lymphatiques sont touchés et plusieurs **examens d'imagerie**. En général les examens d'imageries sont : un scanner thoracique (à la recherche de métastases dans les poumons), un scanner abdominal et de la région pelvienne. Parfois, une échographie abdomino-pelvienne, une IRM du foie, et un PET-scan peuvent compléter le bilan.

E. TRAITEMENT

Chaque traitement du cancer colorectal est unique. Une réunion de concertation pluridisciplinaire (RCP) permet au corps médical d'établir un programme personnalisé de soins (PPS). La prise en charge du **cancer du côlon** s'organise autour de la **chirurgie** et de la **chimiothérapie**. La **radiothérapie** est réservée à certains cas de **cancer du rectum.**

La **chirurgie est le traitement de base du cancer colorectal**. On parle de **colectomie**. Elle consiste à retirer le segment du côlon comprenant la tumeur et à suturer les extrémités restantes. Si des cellules cancéreuses ont atteint un ou plusieurs ganglions proches du côlon, ils doivent être retirés. Le côlon n'étant pas un organe vital, il est possible de vivre normalement si on en enlève une partie. Il existe deux techniques : la **laparotomie** (ouverture de la cavité abdominale pour retirer la portion de côlon avec la tumeur) et la **cœlioscopie** (introduction d'instruments et d'une mini-caméra grâce à trois ou quatre petites incisions et extraction de la tumeur par ces incisions).

Dans le cas du cancer colorectal, la tumeur et l'ensemble des éléments retirés pendant l'opération (vaisseaux sanguins, ganglions) font l'objet d'un examen **anatomopathologique** pour décider si la chirurgie doit être complétée ou non par une chimiothérapie. Les produits habituellement employés (seuls ou en association) sont le **5-fluoro-uracile (5-FU), l'oxaliplatine (Eloxatine®)** et **l'irinotécan (Campto®)** et **le raltitrexed**. L'objectif est de réduire le risque de récidive.

Les thérapies ciblées efficaces dans le cancer du côlon sont nombreuses. Elles agissent sur **l'angiogenèse : bevacizumab (Avastin®)** ; ou sur le **récepteur au facteur de croissance EGF (EGFR)** : le **cetuximab (Erbitux®) et le panitumumab (Vectibix®).** En pratique, les thérapies ciblées ne sont utilisées que pour les **cancers colorectaux avancés et** en **association avec de la chimiothérapie**. La prescription est précédée d'une **analyse immunohistochimique** sur les cellules tumorales à la recherche **d'altérations génétiques** qui peuvent provoquer une résistance au traitement.

En effet, selon des **recommandations de l'ANSM** (151,152), la détermination du **statut mutationnel RAS** (exons 2, 3 et 4 de KRAS et de NRAS) est **obligatoire** avant d'envisager un traitement par le panitumab et le cetuximab, afin de s'assurer que seuls les patients avec un **statut sauvage (non muté) reçoivent le traitement**. Les gènes RAS constituent l'une des familles d'oncogènes le plus fréquemment activées dans les cancers humains. Les mutations des gènes RAS au niveau de certains « hot-spots » des exons 2, 3 et 4 engendrent une activation constitutive des protéines RAS indépendamment des signaux de l'EGFR. Le gène *KRAS* (Kirsten rat sarcoma 2 viral oncogène homologue) et *NRAS* (Neuroblastoma RAS viral oncogene homologue) font partie de la famille de l'oncogène RAS.

F. LES PISTES DE RECHERCHE ACTUELLES

Les chercheurs explorent différentes voies pour lutter contre le cancer colorectal : **mécanismes moléculaires, diagnostic, dépistage, traitement, prévision de l'évolution clinique et de la réponse aux traitements**.

Ainsi, les équipes étudient actuellement des gènes et protéines qui pourraient améliorer le dépistage et le diagnostic précoce des cancers colorectaux dans le but d'améliorer la prise en charge des patients.

Des études récentes suggèrent que certaines bactéries naturellement présentes au niveau du côlon pourraient favoriser la progression du cancer du côlon. Les chercheurs explorent donc l'impact que pourrait avoir une modulation de l'activité de ces bactéries du côlon sur le développement du cancer.

Les traitements ont aussi bénéficié des avancées de la recherche. L'essor des thérapies ciblées a permis une grande amélioration de la prise en charge des patients atteints de certains types de cancers colorectaux. D'autres composés sont actuellement en cours d'étude et font l'objet d'essais cliniques. Comme mentionné précédemment, le **récepteur PTK7,** sur lequel travaille également l'équipe de Jean-Paul Borg, est d'ailleurs actuellement ciblé par un anticorps-médicament en **phase de développement clinique** (cf chapitre II et IV)...

Semblablement au cancer du sein, beaucoup de recherches sont également en cours dans le domaine de l**'immunothérapie.**

.

CHAPITRE II : PROTEINES DE LA VOIE DE SIGNALISATION WNT/PCP ETUDIEES AU LABORATOIRE

I. GENERALITES SUR PTK7, UN RECEPTEUR DE LA VOIE WNT/PCP, DANS LES CANCERS COLORECTAUX

Comme mentionné auparavant, PTK7 est un acteur de la voie Wnt/ β-caténine mais aussi de la voie Wnt/PCP. En effet, PTK7 peut interagir directement avec β-caténine pendant le développement du xénope et peut également activer la voie de signalisation Wnt/PCP (153–155).

C'est un récepteur de la famille des **récepteurs aux tyrosines kinases (RTK)** qui a été identifié pour la première fois dans des cellules **de cancer du côlon** (156). Le récepteur PTK7 peut également être appelé CCK-4 (colon carcinoma kinase-4).

PTK7 a la même structure qu'un RTK classique (**Figure 14**), il est composé d'un domaine extracellulaire comportant sept boucles immunoglobulines, d'un domaine transmembranaire, d'un domaine juxta membranaire et d'un domaine tyrosine kinase intracellulaire

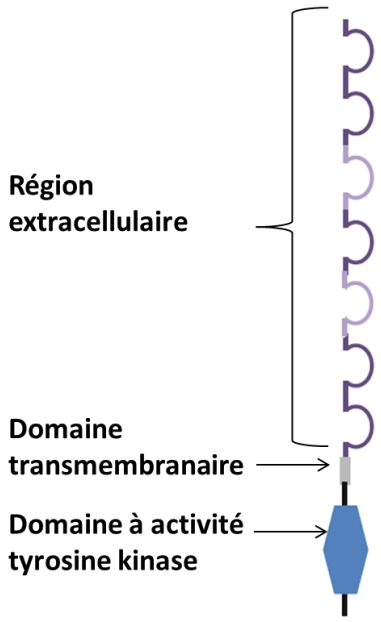
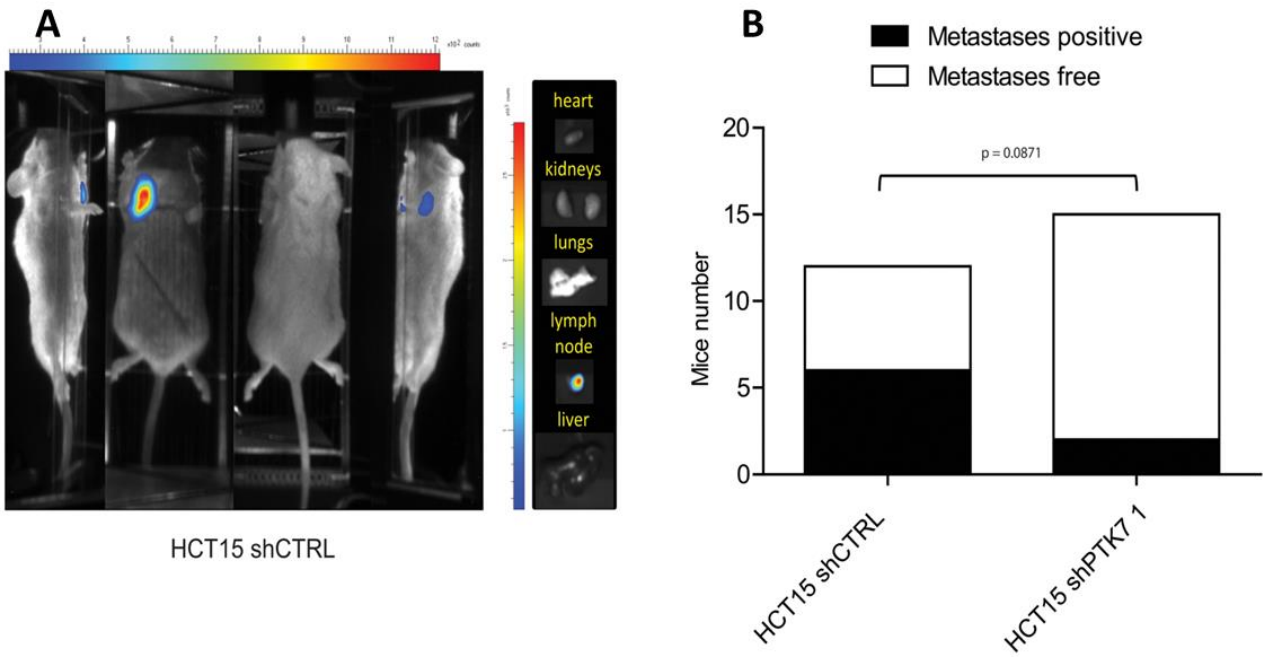


Figure 14 : Structure du récepteur PTK7. Adapté de Lhoumeau et al 2015, Editions Springer.

Cependant, son domaine tyrosine kinase n'a **pas d'activité catalytique** et ses ligands ne sont toujours pas connus à l'heure actuelle. Néanmoins, l'équipe de Jean-Paul Borg a montré que PTK7 agit comme un corécepteur de ROR2 (récepteur à activité tyrosine kinase capable de lier le ligand de la voie Wnt/PCP WNT5A) pour conduire ensuite à l'activation de JNK (157,158).

PTK7 interagit également avec divers récepteurs membranaires impliqué dans le **cancer (VEGFR1, Plexins**) (159). De plus, il a été décrit que la surexpression de PTK7 induit **une résistance à la chimiothérapie à base d'anthracycline** dans les **cancers du sein** (71) et du **côlon** (160). Ces résultats suggèrent que PTK7 puisse être un **marqueur pronostic et prédictif** dans un contexte de résistance à une chimiothérapie à base d'anthracycline.

De plus, l'équipe de Jean-Paul Borg a récemment évalué l'expression protéique de PTK7 dans différents tissus de tumeurs colorectales primaires grâce à une technique de « Tissue Micro Array (TMA) » (technique permettant l'analyse immunohistochimique simultanée de différentes biopsies) et a pu corréler l'expression de PTK7 au pronostic des patients. L'expression de PTK7 a été associée à **une augmentation du risque de métastase** et à une **diminution de la survie** chez les patients atteints de cancer du côlon non métastatique (84). L'équipe a également montré par des tests *in vitro* (lignées cellulaires de cancer colorectal) que PTK7 présente des **capacités promigratoires.** La capacité de PTK7 à augmenter la **croissance tumorale** et **à induire un phénotype métastatique** a été démontrée *in vivo* grâce à un modèle souris avec des xénogreffes de cellules de cancer colorectal (HCT 15) (**Figure 15**). Ces derniers résultats sont en accord avec les données cliniques.



<u>Figure 15</u> : Effet pro-tumorigène de PTK7 dans un modèle de xénogreffe. Adapté de Lhoumeau et al 2015.
(A) Image d'une souris injectée avec des cellules HCT15 shCtrl (l'expression protéique de PTK7 n'est pas inhibée dans ces cellules contrairement aux cellules shPTK7) et ses organes. Cette souris présente des métastases au niveau du ganglion lymphatique.
(B) Le nombre de souris avec des métastases dans chaque condition. La proportion de souris avec des métastases a été comparée en utilisant un test exact de Fisher.

Il reste à clarifier si les fonctions de PTK7 dans le cancer colorectal sont liées à son implication dans la voie Wnt/β-caténine ou à celle dans la voie Wnt/PCP ou à un potentiel rôle dans une autre voie de signalisation.

PTK7 est donc un récepteur **surexprimé dans les cancers colorectaux** de **mauvais pronostic** doté de fonctions promigratoires et d'une capacité à augmenter la croissance tumorale. Ce récepteur peut ainsi être considéré comme une **nouvelle cible thérapeutique prometteuse.** En effet, comme mentionné dans le **tableau 5**, un anticorps conjugué anti-PTK7 entre prochainement en phase II **d'essai clinique**. Je décrirai les résultats encourageants obtenus lors de la phase I dans le chapitre III.

II. ETUDE MOLECULAIRE DE VANGL2, UN RECEPTEUR DE LA VOIE WNT/PCP, DANS LES CANCERS DU SEIN

A. INTRODUCTION

Au cours de mon internat, je me suis intéressée au **récepteur VANGL2** qui est une des molécules-clés de la voie Wnt/PCP. La dérégulation de VANGL2, le plus fréquemment une surexpression, a été décrite dans plusieurs **cancers solides** (161,162) et **hématologiques** (163). De plus, comme mentionné dans le chapitre I, le gène *VANGL2* fait partie de la **signature basale des cancers du sein** comme d'autres gènes de la voie WNT/PCP (PTK7, PRICKLE) et sa surexpression est **corrélée à un mauvais pronostic** (69).

Considérant le rôle important de VANGL2 dans les cancers du sein, un objectif majeur est de définir son **mode d'action** encore mal compris et d'élaborer de futures **stratégies thérapeutiques** capables de bloquer sa fonction dans les cellules tumorales. Cette stratégie, élargie à d'autres molécules impliquées dans la voie WNT/PCP, pourrait représenter une avancée prometteuse dans le traitement des cancers du sein résistants aux thérapies standards.

Au niveau structural, VANGL1 (paralogue de VANGL2) et VANGL2 sont des molécules membranaires qui possèdent **4 domaines transmembranaires**, des **extrémités N-terminale et C-terminale intracellulaires** et **deux boucles extracellulaires** (**Figure 16**). VANGL2 est capable d'interagir physiquement avec VANGL1 **(hétéro-oligomérisation**) ainsi qu'avec lui-même (**homo-oligomérisation**) (164). L'**organisation de VANGL2 à la membrane plasmique** conditionne très probablement le mode d'action de ce récepteur en particulier sa signalisation cellulaire tout comme les **récepteurs couplés aux petites protéines G (RCPG) qui sont les cibles de 50% des médicaments actuellement sur le marché pharmaceutique**. Il est donc important de mieux la comprendre.

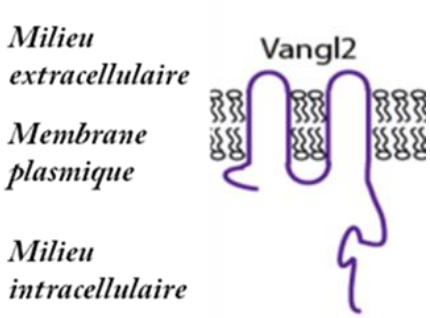


Figure 16 : Structure de la protéine VANGL2.

Une **étude *in silico*** a suggéré la présence dans la région 5' de l'ARNm de *VANGL2* d'**un site d'initiation de la traduction non conventionnel,** en amont de la méthionine, susceptible de générer une protéine étendue de 48 acides aminés du côté N-terminal (**VANGL2-Long**) (165). Une telle extension n'est présente **ni dans** VANGL1 ni chez la drosophile mais apparaît conservée dans toutes les séquences de vertébrés que nous avons analysées (y compris chez le xénope). Cette extension est donc susceptible de porter une **information fonctionnelle unique aux vertébrés**. Selon l'article d'Ivanov et al, la traduction de VANGL2-Long serait initiée à partir d'un **codon codant pour une isoleucine (AUA)** (**Figure 17**). Les codons AUA et AUG (codant pour une méthionine) étant portés par le même exon, VANGL2 et VANGL2-Long ne **sont pas produits par épissage alternatif.**

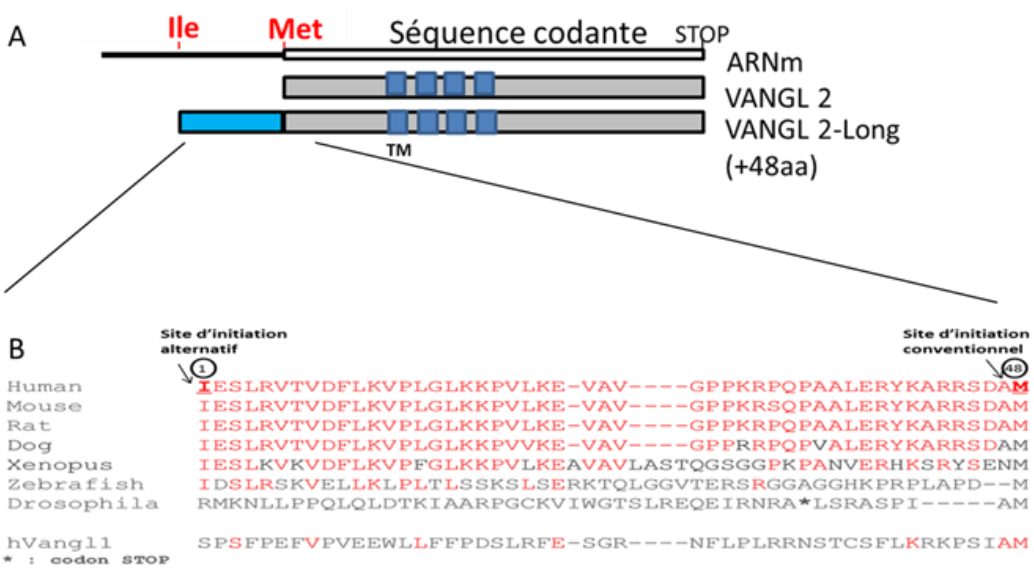


Figure 17 : Une nouvelle isoforme de VANGL2.

(A) Diagramme schématique des protéines VANGL2 et VANGL2-Long. ■: 4 domaines transmembranaires (TM) De VANGL2.

(B) Alignement des séquences protéiques présentes entre les deux codons d'initiation de la traduction (Isoleucine 1 et Méthionine 48) codées par la région 5' des transcrits de VANGL2.

L'**objectif** de mon internat au laboratoire du Professeur JP Borg a été de mieux décrire sur le plan moléculaire et fonctionnel le récepteur de la voie Wnt/PCP VANGL2 en :

- **caractérisant sa nouvelle isoforme** très conservée au cours de l'évolution en répondant à différentes questions : Est-elle traduite en protéine et dans quelle proportion ? Est-elle fonctionnelle ? Est-ce qu'elle présente des caractéristiques différentes de VANGL2 (localisation, partenaires, trafic intracellulaire) ?

- élucidant son **mode d'action en condition physiologique et pathologique (cancer du sein)** en répondant à différentes questions : est-ce que l'oligomérisation de VANGL2 avec VANGL1 est importante pour son mode d'action ? Quelles sont les conséquences de la surexpression de VANGL2 dans les tumeurs mammaires?

B. RESULTATS

1. Caractérisation d'une nouvelle isoforme VANGL2-Long

Un premier argument expérimental en faveur de l'existence d'une isoforme longue de VANGL2 avait été obtenu au laboratoire avec la purification biochimique de VANGL2 et l'identification par spectrométrie de masse d'un peptide comportant 3 acides aminés supplémentaires en amont de la méthionine initiatrice. Ainsi, le clonage de VANGL2-Long a été entrepris au laboratoire. Pour caractériser cette nouvelle isoforme, j'ai généré des anticorps polyclonaux dirigés contre un peptide de l'extension N-terminale de VANGL2-Long. **Grâce à ce nouvel outil, j'ai pu confirmer l'existence de VANGL2-Long** telle qu'elle était prédite par l'étude *in silico* (165) dans des différentes lignées cellulaires humaines ou murines. VANGL2-Long est également exprimée dans plusieurs lignées de cancer du sein (SKBR7, SUM149) (**Figure 18),** ainsi que dans des xénogreffes dérivées de patientes (PDX, Patient Derived Xenograft) atteintes de tumeurs mammaires.

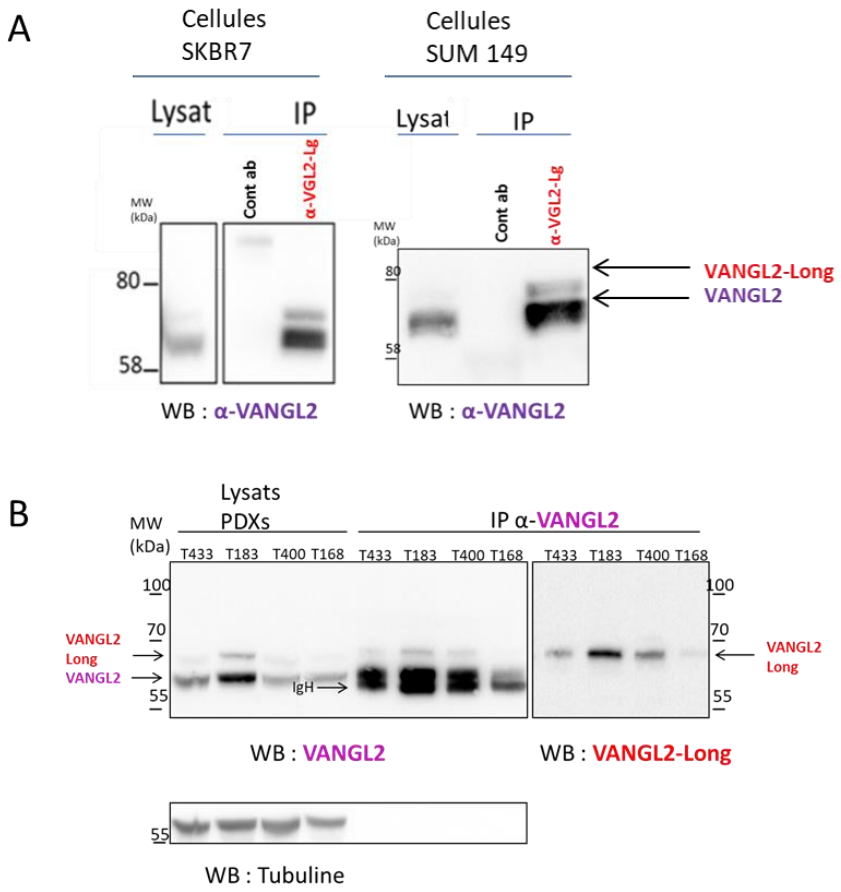
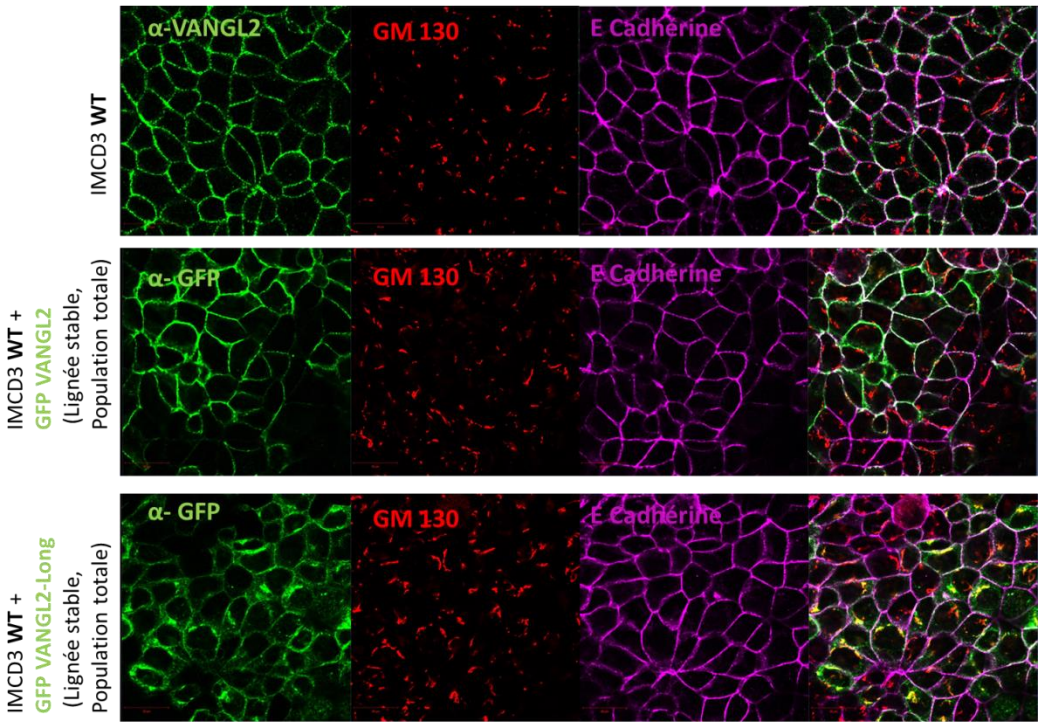
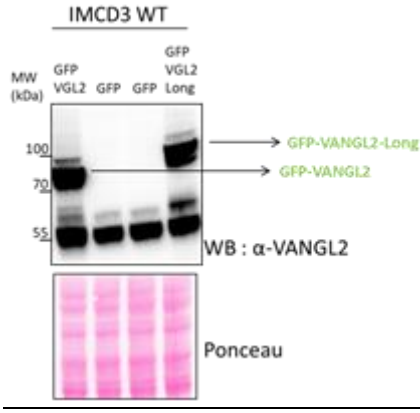


Figure 18 : Détection de VANGL2 endogène avec l'anticorps α-VANGL2-Long.
Immunoprécipitation et Western Blot ont été faits dans les lignées de cancer du sein (SKBR7, SUM-149) (A) et dans des xénogreffes dérivées de patientes (PDX, Patient Derived Xenograft) atteintes de tumeurs mammaires (B) avec les anticorps décrits dans la figure. L'anticorps α-VANGL2 reconnaît les 2 isoformes de VANGL2.

Dans tous les contextes cellulaires testés, VANGL2-Long apparaît comme une isoforme minoritaire. De façon remarquable, quand j'utilise l'anticorps spécifique de VANGL2-Long pour immunoprécipiter cette protéine, **VANGL2 ainsi que VANGL1 sont systématiquement co-immunoprécipitées.** J'ai pu suivre biochimiquement le niveau protéique de VANGL1 grâce à des anticorps monoclonaux également générés et caractérisés pendant mon internat (données non publiées).

Ayant validé l'expression de VANGL2-Long dans les cellules, j'ai cherché à en connaître **la localisation** dans des cellules rénales murines IMCD3 qui ont la propriété de se **polariser** et de former des **jonctions adhérentes,** condition préalable à la localisation membranaire de VANGL2 (69). L'anticorps anti-VANGL2-Long ne fonctionnant pas en immunofluorescence, j'ai utilisé des formes étiquetées des deux isoformes de VANGL2 (GFP-VANGL2 et GFP-VANGL2-Long)**.** Dans ce contexte expérimental, VANGL2-Long se localise partiellement à la membrane plasmique. **Cette distribution membranaire apparaît plus discontinue que celle de VANGL2 et s'accompagne d'une localisation au niveau d'un compartiment intracellulaire que j'ai caractérisé.** En effet, il semblerait que ce compartiment soit **l'appareil de golgi (Figure 19)**.





<u>Figure 19 :</u> Localisation cellulaire de VANGL2-Long dans les cellules IMCD3.

(A) Lignée IMCD3 exprimant de façon stable GFPVANGL2 ou GFPVANGL2-Long. Le marquage sur les IMCD3 WT a été réalisé avec l'anticorps α-VANGL2 qui détecte les deux isoformes. Le marquage sur les IMCD3 surexprimant GFP-VANGL2 ou GFP-VANGL2-Longa été réalisé avec un anticorps α-GFP pour amplifier le signal. Le marquage avec l'anticorps anti-E cadhérine témoigne de l'intégrité des jonctions cellulaires. Le marquage avec l'anticorps anti-GM130 (Golgi Matrix protein of 130kDa) permet de marquer l'appareil de Golgi. Barre d'échelle : 20 µm.

(B) Western Blot dans les lignées IMCD3 exprimant de façon stable GFP-VANGL2 ou GFP-VANGL2-Long avec l'anticorps α-VANGL2 qui reconnaît les 2 isoformes de VANGL2.

Au vu de ces résultats, nous nous sommes demandé si les deux isoformes de VANGL2 ont **un trafic intracellulaire différent** : est-ce que ces isoformes, comme la plupart des protéines membranaires adressées à la membrane plasmique, passent toute les deux par l'appareil de Golgi avant d'atteindre cette dernière ? Est-ce qu'elles ont une cinétique différente pour atteindre la membrane plasmique ? Est-ce que le trafic intracellulaire d'une isoforme peut être influencé par la présence de l'autre ?

