

Introduction

I. Le cancer et la progression tumorale

La grande majorité des tumeurs malignes humaines sont des carcinomes et la dissémination métastatique constitue la cause majeure de mortalité liée à ces cancers. La formation de métastases à partir d'une tumeur épithéliale implique une cascade complexe d'événements qui peut être résumée en trois grandes étapes :

1. La formation de la tumeur primaire

Les cellules épithéliales subissent des altérations génétiques successives aboutissant à l'activation d'oncogènes et l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs. Ces cellules ainsi transformées prolifèrent de façon anarchique et forment une tumeur primaire. Celle-ci est confinée au sein de la couche épithéliale et séparée du stroma sous-jacent par une membrane basale intacte et est appelée **carcinome *in situ***.

2. L'invasion tumorale

Lors de l'invasion tumorale, certaines cellules tumorales acquièrent des capacités migratoires et invasives qui leur confèrent le potentiel de franchir la membrane basale (MB) et d'envahir la matrice extracellulaire (MEC) du mésenchyme sous-jacent, formant ainsi un **carcinome invasif**.

3. La formation de métastases

Les cellules tumorales invasives peuvent gagner les vaisseaux sanguins et lymphatiques et former des **métastases** à distance qui est l'étape ultime de la progression tumorale.

Avant de former des métastases, les cellules tumorales invasives ont plusieurs étapes à franchir (Figure 1) :

- l'intravasation des cellules tumorales dans les vaisseaux sanguins et lymphatiques
- la survie des cellules tumorales dans la circulation vers d'autres organes
- l'extravasation des cellules tumorales qui quittent alors les vaisseaux et envahissent un organe secondaire
- la prolifération des cellules tumorales au sein de l'organe colonisé.

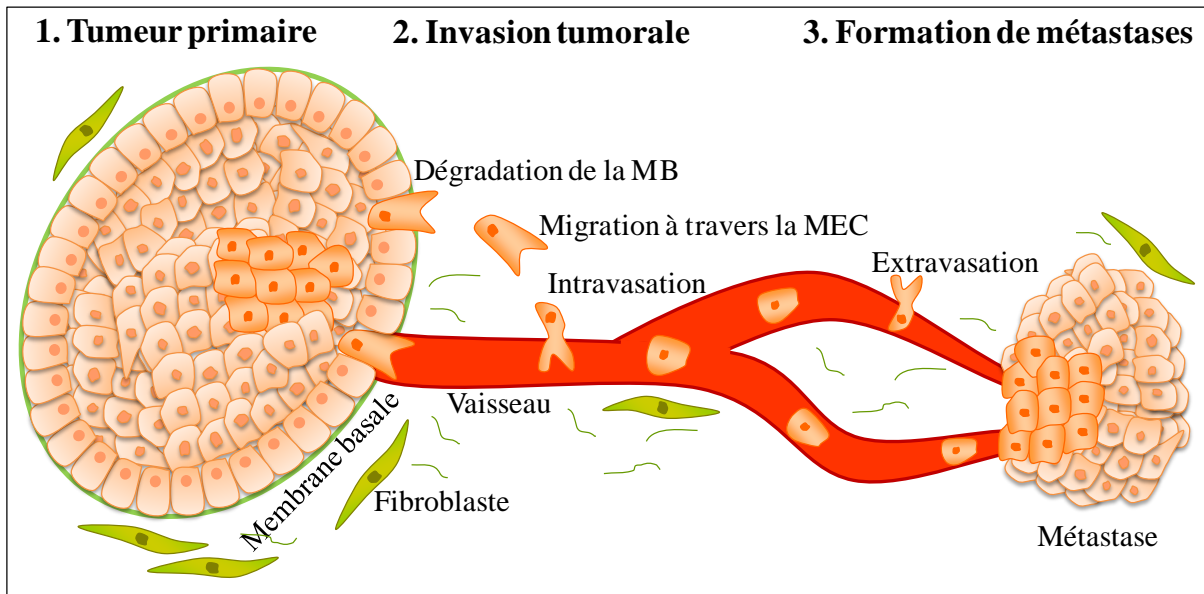


Figure 1 : Schéma général de la progression métastatique. (D'après Peinado et al., 2007).

Chacune de ces étapes représente une ou plusieurs barrières physiologiques que doivent franchir les cellules tumorales invasives. Le processus métastatique est donc hautement sélectif et seul un petit nombre de cellules tumorales est capable d'induire la formation de métastases.

La progression métastatique implique des interactions entre les cellules tumorales, les cellules de l'hôte (cellules endothéliales, fibroblastes, cellules inflammatoires,...) et la MEC. Elle nécessite non seulement des changements au niveau des cellules tumorales elles-mêmes, mais également au niveau du stroma tumoral. En effet, le stroma tumoral est biologiquement et biochimiquement différent du stroma normal et les interactions entre ce stroma et les cellules tumorales influencent directement la cascade métastatique.

Au cours de ce travail, nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux modifications intervenant dans les cellules tumorales elles-mêmes.

II. La transition épithélio-mésenchymateuse

Pour revues : (Hay 1995; Thiery 2002; Thiery 2003; Gotzmann et al. 2004; Thompson et al. 2005; Thiery & Sleeman 2006; Bex et al. 2007; Guarino et al. 2007; Gavert & Ben Ze'ev 2008; De Wever et al. 2008; Sabbah et al. 2008; Kalluri & Weinberg 2009; Polyak & Weinberg 2009; Thiery et al. 2009).

L'acquisition de propriétés migratoires et invasives résulte de modifications intrinsèques importantes des cellules épithéliales tumorales. Les données de la littérature montrent que de tels changements sont caractérisés par des phénomènes de transdifférenciation ou dédifférenciation impliquant la perte de caractéristiques typiquement épithéliales (notamment la perte de cohésion cellulaire et de la polarité) et le gain de propriétés mésenchymateuses (motilité, expression de protéases rarement synthétisées par des cellules épithéliales en conditions normales,...).

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

Les changements phénotypiques intervenant dans les cellules tumorales épithéliales ont été repris sous le terme de « transition épithélio-mésenchymateuse » (TEM), par analogie avec le terme initialement défini pour caractériser la transdifférenciation observée dans les cellules épithéliales migratoires et/ou invasives impliquées dans les phénomènes d'embryogenèse, particulièrement lors de la gastrulation et du développement de la crête neurale. En effet, le terme de TEM est aujourd'hui utilisé de façon plus générale et s'applique également aux changements phénotypiques et moléculaires qui ne caractérisent pas nécessairement une transition complète. Des phénomènes de TEM ou « TEM-like » ont ainsi été décrits dans des processus physiologiques et pathologiques nécessitant la migration et

l'invasion de cellules épithéliales tels que la cicatrisation, l'invasion trophoblastique, la fibrose et l'invasion tumorale.

Récemment, il a été proposé de classifier la TEM en trois sous-types différents selon le contexte biologique dans lequel elle apparaît (Kalluri & Weinberg 2009).

Les TEM de type 1 sont décrites dans l'embryogenèse particulièrement lors de la gastrulation et du développement de la crête neurale (Thiery *et al.* 2009). Les TEM de type 1 concernent également l'invasion trophoblastique (Vicovac & Aplin 1996) et la morphogenèse (morphogenèse mammaire, pulmonaire,...) (Fata *et al.* 2004). Ce type de TEM génère donc des phénotypes mésenchymateux mais peut également être transitoire. Certaines cellules peuvent en effet subir une transition mésenchymo-épithéliale afin de générer des épithélia secondaires.

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

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

Les processus de TEM peuvent être incomplets et sont réversibles dans de nombreux contextes biologiques. Ainsi, de nombreux phénotypes issus de processus de TEM existent. Néanmoins, un certain nombre d'acteurs et de marqueurs moléculaires, communs aux différents types de TEM décrits ci-dessus, ont été identifiés.

Concernant la perte des caractéristiques épithéliales, une réorganisation des jonctions d'adhérence intercellulaire, notamment des jonctions adhérentes et des jonctions serrées, a été

observée au cours de la TEM contribuant à la perte de cohésion intercellulaire et facilitant ainsi la motilité cellulaire.

Parmi les marqueurs mésenchymateux fréquemment exprimés au cours de la TEM, on cite la vimentine, FSP-1 (Fibroblast Specific Protein 1) ou α -SMA (Smooth Muscle Actin- α).

La capacité de dégrader et de restructurer la MEC est également une caractéristique mésenchymateuse. Une série de protéases sont fréquemment surexprimées au cours de la TEM et contribuent fonctionnellement à l'accroissement des propriétés migratoires/invasives des cellules épithéliales tumorales dérivées de la TEM. Parmi ces protéases, la famille des métalloprotéinases matricielles (MMP) semble être particulièrement impliquée dans les processus de la TEM (Gilles *et al.* 2004).

Bien que les bases moléculaires de la TEM ne soient pas encore totalement clarifiées, plusieurs voies de signalisation interconnectées ainsi qu'un bon nombre de molécules de signalisation potentielles, intervenant dans la migration et l'invasion des cellules épithéliales, ont été identifiées comme initiateurs de la TEM dans les cellules tumorales. Parmi eux, citons des facteurs de croissance qui agissent entre autres à travers les récepteurs tyrosine kinases, tels que TGF β (Transforming Growth Factor β), EGF (Epidermal Growth Factor), FGF (Fibroblastic Growth Factor), HGF (Hepatocyte Growth Factor) et PDGF (Platelet-Derived Growth Factor), ainsi que les composants des voies de signalisation Wnt/caténine- β , Hedgehog et Notch. Ces voies de signalisation convergent vers une série de facteurs de transcription spécifiques qui contribuent à la régulation de gènes cibles de la TEM impliqués dans les modifications phénotypiques et fonctionnelles associées au processus de la TEM. Ces facteurs de transcription appartiennent pour la plupart aux familles Snail, ZEB (Zinc E-box binding factor) et bHLH (Basic-Helix-Loop-Helix) (Thiery 2002; Jechlinger *et al.* 2002; Shi & Massague 2003; Peinado *et al.* 2007; Niessen *et al.* 2008; Medici *et al.* 2008; Kokudo *et al.* 2008; Polyak & Weinberg 2009; Thiery *et al.* 2009) (Figure 2). De plus, des gènes plutôt considérés comme gènes cibles de la TEM, peuvent également agir en tant que modulateurs de la TEM. Par exemple, l'expression ectopique de la métalloprotéinase matricielle-3 (MMP-3) dans des cellules épithéliales murines, induit des changements phénotypiques de la TEM associés à la dispersion et l'invasivité (Przybylo & Radisky 2007).