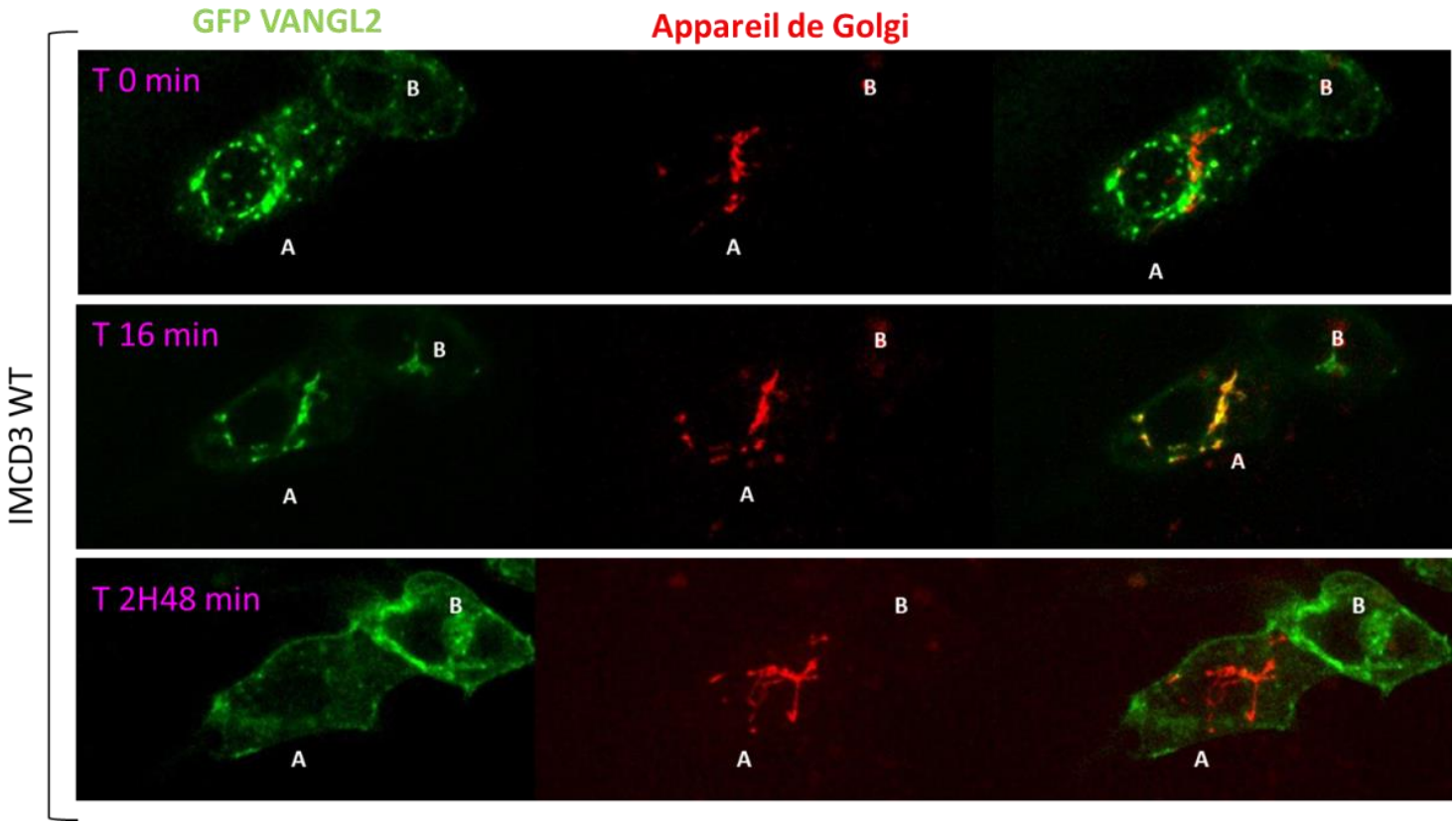
De nombreuses études ont montré que le trafic intracellulaire de VANGL2 et sa localisation à la membrane plasmique sont indispensables pour ses fonctions multiples. Par exemple, la perte de Sec 24b (protéine permettant le bourgeonnement de vésicules recouvertes de protéines COPII, Cytoplamic Coat Protein complex II, au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique et donc la sortie de VANGL2 de cet organite cellulaire) entraîne des anomalies de fermeture du tube neural très similaire au phénotype observé lors d'un déficit de VANGL2 (166,167).

Cependant, il reste beaucoup de zones d'ombre concernant le trafic intracellulaire de VANGL2. En effet, les mécanismes moléculaires responsables de son transport actif à la membrane plasmique ne sont toujours pas connus.

Pour étudier le trafic intracellulaire des deux isoformes de VANGL2, j'ai utilisé un système original, dénommé **RUSH ou « Retention using selective hook »,** qui permet d'analyser et de quantifier, en temps réel, le transport d'une grande diversité de protéines. Ce système est actif dans des conditions physiologiques. La protéine étudiée est d'abord retenue par une molécule « hameçon » (hook) au sein du réticulum endoplasmique, puis relâchée, à volonté, par simple addition de biotine dans le milieu. Le parcours de la protéine dans la cellule est suivi grâce à un marquage GFP (168).

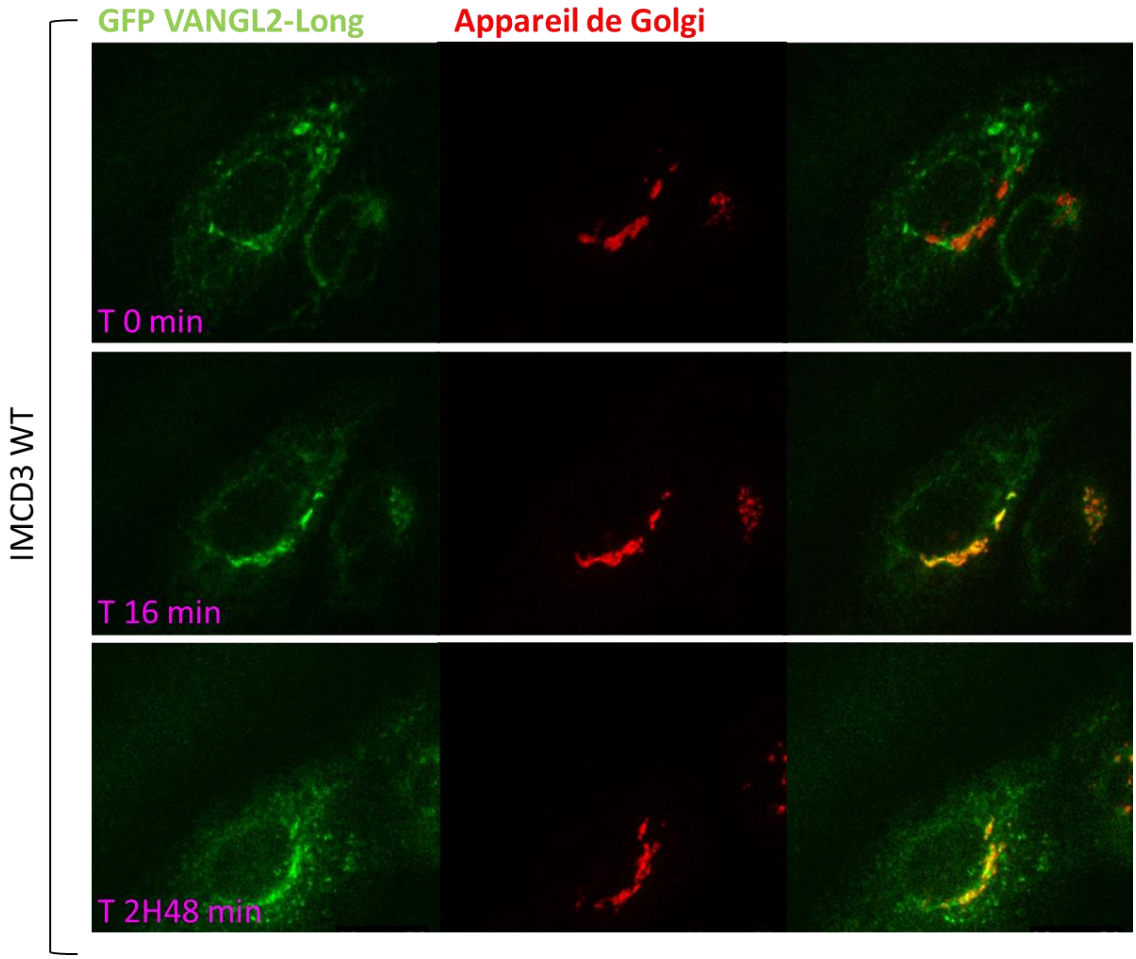
Mes résultats montrent que, dans des cellules IMCD3 sauvages (IMCD3 WT), la protéine **VANGL2 passe par l'appareil de golgi** (**Figure 20, T16 min**), après sa synthèse dans le **réticulum endoplasmique** (**Figure 20, T0 min**), avant d'atteindre la **membrane plasmique** (**Figure 20, T2H48 min**). Dans ce contexte cellulaire, il ne reste plus de VANGL2 dans l'appareil de Golgi une fois que VANGL2 est localisée à la membrane plasmique.

L'isoforme longue passe également par l'appareil de Golgi (**Figure 21, T16 min**). Cependant, contrairement à VANGL2, elle est retenue dans l'appareil de Golgi (**Figure 21, T2H48 min**), probablement pour y exercer sa fonction.



<u>Figure 20 :</u> Illustration de la synchronisation du transport de VANGL2 (en vert) exprimée dans le système RUSH dans les IMCD3 WT en temps réel sur cellules vivantes (« Live cell imaging »).

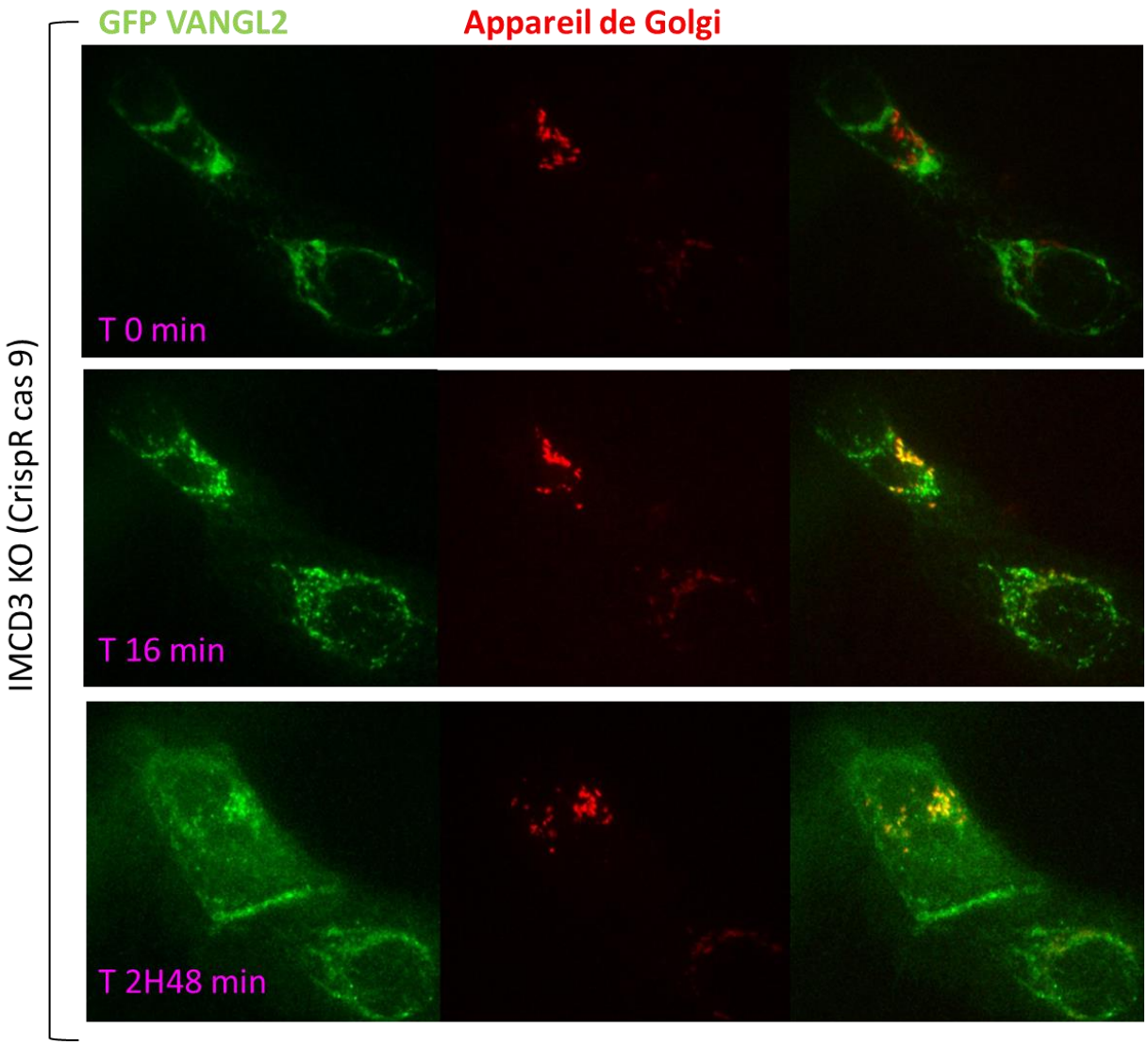
Les cellules ont également été transfectées avec une construction permettant d'exprimer la RFP fusionnée à une enzyme de l'appareil de Golgi (N-acetylgalactosaminyltransferase) pour pouvoir détecter l'appareil de Golgi de la cellule A (en rouge). La cellule B n'a pas été transfectée par cette construction. T O min, T 16min, T 2H48min correspondent à différents temps, avant l'addition de biotine (T 0 min) et après (T16 min, T 2H48min).



<u>Figure 21 :</u> Illustration de la synchronisation du transport de VANGL2-Long (en vert) exprimée dans le système RUSH dans les IMCD3 WT en temps réel sur cellules vivantes (« Live cell imaging »).

Les cellules ont également été transfectées avec une construction permettant d'exprimer la RFP fusionnée à une enzyme de l'appareil de Golgi (N-acetylgalactosaminyltransferase) pour pouvoir détecter l'appareil de Golgi (en rouge). T 0 min, T 16 min, T 2H48 min correspondent à différents temps, avant l'addition de biotine (T 0 min) et après (T16 min, T 2H48min).

Afin de savoir si le trafic intracellulaire de VANGL2 est influencé par la présence de VANGL2-Long ou non, j'ai exploité une lignée IMCD3 préalablement invalidée pour l'expression de VANGL2 par une approche Crispr-Cas9 (IMCD3 KO). Cette lignée n'exprime ni VANGL2 ni VANGL2-Long. Après avoir exprimé transitoirement la construction RUSH VANGL2 dans cette lignée, j'ai pu étudier le **trafic intracellulaire de VANGL2 sans la présence de VANGL2-Long** (**Figure 22**). Dans ce contexte cellulaire, sans la présence de VANGL2-Long, la protéine VANGL2 passe toujours par l'appareil de Golgi (**Figure 22, T 16 min**). Cependant, il reste des molécules de VANGL2 dans l'appareil de Golgi une fois que VANGL2 est localisée à la membrane plasmique (**Figure 22, T2 H 48 min**).



<u>Figure 22 :</u> Illustration de la synchronisation du transport de VANGL2 (en vert) exprimée dans le système RUSH dans les IMCD3 KO (CrispR cas 9).

Les cellules ont également été transfectées avec une construction permettant d'exprimer la RFP fusionnée à une enzyme de l'appareil de Golgi (N-acetylgalactosaminyltransferase) pour pouvoir détecter l'appareil de Golgi (en rouge). T 0 min, T 16 min, T 2H48 min correspondent à différents temps, avant l'addition de biotine (T 0 min) et après (T16 min, T 2H48 min).

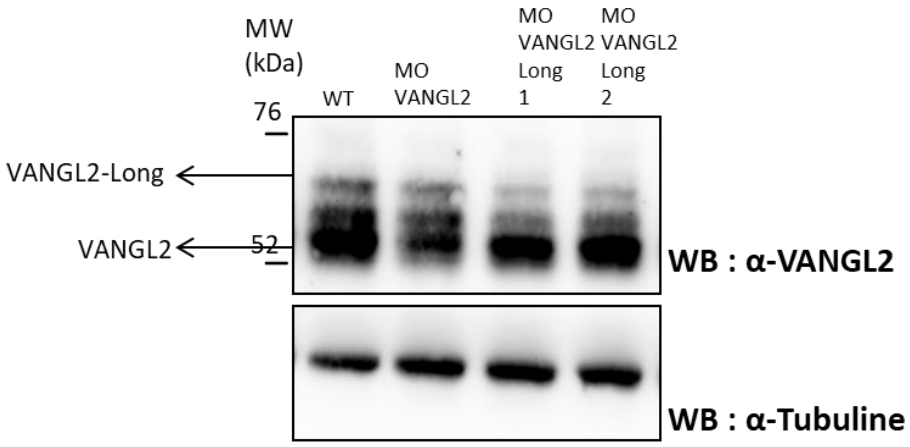
Ainsi, **VANGL2-Long pourrait être impliquée dans le trafic intracellulaire de VANGL2**. Cette isoforme longue, en exerçant sa fonction dans l'appareil de golgi, pourrait être impliquée dans le contrôle de l'export de VANGL2 de cet organite essentiel afin d'avoir la bonne quantité de VANGL2 à la membrane plasmique pour que le récepteur puisse exercer sa fonction.

J'ai ensuite cherché à connaître la contribution fonctionnelle de VANGL2-Long dans la voie de signalisation WNT/PCP. Cette voie gouverne les étapes précoces de développement embryonnaire chez le xénope. Ainsi, ne disposant pas d'un modèle expérimental simple et suffisamment robuste pour l'étude de cette

voie chez les mammifères, nous avons décidé de tirer avantage du **développement embryonnaire précoce chez le xénope (*Xenopus* laevis)** pour aborder la question de la fonction de VANGL2-Long dans cette voie de signalisation (collaboration avec l'équipe de L. Kodjabachian, IBDM, Marseille).

Un de nos anticorps anti-VANGL2 est capable de reconnaître les protéines VANGL2 et VANGL2-Long de xénope. Ceci m'a permis de mettre en évidence un **pic d'expression de VANGL2-Long au moment de la gastrulation et de la neurulation.**

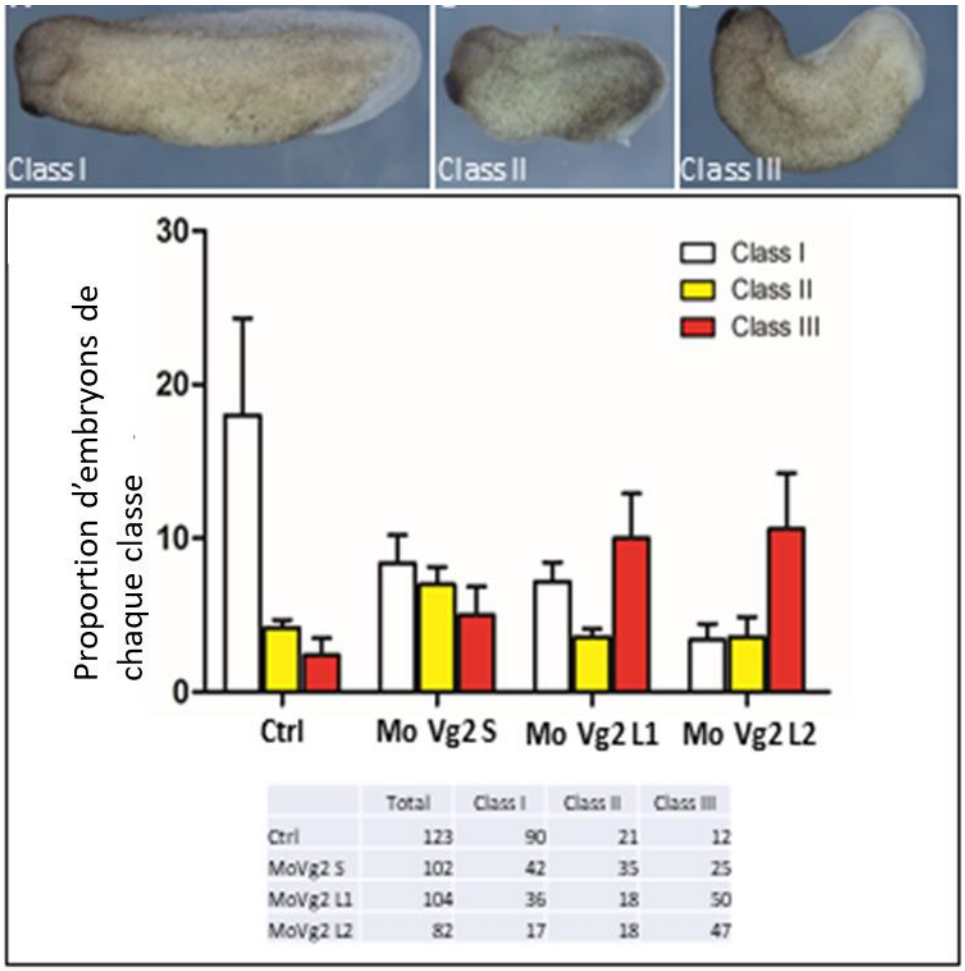
Deux morpholino-oligonucléotides (MO) (outil pour inactiver l'expression d'un gène) ciblant les régions 5' de l'ARNm *Vangl2* de xénope en amont de la méthionine initiatrice sont depuis peu disponibles au laboratoire. Ces MO ont pour but de bloquer spécifiquement l'expression de VANGL2-Long dans des embryons en cours de développement. Nous avons également à notre disposition un MO bloquant l'expression de VANGL2 (57,69). J'ai testé l'efficacité de ces nouveaux outils moléculaires. Mes résultats montrent que l'efficacité de ces MO dépend du stade de cellules des embryons dans lesquelles sont injectés les MO (stade deux cellules ou quatre cellules). Au stade deux cellules, les MO ciblant VANGL2-Long bloquent spécifiquement son expression et le MO ciblant VANGL2 diminue spécifiquement son expression sans altérer l'expression de VANGL2-Long (**Figure 23**).



<u>Figure 23 :</u> Test de l'efficacité des MO ciblant VANGL2/ VANGL2-Long.

Les embryons ont été injectés au stade deux cellules. WB réalisé avec les anticorps décrits dans la figure.

Ces MO sont des outils précieux pour étudier les conséquences phénotypiques de l'extinction de VANGL2 ou VANGL2-Long chez le xénope. L'élimination de VANGL2 grâce à un MO entraîne des problèmes de développement chez les embryons de xénope (57)(69). Ces problèmes de développement ont été classés en trois classes (69). Les embryons de la classe I présentent un phénotype normal, ceux de la classe II un défaut d'élongation et ceux de la classe III un défaut d'élongation auquel s'ajoute une anomalie de fermeture du tube neural. Nos résultats en collaboration avec l'équipe de L. Kodjabachian montrent que la **baisse d'expression de VANGL2-Long entraîne des problèmes de développement plus sévère (proportion d'embryons de classe III plus importante)** que quand l'expression de VANGL2 est bloquée (**Figure 24**).



	Total	Class I	Class II	Class III
Ctrl	123	90	21	12
MoVg2 S	102	42	35	25
MoVg2 L1	104	36	18	50
MoVg2 L2	82	17	18	47

<u>Figure 24 :</u> Conséquences phénotypiques de l'extinction de VANGL2 ou VANGL2-Long sur des embryons de xénope.

Ces résultats suggèrent le rôle éventuel de VANGL2-Long dans le **développement embryonnaire**. Cette protéine semble avoir un rôle important pendant la **gastrulation** et pourrait être essentielle pour la **fermeture tu tube neural**.

2. Caractérisation du complexe VANGL2 à la membrane en condition physiologique et pathologique

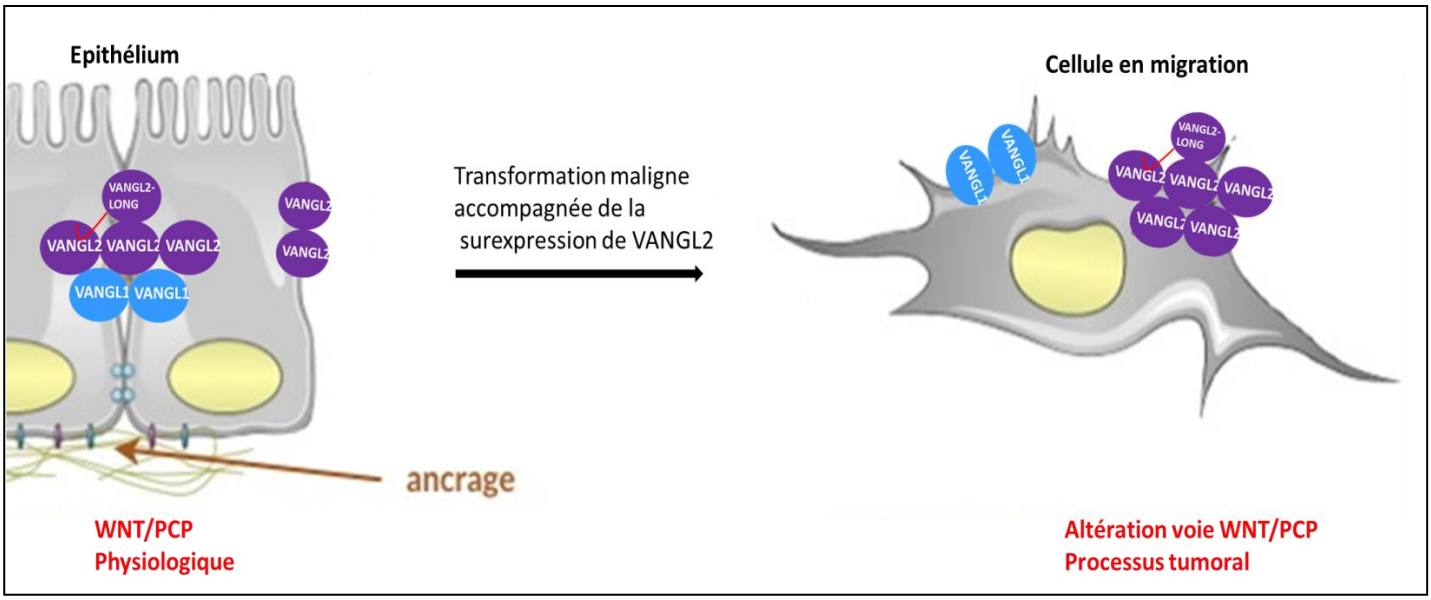
Comme mentionné au préalable, les protéines VANGL2 et VANGL2-Long interagissent physiquement entre elles et avec VANGL1. Nous nous sommes demandés si ces trois protéines font partie d'un seul et même complexe ou si elles forment trois complexes différents (VANGL1/VANGL2, VANGL1/VANGL2-Long, VANGL2/VANGL2-Long). Pour répondre à cette question, nous avons mis à profit la panoplie d'anticorps dont nous disposons contre VANGL1, VANGL2 et VANGL2-Long ainsi que le peptide qui a servi d'immunogène pour obtenir les anticorps anti-VANGL2-Long. Mes résultats indiquent que **VANGL1, VANGL2 et VANGL2-Long font partie d'un seul et même complexe protéique à la membrane plasmique.** Ainsi, **les trois**

membres de cette famille de protéines pourraient exercer leur fonction dans le cadre d'un complexe multimérique dont la composition moléculaire précise et la fonction restent à élucider.

Par une approche biochimique, j'ai pu déterminer qu'une molécule de VANGL2-Long est associée à 3 ou 4 molécules de VANGL2. Le nombre de molécules VANGL1 présentes dans le complexe reste à déterminer précisément, sachant qu'il est au minimum égal à un dans les cellules exprimant les deux paralogues, portant ainsi à 5 ou 6 le nombre de monomères présents dans le complexe. Cette organisation multimérique de VANGL1/2/2Long est en accord avec des données récentes issues du modèle drosophile estimant à 6 le nombre de molécules Van Gogh/Strabismus (homologue unique de VANGL2 chez la Drosophile) présentes dans les complexes de signalisation WNT/PCP de cet organisme (169). Ainsi, même si la diversité des sous-unités des complexes VANGL s'est accrue au cours de l'évolution, il est frappant de constater que **l'organisation multimérique est restée similaire, sinon identique, reflétant probablement une conservation structurale et fonctionnelle très élevée.**

Des données biochimiques obtenues très récemment en collaboration avec l'équipe de L. Kodjabakian chez le xénope, confirment l'expression très précoce de Vangl2 et de Vangl2-Long à des stades de développement pendant lesquels l'ARNm *Vangl1* est indétectable. En accord avec ces données transcriptomiques, nous avons observé que la protéine VANGL1 est absente du complexe VANGL2/VANGL2-Long pendant ces stades précoces de développement**. Ces résultats soulignent la plasticité du complexe VANGL1/2/2Long au cours du développement.**

J'ai également montré que la stœchiométrie de ce complexe est altérée lorsque VANGL2 est surexprimée dans des lignées cellulaires, déplaçant VANGL1 du complexe. J'ai confirmé ce résultat dans des xénogreffes dérivées de patientes (PDX, Patient Derived Xenograft) atteintes de tumeurs mammaires. **Ce complexe présente donc une plasticité également en condition pathologique (Figure 25).**



<u>Figure 25 :</u> Conséquence de la surexpression de VANGL2 sur la composition du complexe VANGL2.

Nous avons également démontré l'importance de la surexpression de VANGL2 (et donc probablement celle du changement de stœchiométrie du complexe) dans **l'organisation du tissu épithélial** grâce à un modèle de culture tridimensionnelle permettant la formation de cystes (monocouches de cellules épithéliales délimitant une lumière au niveau de leur face apicale).

C. DISCUSSION

L'objectif de mon D.E.S a été de mieux comprendre le **mode d'action de VANGL2** et sa contribution dans **le processus tumoral** afin de **définir des stratégies thérapeutiques** capables de bloquer son activité dans le futur.

J'ai caractérisé une nouvelle isoforme de VANGL2 (VANGL2-Long), plus longue d'une cinquantaine d'acides aminés que la forme majoritaire. J'ai montré que cette isoforme est **conservée au cours de l'évolution,** des amphibiens à l'homme, ce qui suggérait un rôle important dans la voie WNT/PCP et l'**embryogenèse**, et potentiellement **en cancérologie**. Mes travaux confirment cette importance car ils montrent que l'isoforme longue pourrait être impliquée dans le **trafic intracellulaire de VANGL2** et que la diminution de l'expression de cette isoforme entraîne des **anomalies de fermeture du tube neural** chez le xénope.

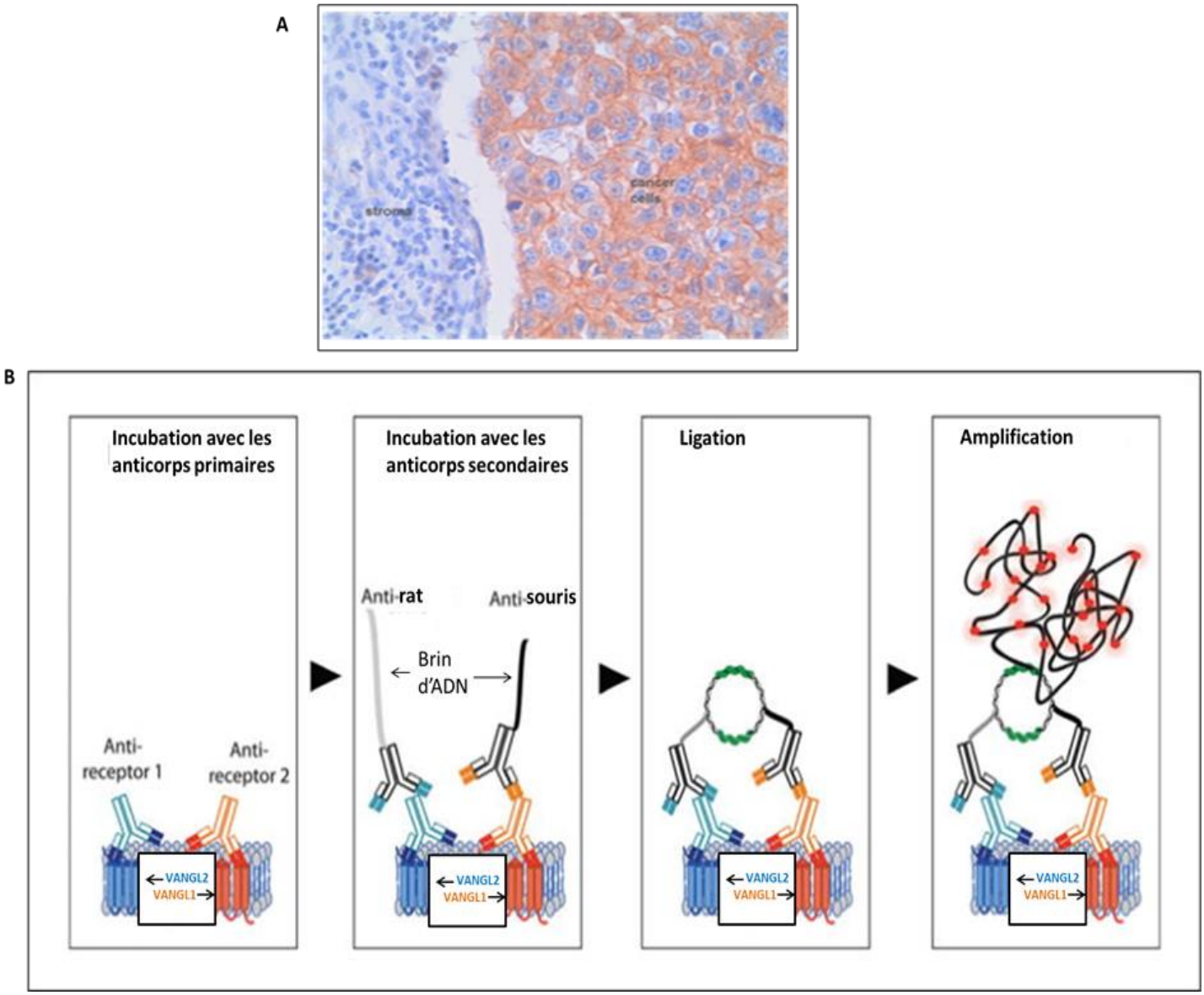
Ces anomalies de développement observées chez le xénope lorsque l'expression de la forme longue est diminuée pourraient être dues au fait que le trafic intracellulaire de VANGL2 ne peut pas bien se dérouler dans ces conditions. Chez l'homme, des mutations de VANGL2 ont été retrouvées chez des patients présentant des

anomalies de fermeture du tube neural (59). Il serait intéressant de savoir si des mutations au niveau des 48 premiers acides aminés de la partie N terminale de VANGL2-Long peuvent être responsables d'anomalie de fermeture du tube neural plus sévère, au même titre que ce que nous observons chez le xénope.

Le rôle important de VANGL2-Long dans le développement embryonnaire et la présence de VANGL2-Long dans des xénogreffes dérivées de patientes (PDX, Patient Derived Xenograft) atteintes de tumeurs mammaires (**Figure 18**) laissent supposer que les cellules cancéreuses peuvent détourner la fonction de cette protéine pour se développer à leur tour. Ainsi, il faudrait tester précisément l'implication de VANGL2-Long dans les phénomènes promigratoires et tumorogéniques par le biais de tests de migration (blessure/cicatrisation, tests en chambre de Boyden) et en étudiant le rôle de VANGL2-Long dans la croissance tumorale *in vitro* et *in vivo* (soft agar assay, xénogreffe à la souris immunodéprimée).

Par ailleurs, j'ai démontré **l'organisation supramoléculaire de VANGL2** qui conditionne très probablement le mode d'action de ce récepteur à la membrane plasmique, en particulier sa signalisation cellulaire. Ainsi, mes travaux abordent pour la première fois, par des approches biochimiques, la description du complexe membranaire formé par VANGL2, son isoforme VANGL2-Long et VANGL1. Loin de la représentation classique que l'on en fait, le récepteur VANGL2 ne fonctionnerait donc pas sous forme de monomère mais d'oligomère et aurait donc besoin d'être dans un complexe à plusieurs sous-unités pour exercer ses fonctions cellulaires à la membrane plasmique. J'ai montré aussi que la stœchiométrie de ce complexe est altérée lorsque VANGL2 est surexprimée dans les cancers, déplaçant VANGL1 du complexe.

Ce changement de stœchiométrie pourrait être déterminant pour la croissance tumorale et/ou la dissémination de la tumeur et donc pourrait en partie expliquer l'effet délétère de la surexpression de VANGL2 dans les cancers du sein de type basal. La technique de « proximity Ligation Assay » (PLA) VANGL1/VANGL2 sur coupes de tumeurs mammaires de type basal et une corrélation des résultats obtenus au pronostic des patients pourraient être un moyen de tester cette hypothèse. Le PLA est une technique qui permet de détecter l'interaction directe entre deux protéines dans des cellules ou des tissus grâce à des anticorps spécifiques de ces protéines. Ces anticorps primaires seront reconnus par des anticorps secondaires couplés à un brin d'ADN permettant la formation d'un ADN circulaire par l'action d'une ligase et par une étape d'amplification grâce à des oligonucléotides fluorescents. Nos anticorps **anti-VANGL1 et VANGL2 fonctionnent en immunohistochimie** (**Figure 26**). Ainsi, il faudrait réaliser des expériences de **PLA sur des coupes de tumeurs basales** qui expriment VANGL1 et qui surexpriment différents niveaux de VANGL2. Le but est de confirmer que la surexpression de VANGL2 déplace l'interaction VANGL1/VANGL2 favorisant la formation d'oligomères VANGL2, comme je l'ai montré par une approche biochimique dans des lignées cellulaires et PDXs.



<u>Figure 26 :</u> Expérience d'Immunohistochimie (IHC) avec l'anticorps anti-VANGL2 et de PLA avec les anticorps anti-VANGL1/2. *Adapté de Ivone Gomes et al, Curr Protoc Pharmacol. 2018*

A L'anticorps anti-VANGL2 fonctionne en IHC. Le niveau d'expression de VANGL2 est élevé dans les cellules cancéreuses et absent dans les cellules stromales dans cet échantillon de tumeur mammaire (cancer du sein basal).

B Représentation schématique de la méthode PLA.

VANGL2 pourrait faire l'objet d'un développement en tant que **biomarqueur** si son expression protéique est corrélée, comme nous l'avons montré pour son ARNm, au pronostic des patientes atteintes de cancer du sein de type basal. Mon équipe a d'ailleurs développé un test immunohistochimique à l'aide de notre anticorps anti-VANGL2 (sous licence Millipore) validé en immunohistochimie. La technique PLA me permettra de conclure à l'avantage éventuel en clinique de mesurer non pas uniquement l'expression de VANGL2 mais également son interaction avec VANGL1.

Comprendre le mécanisme d'action de VANGL2 ainsi que le retentissement que sa dérégulation provoque sur les voies de signalisation oncogéniques permettra d'élaborer de futures stratégies thérapeutiques. Ces

dernières seront développées dans le but de bloquer sa fonction dans les cellules tumorales afin de permettre *in fine* une prise en charge de type **médecine personnalisée.**

D. MATERIELS ET METHODES

1. Biochimie

a. Western blot

Pour obtenir les échantillons protéiques, il faut réaliser au préalable une étape de lyse cellulaire. Ainsi, les cellules sont lavées en PBS 1X (Phosphate Buffered Saline) (Life technologies Gibco ®), puis lysées dans un tampon de lyse (Hépès 50 mM pH 8, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM, 10% glycérol, 0,5 % NP40) supplémenté extemporanément d'inhibiteurs de protéases (PIC, Protease Inhibitors Cocktail, Sigma® au 1/1000).

Les lysats totaux sont ensuite centrifugés à 13 000 rpm pendant 15 minutes à 4°C. Les surnageants contenant les protéines sont récupérés. La concentration protéique des surnageants récupérés est déterminée par un dosage de Bradford (Biorad®) à l'aide d'une gamme étalon (0 à 10 µg) de BSA (Bovine Serum Albumine, Sigma®). 50 µg de chacun des échantillons protéiques sont dénaturés dans du tampon de charge Laemmli 4X (Glycérol 20 %, SDS 8%, 0,44 M 2-Mercaptoethanol, bleu bromophenol 0,008 %, 1M Tris HCL, pH 6.8) 10 minutes à 95°C, puis chargés sur un gel SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate – PolyAcrylamide Gel Electrophoresis). L'extrait est dans un premier temps concentré sur le gel de concentration (stacking : polyacrylamide 4,5 %, Tris 125 mM Ph 6,8, SDS 0,1 %, APS 0,05%, Temed 0,9 mM) puis les protéines sont séparées sur le gel de séparation (resolving : polyacrylamide 7,5%, Tris 375 mM pH 8,8, SDS 0,1%, APS 0,05 % , Temed 0,9 mM). Pour avoir une meilleure séparation entre l'isoforme longue et l'isoforme classique de Vangl 2, des gels précoulés (NuPAGE ® Bis- Tris Midi Gel) avec une concentration de polyacrylamide : gradient 4-12 % sont utilisés.

Les protéines se séparent sur le gel dans un tampon de migration (Tris Glycine 1X, SDS 0.1%) à 80 Volts pendant 15 minutes et 1h à 150 Volts. Les protéines sont électrotransférées à 70 Volts pendant 1h à température ambiante sur une membrane de nitrocellulose (GEhealthcare, Life Sciences®) dans un tampon de transfert (70% H20 , 20% Ethanol, 1X Tris Glycine).

L'efficacité du transfert est vérifiée par coloration de la membrane au rouge Ponceau puis décoloration au TBS 1X, 0,01 % Tween. La membrane est saturée dans du TBS 1X, 0,01 % Tween, 5% lait afin de bloquer les sites non spécifiques avant d'être incubée toute la nuit dans l'anticorps primaire à la dilution appropriée en TBS 1X, 0,01 % Tween, 5% lait à 4°C sur plaque agitatrice. Après 3 lavages de 5 min à température ambiante sur plaque agitatrice avec du TBS 1X, Tween 0,01%, la membrane est incubée 1h dans l'anticorps secondaire

(1/10000ème en TBS Tween + 5% lait) couplé à la HRP (Horse radish peroxydase, Dako®) à température ambiante. La membrane est lavée 3 fois 5 minutes dans du TBS 1X, 0,01 % Tween. Les protéines sont révélées avec le kit ECL (ElectroChimie Luminescence, Super Signal West Pico), substrat de la péroxydase et analysées avec l'imageur (Gbox, logiciel GENEsys).

Anticorps utilisés : anticorps primaires : Anticorps α-VANGL2-Long Polyclonal lapin produit au laboratoire dilution 1/300 ; Anticorps α-Vangl 36E3 Monoclonal rat Produit au laboratoire dilution 1/5000 ; Anticorps α-GFP Monoclonal souris Roche® dilution 1/3000.

b. Immunoprécipitation

Les cellules sont lysées dans un tampon de lyse non dénaturant qui permet de laisser les protéines dans leur conformation native (Hépès 50 mM pH 8, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM,, 10% glycérol, 0,5 % NP40).

Préparation des billes d'agarose couplées à protéine G/A : les billes du mélange (2/3 billes 1/3 ethanol) sont remises en suspension. 25 µl de billes sont prélevés pour chaque échantillon et gardés dans de la glace. Les billes sont lavées deux fois avec 500 µl de tampon de lyse et centrifugées à 2000 rpm 1 min à 4°C.

1 µg à 5 µg selon les anticorps primaires sont rajoutés. Le mélange anticorps/billes est incubé pour 2h à 4°C sur une roue agitatrice puis centrifugé à 2000 rpm pendant 1 minute puis le surnageant est jeté. Les billes couplées à l'anticorps sont ensuite lavées avec 1 ml de tampon de lyse.

Après cette étape de lavage, 300 à 500 µg de lysat cellulaire (protéines ectopiques) ou 1 mg (protéines endogènes) sont ajoutés au culot de billes dans un volume final de 1 ml. Ce mélange lysat/billes/anticorps est incubé à 4°C toute la nuit sur roue agitatrice. Les échantillons sont ensuite centrifugés à 2000 rpm pendant 1 minute. Le surnageant est jeté. Les billes sont lavées 5 fois avec 1ml de tampon de lyse.

Le complexe antigène anticorps est ensuite élué des billes et dénaturé en chauffant les échantillons 10 minutes à 95°C dans 30 µl de tampon de charge 2X (Glycérol 10 %, SDS 4%, 0,22 M 2-Mercaptoethanol, bleu bromophenol 0,008 %, 0,5M Tris HCL pH 6.8). Le contenu des échantillons est analysé par Western Blot comme décrit précédemment après migration sur gel acrylamide SDS-PAGE.

2. Biologie cellulaire

a. Lignées cellulaires et culture

Cinq lignées ont été utilisées. Des cellules SKBR7 sont des cellules épithéliales humaines de carcinome mammaire (mésenchymal). Le milieu de culture contient du RPMI 1640 (Gibco®, Life technologies) avec 10 % de sérum de veau fœtal (FCS, Eurobio®) décomplémenté 30 min à 56°C et 1% de Penicilline-Streptomycine (10000 U/mL de penicilline et 10000 µg/mL de streptomycine (Gibco®, Life technologies).

Les cellules IMCD3 sont des cellules épithéliales murines de rein. Le milieu de culture contient du DMEM/F12 (50 % Dulbecco's Modified Eagle Medium, 50 % Ham's F12) (Gibco®, Life technologies) supplémenté en Glutamax™ (Gibco®, Life technologies) avec 10 % de sérum de veau fœtal décomplémenté et 1% de Penicilline-Streptomycine.

Les cellules SUM149 sont des cellules épithéliales humaines de carcinome mammaire (basal). Le milieu de culture contient du F12 (Gibco®, Life technologies) supplémenté en Glutamax™ (Gibco®, Life technologies) avec 5 % de sérum de veau fœtal décomplémenté, 1% de Penicilline-Streptomycine, 5ml de NEAA (100x), de l'Insuline (28,57 UI), 250 µl d'hydrocortisone (0,5mg), 100 µl de gentamycine (0,1 mg dans 500 ml de solution).

Les cellules ARPE19 sont des cellules épithéliales humaines de rétine. Le milieu de culture contient du DMEM/F12 (50 % Dulbecco's Modified Eagle Medium, 50 % Ham's F12) (Gibco®, Life technologies) supplémenté en Insuline-Transferrine-Selenium 1X (Gibco®, Life technologies) avec 10 % de sérum de veau fœtal décomplémenté et 1% de Penicilline-Streptomycine.

Les cellules HEK293T sont des cellules épithéliales humaines de rein embryonnaire. Le milieu de culture contient du DMEM supplémenté de 10 % de sérum de veau fœtal décomplémenté ainsi que 1 % Penicilline-Streptomycine.

Ces différentes lignées sont cultivées en milieu humide à 37°C avec 5 % de CO_2.

b. Transfection des cellules

Des cellules HEK293T sont mises en culture pendant 24h dans les conditions présentées ci-dessus dans des boîtes de 10cm de diamètre. Au bout de 24h (60% confluence), les cellules peuvent être transfectées. Le milieu réactionnel nécessaire à la transfection des cellules est un mélange composé de : 6µg d'ADN plasmidique pour une boîte de 10 cm ainsi que de 18 µl de PEI (polyéthylènimine, agent polycationique englobant l'ADN, Santa Cruz®) et de 200 µL de opti-MEM (Gibco®, Life technologies). Après 20 minutes d'incubation, ce mélange est ajouté au milieu de culture des cellules à transfecter. Le pic de transfection est généralement observé 48 à 72h après transfection.

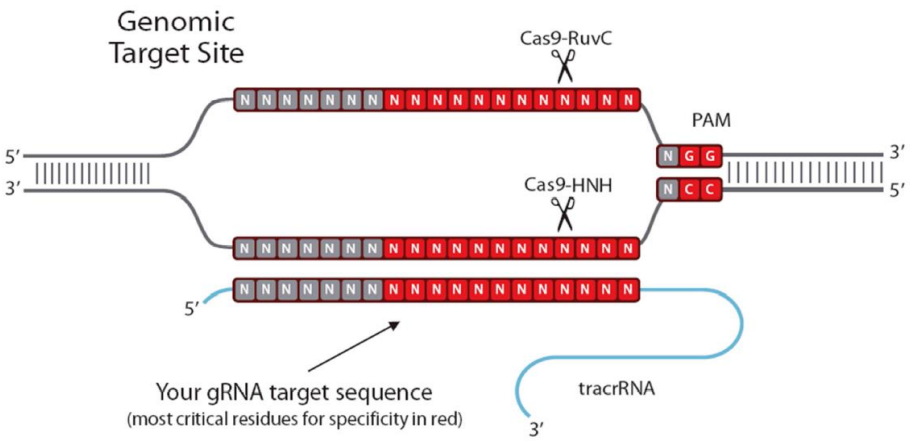
Des cellules IMCD3 sont mises en culture pendant 48 h dans les conditions présentées ci-dessus dans des boîtes 6 puits. Au bout de 24 heures (60% confluence), les cellules peuvent être transfectées. Le milieu réactionnel nécessaire à la transfection des cellules est un mélange composé de : 1,5 µg d'ADN plasmidique pour un puit ainsi que de 6 µL de Lipofectamine LTX (Invitrogen®) et de 1,5 µL du réactif PLUS™. Après 5 minutes d'incubation, ce mélange est ajouté au milieu de culture des cellules à transfecter. Le pic de transfection est généralement observé 48 après transfection. Les lignées stables sont obtenues en sélectionnant les cellules transfectées pendant 3 semaines avec de la généticine à la concentration de 1 mg/ml (Gibco®, Life technologies).

Plasmides et constructions : pEGFP/GFP-Vangl1 : 1,6 µg/µL, pcDNA3/Vangl2-Long : 2,1 µg/µL, pcDNA3/Vangl2 : 1 µg/µL, pcDNA3-HA3 : 0.57 µg/µL, pcDNA3-mCherry : 0,51 µg/µL, pEGFP/GFP-Vangl2 : 4,5 µg/µL, pEGFP/GFP-Vangl2-Long : 920 ng/µL, Streptavidine-KDEL_SBP-EGFP-VANGL2 (plasmide Rush) : 6,5 µg/µL, Streptavidine-KDEL_SBP-EGFP-VANGL2-Long (plasmide Rush) : 2,4 µg/µL.

3. Technologie Crispr/Cas 9

a. Biologie moléculaire

Le design d'ARNs guides pour les constructions CrispR ciblant le gène VANGL2 murin a été réalisé par la société LifeTech. Deux séquences ciblant, respectivement, les exons 2 et 4 ont été choisies (Séquence Exon2 : 5'-TCGGGCTATTCCTACAAGTC-3' ; Séquence Exon4 : TGATGACCTCACGCGCATCG-3'). Des oligonucléotides complémentaires ont été appariés et clonés dans le vecteur pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458) (Addgene) par Eric Bailly. Dans ce système, l'endonucléase Cas9 génère une cassure double brin trois nucléotides avant le site PAM (Protospacer Adjacent Motif) qui est immédiatement adjacent à la séquence de l'ARNg. (**Figure 27**). L'ARNg est transcrit grâce au promoteur hU6 alors que l'endonucléase Cas 9 et la GFP sont transcrits grâce au promoteur CBh. Le plasmide comprend également une cassette de résistance à l'ampicilline pour la sélection des bactéries transformées.



<u>Figure 27 :</u> Schéma de la cassure double-brin ciblée par le système CRISPR/cas9.
(Source : Sigma-Aldrich site web)

b. Transfection, sélection et isolation clonale des IMCD3 GFP+

La transfection des cellules IMCD3 a été faite par électroporation. Cette technique permet l'introduction de macromolécules dans des cellules soumises à une dépolarisation de la membrane induite par un champ électrique. Les cellules cultivées sont lavées avec du PBS, décollées à la trypsine (1ml à 0,05%) et comptées. Pour chaque transfection avec le kit Amaxa®, 2 millions de cellules sont mélangées à 2 µg de plasmide PX458 CrispR exon 2 ou Exon 4 et à 100 µl de Cell Line Nucleofactor Solution V. Le mélange est ensuite mis dans la cuvette et électroporé suivant le programme T-020 pour les IMCD3. Les cellules sont remises en culture.

48 heures après, l'efficacité de transfection des cellules IMCD3 (Cellules GFP +) a été observée à l'aide d'un microscope inversé (Evos). Les cellules GFP + ont été soumises à un tri par FACS quatre jours après la transfection et transférées dans deux plaques 96 puits à raison d'une cellule par puits. Les clones capables de former une colonie après 4 semaines de culture ont été transférés successivement dans des plaques 12 puits puis 6 puits avant d'être analysés en Western Blot pour la perte d'expresson de Vangl2.

4. Imagerie

a. Immunofluorescence (Cellules fixées)

Les cellules sont ensemencées sur des lamelles de verre préalablement recouvertes de collagène 10 % acide acétique 0,2 % pendant 24h à 4°C. Les cellules sont incubées à 37°C 5% de CO_2 jusqu'à ce qu'elles soient confluentes. Elles sont ensuite fixées avec une solution de paraformaldéhyde 4 % en PBS 1X pendant 15 minutes à température ambiante, lavées avec du PBS 3 fois puis perméabilisées avec une solution de Triton-X100 à 0,4 % pendant 20 minutes à température ambiante. Après trois lavages au PBS 1X, les cellules sont incubées avec une solution de BSA 3% en PBS 1X, pendant 1h à température ambiante. Les cellules sont ensuite incubées en présence d'anticorps primaire dilué dans du PBS 1X/BSA 3% toute la nuit. Enfin, après trois lavages au PBS 1X, les cellules sont incubées 1 heure à température ambiante à l'obscurité avec un anticorps secondaire couplé aux fluorochromes Alexa 488, 546 et 647 (Life technologies®).

Après trois lavages au PBS 1X, les lamelles sont ensuite montées sur des lames de verre dans un milieu de montage (Fluorescent mouting medium, Dako). Les cellules sont observées par microscopie confocale (LSM 880, Logiciel Zen).

Anticorps utilisés : Anticorps primaires-Anticorps α-5'Nter Polyclonal lapin produit au laboratoire dilution 1/200 ; Anticorps α-Vangl2 2G4 Monoclonal rat Produit au laboratoire dilution 1/500 ; Anticorps α-GM 130 Monoclonal souris BD biosciences® dilution 1/500 ; Anticorps α-E-Cadhérine Polyclonal chèvre R&D Systems ® dilution 1/500.

b. Cellules vivantes (Live)

Des cellules IMCD3 sont ensemencées sur des boîtes de Petri fond verre 35 mm (ibidi®), préalablement recouvertes de collagène (collagène 10 % acide acétique 0,2 %) pendant 24h à 4°C, un jour avant la transfection. Au moment de la transfection, pour neutraliser la Biotine présente dans le milieu de culture et dans le milieu de transfection, il est nécessaire d'ajouter 0.4x10-8 mol/L de Neutravidine (Thermo Scientific™) dans le DMEM/F12 et 10-7 mol/L dans l'Opti-MEM. 48 H après la transfection de RUSH-VANGL2/VANGL2-Long, le milieu est changé et de la D-Biotine (Sigma-Aldrich) à la concentration finale de 100 µM est introduite. L'acquisition en temps réel (« Time lapse ») et sur différents plans (« z-stack ») est réalisée à 37°C au microscope Confocal Spinning Disk (Nikon) avec l'objectif 100X. Les images brutes sont traitées avec le logiciel MetaMorph puis analysées avec Imaje J.

CHAPITRE III : CIBLAGE DE LA VOIE DE SIGNALISATION WNT

I. THERAPIES CIBLEES EN DEVELOPPEMENT

A. ANTICORPS MONOCLONAUX NON COUPLES (« NUS »)

1. Principe

Les **anticorps monoclonaux** sont capables de reconnaître sélectivement les cellules cancéreuses et de s'y fixer, mais ils ne **peuvent pas traverser la membrane cellulaire.** Plus précisément, l'anticorps se lie au **ligand** (le ligand spécifique, souvent un facteur de croissance, ne pourra pas se fixer au domaine de liaison du récepteur), ou au **récepteur** (le ligand ne pourra pas se lier au récepteur car le site de liaison du récepteur n'est plus accessible).

Les anticorps monoclonaux utilisés en oncologie sont capables de se lier spécifiquement à un **antigène tumoral.** La plupart des anticorps monoclonaux thérapeutiques sont des **IgG** composées de deux portions : la première dénommée **Fab fixe l'antigène**, la seconde, dite portion **Fc**, est responsable des **propriétés effectrices** et **pharmacocinétiques** de l'anticorps (recrutement des effecteurs du système immunitaire après fixation sur un antigène spécifique formant alors ce qu'on appelle un **complexe immun**).

Ils bloquent l'action de l'antigène tumoral ce qui inhibe la croissance tumorale. Pour cela, il existe différents mécanismes d'actions. Ils peuvent en effet agir principalement par effet **neutralisant**, **antagoniste**, **cytolytique** (en recrutant les effecteurs immunitaires) ou par **internalisation des récepteurs de surface.**

Les anticorps neutralisants se fixent sur un **antigène soluble** tel qu'une cytokine, dont ils inhibent l'action en empêchant alors l'interaction entre ces molécules et leur cible cellulaire (ex : bevacizumab (Avastin® anti-vascular endothelial growth factor (anti-VEGF)).

Les anticorps antagonistes ciblent spécifiquement un **récepteur membranaire** et bloquent la liaison de son ou de ses ligands et donc son fonctionnement (ex : trastuzumab (Herceptin®, anti-HER2)).

Les anticorps cytolytiques se fixent sur un **antigène membranaire**, entraînant un **effet cytotoxique** pour la cellule cible. Cet effet peut résulter de la capacité de l'anticorps à activer la **voie classique du complément** jusqu'au complexe d'attaque membranaire (**CDC** : Complement Dependant Cytotoxicity). Ils peuvent aussi recruter des cellules cytotoxiques/phagocytaires (cellules NK, macrophages, polynucléaires,

lymphocyte T) tuant leur cible par un mécanisme de cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (**ADCC :** Antibody Dependant Cellular Cytotoxicity). Les anticorps antagonistes peuvent donc aussi se révéler cytotoxiques.

L'internalisation de récepteurs de surface provoquée par les anticorps monoclonaux entraîne leur dégradation et inhibe les voies de transduction des signaux activées par ces derniers (ex : cetuximab (Erbitux ®, anti-EGFR)).

Les anticorps monoclonaux sont des anticorps produits en laboratoire, à partir d'un clone de cellule (d'où le terme monoclonal). Ensuite, grâce au développement de l'ingénierie des anticorps, des **anticorps monoclonaux chimériques, humanisés ou humains sont produits en grande quantité**.

Les anticorps monoclonaux utilisés pour cibler la voie Wnt en phase d'essais cliniques présentent pour la plupart une **grande spécificité** pour la molécule ciblée et une **longue demi-vie.** Ils sont également tous administrés par voie parentérale.

2. Vantictumab (OMP-18R5) (cible : FRIZZLED 7)

Le **Vantictumab (OMP-18R5)** est un anticorps humanisé développé par OncoMed Pharmaceuticals. Il est dirigé contre **Frizzled 7.** Cependant, il a été découvert que cet anticorps interagit également avec Frizzled 1,2,5,7 et 8 (170).

Au sein d'une **étude préclinique**, il a été montré que le Vantictumab inhibe la croissance de la moitié des tumeurs mammaires xénogreffées (170). Un effet synergique a été observé lors de l'association du Vantictumab avec le Paclitaxel. Le Vantictumab a également permis de diminuer par trois la fréquence d'apparition de cellules souches cancéreuses. Enfin, l'association avec le paclitaxel a permis de diminuer par dix la tumorigénicité des tumeurs mammaires xénogreffées.