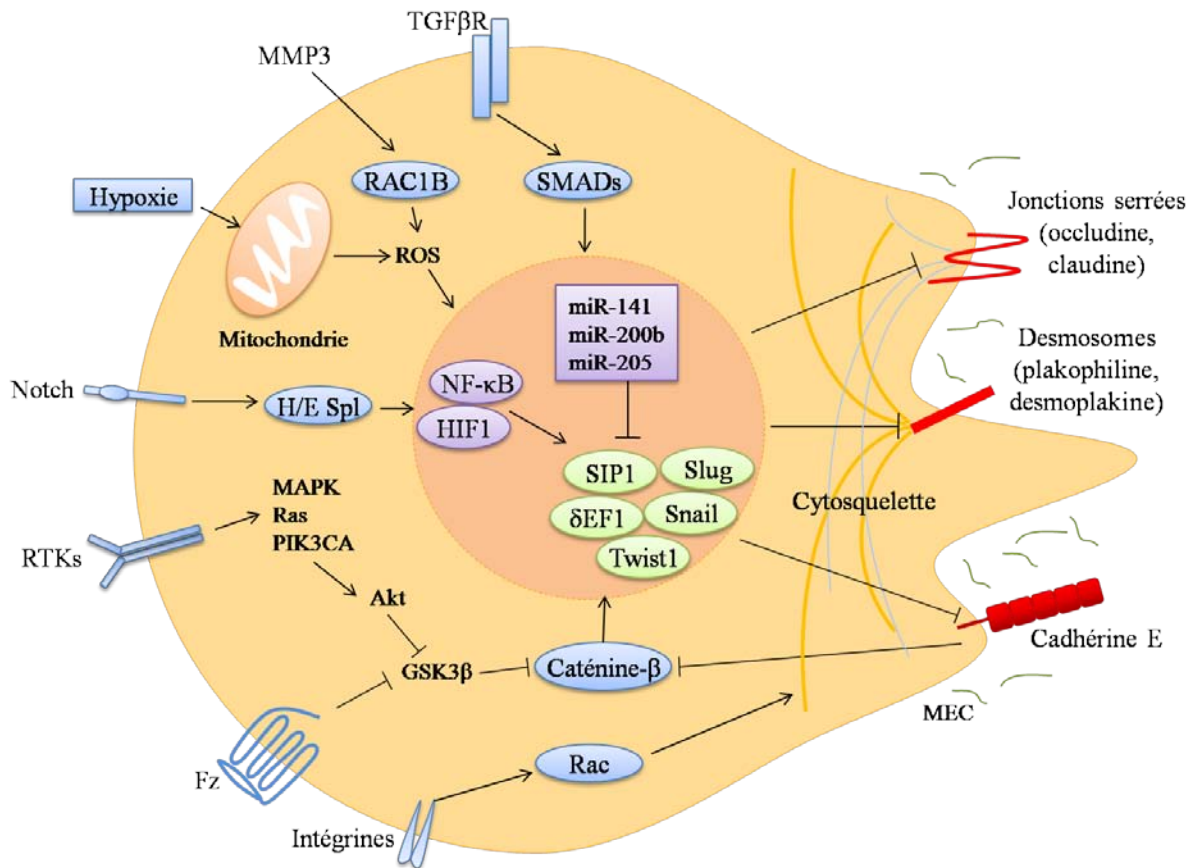


Figure 2 : Représentation schématique des principales molécules et voies de signalisation impliquées dans la TEM. (D'après Polyak and Weinberg, 2009).

Au cours de notre travail, nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux mécanismes de TEM suivants que nous allons détailler :

- une réorganisation des jonctions d'adhérence cellulaire, notamment des jonctions adhérentes (Sommers *et al.* 1994a; Polette *et al.* 1998; Gilles *et al.* 2003; Nawrocki-Raby *et al.* 2003a; Nawrocki-Raby *et al.* 2003b).
- une expression *de novo* de la vimentine (Sommers *et al.* 1989; Sommers *et al.* 1992; Gilles *et al.* 1994b; Sommers *et al.* 1994b; Gilles *et al.* 1996; Gilles & Thompson 1996; Polette *et al.* 1998; Gilles *et al.* 1999; Gilles *et al.* 2003).
- une expression accrue de certains facteurs de transcription, notamment ceux des familles Snail et ZEB (Hemavathy *et al.* 2000; Comijn *et al.* 2001; Nieto 2002; Eger *et al.* 2005; Peinado *et al.* 2007).

III. Jonctions intercellulaires

Au sein d'un épithélium, la cohésion des cellules épithéliales est assurée par des jonctions intercellulaires qui protègent l'organisme de l'environnement extérieur. On distingue essentiellement trois types de jonctions d'adhérence: les jonctions serrées (ou « zonula occludens »), les jonctions adhérentes (ou « zonula adherens ») et les desmosomes (Figure 3). Bien que chaque type de jonction possède son propre mécanisme de formation, de régulation et de fonctionnement, une importante communication existe entre les différents types de jonctions et influence mutuellement leur dynamisme et leurs propriétés de signalisation. D'une manière générale, ces jonctions présentent un même schéma d'organisation. Elles sont toutes trois constituées de molécules transmembranaires reliées au cytosquelette de la cellule (le cytosquelette d'actine pour les jonctions adhérentes et serrées, les filaments intermédiaires pour les desmosomes) par un ensemble de protéines adaptatrices juxta-membranaires.

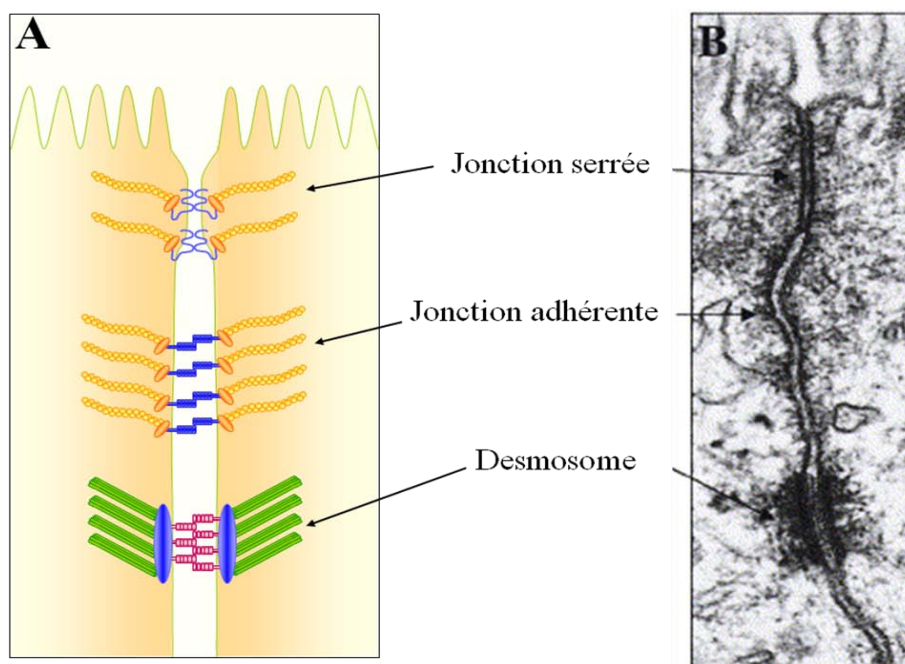


Figure 3: Les différents types de jonctions intercellulaires.

(A) Représentation schématique des trois types de jonctions intercellulaires présents dans les cellules épithéliales; (B) Image obtenue par microscopie électronique mettant en évidence l'ultrastructure des jonctions serrées, des jonctions adhérentes et des desmosomes. (D'après Perez-Moreno et al., 2003).

Au cours de ce travail, nous nous sommes principalement intéressés aux jonctions adhérentes que nous allons détailler.

III.1. Jonctions adhérentes

Pour revues : (Bienz 2005; Cowin et al. 2005; Brembeck et al. 2006; Polette et al. 2007; Gavert & Ben Ze'ev 2007; Van Roy & Berx 2008; Jeanes et al. 2008; Rudini & Dejana 2008; Hartsock & Nelson 2008; Niessen & Gottardi 2008).

Au niveau moléculaire, les jonctions adhérentes sont constituées de la cadhérine E comme protéine transmembranaire, reliée au cytosquelette d'actine via des protéines adaptatrices, principalement les caténines.

III.1.1. Structure de la cadhérine E

La cadhérine E est le prototype de la superfamille des cadhérines. Il s'agit d'une glycoprotéine transmembranaire de 120 kDa composée de trois parties (Shimoyama *et al.* 1989; Nose *et al.* 1990; Takeichi 1991; Kemler 1993; Shapiro *et al.* 1995; Nagar *et al.* 1996; Van Roy & Berx 2008) :

La **partie extracellulaire N-terminale** est constituée de cinq sous-unités répétées avec des domaines de liaison au calcium, nécessaire à l'adhérence. Ces domaines répétés permettent à deux molécules de cadhérine E de former des interactions homotypiques en présence de calcium extracellulaire et de connecter les cellules épithéliales entre elles via la formation d'une jonction en tirette (« zip-like »).

La **partie centrale**, hydrophobe, forme le domaine transmembranaire.

La **partie C-terminale cytoplasmique** interagit avec les autres composants des jonctions adhérentes, en particulier avec les molécules adaptatrices comme les caténines ($-\beta$, $-\gamma$ et $-p120$) avec lesquelles la liaison est cruciale pour une adhérence fonctionnelle. En particulier, la liaison de la caténine- β à la cadhérine E semble être nécessaire à l'adhérence, en protégeant le domaine cytoplasmique de la cadhérine de la protéolyse *in vitro* (Huber *et al.* 2001). Les caténines sont ancrées au réseau du cytosquelette d'actine par un processus dynamique impliquant la caténine- α , assurant une certaine rigidité mécanique à la cellule (Ben Ze'ev & Geiger 1998; Yamada *et al.* 2005). Ainsi la formation des jonctions adhérentes via la cadhérine E module l'organisation du cytosquelette d'actine de façon fondamentale (Figure 4).

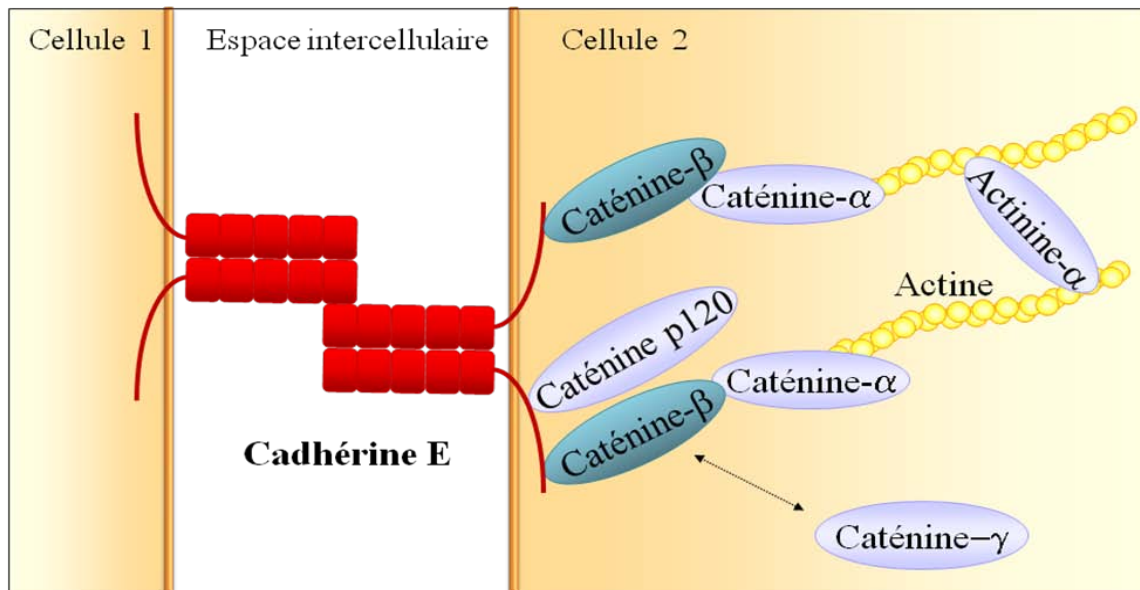


Figure 4 : Représentation simplifiée des jonctions adhérentes.

Les molécules de cadhérine E de deux cellules adjacentes forment des liaisons homotypiques via leur partie extracellulaire. La partie cytoplasmique est reliée au réseau d'actine via les caténines- α et - β . La caténine- γ peut se substituer à la caténine- β . La caténine-p120 se lie à la région juxtamembranaire de la partie cytoplasmique de la cadhérine E.

III.1.2. Les caténines - caténine- β

Le mot « caténine » vient du latin « catena » qui veut dire « chaîne ». Ce nom a été donné aux caténines car elles établissent un lien entre les cadhérines et le réseau d'actine. La famille des caténines comprend la caténine- β , la caténine-p120, la caténine- γ (ou plakoglobine) et la caténine- α . La caténine - β , la caténine -p120 et caténine- γ sont des protéines de la famille Armadillo tandis que la caténine- α est homologuée à la vinculine, une autre protéine liant également l'actine (Rudini & Dejana 2008). Les protéines de la famille Armadillo sont caractérisées par des répétitions de motifs « armadillo » ou « arm ». Ces motifs ont été initialement identifiés dans la protéine Armadillo, impliquée dans la segmentation de l'embryon de la drosophile. Les motifs « arm » favorisent les interactions protéines-protéines et sont responsables de la formation de larges complexes multiprotéiques.