Plusieurs études de **phase 1** évaluant cet anticorps ont eu lieu **(Tableau 5).** Les résultats d'une étude de phase I du Vantictumab chez des patients présentant des **tumeurs solides** ont été reportés lors de l'ASCO en Juin 2013 (102). Les effets indésirables les plus fréquents étaient des vomissements, nausées et fatigues de grade 1 (légers) et 2 (modérés). Un patient a également souffert d'une fracture de grade 2. Cet effet est probablement dû à l'importance de la voie Wnt/β-caténine dans l'homéostasie des tissus osseux. Ce patient avait un taux de Télopeptides C terminaux du collagène de type I (β-CTX, marqueur biologique de remodelage osseux) quatre fois supérieur à la valeur normale. Ainsi, une mesure de sécurité a été instaurée : chaque patient avec un taux de CTX deux fois plus élevé que la valeur normale a reçu de l'acide zolédronique (bisphosphonate ; inhibiteur de la résorption ostéoclastique osseuse).

Au cours de l'ASCO 2016, les premiers résultats d'une étude de phase Ib du Vantictumab, en combinaison avec le paclitaxel, en première ou troisième intention, chez des patientes atteintes de **cancer du sein métastatique HER2 négatif** ont été présentés (171). 23 patientes ont été traitées. Le Vantictumab n'a pas

augmenté la toxicité du paclitaxel et les effets indésirables les plus communs étaient des troubles digestifs. Aucune fracture n'a été reportée grâce à la mesure de sécurité instaurée. Sur 21 patientes, patientes pour qui l'évaluation clinique était possible, 33 % ont eu une réponse partielle (diminution d'au moins 30 % de la somme des plus grands diamètres de chaque lésion cible, en prenant pour référence la somme initiale des plus grands diamètres ; source : Recist nouvelles recommandations) et 29 % une stabilisation de leur maladie. La conclusion de cet essai est que le Vantictumab est **bien toléré** en combinaison avec le paclitaxel. La **toxicité** osseuse est bien **contrôlée** grâce à l'administration d'acide zoledronique le cas échéant. Ce nouveau médicament, en association avec le paclitaxel, pourrait améliorer la réponse des tumeurs mammaires qui répondent faiblement à la chimiothérapie seule. Afin de mieux choisir les patientes éligibles pour l'association paclitaxel/Vantictumab, un **biomarqueur** est en ce moment évalué dans un essai de phase I. Lors des essais précliniques, cet signature a permis de distinguer avec 100 % de sensitivité et de spécificité les souris xénogreffées répondeuses des non répondeuses (172).

B. ANTICORPS MONOCLONAUX COUPLES

1. Principe

Les progrès de l'ingénierie génétique et de l'immunologie ont permis de développer de nouveaux types d'anticorps monoclonaux dont les **anticorps immunoconjugués.**

L'anticorps est couplé à une **substance active** : toxine, **médicament (ADC/Antibody Drug Conjugate),** enzyme, **isotype radiocactif (radioimmunoconjugués)** et une fois l'anticorps parvenu à destination, cette substance est alors libérée au cœur des cellules tumorales, **limitant l'impact de la substance active sur les cellules saines.** Le concept est simple : combiner la spécificité de l'anticorps à la puissance d'un composé hautement cytotoxique. Ce concept de couplage peut être considéré comme un moyen de conférer à des drogues trop toxiques pour être utilisables chez l'homme une sélectivité pour les cellules tumorales, ou bien renforcer la puissance d'anticorps ayant une faible activité tumorale intrinsèque. La classe thérapeutique des ADC est en plein essor et deux succès sont déjà répertoriés : Adcetris ®, un anticorps anti-CD30 couplé à l'auristatine dans le traitement des lymphomes réfractaires ou récidivants approuvé en août 2011 aux états unis et par l'EMA en octobre 2012 et **Kadcyla ®,** un anticorps dérivé de l'Herceptin ® où le trastuzumab est conjugué à l'emtansine, efficace dans **le cancer du sein métastatique** approuvé en 2013 aux Etats unis, en Europe et au Japon.

2. PF-06647020 (PF-7020) (cible : PTK7)

PF-06647020 (PF-7020) est un **anticorps monoclonal humanisé anti PTK7** couplé à l'**auristatine** développé par Pfizer. Les résultats de l'étude de phase I ont été reportés lors de l'ASCO 2018 (173). Des résultats prometteurs ont été observés quant à l'utilisation de ce composé en monothérapie sur des patients atteints de tumeurs solides (cancer de l'ovaire, cancer du poumon non à petites cellules, cancer du sein triple négatif) résistantes aux traitements standards. En effet, tout d'abord, ce médicament présente une **bonne tolérance.** La majorité des effets indésirables reportés étaient spontanément résolutifs et n'ont pas nécessité d'intervention.

De plus, des résultats encourageants en ce qui concerne l'**efficacité** de ce composé ont été constatés : une réponse de 50 % pour le cancer du sein triple négatif et une réponse complète pour une patiente présentant une tumeur ovarienne qui avait été traitée au préalable par de nombreuses chimiothérapies avec des sels de platines.

C. PROTEINES DE FUSION

1. Principe

Les protéines de fusion résultent généralement de la fusion génétique des **parties extracellulaires de différents récepteurs** à la **partie Fc d'une IgG**. Le but final étant de piéger un ligand ou une cellule impliquée dans une pathologie.

2. ipafricept (OMP-54F28) (cible : FRIZZLED 8)

L'ipafricept (OMP-54F28) (co-développé par OncoMed et Bayer) est un **récepteur FRIZZLED 8 tronqué** fusionné à la partie Fc d'une IgG 1. Ainsi, le ligand Wnt se fixera sur cette protéine de fusion au lieu de se fixer sur le récepteur FRIZZLED 8 natif. Ce composé est donc un antagoniste de la voie Wnt/ β-caténine. Il a été montré qu'il inhibe la voie Wnt et la croissance tumorale dans un modèle de souris avec des tumeurs mammaires induites (96). Vu l'efficacité de ce composé lors des essais précliniques, une phase I d'essai clinique évaluant la toxicité d'OMP-54F28 sur des patients avec des tumeurs solides avancées a été entreprise. Les principaux effets indésirables répertoriés ont été : dysgueusie, fatigue, spasmes musculaires, diminution de l'appétit, nausées et vomissements. Pour limiter la toxicité osseuse, comme pour le Vancitumab, il a été recommandé lors de cet essai d'administrer de l'acide zolédronique aux patients avec un taux de β-CTX deux fois supérieur à la valeur normale (174).

D. PETITES MOLECULES

1. Principe

Les petites molécules sont des molécules inhibitrices qui traversent la membrane plasmique pour agir au **niveau intracellulaire** et inhiber, le plus souvent, une **enzyme** qui stimule la prolifération des cellules cancéreuses. Elles peuvent aussi inhiber une **interaction entre deux protéines** responsables d'une cascade d'activation des processus cancéreux à l'intérieur de la cellule.

2. Inhibiteurs de Porcupine

Les ligands Wnt ont besoin d'être **palmitoylés dans le réticulum endoplasmique** pour exercer leur fonction et pour être sécrétés à l'extérieur de la cellule. Cette palmitylation se fait par une acyltransférase appelée **Porcupine** (175). Ainsi, l'enzyme Porcupine est une **cible thérapeutique potentielle**. Le premier inhibiteur de Porcupine a été identifié en 2009 grâce à un screening d'une librairie de composés chimiques synthétiques (176).

LGK974 (WNT974), développé par Novartis, a été le premier inhibiteur de Porcupine à entrer en phase d'essais cliniques. Les **études précliniques** ont montré, grâce à l'utilisation d'un modèle murin présentant des tumeurs induites par Wnt, qu'une dose de 3 mg par kg pendant 14 jours était suffisante pour causer une régression de la croissance tumorale de 63 %. Cependant, avec une dose de 20 mg par kg pendant 14 jours, une altération de l'épithélium intestinal des rats a été notée (177). De plus, une combinaison thérapeutique composée de LGK974, de cetuximab (inhibiteur d'EGFR) et de LGX818 (inhibiteur de BRAF) a prouvé son efficacité pour diminuer la prolifération des cellules tumorales dans un modèle de xénogreffes dérivées de patients (PDX, Patient Derived Xenograft) atteints de tumeurs colorectales avec **mutation de BRAF**. BRAF est une protéine qui joue un rôle central dans la croissance et la survie des cellules cancéreuses. Elle est mutée chez la majorité des patients ayant un mélanome et chez une minorité de patients ayant un cancer du côlon, du sein, et des poumons. Une étude de phase I/ II évaluant cette combinaison thérapeutique sur des patients présentant un **cancer colorectal métastatique avec mutation de BRAF** est en cours. Aucun résultat n'a été reporté à ce jour.

ETC-159 (ETC-1922159) est un autre inhibiteur de Porcupine qui bloque la sécrétion et l'activité de tous les ligands Wnt. ETC 159 est efficace sur les xénogreffes dérivées de patients (PDX, Patient Derived Xenograft) atteints de tumeurs colorectales avec translocation de R-spondine (activateur de la signalisation Wnt) (178). Dans un modèle murin de cancer du sein, il a été montré qu'ETC-159 inhibe la croissance tumorale de 52 % (pour une dose de 1 mg/kg) et 78 % (pour une dose de 3 mg/kg). À ces doses, il n'y avait pas

de signe de toxicité et peu d'effet sur le poids des souris(178). Cet inhibiteur est en phase I d'essai clinique depuis juillet 2015. 10 patients avec tumeurs solides ont été recrutés (9 cancers colorectaux et un cancer du rein). Pour le moment, le seul résultat reporté est que 2 patients présentent une maladie stable (la tumeur est restée de la même taille et aucune autre tumeur n'est apparue)(179).

3. Agonistes de WNT5A

Foxy-5 est un peptide formylé, actuellement en phase 1 d'essai clinique, qui reproduit les effets de **WNT 5A.** Comme mentionné précédemment, il a été montré que WNT5A peut agir comme **suppresseur de tumeur** dans certaines situations et que sa perte d'expression a été associée à une augmentation du risque de métastase dans le cancer du sein (180). Ce composé est en phase I d'essai clinique sur des patients atteints de cancer du sein métastatique, de cancer du côlon et de cancer de la prostate (101). Les tumeurs de ces patients ont une **expression de WNT 5A faible ou négative.** Les premiers résultats reportés montrent une bonne tolérance de Foxy-5 (179).

Les patients qui pourraient bénéficier de cette thérapie devront être sélectionnés avec de grandes précautions car WNT5A participe à la croissance tumorale dans certains cancers.

De plus, l'utilité de cette thérapie peut être controversée en ce qui concerne les cancers du côlon ou de la prostate. En effet, certains auteurs ont montré que WNT5a promouvait la croissance tumorale dans ces types de cancer, et d'autres ont montré que ce dernier l'inhibe (125,181–184).

4. Autre petite molécule : PRI 724

Lorsque les protéines du complexe de destruction de β-caténine sont mutées (APC ou AXIN), la voie Wnt/β-caténine est suractivée sans que les récepteurs ou protéines agissant en amont de ce complexe n'interviennent. Dans ce contexte, il est donc inutile de cibler les acteurs de la voie Wnt/β-caténine agissant en amont du complexe de destruction et il est préférable d**'inhiber la transcription** des gènes cibles de la voie Wnt/ β-caténine.

PRI 724, développé par Prism Pharma et Eisai Pharmaceuticals, inhibe l'interaction entre **CBP et β-caténine.** CBP est une histone acétyltransférase permettant l'expression de gènes cibles de la voie Wnt/β-caténine après recrutement par le complexe β-caténine/Facteurs de transcriptions LEF/TCF (**Figure 6**). Bloquer cette interaction permet **d'empêcher l'expression des gènes cibles de la voie Wnt/β-caténine**.

18 patients avec **tumeurs solides** ont été traités par PRI 724 au cours d'un essai clinique ouvert (un essai clinique dans lequel les médecins et les participants connaissent le médicament qui a été administré) de phase Ia. La molécule PRI-724 a été donnée en continue pendant deux cycles de traitement de 7 jours. La molécule a été bien tolérée, seulement un patient a présenté une hyperbilirubinémie de grade 3 à la dose de 1280

mg/m2/jour. La dose recommandée pour la phase 2 a donc été fixée à 905 mg/m2. 3 patients atteints de cancer colorectal ont présenté une maladie stable pendant 8,10 et 12 semaines. L'expression de survivine dans les cellules tumorales circulantes (biomarqueur pour juger de l'efficacité de l'inhibition de l'interaction β-caténine/CBP) a diminué pour 72 % des patients lors du premier cycle et pour 61 % lors du deuxième cycle (185). Cette étude est désormais terminée à cause d'un faible taux de participation mais d'autres essais sont en cours chez des patients avec un cancer du pancréas et avec des tumeurs hématologiques.

Le PRI-724 est bien toléré par les patients, ce qui prouve la spécificité de ce composé pour l'interaction entre CBP et β-caténine. En effet, CBP interagit avec 500 partenaires moléculaires y compris un grand nombre de facteurs de transcription ce qui pouvait laisser suggérer une toxicité potentielle du PRi-724.

II. NOUVELLES THERAPIES POTENTIELLES

1. Oligonucléotides anti-sens.

Les oligonucléotides anti-sens sont des molécules d'ADN simple brin modifiées chimiquement (17bp) qui inhibent la **traduction** de l'ARN messager de la protéine cible. La traduction est inhibée grâce à la formation d'un **complexe entre l'ARN messager et l'oligonucléotide anti-sens** entrainant un clivage par une ribonucléase, la RNaseH, de l'ARN messager cible.

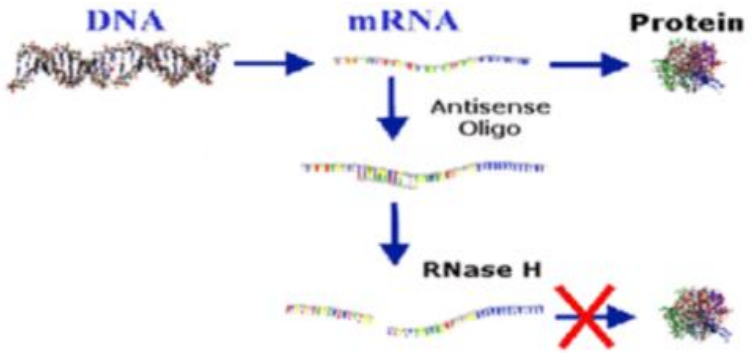


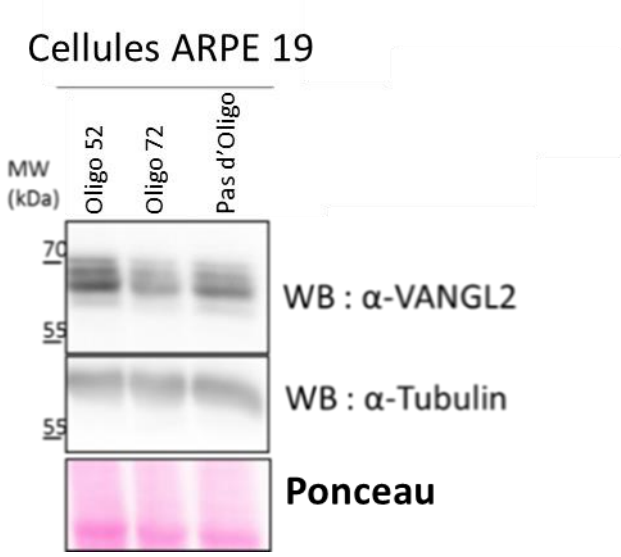
Figure 28 : Mécanisme d'action des oligonucléotides anti-sens.

Ils offrent une approche intéressante pour les gènes qui ne se prêtent pas à une inhibition par des **petites molécules** ou par des **anticorps**.

Il est possible de modifier chimiquement les oligonucléotides anti-sens afin de prolonger leur demi-vie *in vivo*, d'augmenter leur puissance et de diminuer leur toxicité.

Les cibles les plus prometteuses sont celles qui sont surexprimées pendant la tumorigenèse et quelques-unes d'entre elles, y compris BCL2, protéine kinase Cα et Survivine ont d'ailleurs leur inhibiteur en cours d'évaluation dans des **essais cliniques** aux résultats encourageants (**phase III** pour BCl2 et protéine kinase Cα).

En ce qui nous concerne, le **ciblage de VANGL2** par des anticorps monoclonaux dirigés contre les boucles extracellulaires de cette protéine est un challenge en raison de leur très petite taille. Nous avons donc entrepris un travail collaboratif (soutenu par Inserm transfert) qui consiste à cibler VANGL2 par une autre approche utilisant des oligonucléotides anti-sens. Parmi de nombreux oligonucléotides anti-sens testés, mes résultats montrent que l'oligonucléotide 72 diminue l'expression de VANGL2 (**Figure 28**). Il reste à modifier chimiquement cet oligonucléotide anti-sens pour augmenter son efficacité et à l'injecter à des souris xénogreffées avec des lignées cancéreuses mammaires SUM 149 ou SKBR7 (lignées qui expriment fortement VANGL2) pour voir s'il diminue la croissance des tumeurs mammaires.



<u>Figure 29 :</u> Test de l'efficacité des oligonucléotides anti-sens dirigés contre VANGL2 par WB.
WB réalisé avec les anticorps décrits dans la figure.

2. PROTAC (proteolysis targeting chimera)

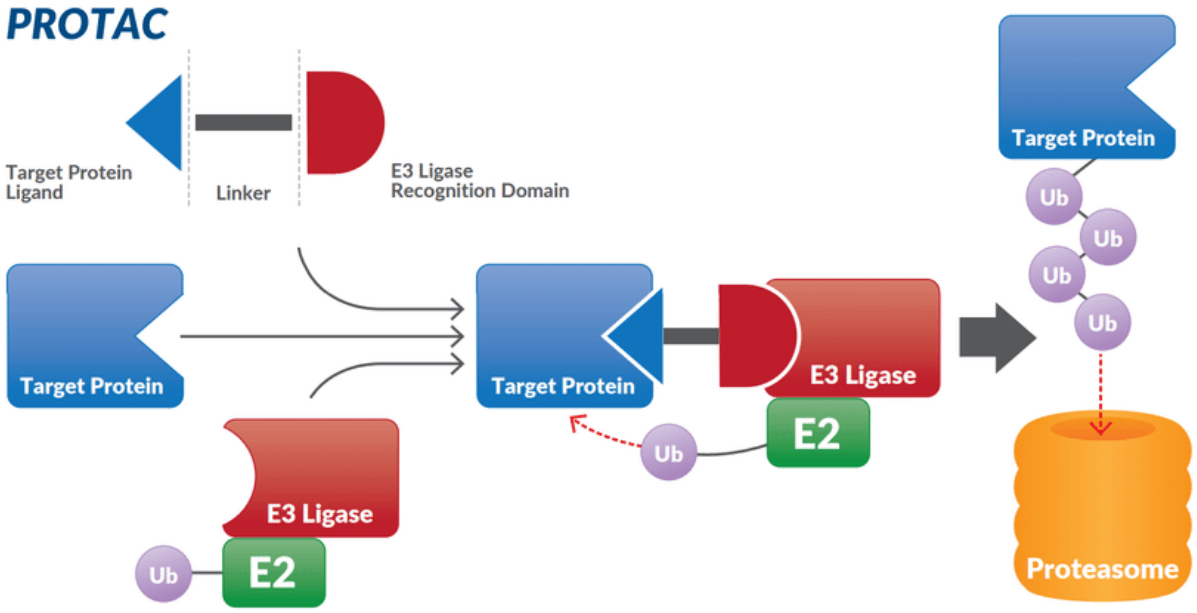
Une autre stratégie envisageable et prometteuse pour le ciblage thérapeutique de protéines surexprimées pendant la tumorigenèse, comme les protéines de la voie de signalisation Wnt, est le **PROTAC (Proteolysis Targeting Chimera).** L'équipe de Jean-Paul Borg développe actuellement cette technique pour le **récepteur PTK7.**

Le concept du PROTAC a été créé par Crews et ses collaborateurs en 2001 (186). C'est est une stratégie chimique qui permet de conduire à la dégradation de protéines d'intérêt par le **protéasome.**

Le protéasome est un complexe protéique, situé dans le cytosol des cellules, hydrolysant les protéines en **peptides inactifs**. Il reconnaît les protéines marquées pour la dégradation. Ces dernières sont modifiées par une chaîne de **poly-ubiquitine** formée grâce à une cascade enzymatique impliquant trois enzymes : E1 (enzyme d'activation de l'Ubiquitine), E2 (enzyme de conjugaison de l'Ubiquitine) et E3 (Ubiquitine ligase). La spécificité de cette réaction est due essentiellement aux E3s.

Les PROTACs sont des molécules chimériques bifonctionnelles composées d'une **partie peptidique** (premières générations de PROTAC) qui se lie à une **E3 ubiquitine ligase** et d'une **partie chimique** qui se lie à la **protéine cible.**

L'approche PROTAC va permettre de recruter directement une E3 ubiquitine ligase permettant de reprogrammer l'enzyme pour ubiquityler la protéine cible afin de conduire à sa dégradation (**Figure 30**). Une fois que l'ubiquitinylation de la protéine cible est complète, le PROTAC se dissocie et peut alors conduire à la dégradation de protéines cibles supplémentaires permettant une réelle activité catalytique.



<u>Figure 30 :</u> Schéma illustrant le principe de l'approche PROTAC.

Les stratégies chimiques permettant de conduire à une diminution de l'expression protéique offrent de **nombreux avantages** en terme de commodité d'administration (voie d'administration, posologie), une biodistribution accordable et des coûts de production plus faibles (187).

De plus, du fait que cette stratégie nécessite uniquement une liaison avec la protéine cible, cela permet de cibler des récepteurs comme PTK7 qui, ne possédant pas d'activité catalytique, ne pouvaient pas être inhibés par les molécules chimiques inhibitrices classiquement utilisées pour le ciblage des récepteurs à activité tyrosine kinase (les ITKs).

Cette stratégie présente également différents avantages théoriques par rapport aux petites molécules traditionnelles incluant une efficacité prolongée, une puissance accrue ainsi qu'un spectre d'activité plus large.

La première génération de PROTAC a permis la dégradation de substrats tels que la methionine aminopeptidase, les récepteurs aux androgènes et les récepteurs aux œstrogènes (186,188). Cependant, les agents peptidiques présentent de nombreuses limitations : haut poids moléculaire, faible pénétration cellulaire...

Récemment, le développement d'une **deuxième génération de PROTAC** utilisant des ligands non peptidiques de l'E3 ligase a permis de s'affranchir de ces limitations. Cette technologie a déjà pu démontrer son efficacité pour éliminer des oncoprotéines dans les cellules tumorales, c'est le cas par exemple de BCR-ABL dans les leucémies myéloïdes chroniques.

Les avantages considérables de l'approche PROTAC par rapport à l'utilisation des petites molécules traditionnelles et les résultats précliniques encourageants suggèrent que la stratégie PROTAC offre une méthode robuste permettant d'obtenir une dégradation protéique in vivo avec de nombreuses applications thérapeutiques potentielles.

III. TOXICITE

Le ciblage de la voie Wnt est un véritable challenge. Pour cibler la voie WNT/PCP, une solution plus simple que tous les inhibiteurs décrits dans ce chapitre aurait été de cibler le dernier acteur de cette voie de signalisation : **la kinase JNK**. Cependant, elle appartient également à d'autres voies de signalisation et a une importance capitale dans l'homéostasie et le métabolisme. Les inhibiteurs de JNK sont donc trop toxiques pour une application thérapeutique éventuelle.

Le rôle de la voie de signalisation Wnt (canonique et non canonique) dans l'embryogénèse montre que les thérapies en développement décrites dans ce chapitre seront très probablement **tératogènes** et qu'une contraception sera nécessaire avant l'initiation d'un tel traitement.

Il a été observé que les inhibiteurs de PORCN, à doses suprathérapeutiques, entraînent une perte de la prolifération des **cellules intestinales** dans des modèles de souris (177). Cette observation n'est pas surprenante étant donné le rôle de la voie Wnt/β-caténine dans la prolifération et la différenciation des cellules souches intestinales.

La voie de signalisation Wnt/β-caténine a aussi un rôle important dans le métabolisme osseux. En effet, elle favorise la différenciation des progéniteurs mésenchymaux en ostéoblastes et favorise la prolifération des ostéoblastes tout en inhibant la formation des ostéoclastes(189). Ainsi, une altération de la voie Wnt entraîne un **défaut de minéralisation des os et une augmentation du risque de fracture** (190). Cependant, comme mentionné auparavant, une prise d'acide zolédronique lorsque les patients présentent des taux de marqueurs du remodelage osseux élevés permet de contrôler cet effet indésirable.

Par ailleurs, des études ont montré que la voie Wnt interagit avec la voie Hedgehog pour réguler le développement des papilles gustatives (191). Il est donc probable que le ciblage de la voie Wnt puisse entraîner une **dysgueusie** chez les patients. La dysgueusie est d'ailleurs un des effets indésirables le plus fréquent de l'inhibiteur commercialisé de la voie Hedgehog (vismodégib ERIVEDGE®). Il n'existe pas de traitement de la dysgueusie, elle est lentement réversible après l'arrêt du traitement.

Le rôle de la voie Wnt dans l'**hématopoïèse** de l'adulte est controversé (192). Cependant, par mesure de précaution, il faudra probablement surveiller la NFS (numération formule sanguine) des patients potentiels et associer à cette surveillance une prise de facteurs de croissance hématopoïétiques le cas échéant.

CHAPITRE IV : CONCLUSION GENERALE

L'activation de la voie Wnt dans le cancer du sein et du côlon a souvent été associée à l'**initiation et la progression tumorale.** Cependant, il parait plus vraisemblable que la voie Wnt favorise ou inhibe la croissance tumorale d'une manière dépendante du **contexte.** Des recherches supplémentaires sont nécessaires pour mieux comprendre ce rôle dépendant du contexte.

Les modulateurs de la voie Wnt représentent une classe thérapeutique avec le potentiel de traiter l'origine du problème : **les cellules souches cancéreuses**. Bien qu'aucune thérapie n'ait, pour le moment, été approuvée pour une utilisation clinique, il y a des **résultats de phase I et II** encourageants. Ces nouvelles thérapies pourraient devenir une option pour les patients dans un futur proche.

Cependant, il existe de nombreux « cross-talk » entre la voie Wnt et les autres voies du développement embryonnaire (voies Notch et Hedgehog) qui, elles aussi, sont impliquées dans la prolifération et l'auto-renouvellement des cellules souches cancéreuses. Cette complexité physiopathologique rend la mise au point de thérapies ciblées plus complexe. Des études précliniques montrent le bénéfice de l'association d'un inhibiteur de la voie Wnt (anticorps anti-LRP6) et d'un inhibiteur de la voie Hedgehog (Vismodegib) (193) .

D'autres arguments témoignent de l'intérêt de ne pas utiliser les inhibiteurs de la voie Wnt en monothérapie. En effet, comme mentionné dans l'introduction, la dérégulation de la voie Wnt n'est pas suffisante pour induire la formation de tumeurs. Il est donc possible qu'une inhibition de la voie Wnt seule ne soit pas suffisante pour freiner la progression du cancer. De plus, l'inhibition de la voie Wnt peut sensibiliser les cellules cancéreuses (cf Chapitre I) aux chimiothérapies, ce qui peut être un avantage considérable dans le développement de **combinaisons thérapeutiques.** Les résultats des essais cliniques montrent effectivement une meilleure réponse aux traitements lorsque les inhibiteurs de la voie Wnt sont associés avec des médicaments de chimiothérapie classique.

Par ailleurs, dans le cadre de la médecine personnalisée, pour proposer au patient un traitement adapté aux anomalies de sa tumeur, les **biomarqueurs prédictifs** ont une importance capitale. Cependant, à ce jour, il n'y a toujours pas de biomarqueurs utilisés en clinique qui pourraient permettre de prédire l'activation de la voie Wnt au sein des tissus. Dans les laboratoires, l'expression d'AXIN est utilisée pour évaluer la sur-activation de la voie Wnt/β-caténine mais ce n'est pas le cas en clinique (194).

Enfin, une autre piste prometteuse à explorer, est le bénéfice de l'**immunothérapie** dans les tumeurs où la voie Wnt est activée. Une étude présentée lors de l'ASCO 2016 a montré une corrélation inverse entre l'expression de β-caténine et la présence de lymphocytes T CD8+ (LT CD8 +) au sein de la tumeur (195). La présence de LT CD8 + intra tumoraux étant associée à une meilleure réponse au traitement par immunothérapie, il y a éventuellement tout intérêt de combiner immunothérapie et inhibiteurs de la voie Wnt pour améliorer la prise en charge des patients...

BIBLIOGRAPHIE

1. Belloni E, Muenke M, Roessler E, Traverso G, Siegel-Bartelt J, Frumkin A, et al. Identification of Sonic hedgehog as a candidate gene responsible for holoprosencephaly. Nat Genet. nov 1996;14(3):353-6.

2. Incardona JP, Gaffield W, Kapur RP, Roelink H. The teratogenic Veratrum alkaloid cyclopamine inhibits sonic hedgehog signal transduction. Dev Camb Engl. sept 1998;125(18):3553-62.

3. Joutel A, Corpechot C, Ducros A, Vahedi K, Chabriat H, Mouton P, et al. Notch3 mutations in CADASIL, a hereditary adult-onset condition causing stroke and dementia. Nature. 24 oct 1996;383(6602):707-10.

4. Li L, Krantz ID, Deng Y, Genin A, Banta AB, Collins CC, et al. Alagille syndrome is caused by mutations in human Jagged1, which encodes a ligand for Notch1. Nat Genet. juill 1997;16(3):243-51.

5. Oda T, Elkahloun AG, Pike BL, Okajima K, Krantz ID, Genin A, et al. Mutations in the human Jagged1 gene are responsible for Alagille syndrome. Nat Genet. juill 1997;16(3):235-42.

6. Raffel C, Jenkins RB, Frederick L, Hebrink D, Alderete B, Fults DW, et al. Sporadic medulloblastomas contain PTCH mutations. Cancer Res. 1 mars 1997;57(5):842-5.

7. Xie J, Murone M, Luoh SM, Ryan A, Gu Q, Zhang C, et al. Activating Smoothened mutations in sporadic basal-cell carcinoma. Nature. 1 janv 1998;391(6662):90-2.

8. Tostar U, Malm CJ, Meis-Kindblom JM, Kindblom L-G, Toftgård R, Undén AB. Deregulation of the hedgehog signalling pathway: a possible role for the PTCH and SUFU genes in human rhabdomyoma and rhabdomyosarcoma development. J Pathol. janv 2006;208(1):17-25.

9. Rubin LL, de Sauvage FJ. Targeting the Hedgehog pathway in cancer. Nat Rev Drug Discov. déc 2006;5(12):1026-33.

10. Ellisen LW, Bird J, West DC, Soreng AL, Reynolds TC, Smith SD, et al. TAN-1, the human homolog of the Drosophila notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms. Cell. 23 août 1991;66(4):649-61.

11. Rizzo P, Osipo C, Foreman K, Golde T, Osborne B, Miele L. Rational targeting of Notch signaling in cancer. Oncogene. 1 sept 2008;27(38):5124-31.

12. Stransky N, Egloff AM, Tward AD, Kostic AD, Cibulskis K, Sivachenko A, et al. The mutational landscape of head and neck squamous cell carcinoma. Science. 26 août 2011;333(6046):1157-60.

13. Von Hoff DD, LoRusso PM, Rudin CM, Reddy JC, Yauch RL, Tibes R, et al. Inhibition of the hedgehog pathway in advanced basal-cell carcinoma. N Engl J Med. 17 sept 2009;361(12):1164-72.

14. Sekulic A, Migden MR, Oro AE, Dirix L, Lewis KD, Hainsworth JD, et al. Efficacy and Safety of Vismodegib in Advanced Basal-Cell Carcinoma. N Engl J Med. 7 juin 2012;366(23):2171-9.

15. Burness CB. Sonidegib: First Global Approval. Drugs. sept 2015;75(13):1559-66.

16. Goldman J, Eckhardt SG, Borad MJ, Curtis KK, Hidalgo M, Calvo E, et al. Phase I dose-escalation trial of the oral investigational Hedgehog signaling pathway inhibitor TAK-441 in patients with advanced solid tumors. Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res. 1 mars 2015;21(5):1002-9.

17. Peukert S, He F, Dai M, Zhang R, Sun Y, Miller-Moslin K, et al. Discovery of NVP-LEQ506, a second-generation inhibitor of smoothened. ChemMedChem. août 2013;8(8):1261-5.

18. Kim DJ, Kim J, Spaunhurst K, Montoya J, Khodosh R, Chandra K, et al. Open-label, exploratory phase II trial of oral itraconazole for the treatment of basal cell carcinoma. J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol. 10 mars 2014;32(8):745-51.

19. Savona MR, Pollyea DA, Stock W, Oehler VG, Schroeder MA, Lancet J, et al. Phase Ib Study of Glasdegib, a Hedgehog Pathway Inhibitor, in Combination with Standard Chemotherapy in Patients with AML or High-Risk MDS. Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res. 15 mai 2018;24(10):2294-303.

20. Wagner AJ, Messersmith WA, Shaik MN, Li S, Zheng X, McLachlan KR, et al. A phase I study of PF-04449913, an oral hedgehog inhibitor, in patients with advanced solid tumors. Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res. 01 2015;21(5):1044-51.

21. Martinelli G, Oehler VG, Papayannidis C, Courtney R, Shaik MN, Zhang X, et al. Treatment with PF-04449913, an oral smoothened antagonist, in patients with myeloid malignancies: a phase 1 safety and pharmacokinetics study. Lancet Haematol. août 2015;2(8):e339-346.

22. Abstract 2819: Identification and characterization of a novel smoothened antagonist for the treatment of cancer with deregulated hedgehog signaling | Cancer Research [Internet]. [cité 15 mai 2019]. Disponible sur: http://cancerres.aacrjournals.org/content/71/8_Supplement/2819

23. Sasaki K, Gotlib JR, Mesa RA, Newberry KJ, Ravandi F, Cortes JE, et al. Phase II evaluation of IPI-926, an oral Hedgehog inhibitor, in patients with myelofibrosis. Leuk Lymphoma. juill 2015;56(7):2092-7.

24. Jimeno A, Weiss GJ, Miller WH, Gettinger S, Eigl BJC, Chang ALS, et al. Phase I study of the Hedgehog pathway inhibitor IPI-926 in adult patients with solid tumors. Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res. 15 mai 2013;19(10):2766-74.

25. Ko AH, LoConte N, Tempero MA, Walker EJ, Kate Kelley R, Lewis S, et al. A Phase I Study of FOLFIRINOX Plus IPI-926, a Hedgehog Pathway Inhibitor, for Advanced Pancreatic Adenocarcinoma. Pancreas. mars 2016;45(3):370-5.

26. Bowles DW, Keysar SB, Eagles JR, Wang G, Glogowska MJ, McDermott JD, et al. A pilot study of cetuximab and the hedgehog inhibitor IPI-926 in recurrent/metastatic head and neck squamous cell carcinoma. Oral Oncol. févr 2016;53:74-9.

27. Abstract A55: A first-in-human, phase I study of an oral hedgehog pathway antagonist, BMS-833923 (XL139), in subjects with advanced or metastatic solid tumors | Molecular Cancer Therapeutics [Internet]. [cité 15 mai 2019]. Disponible sur: http://mct.aacrjournals.org/content/8/12_Supplement/A55

28. Shah NP, Cortes JE, Martinelli G, Smith BD, Clarke E, Copland M, et al. Dasatinib Plus Smoothened (SMO) Inhibitor BMS-833923 in Chronic Myeloid Leukemia (CML) with Resistance or Suboptimal Response to a Prior Tyrosine Kinase Inhibitor (TKI): Phase I Study CA180323. Blood. 6 déc 2014;124(21):4539-4539.

29. Brinkhuizen T, Frencken KJA, Nelemans PJ, Hoff MLS, Kelleners-Smeets NWJ, Zur Hausen A, et al. The effect of topical diclofenac 3% and calcitriol 3 µg/g on superficial basal cell carcinoma (sBCC) and nodular basal cell carcinoma (nBCC): A phase II, randomized controlled trial. J Am Acad Dermatol. juill 2016;75(1):126-34.

30. Rudin CM, Hann CL, Laterra J, Yauch RL, Callahan CA, Fu L, et al. Treatment of medulloblastoma with hedgehog pathway inhibitor GDC-0449. N Engl J Med. 17 sept 2009;361(12):1173-8.

31. Peer E, Tesanovic S, Aberger F. Next-Generation Hedgehog/GLI Pathway Inhibitors for Cancer Therapy. Cancers. 15 avr 2019;11(4).

32. Atwood SX, Sarin KY, Whitson RJ, Li JR, Kim G, Rezaee M, et al. Smoothened variants explain the majority of drug resistance in basal cell carcinoma. Cancer Cell. 9 mars 2015;27(3):342-53.

33. Buonamici S, Williams J, Morrissey M, Wang A, Guo R, Vattay A, et al. Interfering with resistance to smoothened antagonists by inhibition of the PI3K pathway in medulloblastoma. Sci Transl Med. 29 sept 2010;2(51):51ra70.

34. Tolcher AW, Messersmith WA, Mikulski SM, Papadopoulos KP, Kwak EL, Gibbon DG, et al. Phase I study of RO4929097, a gamma secretase inhibitor of Notch signaling, in patients with refractory metastatic or locally advanced solid tumors. J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol. 1 juill 2012;30(19):2348-53.

35. Diaz-Padilla I, Wilson MK, Clarke BA, Hirte HW, Welch SA, Mackay HJ, et al. A phase II study of single-agent RO4929097, a gamma-secretase inhibitor of Notch signaling, in patients with recurrent platinum-resistant epithelial ovarian cancer: A study of the Princess Margaret, Chicago and California phase II consortia. Gynecol Oncol. mai 2015;137(2):216-22.

36. Lee SM, Moon J, Redman BG, Chidiac T, Flaherty LE, Zha Y, et al. Phase 2 study of RO4929097, a gamma-secretase inhibitor, in metastatic melanoma: SWOG 0933. Cancer. 1 févr 2015;121(3):432-40.

37. Pan E, Supko JG, Kaley TJ, Butowski NA, Cloughesy T, Jung J, et al. Phase I study of RO4929097 with bevacizumab in patients with recurrent malignant glioma. J Neurooncol. 2016;130(3):571-9.

38. Locatelli MA, Aftimos P, Dees EC, LoRusso PM, Pegram MD, Awada A, et al. Phase I study of the gamma secretase inhibitor PF-03084014 in combination with docetaxel in patients with advanced triple-negative breast cancer. Oncotarget. 10 janv 2017;8(2):2320-8.

39. Krop I, Demuth T, Guthrie T, Wen PY, Mason WP, Chinnaiyan P, et al. Phase I pharmacologic and pharmacodynamic study of the gamma secretase (Notch) inhibitor MK-0752 in adult patients with advanced solid tumors. J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol. 1 juill 2012;30(19):2307-13.

40. Smith DC, Eisenberg PD, Manikhas G, Chugh R, Gubens MA, Stagg RJ, et al. A phase I dose escalation and expansion study of the anticancer stem cell agent demcizumab (anti-DLL4) in patients with previously treated solid tumors. Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res. 15 déc 2014;20(24):6295-303.

41. Chiorean EG, LoRusso P, Strother RM, Diamond JR, Younger A, Messersmith WA, et al. A Phase I First-in-Human Study of Enoticumab (REGN421), a Fully Human Delta-like Ligand 4 (Dll4) Monoclonal Antibody in Patients with Advanced Solid Tumors. Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res. 15 juin 2015;21(12):2695-703.

42. Sharma RP. Wingless a new mutant in Drosophila melanogaster. Drosoph Inf Serv. 1973;50:134-134.

43. Angers S, Moon RT. Proximal events in Wnt signal transduction. Nat Rev Mol Cell Biol. juill 2009;10(7):468-77.

44. Nusse R, Varmus HE. Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. Cell. nov 1982;31(1):99-109.

45. Rijsewijk F, Schuermann M, Wagenaar E, Parren P, Weigel D, Nusse R. The Drosophila homolog of the mouse mammary oncogene int-1 is identical to the segment polarity gene wingless. Cell. 14 août 1987;50(4):649-57.

46. Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA, Kinzler KW. Cancer genome landscapes. Science. 29 mars 2013;339(6127):1546-58.

47. Pleasance ED, Cheetham RK, Stephens PJ, McBride DJ, Humphray SJ, Greenman CD, et al. A comprehensive catalogue of somatic mutations from a human cancer genome. Nature. 14 janv 2010;463(7278):191-6.

48. Dahmen RP, Koch A, Denkhaus D, Tonn JC, Sörensen N, Berthold F, et al. Deletions of AXIN1, a component of the WNT/wingless pathway, in sporadic medulloblastomas. Cancer Res. 1 oct 2001;61(19):7039-43.

49. Satoh S, Daigo Y, Furukawa Y, Kato T, Miwa N, Nishiwaki T, et al. AXIN1 mutations in hepatocellular carcinomas, and growth suppression in cancer cells by virus-mediated transfer of AXIN1. Nat Genet. mars 2000;24(3):245-50.

50. Clements WM, Wang J, Sarnaik A, Kim OJ, MacDonald J, Fenoglio-Preiser C, et al. beta-Catenin mutation is a frequent cause of Wnt pathway activation in gastric cancer. Cancer Res. 15 juin 2002;62(12):3503-6.

51. Segditsas S, Tomlinson I. Colorectal cancer and genetic alterations in the Wnt pathway. Oncogene. 4 déc 2006;25(57):7531-7.

52. Anastas JN, Moon RT. WNT signalling pathways as therapeutic targets in cancer. Nat Rev Cancer. janv 2013;13(1):11-26.

53. Sebbagh M, Borg J-P. Insight into planar cell polarity. Exp Cell Res. 1 nov 2014;328(2):284-95.

54. Chan DW, Chan C-Y, Yam JWP, Ching Y-P, Ng IOL. Prickle-1 negatively regulates Wnt/beta-catenin pathway by promoting Dishevelled ubiquitination/degradation in liver cancer. Gastroenterology. oct 2006;131(4):1218-27.

55. Lawrence PA, Shelton PM. The determination of polarity in the developing insect retina. J Embryol Exp Morphol. avr 1975;33(2):471-86.

56. Kibar Z, Vogan KJ, Groulx N, Justice MJ, Underhill DA, Gros P. Ltap, a mammalian homolog of Drosophila Strabismus/Van Gogh, is altered in the mouse neural tube mutant Loop-tail. Nat Genet. juill 2001;28(3):251-5.

57. Park M, Moon RT. The planar cell-polarity gene stbm regulates cell behaviour and cell fate in vertebrate embryos. Nat Cell Biol. janv 2002;4(1):20-5.

58. Murdoch JN, Doudney K, Paternotte C, Copp AJ, Stanier P. Severe neural tube defects in the loop-tail mouse result from mutation of Lpp1, a novel gene involved in floor plate specification. Hum Mol Genet. 15 oct 2001;10(22):2593-601.

59. Lei Y-P, Zhang T, Li H, Wu B-L, Jin L, Wang H-Y. VANGL2 mutations in human cranial neural-tube defects. N Engl J Med. 10 juin 2010;362(23):2232-5.

60. Kibar Z, Torban E, McDearmid JR, Reynolds A, Berghout J, Mathieu M, et al. Mutations in VANGL1 associated with neural-tube defects. N Engl J Med. 5 avr 2007;356(14):1432-7.

61. Zallen JA. Planar polarity and tissue morphogenesis. Cell. 15 juin 2007;129(6):1051-63.

62. Yang Y, Mlodzik M. Wnt-Frizzled/planar cell polarity signaling: cellular orientation by facing the wind (Wnt). Annu Rev Cell Dev Biol. 2015;31:623-46.

63. Lejeune S, Huguet EL, Hamby A, Poulsom R, Harris AL. Wnt5a cloning, expression, and up-regulation in human primary breast cancers. Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res. févr 1995;1(2):215-22.

64. MacMillan CD, Leong HS, Dales DW, Robertson AE, Lewis JD, Chambers AF, et al. Stage of breast cancer progression influences cellular response to activation of the WNT/planar cell polarity pathway. Sci Rep. 10 sept 2014;4:6315.

65. Luga V, Zhang L, Viloria-Petit AM, Ogunjimi AA, Inanlou MR, Chiu E, et al. Exosomes mediate stromal mobilization of autocrine Wnt-PCP signaling in breast cancer cell migration. Cell. 21 déc 2012;151(7):1542-56.

66. Avgustinova A, Iravani M, Robertson D, Fearns A, Gao Q, Klingbeil P, et al. Tumour cell-derived Wnt7a recruits and activates fibroblasts to promote tumour aggressiveness. Nat Commun. 18 janv 2016;7:10305.

67. Yang L, Wu X, Wang Y, Zhang K, Wu J, Yuan Y-C, et al. FZD7 has a critical role in cell proliferation in triple negative breast cancer. Oncogene. 27 oct 2011;30(43):4437-46.

68. Anastas JN, Biechele TL, Robitaille M, Muster J, Allison KH, Angers S, et al. A protein complex of SCRIB, NOS1AP and VANGL1 regulates cell polarity and migration, and is associated with breast cancer progression. Oncogene. 9 août 2012;31(32):3696-708.

69. Puvirajesinghe TM, Bertucci F, Jain A, Scerbo P, Belotti E, Audebert S, et al. Identification of p62/SQSTM1 as a component of non-canonical Wnt VANGL2-JNK signalling in breast cancer. Nat Commun. 12 janv 2016;7:10318.

70. Daulat AM, Bertucci F, Audebert S, Sergé A, Finetti P, Josselin E, et al. PRICKLE1 Contributes to Cancer Cell Dissemination through Its Interaction with mTORC2. Dev Cell. 23 mai 2016;37(4):311-25.

71. Ataseven B, Angerer R, Kates R, Gunesch A, Knyazev P, Högel B, et al. PTK7 expression in triple-negative breast cancer. Anticancer Res. sept 2013;33(9):3759-63.

72. Henry C, Quadir A, Hawkins NJ, Jary E, Llamosas E, Kumar D, et al. Expression of the novel Wnt receptor ROR2 is increased in breast cancer and may regulate both β-catenin dependent and independent Wnt signalling. J Cancer Res Clin Oncol. févr 2015;141(2):243-54.

73. Asad M, Wong MK, Tan TZ, Choolani M, Low J, Mori S, et al. FZD7 drives in vitro aggressiveness in Stem-A subtype of ovarian cancer via regulation of non-canonical Wnt/PCP pathway. Cell Death Dis. 17 juill 2014;5:e1346.

74. Taki M, Kamata N, Yokoyama K, Fujimoto R, Tsutsumi S, Nagayama M. Down-regulation of Wnt-4 and up-regulation of Wnt-5a expression by epithelial-mesenchymal transition in human squamous carcinoma cells. Cancer Sci. juill 2003;94(7):593-7.

75. Qin H-D, Liao X-Y, Chen Y-B, Huang S-Y, Xue W-Q, Li F-F, et al. Genomic Characterization of Esophageal Squamous Cell Carcinoma Reveals Critical Genes Underlying Tumorigenesis and Poor Prognosis. Am J Hum Genet. 7 avr 2016;98(4):709-27.

76. Dyberg C, Papachristou P, Haug BH, Lagercrantz H, Kogner P, Ringstedt T, et al. Planar cell polarity gene expression correlates with tumor cell viability and prognostic outcome in neuroblastoma. BMC Cancer. 31 mars 2016;16:259.

77. Dissanayake SK, Wade M, Johnson CE, O'Connell MP, Leotlela PD, French AD, et al. The Wnt5A/protein kinase C pathway mediates motility in melanoma cells via the inhibition of metastasis suppressors and initiation of an epithelial to mesenchymal transition. J Biol Chem. 8 juin 2007;282(23):17259-71.

78. Anastas JN, Kulikauskas RM, Tamir T, Rizos H, Long GV, von Euw EM, et al. WNT5A enhances resistance of melanoma cells to targeted BRAF inhibitors. J Clin Invest. juill 2014;124(7):2877-90.

79. Da Forno PD, Pringle JH, Hutchinson P, Osborn J, Huang Q, Potter L, et al. WNT5A expression increases during melanoma progression and correlates with outcome. Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res. 15 sept 2008;14(18):5825-32.

80. Weeraratna AT, Jiang Y, Hostetter G, Rosenblatt K, Duray P, Bittner M, et al. Wnt5a signaling directly affects cell motility and invasion of metastatic melanoma. Cancer Cell. avr 2002;1(3):279-88.

81. Tiwary S, Xu L. FRIZZLED7 Is Required for Tumor Initiation and Metastatic Growth of Melanoma Cells. PloS One. 2016;11(1):e0147638.

82. O'Connell MP, Fiori JL, Xu M, Carter AD, Frank BP, Camilli TC, et al. The orphan tyrosine kinase receptor, ROR2, mediates Wnt5A signaling in metastatic melanoma. Oncogene. 7 janv 2010;29(1):34-44.

83. O'Connell MP, Marchbank K, Webster MR, Valiga AA, Kaur A, Vultur A, et al. Hypoxia induces phenotypic plasticity and therapy resistance in melanoma via the tyrosine kinase receptors ROR1 and ROR2. Cancer Discov. déc 2013;3(12):1378-93.

84. Lhoumeau A-C, Martinez S, Boher J-M, Monges G, Castellano R, Goubard A, et al. Overexpression of the Promigratory and Prometastatic PTK7 Receptor Is Associated with an Adverse Clinical Outcome in Colorectal Cancer. PloS One. 2015;10(5):e0123768.

85. Mei H, Lian S, Zhang S, Wang W, Mao Q, Wang H. High expression of ROR2 in cancer cell correlates with unfavorable prognosis in colorectal cancer. Biochem Biophys Res Commun. 31 oct 2014;453(4):703-9.

86. Cheng R, Sun B, Liu Z, Zhao X, Qi L, Li Y, et al. Wnt5a suppresses colon cancer by inhibiting cell proliferation and epithelial-mesenchymal transition. J Cell Physiol. déc 2014;229(12):1908-17.

87. Bakker ERM, Das AM, Helvensteijn W, Franken PF, Swagemakers S, van der Valk MA, et al. Wnt5a promotes human colon cancer cell migration and invasion but does not augment intestinal tumorigenesis in Apc1638N mice. Carcinogenesis. nov 2013;34(11):2629-38.

88. Kurayoshi M, Oue N, Yamamoto H, Kishida M, Inoue A, Asahara T, et al. Expression of Wnt-5a is correlated with aggressiveness of gastric cancer by stimulating cell migration and invasion. Cancer Res. 1 nov 2006;66(21):10439-48.

89. Miyamoto DT, Zheng Y, Wittner BS, Lee RJ, Zhu H, Broderick KT, et al. RNA-Seq of single prostate CTCs implicates noncanonical Wnt signaling in antiandrogen resistance. Science. 18 sept 2015;349(6254):1351-6.

90. Kremenevskaja N, von Wasielewski R, Rao AS, Schöfl C, Andersson T, Brabant G. Wnt-5a has tumor suppressor activity in thyroid carcinoma. Oncogene. 24 mars 2005;24(13):2144-54.

91. Kaucká M, Plevová K, Pavlová S, Janovská P, Mishra A, Verner J, et al. The planar cell polarity pathway drives pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia by the regulation of B-lymphocyte migration. Cancer Res. 1 mars 2013;73(5):1491-501.

92. Janovska P, Poppova L, Plevova K, Plesingerova H, Behal M, Kaucka M, et al. Autocrine Signaling by Wnt-5a Deregulates Chemotaxis of Leukemic Cells and Predicts Clinical Outcome in Chronic Lymphocytic Leukemia. Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res. 15 janv 2016;22(2):459-69.

93. Yu J, Chen L, Cui B, Widhopf GF, Shen Z, Wu R, et al. Wnt5a induces ROR1/ROR2 heterooligomerization to enhance leukemia chemotaxis and proliferation. J Clin Invest. févr 2016;126(2):585-98.

94. Prebet T, Lhoumeau A-C, Arnoulet C, Aulas A, Marchetto S, Audebert S, et al. The cell polarity PTK7 receptor acts as a modulator of the chemotherapeutic response in acute myeloid leukemia and impairs clinical outcome. Blood. 30 sept 2010;116(13):2315-23.

95. Jiang G, Zhang M, Yue B, Yang M, Carter C, Al-Quran SZ, et al. PTK7: a new biomarker for immunophenotypic characterization of maturing T cells and T cell acute lymphoblastic leukemia. Leuk Res. nov 2012;36(11):1347-53.

96. Le P, McDermott JD, Jimeno A. Targeting the Wnt pathway in human cancers: therapeutic targeting with a focus on OMP-54F28. Pharmacol Ther. févr 2015;0:1-11.

97. Fischer MM, Cancilla B, Yeung VP, Cattaruzza F, Chartier C, Murriel CL, et al. WNT antagonists exhibit unique combinatorial antitumor activity with taxanes by potentiating mitotic cell death. Sci Adv. 2017;3(6):e1700090.

98. Fukukawa C, Hanaoka H, Nagayama S, Tsunoda T, Toguchida J, Endo K, et al. Radioimmunotherapy of human synovial sarcoma using a monoclonal antibody against FZD10. Cancer Sci. févr 2008;99(2):432-40.

99. Lenz H-J, Kahn M. Safely targeting cancer stem cells via selective catenin coactivator antagonism. Cancer Sci. sept 2014;105(9):1087-92.

100. Pozzi S, Fulciniti M, Yan H, Vallet S, Eda H, Patel K, et al. In vivo and in vitro effects of a novel anti-Dkk1 neutralizing antibody in multiple myeloma. Bone. avr 2013;53(2):487-96.

101. Canesin G, Evans-Axelsson S, Hellsten R, Krzyzanowska A, Prasad CP, Bjartell A, et al. Treatment with the WNT5A-mimicking peptide Foxy-5 effectively reduces the metastatic spread of WNT5A-low prostate cancer cells in an orthotopic mouse model. PloS One. 2017;12(9):e0184418.

102. Smith DC, Rosen LS, Chugh R, Goldman JW, Xu L, Kapoun A, et al. First-in-human evaluation of the human monoclonal antibody vantictumab (OMP-18R5; anti-Frizzled) targeting the WNT pathway in a phase I study for patients with advanced solid tumors. J Clin Oncol. 20 mai 2013;31(15_suppl):2540-2540.

103. Choi MY, Widhopf GF, Ghia EM, Kidwell RL, Hasan MK, Yu J, et al. Phase I Trial: Cirmtuzumab Inhibits ROR1 Signaling and Stemness Signatures in Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia. Cell Stem Cell. 1 juin 2018;22(6):951-959.e3.

104. Naylor S, Smalley MJ, Robertson D, Gusterson BA, Edwards PA, Dale TC. Retroviral expression of Wnt-1 and Wnt-7b produces different effects in mouse mammary epithelium. J Cell Sci. juin 2000;113 (Pt 12):2129-38.

105. Jost E, Gezer D, Wilop S, Suzuki H, Herman JG, Osieka R, et al. Epigenetic dysregulation of secreted Frizzled-related proteins in multiple myeloma. Cancer Lett. 18 août 2009;281(1):24-31.

106. Schlange T, Matsuda Y, Lienhard S, Huber A, Hynes NE. Autocrine WNT signaling contributes to breast cancer cell proliferation via the canonical WNT pathway and EGFR transactivation. Breast Cancer Res BCR. 2007;9(5):R63.

107. Matsuda Y, Schlange T, Oakeley EJ, Boulay A, Hynes NE. WNT signaling enhances breast cancer cell motility and blockade of the WNT pathway by sFRP1 suppresses MDA-MB-231 xenograft growth. Breast Cancer Res BCR. 2009;11(3):R32.

108. DiMeo TA, Anderson K, Phadke P, Fan C, Feng C, Perou CM, et al. A novel lung metastasis signature links Wnt signaling with cancer cell self-renewal and epithelial-mesenchymal transition in basal-like breast cancer. Cancer Res. 1 juill 2009;69(13):5364-73.

109. Barker N, Ridgway RA, van Es JH, van de Wetering M, Begthel H, van den Born M, et al. Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer. Nature. 29 janv 2009;457(7229):608-11.

110. Gonzalez DM, Medici D. Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition. Sci Signal. 23 sept 2014;7(344):re8.

111. Yook JI, Li X-Y, Ota I, Hu C, Kim HS, Kim NH, et al. A Wnt-Axin2-GSK3beta cascade regulates Snail1 activity in breast cancer cells. Nat Cell Biol. déc 2006;8(12):1398-406.

112. Qi L, Sun B, Liu Z, Li H, Gao J, Leng X. Dickkopf-1 inhibits epithelial-mesenchymal transition of colon cancer cells and contributes to colon cancer suppression. Cancer Sci. avr 2012;103(4):828-35.

113. Zi X, Guo Y, Simoneau AR, Hope C, Xie J, Holcombe RF, et al. Expression of Frzb/secreted Frizzled-related protein 3, a secreted Wnt antagonist, in human androgen-independent prostate cancer PC-3 cells suppresses tumor growth and cellular invasiveness. Cancer Res. 1 nov 2005;65(21):9762-70.

114. Ye X, Zerlanko B, Kennedy A, Banumathy G, Zhang R, Adams PD. Downregulation of Wnt signaling is a trigger for formation of facultative heterochromatin and onset of cell senescence in primary human cells. Mol Cell. 20 juill 2007;27(2):183-96.

115. Adams PD, Enders GH. Wnt signaling and senescence: a tug of war in early neoplasia? Cancer Biol Ther. nov 2008;7(11):1706-11.

116. Zhang H, Zhang X, Wu X, Li W, Su P, Cheng H, et al. Interference of Frizzled 1 (FZD1) reverses multidrug resistance in breast cancer cells through the Wnt/β-catenin pathway. Cancer Lett. 1 oct 2012;323(1):106-13.

117. Noda T, Nagano H, Takemasa I, Yoshioka S, Murakami M, Wada H, et al. Activation of Wnt/beta-catenin signalling pathway induces chemoresistance to interferon-alpha/5-fluorouracil combination therapy for hepatocellular carcinoma. Br J Cancer. 19 mai 2009;100(10):1647-58.

118. Flahaut M, Meier R, Coulon A, Nardou KA, Niggli FK, Martinet D, et al. The Wnt receptor FZD1 mediates chemoresistance in neuroblastoma through activation of the Wnt/beta-catenin pathway. Oncogene. 11 juin 2009;28(23):2245-56.