III.1.2.1. Structure de la caténine- β

Parmi les caténines, nous détaillerons la caténine- β à laquelle nous nous sommes plus particulièrement intéressés. La caténine- β est l'homologue d'Armadillo chez les vertébrés (McCrea & Gumbiner 1991; McCrea *et al.* 1991). Elle contient 13 répétitions « arm » de 42 acides aminés qui forment une triple hélice α (Huber *et al.* 1997). Elle est capable de lier le domaine cytoplasmique C-terminal de la cadhérine E et la caténine- α , formant ainsi un

complexe ternaire. La liaison de la caténine- β au domaine cytoplasmique C-terminal de la cadhérine E est régulée par phosphorylation des résidus sérine et tyrosine (Perez-Moreno & Fuchs 2006) (Figure 5).

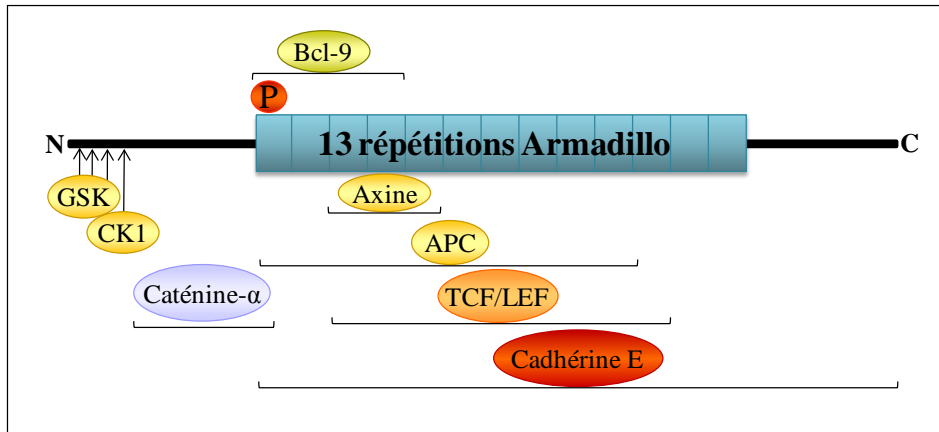


Figure 5 : Structure en domaines de la caténine- β .

Les 13 domaines « armadillo » et les domaines N- et C-terminaux sont schématisés. Les sites d'interactions de la caténine- β avec ses principaux partenaires moléculaires sont indiqués. (D'après Harris and Pfeifer, 2005).

III.1.2.2. La voie de signalisation de la caténine- β

La caténine- β est une molécule « navette » dont le rôle varie en fonction de sa localisation subcellulaire. Ainsi, la caténine- β se répartit dans les cellules en trois « pools » : un pool membranaire, un pool cytoplasmique et un pool nucléaire.

Le pool membranaire de la caténine- β se situe essentiellement dans les jonctions adhérentes, reliant la cadhérine E au cytosquelette d'actine via la caténine- α . C'est dans ce rôle que la caténine- β a été initialement identifiée (Kemler 1993).

Le pool cytoplasmique de la caténine- β est finement régulé par le système du protéasome. La dégradation de la caténine- β par le protéasome dépend de la formation d'un complexe de destruction multiprotéique qu'elle forme avec l'axine et la protéine APC (Adenomatosis Polyposis Coli). L'axine lie directement la caténine- β et, par co-recrutement des sérine/thréonine kinases CK1 (Casein kinase 1) et GSK3 β (Glycogen Synthase kinase 3 β), favorise la phosphorylation des résidus sérine/thréonine au niveau N-terminal de la caténine- β cytosolique. Ceci mène à sa polyubiquitination et à sa destruction par le protéasome.

Lorsque la caténine- β cytoplasmique s'accumule suffisamment dans le cytoplasme, elle peut gagner le noyau et augmenter ainsi le pool nucléaire de la caténine- β . Dans le noyau, elle intervient en tant que coactivateur de transcription en s'associant avec des facteurs de transcription de la famille TCF/LEF (« T-Cell Factor/ Lymphoid Enhancer Factor »)

(Yanagawa *et al.* 1995; Behrens *et al.* 1996; Korinek *et al.* 1997). En l'absence de la caténine- β , TCF agit comme un répresseur des gènes cibles de la caténine- β (Brannon *et al.* 1997) en formant un complexe avec Groucho (Cavallo *et al.* 1998; Hurlstone & Clevers 2002). Une fois dans le noyau, la caténine- β convertit le complexe répresseur en un complexe d'activation transcriptionnel en le dissociant de Groucho (Hecht & Kemler 2000). Ce complexe nucléaire agit directement sur la régulation de gènes (Harris & Peifer 2005; Brembeck *et al.* 2006) en se liant à des sites consensus (5' - A/T A/T CAAAG -3') au niveau du promoteur des gènes cibles (Polette *et al.* 2007; Gavert & Ben Ze'ev 2007) (Figure 6).

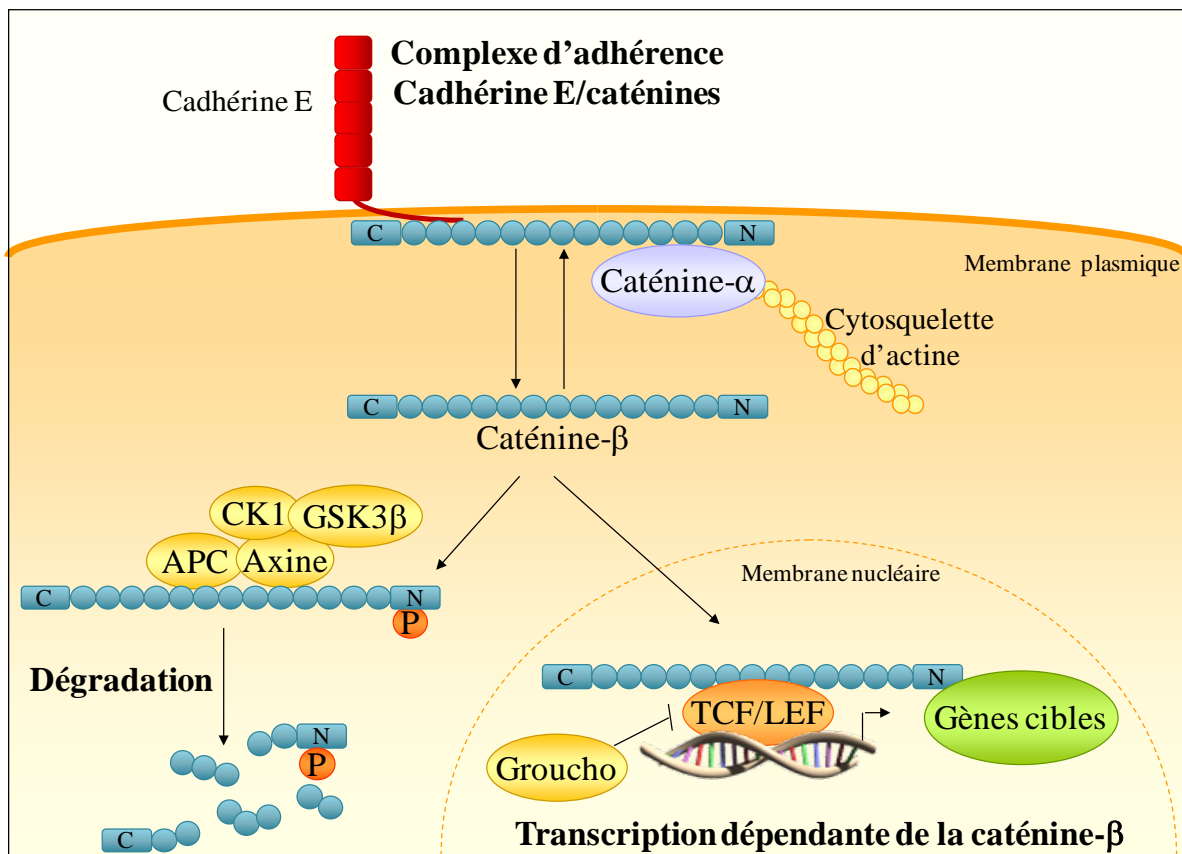


Figure 6 : Représentation schématique de la voie de signalisation de la caténine- β .

Les principaux complexes formés autour de la caténine- β sont représentés : le complexe membranaire, avec la cadhérine E et les autres caténines, qui est impliqué dans l'adhérence intercellulaire ; le complexe cytoplasmique de destruction, avec l'axine, l'APC et la GSK3 β , qui provoque la dégradation via le protéasome de la caténine- β ; le complexe nucléaire, avec les facteurs de transcription de la famille TCF/LEF, impliqué dans la régulation transcriptionnelle. (D'après Brembeck *et al.*, 2006).

Dans les cellules épithéliales, la caténine- β présente donc une double fonction dépendant de sa localisation intracellulaire. Au niveau de la membrane plasmique, la caténine- β est impliquée dans la cohésion cellulaire alors que, libérée de ses interactions avec la cadhérine E, elle participe à des processus de signalisation et de régulation génique.

L'orientation de la caténine- β , comme molécule d'adhérence ou cofacteur de transcription, peut être affectée à différents niveaux. Parmi les différents mécanismes régulant la voie de la caténine- β , on distingue des processus de phosphorylation des membres de la voie de signalisation caténine- β , la régulation par des micro-RNAs, la voie de signalisation Wnt ainsi que des mécanismes d'inactivation et de répression de la cadhérine E (Figure 7).

III.1.2.3. Régulation de la voie de la caténine- β par des micro-RNAs

Récemment, il a été montré que des micro-RNAs peuvent réguler la stabilité des membres de la voie de signalisation caténine- β . Ainsi, dans une étude récente, le miR-200a cible directement le 3'UTR (Untranslated region) de l'ARNm de la caténine- β inhibant la voie de la caténine- β (Saydam *et al.* 2009). Dans une autre étude, les miR135a et b ciblent le 3'UTR du transcrit APC activant au contraire la voie de la caténine- β (Nagel *et al.* 2008).

III.1.2.4. Phosphorylation des composants du complexe cadhérine E/caténine- β

L'intégrité structurale et fonctionnelle des complexes cadhérine E/caténines/actine et les interactions entre la caténine- β et ses différents partenaires moléculaires sont régulés en partie par des processus de phosphorylation et de déphosphorylation impliquant respectivement des kinases et des phosphatases. De manière générale, la phosphorylation des résidus tyrosine des composants des complexes cadhérine E/caténines provoque une fragilisation et une dissociation de ces complexes (Steinberg & McNutt 1999; Lilien & Balsamo 2005). Des études ont montré que la phosphorylation de la caténine- β par les kinases Src, Abl, Fer et Fyn ou des récepteurs tyrosine kinase (RTK), tels que le récepteur à l'EGF ou le récepteur à l'HGF (c-met) (Comoglio *et al.* 2003; Andl & Rustgi 2005), provoque une dissociation de la caténine- β avec la cadhérine E et la caténine $-\alpha$ et désorganise ainsi le complexe cadhérine E/caténine- β (Roura *et al.* 1999; Huber *et al.* 2001; Piedra *et al.* 2003). Le site de liaison de la caténine- β pour Bcl9 (B-cell CLL/lymphoma 9 protein) chevauche celui de la caténine- α , ainsi, leurs interactions sont compétitives, et l'association préférentielle de la caténine- β pour Bcl9, suite à la phosphorylation du résidu tyrosine Y142 par c-met, empêche son interaction avec la caténine- α , ce qui résulte en la libération du complexe caténine $-\beta$ /Bcl9 dans le cytoplasme, et ensuite, en sa translocation dans le noyau et une activité transcriptionnelle accrue favorisées par Bcl9 (Brembeck *et al.* 2004).