119. Zhou Z, Wang J, Han X, Zhou J, Linder S. Up-regulation of human secreted frizzled homolog in apoptosis and its down-regulation in breast tumors. Int J Cancer. 25 sept 1998;78(1):95-9.

120. Shou J, Ali-Osman F, Multani AS, Pathak S, Fedi P, Srivenugopal KS. Human Dkk-1, a gene encoding a Wnt antagonist, responds to DNA damage and its overexpression sensitizes brain tumor cells to apoptosis following alkylation damage of DNA. Oncogene. 31 janv 2002;21(6):878-89.

121. Mazieres J, You L, He B, Xu Z, Lee AY, Mikami I, et al. Inhibition of Wnt16 in human acute lymphoblastoid leukemia cells containing the t(1;19) translocation induces apoptosis. Oncogene. 11 août 2005;24(34):5396-400.

122. Hirata H, Hinoda Y, Nakajima K, Kawamoto K, Kikuno N, Ueno K, et al. Wnt antagonist DKK1 acts as a tumor suppressor gene that induces apoptosis and inhibits proliferation in human renal cell carcinoma. Int J Cancer. 15 avr 2011;128(8):1793-803.

123. He B, You L, Uematsu K, Xu Z, Lee AY, Matsangou M, et al. A monoclonal antibody against Wnt-1 induces apoptosis in human cancer cells. Neoplasia N Y N. févr 2004;6(1):7-14.

124. Mikels AJ, Nusse R. Purified Wnt5a protein activates or inhibits beta-catenin-TCF signaling depending on receptor context. PLoS Biol. avr 2006;4(4):e115.

125. Bakker ERM, Das AM, Helvensteijn W, Franken PF, Swagemakers S, van der Valk MA, et al. Wnt5a promotes human colon cancer cell migration and invasion but does not augment intestinal tumorigenesis in Apc1638N mice. Carcinogenesis. nov 2013;34(11):2629-38.

126. Belotti E, Polanowska J, Daulat AM, Audebert S, Thomé V, Lissitzky J-C, et al. The human PDZome: a gateway to PSD95-Disc large-zonula occludens (PDZ)-mediated functions. Mol Cell Proteomics MCP. sept 2013;12(9):2587-603.

127. Bilder D, Li M, Perrimon N. Cooperative regulation of cell polarity and growth by Drosophila tumor suppressors. Science. 7 juill 2000;289(5476):113-6.

128. Montcouquiol M, Rachel RA, Lanford PJ, Copeland NG, Jenkins NA, Kelley MW. Identification of Vangl2 and Scrb1 as planar polarity genes in mammals. Nature. 8 mai 2003;423(6936):173-7.

129. Pearson HB, Perez-Mancera PA, Dow LE, Ryan A, Tennstedt P, Bogani D, et al. SCRIB expression is deregulated in human prostate cancer, and its deficiency in mice promotes prostate neoplasia. J Clin Invest. nov 2011;121(11):4257-67.

130. Zhan L, Rosenberg A, Bergami KC, Yu M, Xuan Z, Jaffe AB, et al. Deregulation of scribble promotes mammary tumorigenesis and reveals a role for cell polarity in carcinoma. Cell. 28 nov 2008;135(5):865-78.

131. Cordenonsi M, Zanconato F, Azzolin L, Forcato M, Rosato A, Frasson C, et al. The Hippo transducer TAZ confers cancer stem cell-related traits on breast cancer cells. Cell. 11 nov 2011;147(4):759-72.

132. Godde NJ, Sheridan JM, Smith LK, Pearson HB, Britt KL, Galea RC, et al. Scribble modulates the MAPK/Fra1 pathway to disrupt luminal and ductal integrity and suppress tumour formation in the mammary gland. PLoS Genet. mai 2014;10(5):e1004323.

133. Lhoumeau A-C, Arcangeli M-L, De Grandis M, Giordano M, Orsoni J-C, Lembo F, et al. Ptk7-Deficient Mice Have Decreased Hematopoietic Stem Cell Pools as a Result of Deregulated Proliferation and Migration. J Immunol Baltim Md 1950. 15 2016;196(10):4367-77.

134. Jung P, Sommer C, Barriga FM, Buczacki SJ, Hernando-Momblona X, Sevillano M, et al. Isolation of Human Colon Stem Cells Using Surface Expression of PTK7. Stem Cell Rep. 8 déc 2015;5(6):979-87.

135. Yamben IF, Rachel RA, Shatadal S, Copeland NG, Jenkins NA, Warming S, et al. Scrib is required for epithelial cell identity and prevents epithelial to mesenchymal transition in the mouse. Dev Biol. 1 déc 2013;384(1):41-52.

136. Elsum IA, Martin C, Humbert PO. Scribble regulates an EMT polarity pathway through modulation of MAPK-ERK signaling to mediate junction formation. J Cell Sci. 1 sept 2013;126(Pt 17):3990-9.

137. Gujral TS, Chan M, Peshkin L, Sorger PK, Kirschner MW, MacBeath G. A noncanonical Frizzled2 pathway regulates epithelial-mesenchymal transition and metastasis. Cell. 6 nov 2014;159(4):844-56.

138. Lim BC, Matsumoto S, Yamamoto H, Mizuno H, Kikuta J, Ishii M, et al. Prickle1 promotes focal adhesion disassembly in cooperation with the CLASP-LL5β complex in migrating cells. J Cell Sci. 15 2016;129(16):3115-29.

139. Jenny A, Darken RS, Wilson PA, Mlodzik M. Prickle and Strabismus form a functional complex to generate a correct axis during planar cell polarity signaling. EMBO J. 1 sept 2003;22(17):4409-20.

140. Zhang L, Luga V, Armitage SK, Musiol M, Won A, Yip CM, et al. A lateral signalling pathway coordinates shape volatility during cell migration. Nat Commun. 26 2016;7:11714.

141. Kim EK, Yun SJ, Ha JM, Kim YW, Jin IH, Yun J, et al. Selective activation of Akt1 by mammalian target of rapamycin complex 2 regulates cancer cell migration, invasion, and metastasis. Oncogene. 30 juin 2011;30(26):2954-63.

142. Navarro C, Nola S, Audebert S, Santoni M-J, Arsanto J-P, Ginestier C, et al. Junctional recruitment of mammalian Scribble relies on E-cadherin engagement. Oncogene. 23 juin 2005;24(27):4330-9.

143. Cantrell VA, Jessen JR. The planar cell polarity protein Van Gogh-Like 2 regulates tumor cell migration and matrix metalloproteinase-dependent invasion. Cancer Lett. 1 janv 2010;287(1):54-61.

144. Desrochers LM, Antonyak MA, Cerione RA. Extracellular Vesicles: Satellites of Information Transfer in Cancer and Stem Cell Biology. Dev Cell. 23 mai 2016;37(4):301-9.

145. Zhang S, Chen L, Cui B, Chuang H-Y, Yu J, Wang-Rodriguez J, et al. ROR1 is expressed in human breast cancer and associated with enhanced tumor-cell growth. PloS One. 2012;7(3):e31127.

146. MacKeigan JP, Murphy LO, Blenis J. Sensitized RNAi screen of human kinases and phosphatases identifies new regulators of apoptosis and chemoresistance. Nat Cell Biol. juin 2005;7(6):591-600.

147. King TD, Zhang W, Suto MJ, Li Y. Frizzled7 as an emerging target for cancer therapy. Cell Signal. avr 2012;24(4):846-51.

148. Ueno K, Hazama S, Mitomori S, Nishioka M, Suehiro Y, Hirata H, et al. Down-regulation of frizzled-7 expression decreases survival, invasion and metastatic capabilities of colon cancer cells. Br J Cancer. 20 oct 2009;101(8):1374-81.

149. Ueno K, Hiura M, Suehiro Y, Hazama S, Hirata H, Oka M, et al. Frizzled-7 as a potential therapeutic target in colorectal cancer. Neoplasia N Y N. juill 2008;10(7):697-705.

150. Bertucci F, Finetti P, Birnbaum D. Basal breast cancer: a complex and deadly molecular subtype. Curr Mol Med. janv 2012;12(1):96-110.

151. Erbitux (cétuximab) : importance de la détermination du statut mutationnel des gènes RAS de type sauvage (exons 2, 3 et 4 des gènes KRAS et NRAS) avant d'instaurer un traitement par Erbitux - Lettre aux professionnels de santé - ANSM : Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé [Internet]. [cité 10 mars 2019]. Disponible sur: https://ansm.sante.fr/S-informer/Informations-de-securite-Lettres-aux-professionnels-de-sante/Erbitux-cetuximab-importance-de-la-determination-du-statut-mutationnel-des-genes-RAS-de-type-sauvage-exons-2-3-et-4-des-genes-KRAS-et-NRAS-avant-d-instaurer-un-traitement-par-Erbitux-Lettre-aux-professionnels-de-sante

152. Vectibix (panitumumab) : nouvelle recommandation concernant le statut mutationnel RAS – Lettre aux professionnels de santé - ANSM : Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé [Internet]. [cité 10 mars 2019]. Disponible sur: https://ansm.sante.fr/S-informer/Informations-de-securite-Lettres-aux-professionnels-de-sante/Vectibix-panitumumab-nouvelle-recommandation-concernant-le-statut-mutationnel-RAS-Lettre-aux-professionnels-de-sante

153. Lu X, Borchers AGM, Jolicoeur C, Rayburn H, Baker JC, Tessier-Lavigne M. PTK7/CCK-4 is a novel regulator of planar cell polarity in vertebrates. Nature. 1 juill 2004;430(6995):93-8.

154. Puppo F, Thomé V, Lhoumeau A-C, Cibois M, Gangar A, Lembo F, et al. Protein tyrosine kinase 7 has a conserved role in Wnt/β-catenin canonical signalling. EMBO Rep. janv 2011;12(1):43-9.

155. Hayes M, Naito M, Daulat A, Angers S, Ciruna B. Ptk7 promotes non-canonical Wnt/PCP-mediated morphogenesis and inhibits Wnt/β-catenin-dependent cell fate decisions during vertebrate development. Dev Camb Engl. avr 2013;140(8):1807-18.

156. Mossie K, Jallal B, Alves F, Sures I, Plowman GD, Ullrich A. Colon carcinoma kinase-4 defines a new subclass of the receptor tyrosine kinase family. Oncogene. 16 nov 1995;11(10):2179-84.

157. Martinez S, Scerbo P, Giordano M, Daulat AM, Lhoumeau A-C, Thomé V, et al. The PTK7 and ROR2 Protein Receptors Interact in the Vertebrate WNT/Planar Cell Polarity (PCP) Pathway. J Biol Chem. 18 déc 2015;290(51):30562-72.

158. Podleschny M, Grund A, Berger H, Rollwitz E, Borchers A. A PTK7/Ror2 Co-Receptor Complex Affects Xenopus Neural Crest Migration. PLoS ONE [Internet]. 17 déc 2015 [cité 14 mars 2019];10(12). Disponible sur: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4683079/

159. Lhoumeau A-C, Puppo F, Prébet T, Kodjabachian L, Borg J-P. PTK7: a cell polarity receptor with multiple facets. Cell Cycle Georget Tex. 15 avr 2011;10(8):1233-6.

160. Meng L, Sefah K, O'Donoghue MB, Zhu G, Shangguan D, Noorali A, et al. Silencing of PTK7 in colon cancer cells: caspase-10-dependent apoptosis via mitochondrial pathway. PloS One. 16 nov 2010;5(11):e14018.

161. Hatakeyama J, Wald JH, Printsev I, Ho H-YH, Carraway KL. Vangl1 and Vangl2: planar cell polarity components with a developing role in cancer. Endocr Relat Cancer. oct 2014;21(5):R345-356.

162. Hayes MN, McCarthy K, Jin A, Oliveira ML, Iyer S, Garcia SP, et al. Vangl2/RhoA Signaling Pathway Regulates Stem Cell Self-Renewal Programs and Growth in Rhabdomyosarcoma. Cell Stem Cell. 1 mars 2018;22(3):414-427.e6.

163. Kaucká M, Plevová K, Pavlová S, Janovská P, Mishra A, Verner J, et al. The planar cell polarity pathway drives pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia by the regulation of B-lymphocyte migration. Cancer Res. 1 mars 2013;73(5):1491-501.

164. Belotti E, Puvirajesinghe TM, Audebert S, Baudelet E, Camoin L, Pierres M, et al. Molecular characterisation of endogenous Vangl2/Vangl1 heteromeric protein complexes. PloS One. 2012;7(9):e46213.

165. Ivanov IP, Firth AE, Michel AM, Atkins JF, Baranov PV. Identification of evolutionarily conserved non-AUG-initiated N-terminal extensions in human coding sequences. Nucleic Acids Res. mai 2011;39(10):4220-34.

166. Merte J, Jensen D, Wright K, Sarsfield S, Wang Y, Schekman R, et al. Sec24b selectively sorts Vangl2 to regulate planar cell polarity during neural tube closure. Nat Cell Biol. janv 2010;12(1):41-46; sup pp 1-8.

167. Wansleeben C, Feitsma H, Montcouquiol M, Kroon C, Cuppen E, Meijlink F. Planar cell polarity defects and defective Vangl2 trafficking in mutants for the COPII gene Sec24b. Dev Camb Engl. avr 2010;137(7):1067-73.

168. Boncompain G, Divoux S, Gareil N, de Forges H, Lescure A, Latreche L, et al. Synchronization of secretory protein traffic in populations of cells. Nat Methods. 11 mars 2012;9(5):493-8.

169. Strutt H, Gamage J, Strutt D. Robust Asymmetric Localization of Planar Polarity Proteins Is Associated with Organization into Signalosome-like Domains of Variable Stoichiometry. Cell Rep. 06 2016;17(10):2660-71.

170. Gurney A, Axelrod F, Bond CJ, Cain J, Chartier C, Donigan L, et al. Wnt pathway inhibition via the targeting of Frizzled receptors results in decreased growth and tumorigenicity of human tumors. Proc Natl Acad Sci U S A. 17 juill 2012;109(29):11717-22.

171. Mita MM, Becerra C, Richards DA, Mita AC, Shagisultanova E, Osborne CRC, et al. Phase 1b study of WNT inhibitor vantictumab (VAN, human monoclonal antibody) with paclitaxel (P) in patients (pts) with 1st- to 3rd-line metastatic HER2-negative breast cancer (BC). J Clin Oncol. 20 mai 2016;34(15_suppl):2516-2516.

172. Zhang C, Yeung P, Beviglia L, Cancilla B, Tang T, Yen W-C, et al. Abstract 2830: Predictive biomarker identification for response to vantictumab (OMP-18R5; anti-Frizzled) by mining gene expression data of human breast cancer xenografts. Cancer Res. 1 oct 2014;74(19 Supplement):2830-2830.

173. Sachdev JC, Maitland ML, Sharma M, Moreno V, Boni V, Kummar S, et al. PF-06647020 (PF-7020), an antibody-drug conjugate (ADC) targeting protein tyrosine kinase 7 (PTK7), in patients (pts) with advanced solid tumors: Results of a phase I dose escalation and expansion study. J Clin Oncol. 20 mai 2018;36(15_suppl):5565-5565.

174. Tabatabai R, Linhares Y, Bolos D, Mita M, Mita A. Targeting the Wnt Pathway in Cancer: A Review of Novel Therapeutics. Target Oncol. 2017;12(5):623-41.

175. Mikels AJ, Nusse R. Wnts as ligands: processing, secretion and reception. Oncogene. 4 déc 2006;25(57):7461-8.

176. Chen B, Dodge ME, Tang W, Lu J, Ma Z, Fan C-W, et al. Small molecule-mediated disruption of Wnt-dependent signaling in tissue regeneration and cancer. Nat Chem Biol. févr 2009;5(2):100-7.

177. Liu J, Pan S, Hsieh MH, Ng N, Sun F, Wang T, et al. Targeting Wnt-driven cancer through the inhibition of Porcupine by LGK974. Proc Natl Acad Sci U S A. 10 déc 2013;110(50):20224-9.

178. Madan B, Ke Z, Harmston N, Ho SY, Frois AO, Alam J, et al. Wnt addiction of genetically defined cancers reversed by PORCN inhibition. Oncogene. 28 2016;35(17):2197-207.

179. Krishnamurthy N, Kurzrock R. Targeting the Wnt/beta-catenin pathway in cancer: Update on effectors and inhibitors. Cancer Treat Rev. janv 2018;62:50-60.

180. Säfholm A, Tuomela J, Rosenkvist J, Dejmek J, Härkönen P, Andersson T. The Wnt-5a–Derived Hexapeptide Foxy-5 Inhibits Breast Cancer Metastasis In vivo by Targeting Cell Motility. Clin Cancer Res. 15 oct 2008;14(20):6556-63.

181. Mehdawi LM, Prasad CP, Ehrnström R, Andersson T, Sjölander A. Non-canonical WNT5A signaling up-regulates the expression of the tumor suppressor 15-PGDH and induces differentiation of colon cancer cells. Mol Oncol. 2016;10(9):1415-29.

182. Wang Q, Williamson M, Bott S, Brookman-Amissah N, Freeman A, Nariculam J, et al. Hypomethylation of WNT5A, CRIP1 and S100P in prostate cancer. Oncogene. 4 oct 2007;26(45):6560-5.

183. Syed Khaja AS, Helczynski L, Edsjö A, Ehrnström R, Lindgren A, Ulmert D, et al. Elevated level of Wnt5a protein in localized prostate cancer tissue is associated with better outcome. PloS One. 2011;6(10):e26539.

184. Khaja ASS, Egevad L, Helczynski L, Wiklund P, Andersson T, Bjartell A. Emphasizing the role of Wnt5a protein expression to predict favorable outcome after radical prostatectomy in patients with low-grade prostate cancer. Cancer Med. août 2012;1(1):96-104.

185. El-Khoueiry AB, Ning Y, Yang D, Cole S, Kahn M, Zoghbi M, et al. A phase I first-in-human study of PRI-724 in patients (pts) with advanced solid tumors. J Clin Oncol. 20 mai 2013;31(15_suppl):2501-2501.

186. Sakamoto KM, Kim KB, Kumagai A, Mercurio F, Crews CM, Deshaies RJ. Protacs: chimeric molecules that target proteins to the Skp1-Cullin-F box complex for ubiquitination and degradation. Proc Natl Acad Sci U S A. 17 juill 2001;98(15):8554-9.

187. Tinworth CP, Lithgow H, Churcher I. Small molecule-mediated protein knockdown as a new approach to drug discovery. MedChemComm. 7 déc 2016;7(12):2206-16.

188. Sakamoto KM, Kim KB, Verma R, Ransick A, Stein B, Crews CM, et al. Development of Protacs to target cancer-promoting proteins for ubiquitination and degradation. Mol Cell Proteomics MCP. déc 2003;2(12):1350-8.

189. Baron R, Kneissel M. WNT signaling in bone homeostasis and disease: from human mutations to treatments. Nat Med. févr 2013;19(2):179-92.

190. Laine CM, Joeng KS, Campeau PM, Kiviranta R, Tarkkonen K, Grover M, et al. WNT1 mutations in early-onset osteoporosis and osteogenesis imperfecta. N Engl J Med. 9 mai 2013;368(19):1809-16.

191. Iwatsuki K, Liu H-X, Grónder A, Singer MA, Lane TF, Grosschedl R, et al. Wnt signaling interacts with Shh to regulate taste papilla development. Proc Natl Acad Sci U S A. 13 févr 2007;104(7):2253-8.

192. Zhang L-S, Lum L. Chemical Modulation of WNT Signaling in Cancer. Prog Mol Biol Transl Sci. 2018;153:245-69.

193. Biehs B, Dijkgraaf GJP, Piskol R, Alicke B, Boumahdi S, Peale F, et al. A cell identity switch allows residual BCC to survive Hedgehog pathway inhibition. Nature. 2018;562(7727):429-33.

194. Madan B, Virshup DM. Targeting Wnts at the source--new mechanisms, new biomarkers, new drugs. Mol Cancer Ther. mai 2015;14(5):1087-94.

195. Luke JJ, Bao R, Spranger S, Sweis RF, Gajewski T. Correlation of WNT/β-catenin pathway activation with immune exclusion across most human cancers. J Clin Oncol. 20 mai 2016;34(15_suppl):3004-3004.

196. INCa https://www.e-cancer.fr

197. La ligue contre le cancer https://www.ligue-cancer.net

ANNEXE I

Seminars in Cell & Developmental Biology xxx (2017) xxx–xxx

Contents lists available at ScienceDirect

Seminars in Cell & Developmental Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/semcdb

Review

The planar cell polarity Vangl2 protein: From genetics to cellular and molecular functions

Eric Bailly[a,b,c,d], Alexandra Walton[a,b,c,d], Jean-Paul Borg[a,b,c,d,*]

[a] Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille (CRCM), 'Cell Polarity, Cell Signalling, and Cancer', Equipe Labellisée Ligue Contre le Cancer, Inserm, U1068, Marseille, F-13009, France
[b] CNRS, UMR7258, Marseille, F-13009, France
[c] Institut Paoli-Calmettes, Marseille, F-13009, France
[d] Aix-Marseille University, UM 105, Marseille, F-13284, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 20 July 2017
Received in revised form 24 October 2017
Accepted 26 October 2017
Available online xxx

Keywords:
Vangl2
Planar cell polarity
Developmental pathway
Binding partners

ABSTRACT

Planar cell polarity (PCP) refers to the capacity of a tissue, typically, but not exclusively, an epithelium, to transmit directional information across the tissue plane such that its cellular constituents can differentiate, divide or move in a coordinated manner and along a common axis, generally orthogonal to the apical-basal axis. PCP relies on a core module of highly conserved proteins originally identified in *Drosophila* which can act intra- and extracellularly. In this review, we focus on the vertebrate ortholog of one of these core PCP components, namely the Vangl2 protein. After a brief historical perspective, we discuss novel cellular settings for which a cellular Vangl2 requirement has been recently documented, with a particular emphasis on adult tissues that rely on Vangl2 for the maintenance of their regenerative capacity or their physiological functions. Finally we compile the most recent data about Vangl2 interacting proteins.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Contents

1. Historical perspective of Vangl2 functions in PCP 00
2. New PCP-dependent cellular functions of Vangl2 00
3. Vangl2 trafficking: a long path to the surface 00
4. Molecular organization and partners of Vangl2 00
5. Concluding remarks 00
Acknowledgements 00
References 00

1. Historical perspective of Vangl2 functions in PCP

Vangl2 is a vertebrate counterpart of the *Drosophila melanogaster* Vang Gogh (Vang)/Strabismus (Stbm) protein, discovered nearly two decades ago by virtue of its central role in planar cell polarity (PCP) [1,2]. Pioneering genetic studies conducted in this organism identified a total of six so-called core PCP components, which in addition to Vang/Stbm included two seven-pass transmembrane proteins, Frizzled (Fz) and Flamingo (Fmi)/Starry Night (Stan), and three cytoplasmic factors, Dishevelled (Dsh), Prickle (Pk) and Diego (Dgo) [3]. This set of core PCP proteins appears remarkably well conserved as orthologs can be easily recognized throughout the animal kingdom with very few exceptions [4,5].

Vertebrates possess a second Vang/Stbm ortholog, Vangl1, that is not found in *Drosophila* or *C. elegans*. Vangl1 and Vangl2 are closely related and exhibit a large number of common interactors. The present review mainly focuses on Vangl2 as genetic studies support the view that the two paralogs have to a large extent overlapping functions notably in the context of mouse development [6,7].

* Corresponding author at: Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille Inserm, CNRS, Aix-Marseille Université, Institut Paoli-Calmettes, 27 bd Leï Roure, BP 30059, 13273 Marseille Cedex 09, France.
E-mail addresses: eric.bailly@inserm.fr (E. Bailly), jean-paul.borg@inserm.fr (J.-P. Borg).

https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.10.030
1084-9521/© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Please cite this article in press as: E. Bailly, et al., The planar cell polarity Vangl2 protein: From genetics to cellular and molecular functions, Semin Cell Dev Biol (2017), https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.10.030

Vangl2 is a membrane-embedded protein characterized by the presence of four internal and contiguous transmembrane domains in the amino-terminal half (Fig. 1a). The protein exhibits no canonical signal peptide and its amino- and carboxy-terminal regions are predicted to be exposed to the cytosol (Fig. 1b). This topology is supported by immunofluorescence data obtained with intact, *i.e.* non-permeabilized cells, showing the non-accessibility of an epitope tag introduced into the N- or C-terminal regions of Vangl1 whereas the same tag is readily accessible to antibodies when inserted in the predicted extracellular loops located between the first and second and between the third and fourth transmembrane domains of Vangl1 [8]. Besides the presence of two Ser/Thr phosphorylation clusters in the cytoplasmic N-terminal region of Vangl2 [9], the functional contribution of this region remains poorly characterized. This contrasts with the long intracellular C-terminal region which harbors interaction domains for multiple protein partners, including the two PCP components Dvl and Pk [10,11]. A *trans* Golgi network (TGN) export signal and a conserved PDZ binding motif (PBM) also map to this region [2,12]. It is also in this region that two missense mouse mutations causing a *looptail* phenotype have been mapped [10].

A salient feature of the core PCP module is the capacity of its components to segregate in a stereotyped and highly asymmetric manner, first along the apical-basal polarity axis and second, but most importantly, in a specified direction of the epithelial sheet [13]. This is best illustrated in the case of the developing *Drosophila* wing epithelium, an experimental setting that has tremendously contributed to our understanding of planar polarity organization and PCP-mediated regulatory mechanisms [14]. The power of this model stems from the fact that morphological manifestations of planar polarity can be directly read out through the stereotyped positioning and orientation of single actin-rich cell appendages, the trichomes that each cell of the wing epithelium assemble at its distal edge (Fig. 2a). Trichome assembly along the proximal-distal axis is preceded by a dramatic cellular redistribution of the core PCP proteins from a uniform apicolateral to a highly asymmetric local-

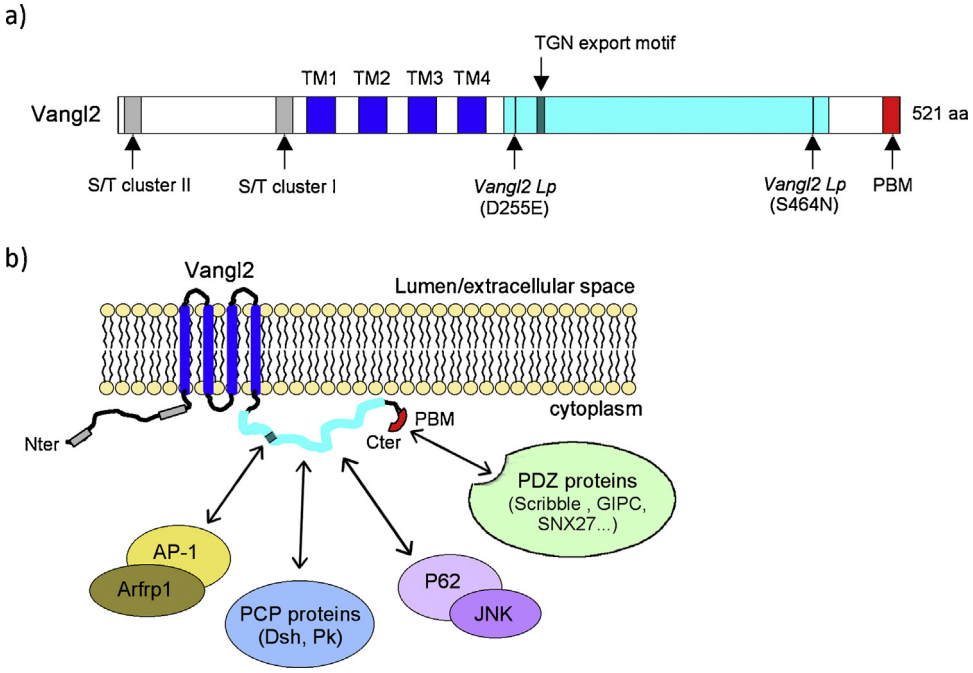


Fig. 1. Structural and topological organization of Vangl2. (a) Schematics depicting the structural organization of Vangl2 with the positions of its main domains such as the four transmembrane (TM) domains (dark blue), two Ser/Thr phosphorylation site clusters (grey), the Dvl/Pk interacting region (cyan), the C-terminal PDZ binding Motif (PBM) domains (red) or the TGN sorting motif (grey box in the C-terminal region). Positions of the two Lp mutations are also indicated by arrows. (b) Schematic representation of Vangl2 topology. Some of the many protein interactions that Vangl2 and possibly Vangl1 as well can make, notably with the other core PCP components and the trafficking regulatory protein SNX27. Note that Scribble has been shown to interact with both Vangl1 and Vangl2.

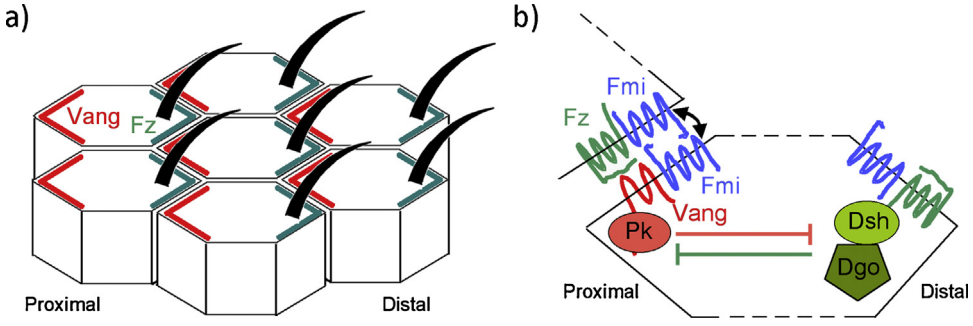


Fig. 2. Asymmetric distribution and antagonistic relationships of core PCP proteins in *Drosophila* wing epithelial cells. (a) Schematic representation of the asymmetric distribution of the fruit fly core PCP proteins in the wing epithelium. The distal positioning and tilting of each trichome is also depicted in each cell. The proximally accumulated Vang/Stbm-Pk complex is in red while the distally enriched Fr-Dsh complex is shown in green. (b) Schematics depicting the positive (double black arrows) intercellular interactions and the antagonizing intracellular interactions between opposing complexes formed by Vang/Stbm-Pk on the proximal pole and by Fz/Dsh on the distal edge of the cells.

Please cite this article in press as: E. Bailly, et al., The planar cell polarity Vangl2 protein: From genetics to cellular and molecular functions, Semin Cell Dev Biol (2017), https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.10.030

ization along the same axis. During this dynamic process Fz, Dsh and Dgo accumulate at the distal side, while Vang/Stbm and Pk concentrate on the opposite, *i.e.* proximal region (Fig. 2a). This cellular asymmetry is thought to result from an intricate series of antagonistic and stimulatory interactions between the two complexes. The reciprocal inhibitory interactions that operate intracellularly between Fz-Dsh-Dgo and Vang-Pk are intercellularly counterbalanced by stabilizing interactions occurring between the Fmi-Fz complex of one cell and the Fmi-Vang complex of its immediately adjacent neighbor (Fig. 2b). Such intercellular interactions serve at least two functions: the bridging of neighboring cells and the propagation of PCP signal from cell to cell [15]. These spatially integrated feedback-loops also account for both the interdependent localization property and the extreme dosage-sensitivity of the whole core PCP module, and explains in particular why loss or overexpression of any of the core components randomize the localization and polarity of the other core proteins. They also provide a molecular basis for how the transmembrane core PCP actors can function both in a non-cell autonomous and cell autonomous manner. It is worth noting here that similar asymmetric localization patterns of core PCP components have been described in planar polarized vertebrate epithelia, from mouse tissues such as cochlear inner ear [16,17], epidermis [11], limb [9] or trachea [19], to *Xenopus* larval skin [20].

The mechanisms governing the asymmetric distribution of the core PCP factors are progressively being unraveled. Yet a pending question remains regarding the symmetry-breaking cues that orient planar polarity in a particular direction [21]. Earlier studies hypothesized that the global PCP module comprising the protocadherins Fat (Ft) and Dachsous (Ds) and the Golgi-associated Four-jointed (Fj) kinase could play an instructive role in providing the directionality to the core PCP module. This scenario however was ruled out after a genetic analysis performed in *Drosophila* unambiguously demonstrated that the Ft-Ds module acts in parallel to rather than upstream of the core PCP pathway [22]. Other obvious candidates for external cues directing PCP orientation are the secreted Wnt ligands as PCP and the Wnt-Fz canonical pathways share at least two components: the Fz receptor itself which acts as a Wnt receptor in the canonical Wnt cascade and its direct partner Dsh. Data obtained in the *Drosophila* wing epithelium [23] and the mouse limb bud [9] lend strong support to this hypothesis [24,25].

Several vertebrate models have been exploited to study PCP functions, including mouse, *Xenopus* and zebrafish embryos. Remarkably in all these animal models, loss of Vangl2 function is invariably associated with the occurrence of neural tube defects (NTDs), the most severe form of which is the craniorachischisis phenotype with a complete opening of the neural tube from the midbrain-hindbrain boundary up to the tail tip [26]. NTDs result from disrupted convergent-extension (CE) movements that normally take place at the gastrulation and neurulation stage of embryogenesis. Early studies of Vangl2 in mammals have benefited from a spontanous *Looptail* (*Lp*) mutant mouse line isolated nearly seventy years ago by Strong and Hollander [27], long before the mutation could be mapped to the *Vangl2* gene [28]. The *Lp* encoded protein harbors a S464N substitution that confers a semi-dominant looped tail phenotype to heterozygous mice while *Lp/Lp* homozygous embryos die *in utero* with a craniorachischisis phenotype [27]. The *Lp* allele has been used to document several genetic interactions of Vangl2, in particular with the apicobasal polarity protein Scribble [29,30]. Using the planar polarized stereociliary bundles of hair cells in the mouse inner ear as a readout, Montcouquiol et al. could document extensive orientation anormalities, *i.e.* PCP defects, in the cochlea of *Lp* mouse mutants [26]. Consistent with the *Lp* phenotype in the mouse model, familial or sporadic cases of human NTDs have been reported in the literature for individuals harboring spontanous heterozygous missense mutations in the *VANGL2* locus [31,32].

2. New PCP-dependent cellular functions of Vangl2

The recent years have seen the emergence of novel mammalian models addressing Vangl2 functions beyond conventional PCP functions (Table 1). The mouse developing tooth, for instance, has been shown to require Vangl2 at an early step of its morphogenetic program, when a signaling center has to emerge and organize before instillating its differentiation program to the whole dental epithelium [33]. Another model is provided by the mouse tongue [34]. The dorsal epithelium of this organ is covered by several thousands of papillae whose morphological asymmetry present a degree of local order high enough such that a stereotyped macroscopic pattern of polarization can be deduced, thereby allowing PCP defects to be quantitatively assessed. Using conditional knockout constructs of *Vangl1* and *Vangl2* in the tongue epithelium, Wang et al. observed strong papillae orientation defects in the tongue of *Vangl1, Vangl2* double mutant mice [34], a phenotype that they found more penetrant than in the context of a *Fz3*, *Fz6* double mutation [35]. Whether this new role of Vangl1 and Vangl2 also requires their spatial segregation along the plane of the mouse lingual epithelium has not been addressed yet and will certainly deserve further immunolocalization studies.

Other mouse adult organs have caught the attention of PCP investigators, with the rationale that Vangl2 might contribute repair and homeostatic functions after birth (Table 1). Consistent with this idea, organs such as the brain, lung or kidney have been found to express substantial levels of Vangl2 [36]. In the case of adult kidney, induction of Vangl2 expression and of other PCP components has been observed in response to glomerular injury [37]. In this experimental setting, Rocques et al. could provide evidence that podocyte-specific ablation of Vangl2 exacerbates glomerular lesions [37], thereby arguing in favor of a protective role of Vangl2 in this context. Similar conclusions have been reached with the lung [38]. As for the kidney [39], branching morphogenesis of the lung takes place late in the development and critically depends on Vangl2 [40]. Recent findings indicate that the lungs of adult mice with slightly compromised Vangl2 function due to a heterozygous $Vangl2^{Lp/+}$ genetic background display larger alveolar spaces than wild type lungs, defects that persist as the animals age and are associated with impaired lung functions. Although the possibility that the altered lung function seen in $Vangl2^{Lp/+}$ adult mice stems from earlier embryonic defects has not been formally excluded, the authors favor the hypothesis that these defects reflect a disrupted regenerative capacity of the $Vangl2^{Lp/+}$ lung tissue [38].

Using the mouse cornea as another model to investigate PCP functions, it has been reported that Vangl2 is highly expressed in the adult tissue [41]. Furthermore, targeted *Vangl2* inactivation strongly impairs *in vitro* directional migration and alignment properties of corneal epithelial cells [41]. These results have been confirmed by *in vivo* data demonstrating a dramatic decrease of the characteristic centripetal migration of corneal cells from the periphery to the center of the cornea in the cornea of *Vangl2* KO mice. Because cornea is constantly replenished by cells coming from the limbus periphery, the migratory defects caused by the absence of Vangl2 is likely to have adverse repercussions on the regenerative capacity of this tissue. Evidence for a role of Vangl2 in adult tissues has also been obtained in studies of the male and female reproductive systems. In rat testes, Vangl2 expression in Sertoli and germs cells appears to play a critical role in the polarity, maturation and transport of spermatids during spermatogenis [42] while periodic expression of Vangl2 in the mouse uterus has been functionally linked to proper crypt formation and blastocyst

Please cite this article in press as: E. Bailly, et al., The planar cell polarity Vangl2 protein: From genetics to cellular and molecular functions, Semin Cell Dev Biol (2017), https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.10.030

Table 1
Vangl2-associated mutant phenotypes beyond conventional PCP functions.

Organ (species)	Vangl2 mutation	Phenotype	Molecular/cellular Pathway	References
Tooth (mouse)	RNA interference	Retarded tooth germ growth	ND	[33]
Tongue (mouse)	*Vangl2*$^{CKO/-}$; *K14-Cre* (viable)	papillae orientation defects	ND	[34]
Kidney (mouse)	*Vangl2*$^{Lp/Lp}$ (embryonic lethal)	Reduced kidney size, branching and glomerular maturation	ND	[39]
	Vangl2$^{Ex4/Flox}$; *Pod-Cr* (Podocyte-targeted Vangl2 KO)	Normal size Glomerular maturation delay	ND	[37]
	(viable)	Reduced Podocyte recovery after injury		
Lung (mouse)	*Vangl2*$^{Lp/Lp}$ (embryonic lethal)	Branching defects Alveolar enlargement	ND	[40]
	Vangl2$^{Lp/+}$	Imparired adult lung function	ND	[38]
Cornea (mouse)	*Vangl2*$^{Flox/Flox}$; *Le-Cre (Cornea-targeted Vangl2 KO)*	Centripetal cell migration defects	JNK pathway	[41]
Uterus (mouse)	*Vangl2*$^{Flox/Flox}$; *Prg-Cre*	Misdirected epithelial evaginations Defective crypt formation and blastocyst implantation	Wnt5a-ROR1/2 pathway	[43]
Testis (rat)	RNA interferrence	disrupted spermatid transport and polarity	Actin microfilament polarization	[42]
Skin (mouse)	*Vangl2*$^{Lp/Lp}$	Mis-angled hair follicles	Celsr1 dependent asymmetric localization	[18]
Brain (mouse)	*Vangl2*$^{Lp/Lp}$ (embryonic lethal)	Ciliary orientation and alignment defects	–	[45]
Trachea (mouse)	*Vangl2*$^{Lp/Lp}$	Misoriented motile cilia in multiciated tracheal cells	Planar polarization of MT-associated basal bodies	[19]

Abbreviations used throughout the table: ND: Not Determined.

implantation and development [43]. The contribution of Vangl2 to the planar polarized ciliary beating in mono- and multi-ciliated cells is now well established [44]. While first demonstrated in embryonic contexts, this Vangl2 function has been extended to postnatal events in the brain [45] as well as in the trachea [19].

3. Vangl2 trafficking: a long path to the surface

Vangl2, like its fly counterpart Vang/Stbm, localizes to the plasma membrane in planar polarized epithelial tissues [9,16,18]. Our knowledge of the regulatory factors responsible for the trafficking of Vangl2 from its site of biosynthesis, *i.e.* the endoplasmic reticulum (ER) to the place where PCP signaling is supposed to occur, *i.e.* the cell surface, is slowly progressing. Two genetic studies [46,47] focusing on mouse lines with PCP-related phenotypes have independently isolated mutant alleles of *Sec24b*, a gene that encodes a component of the coat protein complex II (COPII) involved in the ER-to-Golgi transport [48]. The finding that *Sec24b* genetically interacts with the dominant negative *Vangl2 looptail* mutant provided a first hint that the two genes might function in the same pathway. A role for Sec24b in the vesicular trafficking of Vangl2 has been demonstrated by elegant biochemical experiments showing that the loading of Vangl2 cargos onto vesicles could be recapitulated in an *in vitro* reaction assay containing recombinant Sec24b [46]. As expected, targeting of Vangl2 to the cell surface is impaired upon genetic inactivation of *Sec24b* [46,47,49].

In a search for small GTP-binding proteins that might regulate further downstream events of Vangl2 trafficking, Guo et al. [12] could ascribe an important role to the small GTPase Arfrp1 and the clathrin adaptor complex (AP-1) in Vangl2 export from the Trans-Golgi Network (TGN). Downregulation of either protein was found to induce a similar phenotype characterized by a massive accumulation of Vangl2 in a juxtanuclear compartment that colocalized with the TGN marker Golgin 97. This work has also provided evidence for the existence of a basolateral sorting tyrosine-based motif (YYXXF) in the C-terminal cytosolic domain of Vangl2 that is absolutely required for the interaction of Vangl2 with the μ1 subunit of AP-1 and for its TGN export. The model proposed by these authors is that the membrane recruitment of AP-1 by Arfrp1 exposes a domain of μ1 adaptin that allows the interaction and thereby the loading of Vangl2 into transport cargos [12]. The finding that localization of Frizzled 6 and Celsr1, two other components of the mammalian core PCP module, is insensitive to siRNA-mediated silencing of Arfrp1 and the μ1 adaptin is interesting as it suggests that distinct transmembrane PCP proteins use specific sorting machineries to ensure their polarized delivery to the right site. The TGN sorting mechanism of Vangl2 appears evolutionarily conserved as polarized localization of Vang/Stbm in *Drosophila* requires orthologs of ArfRp1 and AP-1 [50] and because the YYXXF sorting motif identified in Vangl2 is also found in Vang/Stbm [12].

Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) experiments performed in the *Drosophila* wing model [51] or more recently in the mouse oviduct [52] support the notion that cellular asymmetry of the core PCP proteins is achieved through their rapid turnover at the plasma membrane followed by a progressive stabilization at specialized subdomains or punctae [51]. Along the same lines, Vangl2 dynamically redistributes to anterior cell edges at the time mesodermal cells undergo CE movements in zebrafish or *Xenopus* embryos [53,54]. Yet our current understanding of the molecular mechanisms involved in the dynamic behavior of Vangl2 is still limited. Biochemical evidence for Vangl2 endocytosis has been reported using cell surface biotinylation of ectopically expressed Vangl2 in HEK293T cells [55]. In this assay, a small amount of the overexpressed Vangl2 pool could be detected among the cell surface labeled proteins, a fraction that markedly increased when dominant-negative forms of two well-established endocytic regulators namely Rab5 and dynamin were co-expressed [55]. Other trafficking regulatory factors like GIPC1 and SNX27 are likely to play an active role in Vangl2 recycling at the plasma membrane. Both factors harbor a PDZ domain that shows a robust yeast two-hybrid interaction with the PBM of Vangl2 [56,57]. GIPC1, in a complex with the actin motor Myosin IV, has been proposed to regulate the pool of Vangl2 at the plasma membrane, possibly by powering one of its internalization steps [56]. SNX27, on the

Please cite this article in press as: E. Bailly, et al., The planar cell polarity Vangl2 protein: From genetics to cellular and molecular functions, Semin Cell Dev Biol (2017), https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.10.030

other hand, is an early endosome-associated retromer component that may promote the retrieval and/or recycling of endocytosed Vangl2 back to the plasma membrane or to the TGN compartment [58]. Other proteins such as Rack1 or Syndecan 4 (Sdc4) have also been postulated to participate in the control of some undefined Vangl2 trafficking events based on their physical [59] or genetic interactions [60,61] with Vangl2. Vangl2 and Sdc4 both contain a C-terminal PBM, but whether this motif is required for their interaction, for instance *via* a third unidentified partner with multiple PDZ domains remains to be addressed.

4. Molecular organization and partners of Vangl2

Over the past 15 years, many Vangl2 interactors have been isolated through a variety of methods (see Table 2). While Vangl2 interacting proteins like Scribble [16,57,62], GIPC1 [56,57], Ror2 [9], p62/SQSTM1 [63], AP-1 [12], MCC [64] or more recently Nrdp1 [65] have been validated by independent functional studies, others need to be further characterized. Nevertheless the list of Vangl2 interacting proteins provided in Table 2 already gives us an idea of the large spectrum of regulatory mechanisms exploited or contributed by Vangl2 under normal or pathological conditions.

Not surprisingly, and excluding Vangl2 itself and Vangl1, four Vangl2 interacting proteins, namely Dvl [10,66], Fz3 [16], Pk1 [11,67] and the vertebrate Fmi homolog Celsr1 [18] are core PCP components whose fly orthologs also assemble in large complexes with Vang/Stbm [14]. These interactions are therefore likely reflecting ancestral binding properties of the core PCP components. We and others have provided biochemical evidence that Vangl2 can self-interact and also form hetero-oligomers with Vangl1 [36,68]. Moreover, we could demonstrate that Vangl1-Vangl2 hetero-oligomers required neither the N-terminal nor the C-terminal cytoplasmic domains of Vangl2, as a fragment of Vangl2 encompassing its four transmembrane domains still coimmunoprecipitated with Vangl1 [36]. The ability of Vangl1 and Vangl2 to hetero and homo-oligomerize echoes the supramolecular organization of fly core PCP complexes into signalosome-like structures as recently reported [69]. It is currently unclear whether Vangl1 and/or Vangl2 are endowed with paralog-specific functions or structural properties, but if this turned to be the case and as depicted in Fig. 3, the composition, stochiometry and relative abundance of such oligomers could have important functional implications.

The conserved PDZ interaction that Scribble entertains with Vang/Stbm/Vangl proteins [16,62,70], although still poorly understood from a mechanistic point of view, is nevertheless thought to be functionally important [36]. Considering the pivotal role of Scribble in the maintenance of apico-basal organization in polarized epithelia [62], this scaffold protein appears ideally positioned to serve as a molecular link between apico-basal polarity regulators and PCP factors (Fig. 3) as proposed by a recent study [71]. Scribble, however, is not the only PDZ protein to bind the PBM of Vangl2 and at least six other PDZ proteins have been shown to do so as well. These include GIPC1 [56] and SNX27 [57] whose possible function in Vangl2 trafficking has been discussed above. The multi-PDZ domain MAGI-3 protein has been proposed to bridge Frizzled4 and Vangl2 to promote Rac1-dependent activation of JNK signaling [72]. DLG/SAP97 and PSD95, on the other hand, are two members of the MAGUK protein family that bind the PBM of Vangl2 in very diverse cellular contexts [57,73,72]. These adaptor proteins are widely used by cell surface receptors, notably in neuronal cells, for their targeting to specialized membrane domains. Vangl2 indeed functions in neuronal cells and in particular in the postsynaptic compartment where it is found to be strongly enriched. A recent study indicates that the PDZ interaction between Vangl2 and the postsynaptic protein PDS95 is not absolutely required for the synapse-associated distribution of Vangl2 and suggests that at that site Vangl2 might serve to control the clustering of postsynaptic molecules [75]. The last PDZ protein to robustly interact with the PBM of Vangl2 is PDZRN3 [57]. However, whether this E3 ubiquitin ligase targets Vangl2 for polyubiquitination in a PBM-dependent manner is currently unknown but will certainly warrant further investigations.

Among the other Vangl2 interactors, Ror2, stands out as this single transmembrane receptor tyrosine kinase is strongly suspected to translate a mouse Wnt5a proximo-distal (PD) gradient into a global directional cue through a graded phosphorylation of Vangl2 that promotes its own asymmetric localization [9]. Ryk, another RTK member with a nonfunctional kinase domain seems to operate through a very similar mechanism [76]. MCC is a PDZ protein that binds Vangl2 in a manner similar to Dvl, *i.e.* through the same unconventional internal PDZ binding motif of Vangl2 and functional data support a role of MCC in the Wnt5a-mediated PCP pathway, with MCC acting downstream of Ror2 and Ryk and upstream of RhoA/JNK [64]. Potentially acting in the same signaling pathway, Dact1 [77] and Sestd1 [78], have also been shown

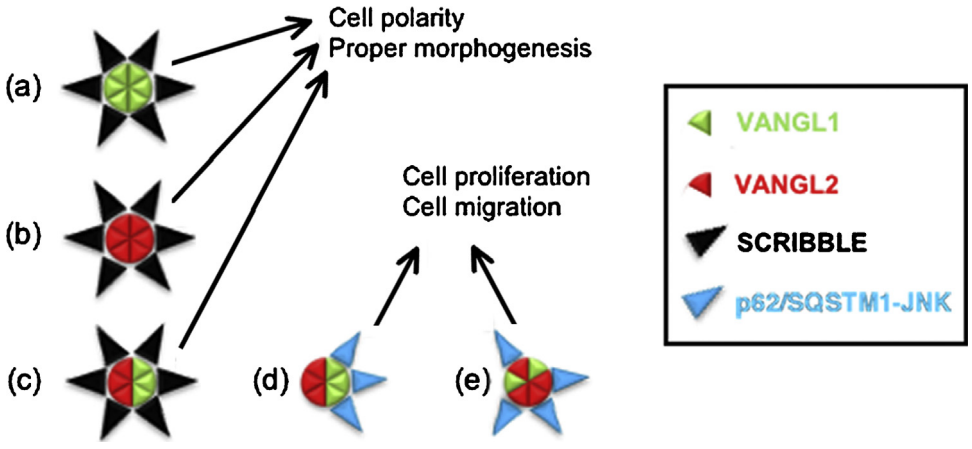


Fig. 3. A model of paralog-specific protein interactions and complex composition. In this model, we speculate on the possible functional consequences of having Vangl1 (green pies) and Vangl2 (red pies) complexes of various composition, stoichiometry and paralog specific interactors. We arbitrarily opted for a scenario whereby Vangl1 and Vangl2 make hexamers based on previous report [69]. In this model and depending on which isoform is expressed in a given cell type, Vangl1 and Vangl2 can form homohexamers (a) and (b) or heterohexamers (c)–(e). To further elaborate on this scenario, we postulate that Scribble (black triangles) can interact with both isoforms while p62/SQSTM1 (blue triangles) has a Vangl2-specific interaction associated with proliferative and pro-migratory properties. Finally we assume that the subunit ratio between Vangl1 and Vangl2 in the complexes reflects the relative concentration of each paralog.

Please cite this article in press as: E. Bailly, et al., The planar cell polarity Vangl2 protein: From genetics to cellular and molecular functions, Semin Cell Dev Biol (2017), https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.10.030

Table 2
A list of VANGL2 interacting proteins.

Vangl2 Partners	Method(s)	Interacting part of Vangl2	Vangl1 Interaction	Functional relevance	references
Dvl1, Dvl2 et Dvl3	Y2H	unconventional internal PBM requiring Ser464	Yes	Proper signaling during neural tube closure	[10]
	GST pull-down co-IP				[66]
Prickle	Y2H	Internal C-terminal domain (85 amino acids)	Yes	Fz/Dsh localization inhibition	[11]
	GST pull-down			Membrane Vangl2 localization	[67]
	Affinity purification/MS				
Celsr1/Fmi	Co-IP	ND	Yes	Interdependent asymmetric localization	[18]
Frizzled 3	co-IP	ND	ND	ND	[16]
Scribble	Y2H	C-terminal PBM	Yes	Vangl2 promigratory activity.	[16]
	Peptide pull down				[57]
	Co-IP				[62]
MAGI-3	pull-down Co-IP	C-terminal PBM	ND*	JNK signaling cascade.	[72]
GIPC1	Y2H	C-terminal PBM	ND*	Regulates Vangl2 trafficking	[56]
	co-IP				[57]
SNX27	Y2H	C-terminal PBM	ND*	ND	[57]
	Co-IP				[58]
PDZNR3	Y2H	C-terminal PBM	ND*	ND	[57]
DLG	Y2H	C-terminal PBM	ND*	plasma membrane formation during cellularization	[73]
PSD-95	co-IP	C-terminal PBM	ND*	postsynaptic Vangl2 localization	[74]
MCC	co-IP	C-terminal region	ND	Convergent extension	[64]
VANGL1	Affinity-purification/MS	region encompassing the four TM domains	Yes	ND	[36]
	Co-IP				[68]
VANGL2	Co-IP	ND	Yes	ND	[36] [68]
p62/SQSTM1	Affinity purification/MS	C-terminal region	No	JNK-dependent cancer cell proliferation	[63]
Ryk	Genetic interaction co-IP	ND	ND	Increased Vangl2 stability	[76]
ROR2	Co-IP in Wnt5a stimulated cells.	ND	ND	WNT5A-ROR2 dependent stimulation of VANGL2 phosphorylatin	[9]
Bbs8	co-IP	ND	ND	Vangl2 localization	[89]
Ift20	co-IP	ND	ND	Vangl2 localization	[89]
E-Cadherin	Co-IP	C-terminal region	ND	E-Cadherin internalization	[55]
N—Cadherin	co-IP	C-terminal region	ND	N—Cadherin internalization and synapse formation	[81]
AP-1 (μ1 subunit)	Y2H GST pull-down	YYXXF sorting signal (C-ter region)	ND	TGN export of Vangl2	[12]
Rac1	Co-IP	PBM-dependent	ND	adherens junctions formation	[79]
RhoA	Co-IP	ND	ND	adherens junctions formation	[79]
Dact1	Co-IP pulldown assays	ND	ND	Morphogenetic events at primitive streak	[77]
SestD1	Co-IP	ND	ND	Unknown	[78]
Rack1	Y2H co-IP	ND	ND	Vangl2 membrane localization	[59]
Nrdp1	Co-IP	C-terminal region	Yes	Dvl Ubiquitination	[65]

Abbreviations used throughout the table: PBM: PDZ Binding Motif, ND: Not Determined, PBM: PDZ Binding Motif, TM: Transmembrane domain, ND*: Not Determined but expected based on highly conserved PBM of Vangl1 and Vangl2.

to interact with Vangl2. Although the mechanism is not entirely clear, it has been proposed that Dact1 and SestD1 act in a complex downstream of Vangl2 to activate a Rho GTPase branch of the PCP signaling pathway. Interestingly, Vangl2 has also been reported to directly bind Rac1 and RhoA [79]. *In vitro* as well as *in vivo* functional data from the same study led the authors to propose that this might allow Vangl2 to recruit active Rac1 to adherens junctions where the Rho GTPase would affects cell adhesion and the actin cytoskeleton. E-Cadherin is a major component of AJs, in epithelial cells and Vangl2 expression has been shown to control its internalization in different cellular contexts [55]. Among the many functions of Vangl2, internalization clearly appears as a recurrent theme as this PCP component has been found to interact with and enhance the endocytosis of an ever growing list of PCP and non-PCP proteins, including Frizzled 3 [80], the E- and N-Cadherin AJ components [55,81], the podocyte protein nephrin [82]

Please cite this article in press as: E. Bailly, et al., The planar cell polarity Vangl2 protein: From genetics to cellular and molecular functions, Semin Cell Dev Biol (2017), https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.10.030

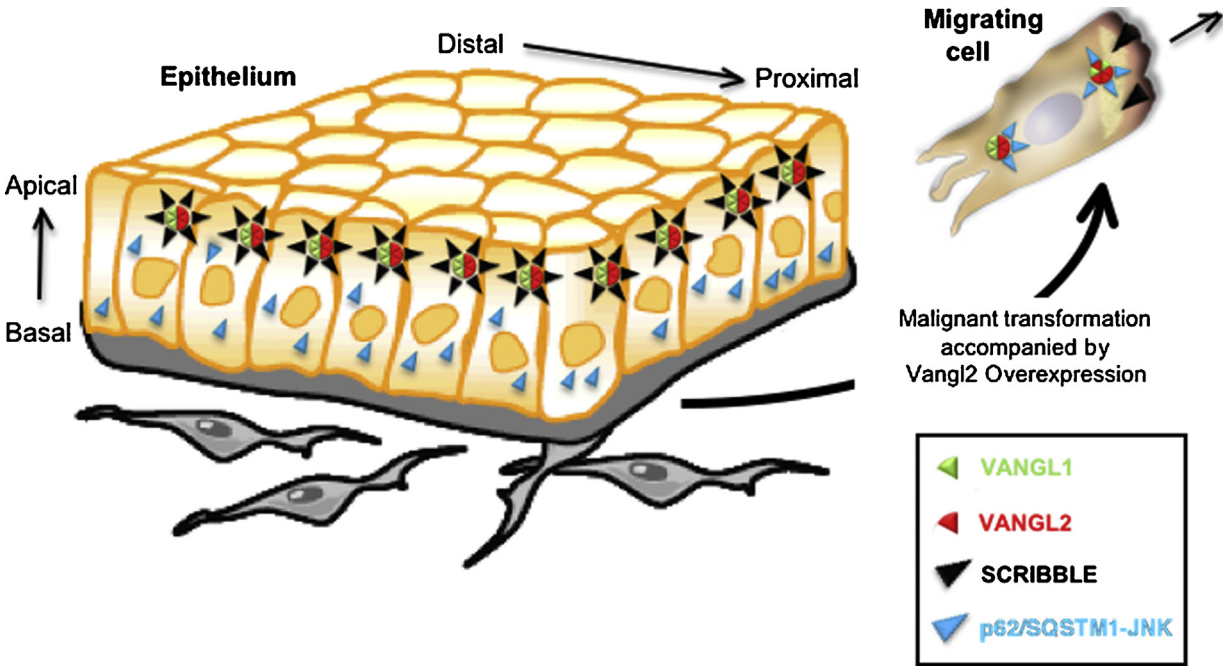


Fig. 4. Model of epithelial cell transformation with concomitant upregulation of Vangl2. Here we further elaborate at the tissular level on the molecular model presented in Fig. 2. Our model depicts the consequences of a Vangl2 up-regulation following an oncogenic event in an epithelium that originally expresses both isoforms and in which Scribble-dependent apical-basal and PCP signaling are strongly disrupted by a sudden excess of Vangl2. This model is largely inspired based on our recently published data [63].

or the matrix metalloproteinase MMP14 [83]. A newcomer to the list of Vangl2 interactors is the p62/SQSTM1 autophagy receptor [63] that has been recently co-purified with VANGL2 upon immunoprecipitation with a highly specific monoclonal antibody [55]. A previously uncharacterized small region (amino-acid 346–388) in p62/SQSTM1 was shown to be necessary and sufficient for the interaction with the cytoplasmic C-terminal region of VANGL2. The usual autophagy partners of p62/SQSTM1such as LC3 were undetectable in the immunopurified fraction, indicating that the VANGL2-p62/SQSTM1 complex had no functional relationship with an autophagic process. In this study we propose that this complex constitutes a platform for the recruitment and activation of JNK, an established PCP effector. Importantly, blocking the formation of this complex with a dominant negative p62/SQSTM1 peptide strongly reduced the tumorigenic potential of human breast cancer cells engrafted in the mouse fat pad. Remarkably, the magnitude of the VANGL2-p62/SQSTM1 interaction exhibited an inverse correlation with the occurrence of cell junctions, strongly suggesting that JNK activation by the Vangl2-p62/SQSTM1 platform is strongly enhanced following polarity loss events as frequently observed during tumorigenesis (Fig. 4).