III.1.2.5. Régulation par la voie Wnt

La dégradation de la caténine- β par le protéasome est largement contrôlée par la voie Wnt qui est initiée par la liaison des molécules Wnt sur deux récepteurs transmembranaires, Frizzled (Fz) et LRP-5/6 (Lipoprotein Receptor-related Protein 5/6) (He *et al.* 2004; Li & Bu 2005). Les Wnt sont une famille de glycoprotéines sécrétées qui interviennent dans le développement embryonnaire et la morphogénèse. La transmission du signal phosphoryle la protéine cytoplasmique Dishevelled (DSH), qui est alors recrutée au niveau du corécepteur Fz/LRP qui, à son tour, recrute l'axine à la membrane plasmique, un des composants du complexe de destruction. De plus, la phosphorylation du récepteur LRP-5/6 dans sa partie intracellulaire par les kinases CK1 et GSK3 β stimule également le recrutement de l'axine à la membrane plasmique (Davidson *et al.* 2005; Zeng *et al.* 2005). Il en résulte une déstabilisation du complexe de destruction, et la caténine- β échappe ainsi à la phosphorylation par les kinases CK1 et GSK3 β et donc à sa dégradation par le protéasome. La voie Wnt aboutit ainsi à une augmentation du pool cytoplasmique libre de la caténine- β qui peut ensuite gagner le noyau et activer la transcription de ses gènes cibles (Brembeck *et al.* 2006).

III.1.2.6. Régulation du taux membranaire de la cadhérine E

Une transactivation de la caténine- β indépendante de la voie Wnt a également été observée suite à une diminution de la cadhérine E. En effet, une telle diminution entraîne une relocalisation de la caténine- β en dehors de jonctions adhérentes et son accumulation dans le cytoplasme, comme observé suite à l'activation de la voie Wnt (Orsulic *et al.* 1999; Conacci-Sorrell *et al.* 2003; Lu & Hunter 2004). Ainsi la perte de l'expression de la cadhérine E engendre une relocalisation de la caténine- β dans le noyau (Gottardi *et al.* 2001; Kuphal & Behrens 2006; Onder *et al.* 2008).

L'expression de la cadhérine E peut être régulée par répression transcriptionnelle, notamment par une variété de facteurs de transcription qui ciblent le promoteur de la cadhérine E (Peinado *et al.* 2004c; Peinado *et al.* 2007). Les répresseurs transcriptionnels de ce suppresseur de tumeurs détectés sont des membres des familles de facteurs de transcription en doigt de zinc ZEB (Grootclaes & Frisch 2000; Comijn *et al.* 2001) et Snail (Batlle *et al.* 2000; Cano *et al.* 2000; Hajra *et al.* 2002) et de facteurs de transcription hélice-boucle-hélice bHLH (Perez-Moreno *et al.* 2001; Yang *et al.* 2004) et plus récemment le Krüppel-like factor 8 (KLF8) (Wang *et al.* 2007a). Le taux membranaire de la cadhérine E peut également être contrôlé directement au niveau de la protéine par internalisation (Zhu *et al.* 2001) ou clivage protéolytique du domaine extracellulaire de la cadhérine E par des métalloprotéinases

matricielles (MMPs (Lochter *et al.* 1997; Noe *et al.* 2001; Mei *et al.* 2002; Zheng *et al.* 2009) ou des ADAMs (proteins containing A Disintegrin and A Metalloprotease domain) (Maretzky *et al.* 2005; Najy *et al.* 2008).

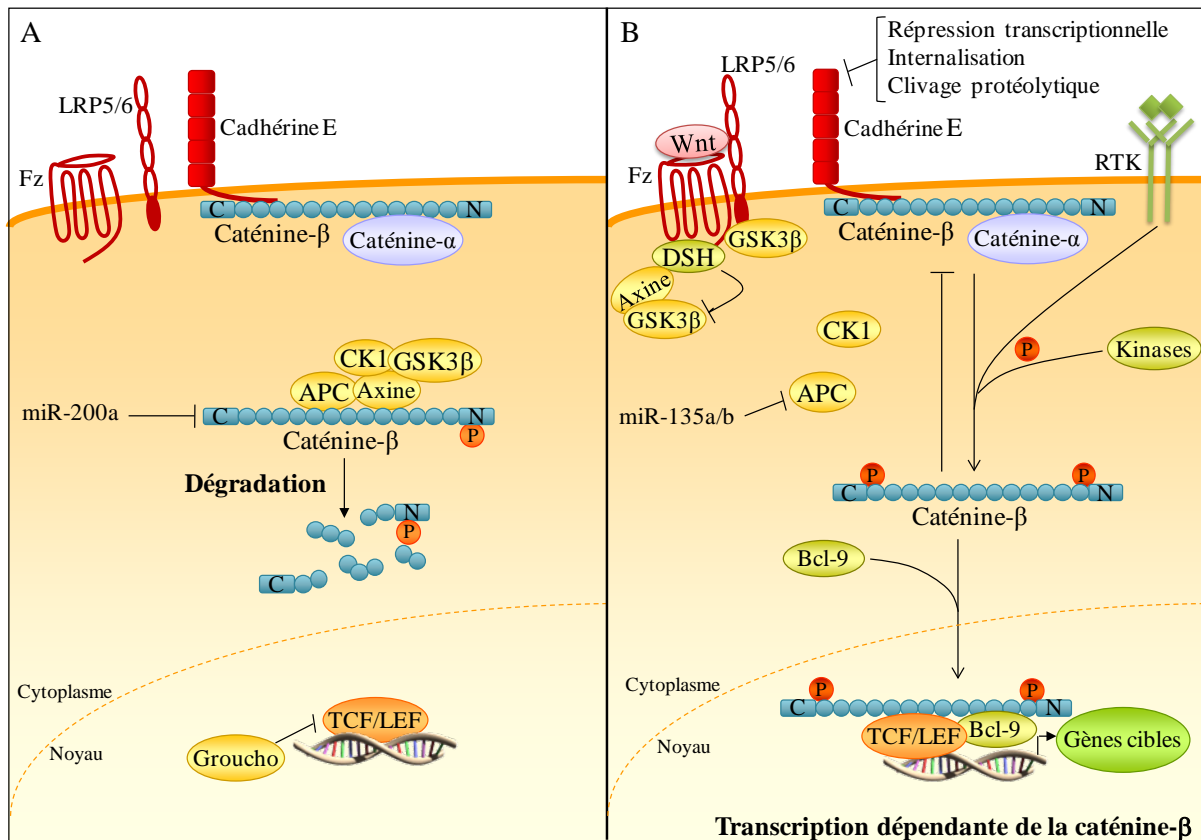


Figure 7 : Régulation de la voie de signalisation de la caténine-β.

(A) En l'absence de ligands Wnt ou lorsque la cadhérine E est présente en forte quantité au niveau de la membrane plasmique, la caténine-β est liée à la cadhérine E et assure l'adhérence cellulaire. Dans le cytoplasme, la caténine-β est phosphorylée et dégradée par le complexe de destruction. Dans le noyau, les complexes Groucho-TCF/LEF répriment des gènes présentant une séquence LBS (LEF-binding site). (B) En présence des ligands Wnt, le complexe de dégradation est dissocié et la caténine-β n'est plus dégradée et peut ainsi s'accumuler dans le cytoplasme. Une accumulation de la caténine-β peut également résulter de sa phosphorylation par des RTK ou des kinases cytoplasmiques, mais également d'une absence de la cadhérine E. La caténine-β gagne alors le noyau et s'associe aux membres des facteurs de transcription de la famille TCF/LEF favorisant ainsi la transcription des gènes cibles.

III.1.3. La désorganisation des complexes cadhérine E/caténine-β et la voie de signalisation de la caténine-β: implication dans la TEM et dans la progression métastatique

Durant les phénomènes physiologiques ou pathologiques impliquant une TEM associée à une migration cellulaire, l'organisation des jonctions adhérentes est perturbée. Ainsi, une réorganisation des complexes cadhérine E/caténines, une activation de la voie de signalisation de la caténine-β, et une modification des facteurs régulant cette voie sont des événements

largement impliqués dans les processus de TEM et dans la progression métastatique (Takeichi 1993; Birchmeier & Behrens 1994; Bracke *et al.* 1996; Danen *et al.* 1996; Jiang 1996; Christofori & Semb 1999; Nollet *et al.* 1999; Debruyne *et al.* 1999; Beavon 2000; Jiang & Mansel 2000; Berx & Van Roy 2001; Cavallaro *et al.* 2002; Conacci-Sorrell *et al.* 2002). Cette réorganisation des complexes cadhérine E/caténines, souvent associée à une diminution d'expression de la cadhérine E, est considérée comme un marqueur précoce de la TEM, intervenant dès les premières phases de dispersion cellulaire.

Une diminution de l'expression de la cadhérine E et une augmentation de la caténine- β nucléaire ont été documentées dans de nombreux types de cancers ainsi que dans de nombreux systèmes tumoraux *in vitro* et *in vivo* (Beavon 2000; Wijnhoven *et al.* 2000; Berx & Van Roy 2001; Cavallaro *et al.* 2002; Conacci-Sorrell *et al.* 2002; Gilles *et al.* 2003; Wheelock & Johnson 2003; Come *et al.* 2004; Howe & Brown 2004; Barrallo-Gimeno & Nieto 2005; Cowin *et al.* 2005; Knudsen & Wheelock 2005; Mazieres *et al.* 2005; Brembeck *et al.* 2006; Schmalhofer *et al.* 2009). En effet, la perte de la cadhérine E, et donc par la suite, une désorganisation des complexes cadhérine E/caténines, suffit souvent à initier une conversion phénotypique caractéristique d'une TEM associée à une acquisition des propriétés migratoires et/ou invasives des cellules épithéliales dans de nombreux systèmes *in vitro* (Behrens *et al.* 1992; Birchmeier & Behrens 1994; Stetler-Stevenson *et al.* 2000; Beavon 2000; Jiang & Mansel 2000; Berx & Van Roy 2001; Conacci-Sorrell *et al.* 2002). A l'inverse, une surexpression de la cadhérine E exerce souvent un rôle de suppresseur de tumeur et diminue l'invasivité de cellules tumorales (Behrens *et al.* 1989; Frixen *et al.* 1991; Vleminckx *et al.* 1991; Chen & Obrink 1991; Navarro *et al.* 1991; Meiners *et al.* 1998; Perl *et al.* 1998; Christofori & Semb 1999). Ces études *in vitro* ont permis de détecter un bon nombre de gènes cibles de la voie caténine- β . Parmi les gènes régulés par la voie de la caténine- β , on distingue plusieurs gènes largement impliqués dans la TEM et dans diverses étapes de la progression métastatique. On cite ainsi des protéases telles que des membres des métalloprotéinases matricielles (MMPs) la MMP-7 (Crawford *et al.* 1999; Brabletz *et al.* 1999), la MT1-MMP (Takahashi *et al.* 2002), la MMP-26 (Marchenko *et al.* 2002), et l'ADAM10 (Gavert *et al.* 2007), des composants de la MEC, tels que la fibronectine (Gradl *et al.* 1999) et la laminine γ 2 (Hlubek *et al.* 2001; Hlubek *et al.* 2004), des protéines du cytosquelette tels que la vimentine (Gilles *et al.* 2003), des cytokines comme l'IL-8 (Interleukine 8) (Levy *et al.* 2002) et MCP1 (Monocyte Chemotactic Protein 1) (Mestdagt *et al.* 2006), des récepteurs d'adhérence cellulaire comme le CD44 (Wielenga *et al.* 1999) et uPaR (Urokinase

Plasminogene Activator Receptor) (Mann *et al.* 1999), ainsi que le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) (Easwaran *et al.* 2003), c-myc (He *et al.* 1998), la claudine 1 (Miwa *et al.* 2000), la cycline D1 (Shtutman *et al.* 1999) et le facteur de transcription Slug (Conacci-Sorrell *et al.* 2003).

De nombreuses études immunohistochimiques menées sur des biopsies de tumeurs ont démontré que la perte d'expression de la cadhérine E dans les tumeurs est corrélée à l'invasivité tumorale, à la présence de métastases, et à la mortalité des patients (Birchmeier & Behrens 1994; Perl *et al.* 1998). Au cours de la progression métastatique, le gène de la cadhérine E peut être fonctionnellement inactivé par différents mécanismes pouvant intervenir en combinaison, tels que des altérations génétiques (Hirohashi 1998; Berx *et al.* 1998), une inactivation épigénétique (Jones & Laird 1999; Graff *et al.* 2000; Grady *et al.* 2000; Caldeira *et al.* 2006) et/ou la répression transcriptionnelle (Batlle *et al.* 2000; Cano *et al.* 2000; Comijn *et al.* 2001; Perez-Moreno *et al.* 2001). Ainsi, des mutations au niveau du gène de la cadhérine E (CDH1), qui compromettent la fonction adhésive de la cadhérine E, sont essentiellement retrouvées dans les cancers gastriques et mammaires lobulaires infiltrants (Hirohashi 1998; Berx *et al.* 1998). Outre ces mutations, l'hyperméthylation du promoteur de la cadhérine E a été associée à la diminution d'expression de la cadhérine E dans différents types de cancers (Auerkari 2006). Bien que ces deux mécanismes ont été largement décrits, le mécanisme le plus fréquent d'inhibition de la cadhérine E dans les cancers semble être une répression transcriptionnelle par des facteurs de transcription (Batlle *et al.* 2000; Cano *et al.* 2000; Comijn *et al.* 2001; Perez-Moreno *et al.* 2001). Ainsi, une surexpression des différents facteurs de transcription Snail, Slug, δ EF1 (δ -crystallin Enhancer Factor 1) ou SIP1 (Smad-Interacting Protein 1) accompagnée d'une perte d'expression de la cadhérine E a été observée dans plusieurs types de cancers (voir le tableau 3 dans le paragraphe dédié aux facteurs de transcription).

Dans les cancers, ce n'est pas seulement la perte de la cadhérine E qui active la voie de la caténine- β mais également la modulation des facteurs régulant cette voie. L'activation de la voie canonique Wnt est un événement clé précoce dans la plupart des cancers colorectaux sporadiques et familiaux (Fodde & Brabletz 2007). Dans la majorité des cas, ce signal hyperactif se présente, soit par des mutations inactivatrices de l'APC, soit par des mutations de la caténine- β qui la rendent résistante à la phosphorylation par le GSK β et donc à la dégradation (Giles *et al.* 2003; Huang & Du 2008). Des mécanismes similaires d'activation de la voie caténine- β ont été identifiés dans le développement d'une variété d'autres tumeurs

telles que les tumeurs cutanées, mammaires et hématopoïétiques (Polakis 2000; Fodde & Brabletz 2007; Polakis 2007). Dans des cancers du sein, une expression accrue de la protéine « dishevelled » a été observée suite à une amplification de son gène (Nagahata *et al.* 2003). Par ailleurs, dans les cancers mammaires, pulmonaires et gastriques, une surexpression de certains membres de la famille Wnt a été décrite (Wong *et al.* 2002; Howe & Brown 2004; Mazieres *et al.* 2005; Katoh 2005). Plus récemment, une faible expression du micro-RNA, miR-200a, associée à une surexpression de la caténine- β a été observée dans le cancer du méningiome (Saydam *et al.* 2009). Dans le cancer colorectal, au contraire, une expression accrue des miR135a et b, accompagnée d'une perte d'expression de l'APC, a été détectée (Nagel *et al.* 2008).

IV. La vimentine

IV.1. Structure de la vimentine

Pour revues : (Helfand *et al.* 2004; Herrmann & Aebi 2004; Herrmann *et al.* 2009).

La vimentine est un filament intermédiaire (FI) de type III. Les FIs sont des polymères fibreux de 7-11 nm de diamètre constituant, avec les microtubules et le réseau d'actine, le cytosquelette des cellules eucaryotes (Herrmann *et al.* 2009).

Les FIs sont formés de polymères de protéines fibreuses dont chaque monomère polypeptidique est composé de 3 domaines (Figure 8) :

- un domaine central (« rod domain ») conservé au sein des différentes familles de filaments intermédiaires et organisé en une hélice alpha.
- une extrémité N-terminale (« head domain ») et une extrémité C-terminale (« tail domain ») de longueur variable, portant toutes deux des sites de phosphorylation intervenant dans la régulation de la polymérisation.

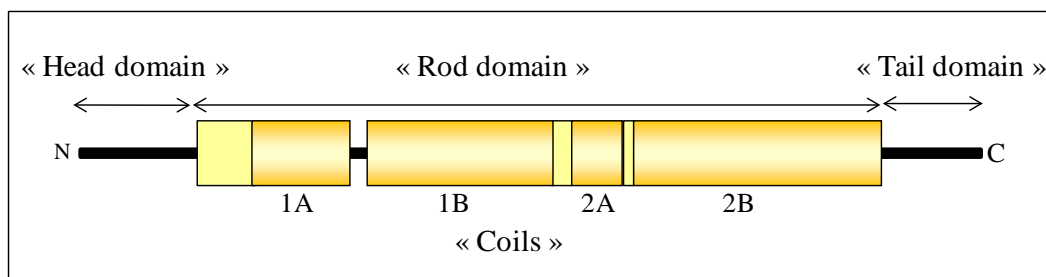


Figure 8 : Structure en domaines de la vimentine.

On distingue 4 grandes familles de FIs (Tableau 1). Outre la famille des lamines, qui est exprimée dans le noyau de toutes les cellules eucaryotes, les 3 autres familles, principalement cytoplasmiques, sont synthétisées dans un organisme adulte et, dans des conditions normales, par des types cellulaires spécifiques. Par exemple, les kératines sont caractéristiques des cellules épithéliales alors que la vimentine est préférentiellement exprimée par des cellules d'origine mésenchymateuse (fibroblastes, cellules inflammatoires,...).

Familles de FIs	Types de FIs	Types cellulaires impliqués
<i>Cytokératines</i>	Type I : kératines acides Type II : kératines basiques	Cellules épithéliales Cellules épithéliales
<i>FIs de type vimentine :</i> - vimentine - desmine - GFAP (glial fibrillary acidic protein)	Type III	Cellules mésenchymateuses Cellules musculaires Cellules gliales
<i>Neurofilaments</i>	Type IV	Neurones
<i>Lamines</i>	Type V	Noyaux de toutes les cellules

Tableau 1 : Les 4 principales familles de FIs.

La polymérisation des monomères donne naissance aux FIs en plusieurs étapes successives (Figure 9):

- 1) Deux monomères de même orientation s'associent par leur domaine central pour donner un dimère torsadé. L'association résulte de l'interaction entre les acides aminés hydrophobes de ce domaine.
- 2) Deux dimères d'orientation opposée s'associent avec un décalage pour donner un tétramère.
- 3) L'association latérale de huit tétramères constitue un ULF (Unit Length Fragment) constituant l'unité de base de construction des filaments de vimentine.
- 4) L'association longitudinale des ULF constitue un FI de forme cylindrique, qui en coupe transversale, est composé de 32 monomères.

La polymérisation et la dépolymérisation de la vimentine sont finement régulées par des phénomènes de phosphorylation et de déphosphorylation impliquant de nombreuses kinases, telles que CDK1 (Cyclin-Dependent Kinase 1), PKC (Protéine Kinase C), la Rho-kinase, ... Ces kinases interviennent principalement au niveau de résidus sérine du domaine N-terminal de la vimentine (Izawa & Inagaki 2006). La dissociation de la vimentine est, de manière générale, favorisée par son hyperphosphorylation.

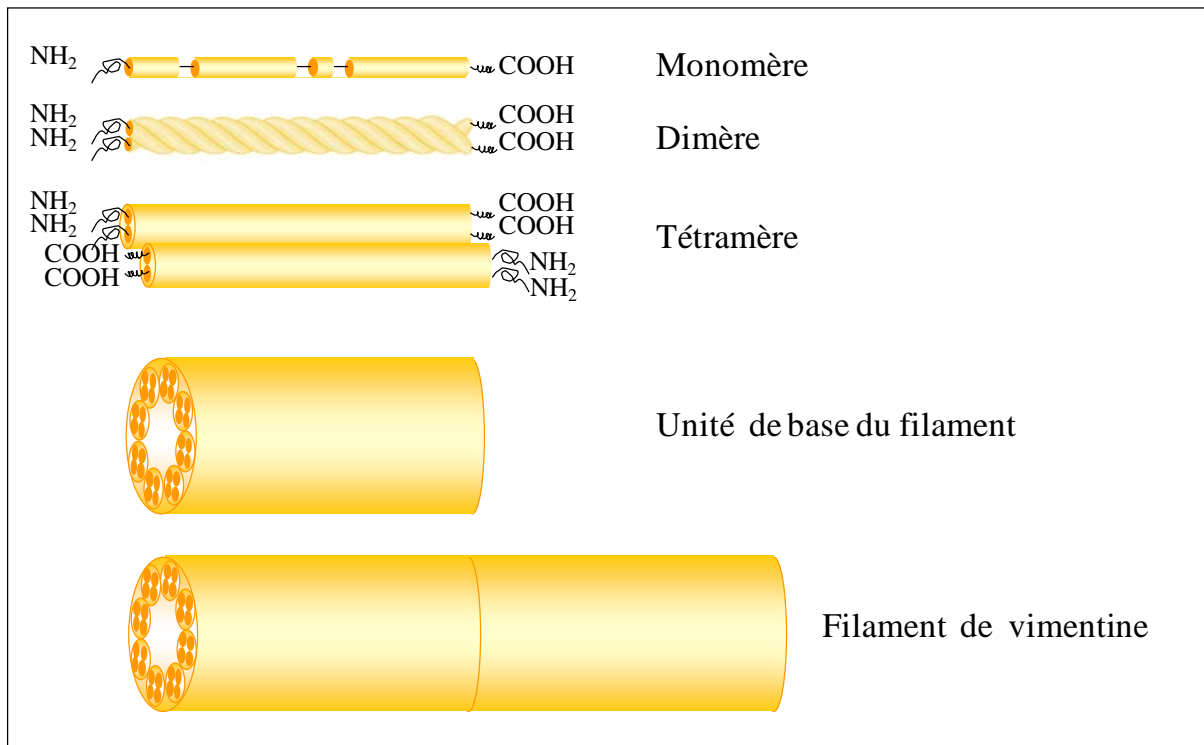


Figure 9 : Les différentes étapes de la formation de la vimentine.

IV.2. Organisation intracellulaire de la vimentine

Dans les cellules d'origine mésenchymateuse, le réseau de vimentine présente une organisation radiale dans le cytoplasme. Il constitue un réseau fibreux autour de l'enveloppe nucléaire et s'étend jusqu'à la membrane plasmique (Green & Goldman 1986; Klymkowsky *et al.* 1989; Herrmann & Aebi 2004). Au niveau de la membrane plasmique, la vimentine peut s'associer aux hémidesmosomes (Homan *et al.* 2002) et aux adhérences focales (Gonzales *et al.* 2001; Kreis *et al.* 2005; Bhattacharya *et al.* 2009) via différentes intégrines, tandis que son interaction avec la membrane nucléaire implique la laminine B (Georgatos & Blobel 1987; Maison *et al.* 1995). Outre leurs interactions avec les membranes plasmiques et nucléaire, les FIs interagissent également de manière étroite avec les deux autres composants du cytosquelette : le réseau d'actine et les microtubules (Goldman *et al.* 1986; Seifert *et al.* 1992; Svitkina *et al.* 1996).