Nrdp1, a RING-finger E3 ubiquitin ligase frequently downregulated in aggressive forms of glioblastomas, has been recently shown to physically interact with Vangl1 and Vangl2 possibly through a coiled coil interaction with these two paralogs [65]. Published biochemical data also revealed that Nrdp1 does not promote polyubiquitination of Vangl1 and Vangl2, despite the fact that it can bind the two proteins. Instead, this E3 ligase was found to stimulate the polyubiquitination of Dvl in a Vangl-dependent manner and through K63-ubiquitin linkages [65]. The model proposed by the authors posits that Vangl1/2-stimulated and Nrdp1-dependent polyubiquitination of Dvl1 prevents Dvl binding to phosphatidic acid and consequently the plasma membrane recruitment of Dvl1, thereby blocking the signals lying downstream of Dvl. Nrdp1 therefore behaves as a negative regulator of PCP transduction. While, as already mentioned, Vangl2 does not seem to be a substrate for this E3 ligase, it will be interesting to investigate whether this enzyme targets other regulatory proteins in a similar, *i.e.*Vangl2-dependent manner.

5. Concluding remarks

Vang/Stbm and its vertebrate counterparts, Vangl1 and Vangl2 have, over the years, caught the attention of more and more laboratories. Arguably, our current understanding of these key PCP molecules has greatly improved [84,85] and will hopefully continue to do so. For instance, it is now very clear that, contrary to the initial general belief, the PCP functions fulfilled by these two paralogs are not limited to embryonic developmental morphogenetic event but are frequently maintained and exploited throughout or over a long period of the adult life [38,41,43,52,86]. Other recent major advances in our conceptual understanding of PCP establishment mechanisms have come from the elucidation of a global cue used by some tissues to coordinately elongate in a proximo-distal direction [24,25] or from the recent use of sophisticated quantitative imaging techniques to address the fundamental question regarding the composition of the core protein complex *in vivo* [69].

Yet, we still have a lot to learn. For instance, we all would like to know more about how Vangl1/2 proteins reach their final destination, are targeted for internalization recycling or destruction, whether they also make higher-order assemblies, where and with whom. Another long standing and still unresolved issue relates to their status: should we really conceive them as *bona fide* membrane receptors for secreted ligands, and if not, what other proteins could do the job? While Ror2 has already been proposed to serve such a role [9], the list is likely to grow in the next decade. A new question then immediately comes to mind: how many complexes are these two paralogs able to form at the cell surface and/or in intracellular compartments and with which stochiometry? Finally, as their role in tumorigenesis is getting clearer [63,65,87,88] could these

Please cite this article in press as: E. Bailly, et al., The planar cell polarity Vangl2 protein: From genetics to cellular and molecular functions, Semin Cell Dev Biol (2017), https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.10.030

PCP molecules be of any help for diagnosis or therapeutic purpose? With all these questions, we have no doubt that many discoveries, and maybe also some surprises, are ahead of us.

Acknowledgements

We would like to sincerely apologize to our colleagues whose contributions were not cited in this review due to manuscript length limitation. JP Borg's lab is funded by La Ligue Nationale Contre le Cancer (Label Ligue J.P.B.), Institut Paoli-Calmettes, Assistance Publique – Hôpitaux de Marseille (fellowship to A.W.), and SIRIC (INCa-DGOS-Inserm 6038). JPB is a scholar of Institut Universitaire de France.

References

[1] J. Taylor, N. Abramova, J. Charlton, P.N. Adler, Van Gogh: a new *Drosophila* tissue polarity gene, Genetics 150 (1998) 199–210.
[2] T. Wolf, G.M. Rubin, Strabismus: a novel gene that regulates tissue polarity and cell fate decisions in *Drosophila*, Development 125 (1998) 1149–1159.
[3] J.A. Zallen, Planar polarity and tissue morphogenesis, Cell 129 (2007) 1051–1063.
[4] Q. Schenkelaars, L. Fierro-Constain, E. Renard, C. Borchiellini, Retracing the path of planar cell polarity, BMC Evol. Biol. 16 (2016) 69–81.
[5] R. Hale, D. Strutt, Conservation of planar pathway function across the animal kingdom, Annu. Rev. Genet. 49 (2015) 529–551.
[6] E. Torban, A.-M. Patenaude, S. Leclerc, S. Rakowiecki, S. Gauthier, G. Andelfinger, D.J. Epstein, P. Gros, Genetic interaction between members of the Vangl family causes neural tube defects in mice, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 105 (2008) 3449–3454.
[7] H. Song, J. Hu, W. Chen, G. Elliott, P. Andre, B. Gao, Y. Yang, Planar cell polarity breaks bilateral symmetry by controlling ciliary positioning, Nature 466 (2010) 378–382.
[8] A. Iliescu, M. Gravel, C. Horth, S. Apuzzo, P. Gros, Transmembrane topology of mammalian planar cell polarity protein Vangl1, Biochemistry 50 (2010) 2274–2282.
[9] B. Gao, H. Song, K. Bishop, G. Elliot, L. Garrett, M.A. English, P. Andre, J. Robinson, R. Sood, Y. Minami, A.N. Economides, Y. Yang, Wnt signaling gradients establish planar cell polarity by inducing Vangl2 phosphorylation through Ror2, Dev. Cell 20 (2011) 163–176.
[10] E. Torban, H.J. Wang, N. Groulx, P. Gros, Independent mutations in mouse Vangl2 that cause neural tube defects in looptail mice impair interaction with members of the Dishevelled family, J. Biol. Chem. 279 (2004) 52703–52713.
[11] A. Jenny, R.S. Darken, P.A. Wilson, M. Mlodzik, Prickle and Strabismus form a functional complex to generate a correct axis during planar cell polarity signaling, EMBO J. 22 (2003) 4409–4420.
[12] Y. Guo, G. Zanetti, R. Schekman, A novel GTP-binding protein-adaptor protein complex responsible for export of Vangl2 from the trans Golgi network, Elife 2 (2013) e00160.
[13] D. Devenport, The cell biology of planar cell polarity, J. Cell Biol. 207 (2014) 171–179.
[14] P.N. Adler, The frizzled/Stan pathway and planar cell polarity in the *Drosophila* wing, Curr. Top. Dev. Biol. 101 (2012) 1–31.
[15] H. Strutt, D. Strutt, Asymmetric localisation of planar polarity proteins: mechanisms and consequences, Semin. Cell Dev. Biol. 20 (2009) 957–963.
[16] M. Montcouquiol, N. Sans, D. Huss, J. Kach, J.D. Dickman, A. Forge, R.A. Rachel, N.G. Copeland, N.A. Jenkins, D. Bogani, J. Murdoch, M.E. Warchol, R.J. Wenthold, M.W. Kelley, Asymmetric localization of Vangl2 and Fz3 indicate novel mechanisms for planar cell polarity in mammals, J. Neurosci. 26 (2006) 5265–5275.
[17] Y. Wang, N. Guo, J. Nathans, The role of frizzled3 and frizzled6 in neural tube closure and in the planar polarity of inner-ear sensory hair cells, J. Neurosci. 26 (2006) 2147–2156.
[18] D. Devenport, E. Fuchs, Planar polarization in embryonic epidermis orchestrates global asymmetric morphogenesis of hair follicles, Nat. Cell Biol. 10 (2008) 1257–1268.
[19] E.K. Vladar, R.D. Bayly, A.M. Sangoram, M.P. Scott, J.D. Axelrod, Microtubules enable the planar cell polarity of airway cilia, Curr. Biol. 22 (2012) 2203–2212.
[20] M.T. Butler, J.B. Wallingford, Control of vertebrate core planar cell polarity protein localization and dynamics by Prickle 2, Development 142 (2015) 3429–3439.
[21] J. Wu, M. Mlodzik, A quest for the mechanism regulating global planar cell polarity of tissues, Trends Cell Biol. 19 (2009) 295–305.
[22] J. Casal, P.A. Laurence, G. Struhl, Two separate molecular systems, Dachsous/Fat and Starry Nnight/Frizzled, act independently to confer planar cell polarity, Development 133 (2006) 4561–4572.
[23] J. Wu, A.C. Roman, J.M. Carvajal-Gonzalez, M. Mlodzik, Wg and Wnt4 provide long-range directional input to planar cell polarity orientation in Drosophila, Nat. Cell Biol. 15 (2013) 1045–1055.
[24] Y. Yang, M. Mlodzik, Wnt-Frizzled/planar cell polarity signaling: cellular orientation by facing the wind (Wnt), Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 31 (2015) 623–646.
[25] B. Gao, Wnt regulation of planar cell polarity (PCP), Curr. Top. Dev. Biol. 101 (2012) 263–295.
[26] E. Torban, C. Kor, P. Gros, Van Gogh-like2 (Strabismus) and its role in planar cell polarity and convergent extension in vertebrates, Trends Genet. 20 (2004) 570–577.
[27] L.C. Strong, F. Hollander, Hereditary loop-tail in the house mouse: accompanied by imperforate vagina and with lethal craniorachisschisis when homozygous, J. Hered. 40 (1949) 329–334.
[28] Z. Kibar, K.J. Vogan, N. Groux, M.J. Justice, D.A. Underhill, P. Gros, Ltap, a mammalian homolog of Drosophila Strabismus/Vang Gogh, is altered in the mouse neural tube mutant Loop-tail, Nat. Genet. 28 (2001) 251–255.
[29] M. Montcouquiol, R.A. Rachel, P.J. Lanford, N.G. Copeland, N.A. Jenkins, M.W. Kelley, Identification of Vangl2 and Scrb1 as planar polarity genes in mammals, Nature 423 (2003) 173–177.
[30] J.N. Murdoch, D.J. Henderson, K. Doudney, C. Gaston-Massuet, H.M. Phillips, C. Paternotte, R. Arkell, P. Stanier, A.J. Copp, Disruption of scribble (Scrb1) causes severe neural tube defects in the circletail mouse, Hum. Mol. Genet. 112 (2003) 87–98.
[31] Y.P. Lei, T. Zhang, H. Li, B.L. Wu, L. Jin, H.Y. Wang, VANGL2 mutations in human cranial neural-tube defects, N. Engl. J. Med. 362 (2010) 2232–2235.
[32] A. Iliescu, M. Gravel, C. Horth, P. Gros, Independent mutations at Arg181 and Arg274 of Vangl proteins that are associated with neural tube defects in humans decrease protein stability and impair membrane targeting, Biochemistry 53 (2014) 5356–5364.
[33] Z. Wu, D. Epasinghe, Jinquan He, Liwen Li, David W. Green, Min-Jung Lee, Han-Sung Jung, Altered tooth morphogenesis after silencing the planar cell polarity core component, Vangl2, Cell Tissue Res. 366 (2016) 617–621.
[34] Y. Wang, J. Williams, A. Rattner, S. Wu, A.G. Bassuk, A.M. Goffinet, J. Nathans, Patterning of papillae on the mouse tongue: a system for the quantitative assessment of planar cell polarity signaling, Dev. Biol. 419 (2016) 298–310.
[35] Z.L. Hua, H. Chang, Y. Wang, P.M. Smallwood, J. Nathans, Partial interchangeability of Fz3 and Fz6 in tissue polarity signaling for epithelial orientation and axon growth and guidance, Development 141 (2014) 3944–3954.
[36] E. Belotti, T.M. Puvirajesinghe, S. Audebert, E. Baudelet, L. Camoin, M. Pierres, L. Lasvaux, G. Ferracci, M. Montcouquiol, J.P. Borg, Molecular characterisation of endogenous Vangl2/Vangl1 heteromeric protein complexes, PLoS One 7 (9) (2012) e46213.
[37] B.L. Rocque, S. Babayeva, J. Li, V. Leung, L. Nezvitsky, A.V. Cybulsky, P. Gros, E. Torban, Deficiency of the planar cell polarity protein Vangl2 in podocytes affects glomerular morphogenesis and increases susceptibility to injury, J. Am. Soc. Nephrol. 26 (2015) 576–586.
[38] T. Poobalasingam, L.L. Yates, S.A. Walker, M. Pereira, N.Y. Gross, A.A.M. Kolatsi-Joannou, M.-R. Jarvelin, J. Pekkanen, E. Papakrivopoulou, D.A. Long, M. Griffiths, D. Wagner, M. Königshoff, M. Hind, C. Minelli, C.M. Lloyd, C.H. Dean, Heterozygous Vangl2Looptail mice reveal novel roles for the planar cell polarity pathway in adult lung homeostasis and repair, Dis. Model Mech. 10 (2017) 409–423.
[39] L.L. Yates, J. Papakrivopoulou, D.A. Long, P. Goggolidou, J.O. Connolly, A.S. Woolf, C.H. Dea, The planar cell polarity gene Vangl2 is required for mammalian kidney-branching morphogenesis and glomerular maturation, Hum. Mol. Genet. 19 (2010) 4663–4676.
[40] L.L. Yates, C. Schnatwinkel, J.N. Murdoch, D. Bogani, C.J. Formstone, S. Townsend, A. Greenfield, L.A. Niswander, C.H. Dean, The PCP genes Celsr1 and Vangl2 are required for normal lung branching morphogenesis, Hum. Mol. Genet. 11 (2010) 2251–2267.
[41] A.S. Findlay, D.A. Panzica, P. Walczysko, A.B. Holt, D.J. Henderson, J.D. West, A.M. Rajnicek, J.M. Collinson, The core planar cell polarity gene, Vangl2, directs adult corneal epithelial cell alignment and migration, R. Soc. Open Sci. 3 (2016).
[42] H. Chen, D.D. Mruk, W.M. Lee, C.Y. Cheng, Planar cell polarity (PCP) protein Vangl2 regulates ectoplasmic specialization dynamics via its effects on actin microfilaments in the testes of male rats, Endocrinology 157 (2016) 2140–2159.
[43] J. Yuana, J. Chaa, W. Denga, A. Bartosa, X. Suna, H.-Y.H. Hob, J.-P. Borg, T.P. Yamaguchie, Y. Yangf, S.K. Dey, Planar cell polarity signaling in the uterus directs appropriate positioning of the crypt for embryo implantation, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 113 (2016) 8079–8088.
[44] J.B. Wallingford, Planar cell polarity signaling, cilia and polarized ciliary beating, Curr. Opin. Cell Biol. 22 (2010) 597–604.
[45] B. Guirao, A. Meunier, S. Mortaud, A. Aguilar, J.M. Corsi, L. Strehl, Y. Hirota, A. Desoeuvre, C. Boutin, Y.G. Han, Z. Mirzadeh, H. Cremer, M. Montcouquiol, K. Sawamoto, N. Spassky, Coupling between hydrodynamic forces and planar cell polarity orients mammalian motile cilia, Nat. Cell Biol. 12 (2010) 341–3150.
[46] J. Merte, D. Jensen, K. Wright, S. Sarsfield, Y. Wang, R. Schekman, D.D. Ginty, Sec24b selectively sorts Vangl2 to regulate planar cell polarity during neural tube closure, Nat. Cell Biol. 12 (2010) 41–46.
[47] C. Wansleeben, H. Feitsma, M. Montcouquiol, C. Kroon, E. Cuppen, F. Meijlink, Planar cell polarity defects and defective Vangl2 trafficking in mutants for the COPII gene Sec24b, Development 137 (2010) 1067–1073.

Please cite this article in press as: E. Bailly, et al., The planar cell polarity Vangl2 protein: From genetics to cellular and molecular functions, Semin Cell Dev Biol (2017), https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.10.030

[48] J.G. D'Arcangelo, K.R. Stahmer, E.A. Miller, Vesicle-mediated export from the ER: COPII coat function and regulation, Biochim. Biophys. Acta 1833 (2013) 2464–2472.
[49] X.Y. Yang, X.Y. Zhou, Q.Q. Wang, H. Li, Y. Chen, Y.P. Lei, X.W. Ma, P. Kong, Y. Shi, L. Jin, T. Zhang, H.Y. Wang, Mutations in the COPII vesicle component gene SEC24B are associated with human neural tube defects, Hum. Mutat. 34 (2013) 1094–1101.
[50] J.M. Carvajal-Gonzalez, S. Balmer, M. Mendoza, A. Dussert, G. Collu, A.-C. Roman, U. Weber, B. Ciruna, M. Mlodzik, The clathrin adaptor AP-1 complex and Arf1 regulate planar cell polarity in vivo, Nat. Commun. 7 (2015) 6751.
[51] H. Strutt, S.J. Warrington, D. Strutt, Dynamics of core planar polarity protein turnover and stable assembly into discrete membrane subdomains, Dev. Cell 20 (2011) 511–525.
[52] D. Shi, F. Usami, K. Komatsu, S. Oka, T. Abe, T. Uemura, T. Fujimori, Dynamics of planar cell polarity protein Vangl2 in the mouse oviduct epithelium, Mech. Dev. 141 (2016) 78–89.
[53] I. Roszko, Diane S. Sepich, Jason R. Jessen, Anand Chandrasekhar, Lilianna Solnica-Krezel, A dynamic intracellular distribution of Vangl2 accompanies cell polarization during zebrafish gastrulation, Development 142 (2015) 2508–2520.
[54] O. Ossipova, K. Kyeongmi, S.Y. Sokol, Planar polarization of Vangl2 in the vertebrate neural plate is controlled by Wnt and Myosin II signaling, Biol. Open 4 (2015) 722–730.
[55] T. Nagaoka, A. Inutsuka, K. Begum, K.M. Bin Hafiz, M. Kishi, Vangl2 regulates E-cadherin in epithelial cells, Sci. Rep. 4 (2014) 6940.
[56] A.P. Giese, J. Ezan, L. Wang, L. Lasvaux, F. Lembo, C. Mazzocco, E. Richard, J. Reboul, J.P. Borg, M.W. Kelley, N. Sans, J. Brigande, M. Montcouquiol, Gipc1 has a dual role in Vangl2 trafficking and hair bundle integrity in the inner ear, Development 139 (2012) 3775–3785.
[57] E. Belotti, J. Polanowska, A.M. Daulat, S. Audebert, V. Thome, J.C. Lissitzky, F. Lembo, K. Blibek, S. Omi, N. Lenfant, A. Gangar, M. Montcouquiol, M.J. Santoni, M. Sebbagh, M. Aurrand-Lions, S. Angers, L. Kodjabachian, J. Reboul, J.P. Borg, The human PDZome: a gateway to PSD95-Disc large-zonula occludens (PDZ)-mediated functions, Mol. Cell. Proteom. 12 (2013) 2587–2603.
[58] F. Steinberg, M. Gallon, M. Winfield, E.C. Thomas, A.J. Bell, K.J. Heesom, J.M. Tavaré, P.J. Cullen, A global analysis of SNX27–retromer assembly and cargo specificity reveals a function in glucose and metal ion transport, Nat. Cell Biol. 15 (2013) 461–471.
[59] S. Li, R. Esterberg, V. Lachance, D. Ren, K. Radde-Gallwitz, F. Chi, J.L. Parent, A. Fritz, P. Chen, Rack1 is required for Vangl2 membrane localization and planar cell polarity signaling while attenuating canonical Wnt activity, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 108 (2011) 2264–2269.
[60] N. Escobedo, O. Contreras, R. Muñoz, M. Farías, H. Carrasco, C. Hill, U. Tran, S.E. Pryor, O. Wessely, A.J. Copp, J. Larraín, Syndecan 4 interacts genetically with Vangl2 to regulate neural tube closure and planar cell polarity, Development 140 (2013) 3008–3017.
[61] Y. Wang, N. Baeyens, F. Corti, K. Tanaka, J.S. Fang, J. Zhang, Y. Jin, B. Coon, K.K. Hirschi, M.A. Schwartz, M. Simons, Syndecan 4 controls lymphatic vasculature remodeling during mouse embryonic development, Development 143 (2016) 4441–4451.
[62] L.M. Kallay, A. McNickle, P.J. Brennwald, A.L. Hubbard, L.T. Braiterman, Scribble associates with two polarity proteins, Lgl2 and Vangl2, via distinct molecular domains, J. Cell. Biochem. 99 (2006) 647–664.
[63] T.M. Puvirajesinghe, F. Bertucci, A. Jain, P. Scerbo, E. Belotti, S. Audebert, M. Sebbagh, M. Lopez, A. Brech, P. Finetti, E. Charafe-Jauffret, M. Chaffanet, R. Castellano, A. Restouin, S. Marchetto, Y. Collette, A. Goncalves, I. Macara, D. Birnbaum, L. Kodjabachian, T. Johansen, J.P. Borg, Identification of p62/SQSTM1 as a component of non-canonical Wnt VANGL2-JNK signalling in breast cancer, Nat. Commun. 7 (2016) 10318.
[64] T. Young, Y. Poobalan, E.K. Tan, S. Tao, S. Ong, P. Wehner, J. Schwenty-Lara, C.Y. Lim, A. Sadasivam, M. Lovatt, S.T. Wang, Y. Ali, A. Borchers, K. Sampath, N.R. Dunn, The PDZ domain protein Mcc is a novel effector of non-canonical Wnt signaling during convergence and extension in zebrafish, Development 141 (2014) 3505–3516.
[65] J.H. Wald, J. Hatakeyama, I. Printsev, A. Cuevas, W.H.D. Fry, M.J. Saldana, K. VanderVorst, A. Rowson-Hodel, J.M. Angelastro, C. Sweeney, K.L. Carraway 3rd, Suppression of planar cell polarity signaling and migration in glioblastoma by Nrdp1-mediated Dvl polyubiquitination, Oncogene 36 (2017) 5158–5167.
[66] M. Park, R.T. Moon, The planar cell-polarity gene stbm regulates cell behaviour and cell fate in vertebrate embryos, Nat. Cell Biol. 4 (2002) 20–25.
[67] A.M. Daulat, O. Luu, A. Sing, L. Zhang, J.L. Wrana, H. McNeill, R. Winklbauer, S. Angers, Mink1 regulates β-catenin-independent Wnt signaling via prickle phosphorylation, Mol. Cell. Biol. 32 (2012) 173–185.
[68] H. Yin, C.O. Copley, L.V. Goodrich, M.R. Deans, Comparison of phenotypes between different vangl2 mutants demonstrates dominant effects of the looptail mutation during hair cell development, PLoS One 7 (2) (2012) e31988.
[69] H. Strutt, J. Gamage, D. Strutt, Robust asymmetric localization of planar polarity proteins is associated with organization into signalosome-like domains of variable stoichiometry, Cell Rep. 17 (2016) 2660–2671.
[70] J.-R. Courbard, A. Djiane, J. Wu, M. Mlodzik, The apical/basal-polarity determinant acribble cooperates with the PCP core factor Stbm/Vang and functions as one of its effectors, Dev. Biol. 333 (2009) 67–77.
[71] F. Kharfallah, M.C. Guyot, A.R. El Hassan, R. Allache, E. Merello, P. De Marco, G. Di Cristo, V. Capra, Z. Kibar, Scribble1 plays an important role in the pathogenesis of neural tube defects through its mediating effect of Par-3 and Vangl1/2 localization, Hum. Mol. Genet. 26 (2017) 2307–2320.
[72] R. Yao, Y. Natsume, T. Noda, MAGI-3 is involved in the regulation of the JNK signaling pathway as a scaffold protein for frizzled and Ltap, Oncogene 23 (36) (2004) 6023–6030.
[73] O.K. Lee, K.K. Frese, J.S. James, D. Chadda, Z.H. Chen, R.T. Javier, K.O. Cho, Discs-Large and Strabismus are functionally linked to plasma membrane formation, Nat. Cell Biol. 5 (2003) 987–993.
[74] T. Yoshioka, A. Hagiwara, Y. Hida, T. Ohtsuka, Vangl2 the planar cell polarity protein, is complexed with postsynaptic density protein PSD-95, FEBS Lett. 587 (2013) 1453–1459.
[75] T. Nagaoka, K. Tabuchi, M. Kishi, PDZ interaction of Vangl2 links PSD-95 and Prickle2 but plays only a limited role in the synaptic localisation of Vangl2, Sci. Rep. 5 (2015) 12916.
[76] P. Andre, Q. Wang, N. Wang, B. Gao, A. Schilit, M.M. Halford, S.A. Stacker, X. Zhang, Y. Yang, The Wnt coreceptor Ryk regulates Wnt/planar cell polarity by modulating the degradation of the core planar cell polarity component Vangl2, J. Biol. Chem. 287 (2012) 44518–44525.
[77] R. Suriben, S. Kivimae, D.A. Fisher, R.T. Moon, B.N. Cheyette, Posterior malformations in Dact1 mutant mice arise through misregulated Vangl2 at the primitive streak, Nat. Genet. 41 (9) (2009) 977–985.
[78] X.Y. Yang, B.N. Cheyette, SEC14 and spectrin domains 1 (Sestd1) and Dapper antagonist of catenin 1 (Dact1) scaffold proteins cooperatively regulate the Van Gogh-like 2 (Vangl2) four-pass transmembrane protein and planar cell polarity (PCP) pathway during embryonic development in mice, J. Biol. Chem. 288 (2013) 20111–20120.
[79] M. Lindqvist, Z. Horn, V. Bryja, G. Schulte, P. Papachristou, R. Ajima, C. Dyberg, E. Arenas, T.P. Yamaguchi, H. Lagercrantz, T. Ringstedt, Vang-like protein 2 and Rac1 interact to regulate adherens junctions, J. Cell Sci. 123 (2010) 472–483.
[80] B. Shafer, K. Onishi, C. Lo, G. Colakoglu, Y. Zou, Vangl2 promotes Wnt/planar cell polarity-like signaling by antagonizing Dvl1-mediated feedback inhibition in growth cone guidance, Dev. Cell 20 (2011) 177–191.
[81] T. Nagaoka, R. Ohash, A. Inutsuka, S. Sakai, N. Fujisawa, M. Yokoyama, Y.H. Huang, M. Igarashi, M. Kishi, The Wnt/planar cell polarity pathway component Vangl2 induces synapse formation through direct control of N-cadherin, Cell Rep. 6 (2014) 916–927.
[82] S. Babayeva, B. Rocque, L. Aoudjit, Y. Zilber, J. Li, C. Baldwin, H. Kawachi, T. Takano, E. Torban, Planar cell polarity pathway regulates nephrin endocytosis in developing podocytes, J. Biol. Chem. 288 (2013) 24035–24048.
[83] B.B. Williams, V.A. Cantrell, N.A. Mundell, A.C. Bennett, R.E. Quick, J.R. Jessen, VANGL2 regulates membrane trafficking of MMP14 to control cell polarity and migration, J. Cell Sci. 125 (2012) 2141–2147.
[84] E. Torban, A. Iliescu, P. Gros, An expanding role of Vangl proteins in embryonic development, Curr. Top. Dev. Biol. 101 (2012) 237–261.
[85] M. Sebbagh, J.-P. Borg, Insight into planar cell polarity, Exp. Cell Res. 328 (2014) 284–295.
[86] E.K. Vladar, J.V. Nayak, C.E. Milla, J.D. Axelrod, Airway epithelial homeostasis and planar cell polarity signaling depend on multiciliated cell differentiation, JCI Insight 1 (2016), pii: e88027.
[87] J. Hatakeyama, J.H. Wald, I. Printsev, H.-Y. Henry Ho, K.L. Carraway, Vangl1 and Vangl2: planar cell polarity components with a developing role in cancer, Endocr. Relat. Cancer 21 (2014) R345–R356.
[88] J.N. Anastas, T.L. Biechele, M. Robitaille, J. Muster, K.H. Allison, S. Angers, R.T. Moon, A protein complex of SCRIB NOS1AP and VANGL1 regulates cell polarity and migration, and is associated with breast cancer progression, Oncogene 31 (2012) 3696–3708.
[89] H.L. May-Simera, R.S. Petralia, M. Montcouquiol, Y.X. Wang, K.B. Szarama, Y. Liu, W. Lin, M.R. Deans, G.J. Pazour, M.W. Kelley, Ciliary proteins Bbs8 and Ift20 promote planar cell polarity in the cochlea, Development 142 (3) (2015) 555–566.

Please cite this article in press as: E. Bailly, et al., The planar cell polarity Vangl2 protein: From genetics to cellular and molecular functions, Semin Cell Dev Biol (2017), https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.10.030

SERMENT DE GALIEN

Je jure, en présence de mes maîtres de la Faculté, des conseillers de l'Ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

- *D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.*
- *D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.*
- *De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.*
- *En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.*

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre, méprisé de mes confrères, si j'y manque.

Université d'Aix-Marseille – Faculté de Pharmacie – 27 boulevard Jean Moulin – CS 30064 - 13385 Marseille cedex 05 - France
Tél. : +33 (0)4 91 83 55 00 - Fax : +33 (0)4 91 80 26 12