L'interaction des FIs entre eux, avec le réseau d'actine et les microtubules, ainsi qu'avec d'autres structures cellulaires, telles que la membrane plasmique et le noyau, s'effectue par l'intermédiaire de protéines associées aux FIs, appelées IFAPs (Intermediate Filaments Associated Proteins) (Chou *et al.* 1997; Djabali 1999; Green *et al.* 2005). Parmi les IFAPs identifiées à ce jour, la plectine joue un rôle clé de connecteur moléculaire. Cette molécule

participe, non seulement au pontage des FIs de vimentine entre eux, mais intervient également dans la liaison de la vimentine aux filaments d'actine et aux microtubules (Svitkina *et al.* 1996; Steinbock & Wiche 1999; Leung *et al.* 2002). Elle participe également à la liaison de la vimentine au noyau (Gerashchenko *et al.* 2009) et à la membrane plasmique en reliant celle-ci à certaines intégrines (Homan *et al.* 2002; Bhattacharya *et al.* 2009). Dans les cellules endothéliales, il a également été démontré que la vimentine est reliée à des jonctions intercellulaires (jonctions adhérentes, desmosomes) via la caténine- γ ou la desmoplakine, toutes deux pouvant également être considérées comme des IFAPs (Shasby *et al.* 2002).

IV.3. Dynamique du réseau de vimentine

Jusqu'à il y a peu, le réseau des FIs était principalement considéré comme une structure rigide et statique intervenant uniquement dans la maintenance de l'intégrité cellulaire. En rapport direct avec nos préoccupations, il apparaît très clairement aujourd'hui que le réseau de vimentine, comme celui des autres familles de FIs, est hautement dynamique et participe au changement de forme, à l'étalement et à la migration des cellules. En effet, l'assemblage et l'organisation des FIs de vimentine varient en relation avec le comportement et la morphologie cellulaire (Yoon *et al.* 1998; Clarke & Allan 2002; Helfand *et al.* 2004).

Une telle dynamique des filaments de vimentine est due :

- aux propriétés intrinsèques du réseau de vimentine qui subit des phénomènes de polymérisation et de dépolymérisation. Ceux-ci sont finement régulés par des phosphatases et des kinases qui contrôlent le taux de phosphorylation des FIs. D'une manière générale, l'hyperphosphorylation des FIs favorise leur dissociation.
- aux interactions du réseau de vimentine avec le réseau d'actine, les microtubules et des structures membranaires (assurant des contacts cellule-cellule ou cellule-substrat), eux-mêmes soumis à une dynamique constante en relation avec le comportement cellulaire.

La polymérisation des filaments intermédiaires se réalise à partir de « particules » qui s'organisent en petits filaments appelés « squiggles », qui eux-mêmes s'associent en longs filaments (Yoon *et al.* 2001; Helfand *et al.* 2004). Des études comparatives ont montré que le mouvement des « squiggles » de la vimentine est beaucoup plus rapide que celui des « squiggles » des kératines (Clarke & Allan 2002; Helfand *et al.* 2004). De telles différences

sont en accord avec les propriétés motiles plus importantes des cellules d'origine mésenchymateuse par rapport aux cellules épithéliales (Helfand *et al.* 2004). De plus, dans des fibroblastes et des cellules endothéliales, une réorganisation du réseau de vimentine en migration a été observée (Gurland & Gundersen 1995; Valgeirsdottir *et al.* 1998). Même si les mécanismes impliqués restent à élucider, un rôle fonctionnel de la vimentine dans la migration des fibroblastes a également été démontré. Ainsi, les fibroblastes issus de souris déficientes pour la vimentine sont incapables de migrer, comme il a été démontré *in vitro* et *in vivo* (Eckes *et al.* 1998; Eckes *et al.* 2000). Une autre étude également sur des souris déficientes pour la vimentine, montre que la vimentine est nécessaire à la migration transendothéliale des lymphocytes (Nieminen *et al.* 2006).

L'implication exacte de la vimentine dans la migration est encore méconnue. Ses interactions avec d'autres structures, elles mêmes soumises à une dynamique constante, telle que le réseau d'actine, les microtubules et les structures membranaires (intégrines ou jonctions intercellulaires) semblent jouer un rôle important dans la migration cellulaire. Ainsi, les adhérences focales issues de fibroblastes de souris déficientes pour la vimentine, dont le potentiel migratoire est réduit, présentent une organisation aberrante (Eckes *et al.* 1998). La cicatrisation de ses souris est également réduite (Eckes *et al.* 2000). On observe également une association des FIs de la vimentine aux adhérences focales via les intégrines dans des cellules endothéliales en migration, tandis que ces interactions sont absentes dans des cellules stationnaires (Gonzales *et al.* 2001; Kreis *et al.* 2005).

IV.4. Expression de la vimentine dans les cellules épithéliales : marqueur de TEM et rôle fonctionnel dans la migration et l'invasion des cellules tumorales épithéliales

Comme décrit ci-dessus, la vimentine est une protéine exprimée par les cellules d'origine mésenchymateuse dans des conditions normales (Steinert & Roop 1988). L'expression de la vimentine est devenue dès lors un marqueur par excellence des phénomènes de TEM. La présence de vimentine dans les cellules épithéliales a été décrite dans divers processus physiologiques ou pathologiques impliquant une TEM associée à une migration épithéliale. Ceux-ci incluent des processus d'embryogenèse et d'organogenèse (Guarino 1995; Hay 1995), la cicatrisation (SundarRaj *et al.* 1992), l'invasion trophoblastique (Vicovac & Aplin 1996; Badwaik *et al.* 1998), la morphogenèse du sein (Fata *et al.* 2004) ou l'invasion tumorale (Ramaekers *et al.* 1983; Savagner *et al.* 1994; Guarino 1995; Gilles *et al.* 1996; Gilles & Thompson 1996).

En ce qui concerne l'invasion tumorale, l'expression de la vimentine dans des lignées tumorales est corrélée à des propriétés migratoires et invasives élevées *in vitro*. Cela a été particulièrement décrit dans des lignées de sein, de poumon, de col, de prostate ou de mélanome (Sommers *et al.* 1989; Sommers *et al.* 1992; Gilles *et al.* 1994a; Gilles *et al.* 1994b; Sommers *et al.* 1994b; Gilles *et al.* 1996; Gilles & Thompson 1996; Hendrix *et al.* 1996; Gilles *et al.* 1999; Lang *et al.* 2002; Fuchs *et al.* 2002; Gilles *et al.* 2003; Singh *et al.* 2003; Korsching *et al.* 2005). Utilisant un modèle de migration *in vitro* où un phénotype migratoire peut être induit de manière transitoire, notre laboratoire a également décrit une association spatio-temporelle entre l'expression *de novo* de la vimentine dans des cellules épithéliales mammaires et le statut migratoire (Gilles *et al.* 1999). Un rôle fonctionnel de la vimentine dans la migration et l'invasion des cellules épithéliales tumorales a également été démontré. Ainsi, l'inhibition de l'expression de la vimentine par diverses stratégies de transfection antisens dans des lignées tumorales invasives réduit fortement leurs propriétés migratoires et invasives (Hendrix *et al.* 1997; Gilles *et al.* 1999; Singh *et al.* 2003).

Des études *in vivo* récentes montrent que la perte d'expression de la vimentine dans des cellules tumorales de la prostate réduit significativement la croissance tumorale après injection sous-cutanée dans des souris athymiques (Zhang *et al.* 2009b). Dans d'autres lignées cellulaires de la prostate, une corrélation positive entre l'expression de la vimentine et la capacité à former des métastases en souris a été observée (Wu *et al.* 2007).

De même, *in vivo* dans des biopsies humaines, une expression atypique de la vimentine dans des cellules épithéliales tumorales a été observée dans de nombreux types de cancers, tels que des cancers du sein, du poumon, de l'ovaire, de la thyroïde, du rein, de la prostate, de la peau,... (Miettinen *et al.* 1983; Miettinen *et al.* 1984; McNutt *et al.* 1985; Gatter *et al.* 1986; Upton *et al.* 1986; Benjamin *et al.* 1987; Buley *et al.* 1987; Doglioni *et al.* 1987; Ikegawa *et al.* 1989; Oosterwijk *et al.* 1990). Plus particulièrement pour le cancer du sein, la présence de la vimentine dans les cellules tumorales a également été associée à l'agressivité (Niveditha & Bajaj 2003; Korsching *et al.* 2005; Reis-Filho 2005; Vora *et al.* 2009; Kusinska *et al.* 2009) et à un mauvais pronostic (Domagala *et al.* 1990; Domagala *et al.* 1994; Sabo *et al.* 1997; Vora *et al.* 2009). Récemment, il a été montré que le gène de la vimentine est hautement méthylé dans le carcinome colorectal (Itzkowitz *et al.* 2007) et gastrique (Kitamura *et al.* 2009).

Il est à noter que l'expression de la vimentine est plutôt considérée comme un mécanisme tardif de la TEM car elle est rarement induite dans les premières phases de dispersion cellulaire qui précèdent les mécanismes de migration actifs et directionnels.

V. Les familles de facteurs de transcription Snail et ZEB

Pour revues : (Peinado et al. 2004c; Peinado et al. 2007; Vandewalle et al. 2009).

La régulation de l'expression des gènes impliqués dans les processus de TEM est contrôlée par un ensemble de facteurs de transcription. Parmi ceux-ci, on distingue les facteurs de transcription des familles Snail et ZEB (Peinado *et al.* 2007). Les membres des familles Snail et ZEB sont des facteurs de transcription à doigt de zinc dont le rôle dans le contrôle de la TEM associée aux processus embryologiques a été largement décrit. Plus récemment, leur implication dans la TEM liée à l'invasion tumorale a également été démontrée.

V.1. Structure de la famille Snail

La superfamille Snail est subdivisée en la famille du même nom (Snail) et la famille Scratch. A l'heure actuelle, la famille Snail comprend trois membres chez les vertébrés, SNAI1 (Snail) SNAI2 (Slug) et SNAI3, dont les membres Snail et Slug sont particulièrement impliqués dans la TEM (Barrallo-Gimeno & Nieto 2005; Barrallo-Gimeno & Nieto 2009). Le rôle de SNAI3, plus récemment découvert, n'a pas encore clairement été établi (Katoh & Katoh 2003). Snail et Slug présentent une organisation en domaines commune : un domaine C-terminal hautement conservé comprenant un nombre variable de motifs en doigt de zinc et un domaine N-terminal variable. Les motifs en doigt de zinc, impliqués dans la fixation à l'ADN, sont de type C₂H₂ où C et H représentent les résidus cystéine et histidine. Slug et Snail possèdent dans leur partie C-terminale respectivement 4 et 5 domaines en doigt de zinc (Figure 10). Slug et Snail agissent en tant que répresseurs transcriptionnels en se liant à l'ADN sur des séquences 5'-CAGGTG ou 5'-CACCTG connues sous le nom de « E-box » (Nieto 2002). En outre, Slug et Snail contiennent dans leur partie N-terminale un domaine SNAG, initialement identifié dans une oncoprotéine appelée Gfi-1 (d'où le nom de ce domaine : Snail and Gfi-1), et dont les sept premiers acides aminés sont conservés (Sefton *et al.* 1998; Hemavathy *et al.* 2000; Manzanares *et al.* 2001; Nieto 2002). Le rôle de ce domaine, encore très peu connu, semble être nécessaire à l'activité transcriptionnelle de Slug et Snail (Peinado *et al.* 2004a). Le domaine central des deux protéines Snails contient une région riche en sérine-proline (S-P) variable entre les membres de la famille Snail. Les protéines Slug possèdent dans cette région centrale une insertion de 29 acides aminés juste avant le domaine à doigt de zinc, appelé le domaine Slug (Manzanares *et al.* 2001). La fonction exacte de ce

domaine est encore inconnue à ce jour mais semble intervenir dans une oligomérisation des protéines Slug, qui, contrairement à Snail, se lierait à l'ADN plutôt sous forme multimérique (Bolos *et al.* 2003). A la différence des protéines Slug, deux domaines fonctionnellement différents ont été observés dans la région centrale des protéines Snail : un signal d'exportation nucléaire (NES), reconnu par le transporteur CRM1 (Exportine 1) (Dominguez *et al.* 2003; Zhou *et al.* 2004), et une boîte de destruction (DB) régulant la stabilité de la protéine (Zhou *et al.* 2004) (Figure 10).

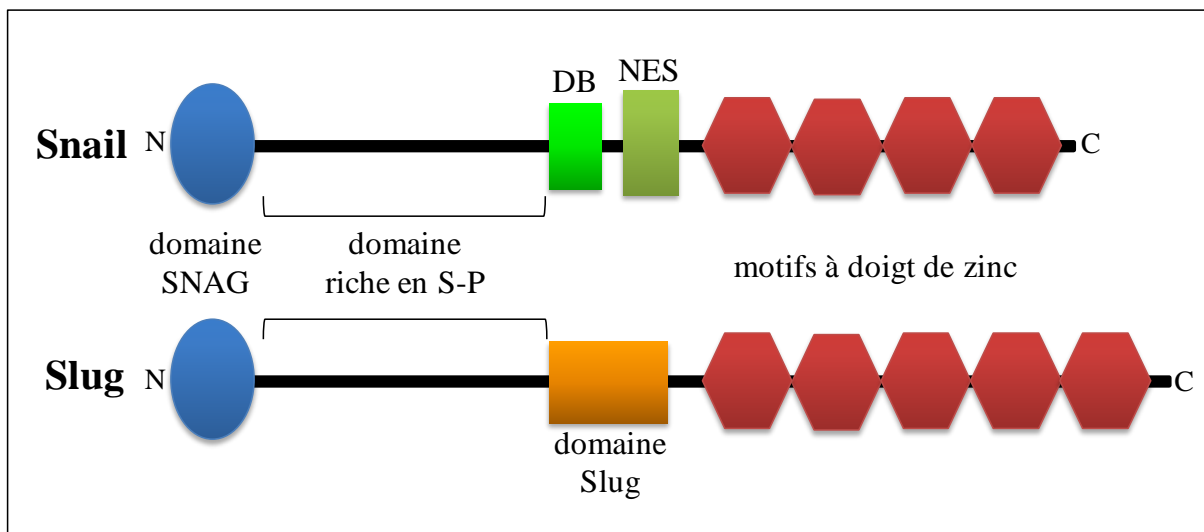
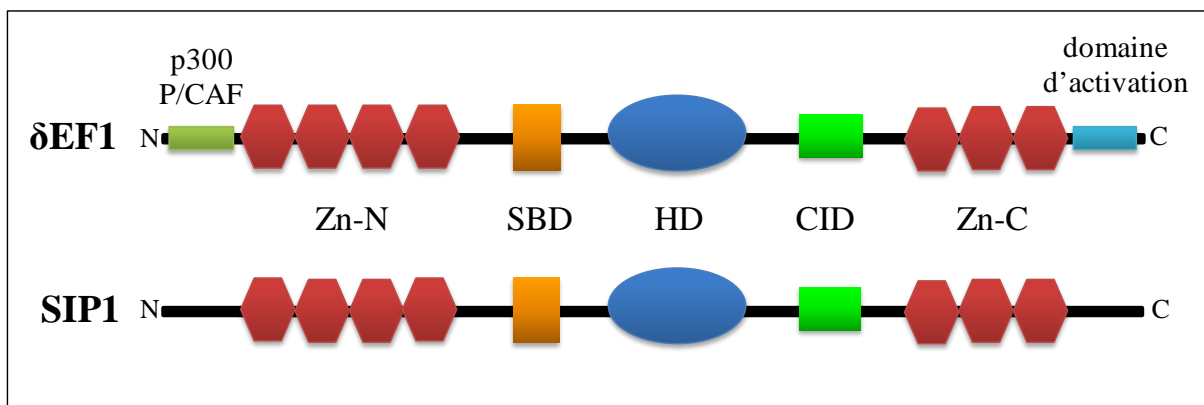


Figure 10 : Schéma de la structure de Snail et Slug. (D'après Peinado *et al.*, 2007).

V.2. Structure de la famille ZEB

Chez les vertébrés, la famille des facteurs de transcription ZEB contient 2 homologues, ZEB1 (Zinc E-box Binding factor 1, également dénommé δ EF1) et ZEB2 (Zinc E-box Binding factor 2, également dénommé SIP1). δ EF1 (δ -cristallin Enhancer Factor 1), a été initialement identifié comme facteur nucléaire qui lie spécifiquement et réprime le 'lens-specific δ 1 cristallin enhancer' chez la poule (Funahashi *et al.* 1993). Le second membre, SIP1, a été identifié comme une protéine se liant au domaine MH2 des protéines Smad (d'où son nom : Smad Interacting Protein 1), qui jouent un rôle important dans la transmission du signal TGF β de la membrane plasmique au noyau (Derynck *et al.* 1998; Verschueren *et al.* 1999). La famille ZEB est caractérisée par la présence de deux domaines à doigt de zinc à chaque extrémité et un homéodomaine central (HD). Comme pour les membres de la famille Snail, les domaines à doigt de zinc sont nécessaires pour la liaison à l'ADN. Le domaine N-terminal (Zn-N) est caractérisé par la présence de 4 motifs à doigt de zinc, dont trois sont de

type CHH et un de type CHC. Le domaine C-terminal (Zn-C), quant à lui, est constitué de trois motifs à doigt de zinc de type CHH (Figure 11) (Verschuere *et al.* 1999). Comme les facteurs Snail, les facteurs ZEB sont également reconnus comme répresseurs transcriptionnels. Chaque motif à doigt de zinc reconnaît le motif CACCT sur l'ADN, mais la molécule complète est nécessaire à la liaison à l'élément bipartite composé d'une séquence 5'CACCT et 5'CACCTG (Verschuere *et al.* 1999; Remacle *et al.* 1999) dont l'orientation et la distance peuvent varier (Remacle *et al.* 1999). L'homéodomaine ne lie pas l'ADN et semble surtout être impliqué dans les interactions protéiques. Comme déjà mentionné, SIP1 est une protéine capable d'interagir avec des Smads activés par le récepteur β au TGF (Verschuere *et al.* 1999). Plus récemment, il a également été démontré que δ EF1 peut se lier à des Smads activés, bien que de manière moins efficace que SIP1. Une région conservée en aval du motif à doigt de zinc N-terminal a été identifiée dans les deux protéines comme domaine d'interaction avec les Smads (SBD) (Verschuere *et al.* 1999; Postigo 2003). Ainsi, les facteurs ZEB peuvent influencer la TEM médiée par le TGF β (Postigo 2003). On peut également trouver d'autres domaines chez les membres de cette famille, tels qu'un domaine de liaison au corépresseur CtBP (CID, CtBP Interaction Domain) impliqué dans la répression des gènes cibles (Verschuere *et al.* 1999; Remacle *et al.* 1999; Comijn *et al.* 2001; Postigo *et al.* 2003). De plus, dans la protéine δ EF1, un domaine d'activation de la transcription et un site de liaison pour les coactivateurs de transcription p300 et P/CAF ont été identifiés (Figure 11) (Vandewalle *et al.* 2009).



*Figure 11 : Schéma de la structure de δ EF1 et SIP1. (D'après Vandewalle *et al.*, 2009).*

V.3. Mécanismes de répression (Peinado *et al.* 2007)

La liste de gènes cibles des membres des familles Snail et ZEB s'accroît constamment, toutefois le mécanisme d'action de ces protéines doit encore être élucidé. Les facteurs de transcription à doigt de zinc sont plutôt reconnus comme des répresseurs transcriptionnels en se liant directement à l'ADN sur des séquences 5'-CACCT(G) connues sous le nom de « E-box » via leurs motifs à doigt de zinc (Verschuere *et al.* 1999; Batlle *et al.* 2000; Cano *et al.* 2000; Hajra *et al.* 2002; Nieto 2002). La liaison des facteurs Snail à l'ADN ne nécessite qu'une « E-box », tandis que l'intégralité des deux motifs à doigt de zinc est nécessaire pour la liaison des facteurs ZEB à des éléments de régulation bipartite dans les promoteurs constitués de deux séquences « E-box » distinctes, notamment pour la répression de la cadhérine E (Remacle *et al.* 1999). Les mécanismes par lesquels les différents répresseurs contrôlent les gènes au cours de la TEM sont encore méconnus. La modification de la structure de la chromatine est un événement important favorisé par ces protéines au cours de la TEM (Peinado *et al.* 2004c), et des analyses de répression de Slug montrent une implication des HDACs (Histone DesAcétylases) (Hemavathy *et al.* 2000). Ainsi, au niveau du promoteur de leurs gènes cibles, ces facteurs de transcription peuvent former des complexes avec différents corépresseurs. La répression de la cadhérine E par Snail semble impliquer un recrutement direct d'un complexe de répression composé de HDAC1, HDAC2 et Sin3A (Peinado *et al.* 2004a). Slug agit de façon similaire en recrutant une combinaison différente de corépresseurs, tels que HDAC1/3 et CtBP1/2 au niveau du promoteur de la cadhérine E (Peinado *et al.* 2007). Cette interaction semble être indirecte puisque la séquence de liaison au CtBP n'est pas conservée chez les vertébrés (Hemavathy *et al.* 2000) et que Slug n'est pas capable de lier directement le CtBP (Bailey *et al.* 2007). Dans une étude récente, le TGF β favorise la formation d'un complexe de répression formé de Snail et Smad3/4 qui intervient dans la répression de plusieurs gènes cibles, dont la cadhérine E (Vincent *et al.* 2009). L'identification de sites d'interaction pour le CtBP chez les facteurs ZEB a laissé supposer que CtBP est recrutée en tant que corépresseur au niveau du promoteur des gènes cibles. Ainsi, un complexe de répression a été identifié, constitué entre autres de CtBP et de HDACs (Shi *et al.* 2003), bien qu'il semble que SIP1 peut réprimer la cadhérine E indépendamment de CtBP (van Grunsven *et al.* 2003) (Figure 12).

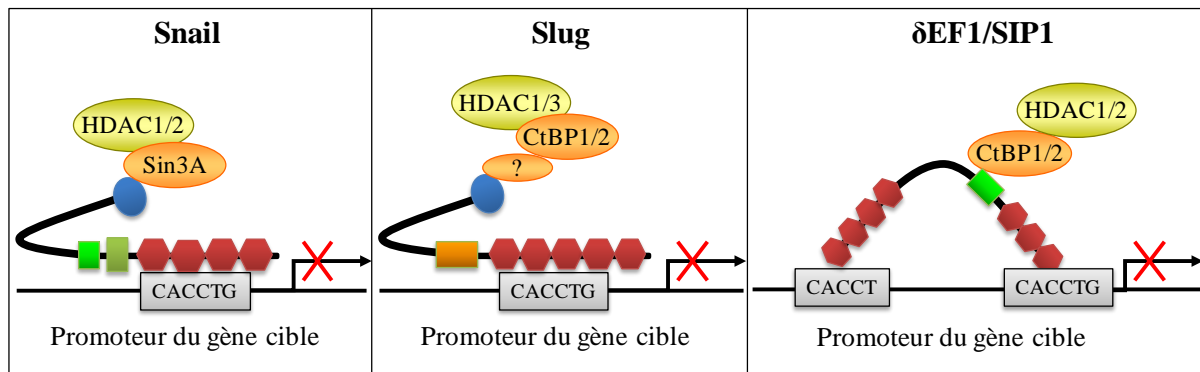


Figure 12 : Mécanismes de répression impliqués dans la régulation et la fonction des facteurs Snail et ZEB. Vue schématique du mécanisme de répression de ces facteurs, représentant les principaux complexes de répression pour chaque facteur de transcription. (D'après Peinado *et al.*, 2007).

V.4. Modifications post-transcriptionnelles

Des études récentes montrent que l'expression des membres de la famille ZEB peut être régulée par des miRNAs. En effet, les ARNm de δ EF1 et de SIP1 contiennent plusieurs séquences de liaison pour divers miRNAs. Ainsi, les miRNAs tels que le miR141, la famille miR200 et miR205 peuvent réprimer directement l'expression de δ EF1 et de SIP1 (Hurteau *et al.* 2007; Christoffersen *et al.* 2007; Gregory *et al.* 2008; Nakada *et al.* 2008; Burk *et al.* 2008; Korpala *et al.* 2008; Park *et al.* 2008b; Saydam *et al.* 2009; Hu *et al.* 2009). Le miR-200a, quant à lui, possède une fonction suppresseur de tumeur en inhibant la signalisation Wnt/caténine- β par deux mécanismes complémentaires : en ciblant directement l'ARNm de la caténine- β menant à une quantité réduite de celle-ci dans le cytoplasme; et en ciblant les ARNm de δ EF1 et SIP1 résultant en une surexpression de la cadhérine E et en une séquestration de la caténine- β au niveau de la membrane plasmique (Saydam *et al.* 2009). De façon intéressante, la régulation de SIP1 est également sous le contrôle d'un ARN non-codant différent des miRNAs. En effet, un transcrit antisens naturel de SIP1 (NAT) a été décrit, comme assurant la traduction de l'ARNm en empêchant le splicing de l'intron de la région 5'-UTR. Cet intron contient un site d'entrée ribosomal interne (IRES) qui constitue le site d'initiation de traduction principal pour l'ARNm de SIP1. La présence de NAT, qui peut être directement induite par Snail, agit comme régulateur positif de l'expression protéique de SIP1 (Beltran *et al.* 2008).

V.5. Modifications post-traductionnelles

L'expression des facteurs de transcription Snail et ZEB est finement régulée au niveau protéique. Plusieurs mécanismes de régulation post-traductionnelle ont ainsi été décrits pour Snail. Dans des conditions normales, Snail est une protéine très instable. GSK3 β et phosphoryle Snail sur le domaine de destruction (DB) et le domaine NES. La phosphorylation des résidus sérine/proline du signal d'exportation nucléaire dans le noyau favorise son exportation dans le cytoplasme, tandis que la phosphorylation de la boîte de destruction entraîne son ubiquitination et ainsi sa dégradation par le protéasome au niveau du cytoplasme (Zhou *et al.* 2004; Yook *et al.* 2005). La régulation post-traductionnelle de Snail par GSK3 β relie Snail à la voie de signalisation Wnt. De fait, suite à l'activation de la voie de signalisation Wnt, GSK3 β n'est plus capable de phosphoryler ses cibles et ainsi, la caténine β ainsi que Snail sont stabilisés et peuvent agir en tant que facteurs de transcription (Barrallo-Gimeno & Nieto 2005). En outre, LOXL2 (Lysyl Oxidase Homolog 2), un membre de la famille des lysines oxydases, peut également contrebalancer l'action de GSK3 β sur Snail. Ainsi, l'oxydation de résidus lysines par LOXL2 entraîne un changement de conformation de la protéine Snail masquant les sites de phosphorylation de GSK3 β , ce qui favorise la stabilité et la localisation nucléaire de Snail (Peinado *et al.* 2005a; Peinado *et al.* 2005b). De plus, une phosphatase SCP (Small C-terminal domain Phosphatase), très récemment identifiée, semble être responsable de la déphosphorylation de Snail phosphorylée par GSK3 β (Wu *et al.* 2009b). Par ailleurs, la kinase p21 activée (PAK1) est également capable de phosphoryler Snail sur des résidus différents favorisant au contraire la localisation nucléaire de Snail (Yang *et al.* 2005). De même, le transporteur à doigt de zinc, LIV1, favorise l'importation de Snail dans le noyau par un mécanisme encore méconnu (Yamashita *et al.* 2004). Des données récentes montrent que la phosphorylation de Snail par les kinases CK2 (Caseine kinase 2) et PKA (Protéine kinase A) favorise le recrutement du corépresseur Sin3A et l'activité répressive de Snail (Macpherson *et al.* 2009). Un mécanisme alternatif de stabilisation de Snail par la voie TNF α /NF- κ B (Tumor Necrosis Factor α /Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) indépendant de la phosphorylation par GSK3 β , a également été décrit récemment (Wu *et al.* 2009a) (Figure 13).

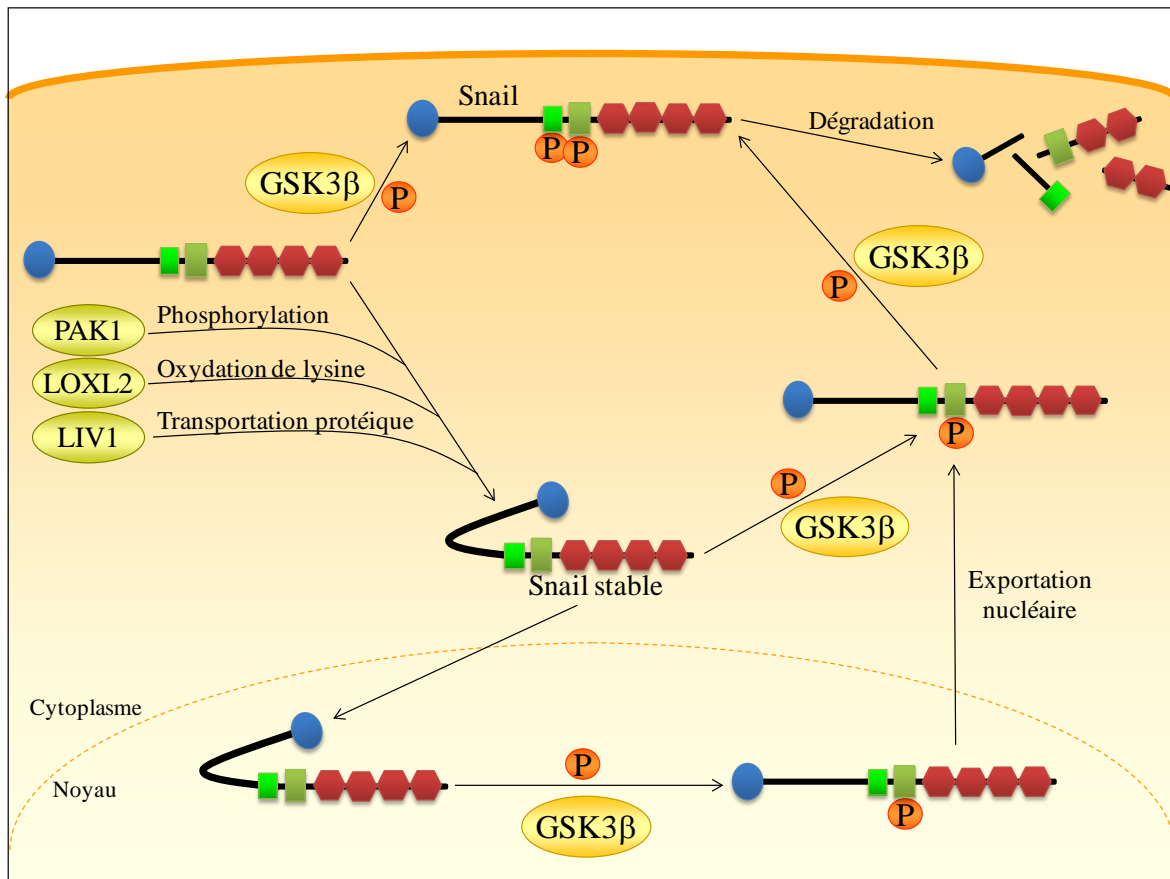


Figure 13 : Mécanisme de régulation post-traductionnelle de Snail.

La stabilité et la translocation nucléaire de Snail peuvent être modulées positivement par PAK1, LIV1 ou LOXL2. La phosphorylation de Snail par GSK3 β favorise l'exportation cytoplasmique, l'ubiquitination et la dégradation par le protéasome. (D'après Peinado et al., 2007).

Il y a nettement moins de données concernant la régulation post-traductionnelle de Slug, bien qu'une étude montre que la stabilité et la dégradation de Slug sont modulées par la protéine paired (PPa) (Vernon & LaBonne 2006).

En ce qui concerne les membres de la famille ZEB, il a été observé que δ EF1 et SIP1 sont tous les deux SUMOylés sur deux résidus lysine. La SUMOylation (SUMO = Small Ubiquitin-like Modifier) est une modification covalente qui ajoute des petites modifications ubiquitine-like sur des résidus lysine. Cette modification implique l'action coordonnée de multiples enzymes, d'une manière similaire à l'ubiquitination. Pour SIP1, ce processus s'opère via la protéine polycomb Pc2, qui agit comme la ligase E3 lors de l'ubiquitination « classique ». Cette modification empêche l'interaction avec le corépresseur CtBP et atténue ainsi son activité transcriptionnelle résultant en une répression moins efficace de la cadhérine E (Long et al. 2005). Par ailleurs, des formes hyper- et hypo-phosphorylées de δ EF1 ont été

observées dans des lignées cellulaires différentes. Néanmoins, le mécanisme et l'impact de ces phosphorylations n'ont pas encore été élucidés (Costantino *et al.* 2002) (Figure 14).

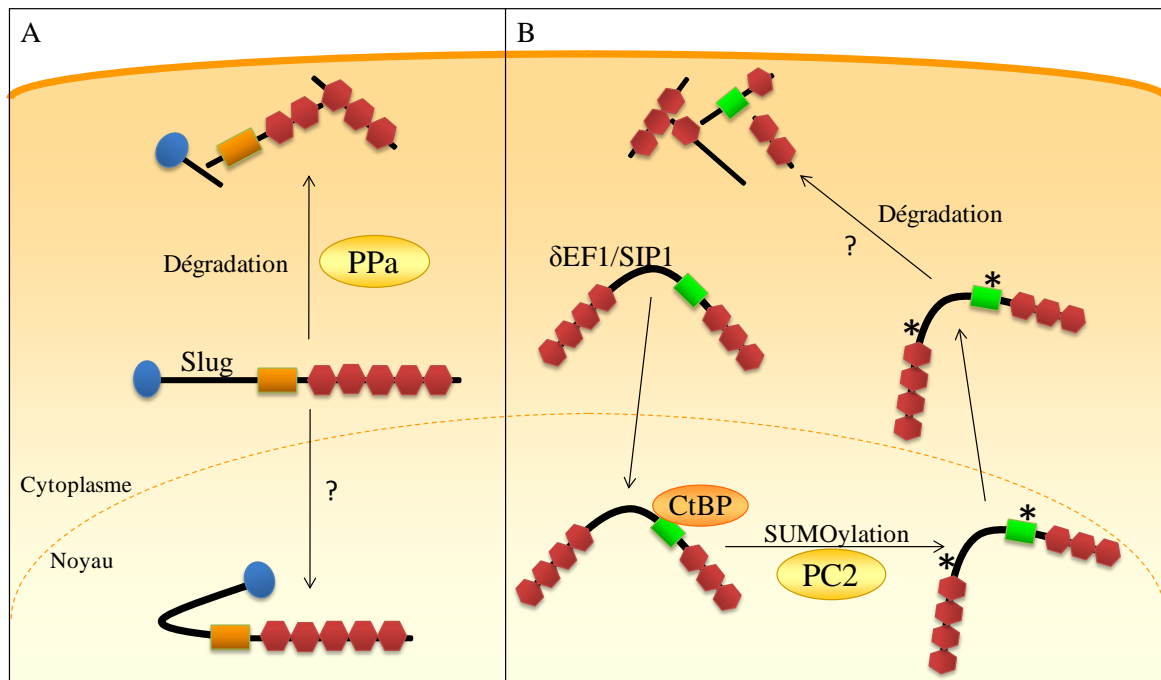


Figure 14 : Mécanisme de régulation post-traductionnelle de Slug, δ EF1 et SIP1.

(A) La stabilité et la dégradation de la protéine Slug est modulée par paired (PPa), par contre les mécanismes d'exportation et d'importation sont encore méconnus. (B) La SUMOylation de SIP1 médiée par PC2 prévient son interaction avec CtBP, favorisant sa localisation cytoplasmique. (D'après Peinado *et al.*, 2007).

V.6. Les gènes cibles

Si ces répresseurs transcriptionnels répriment plusieurs gènes cibles communs impliqués dans la TEM, chacun possède néanmoins des cibles et des mécanismes de régulation spécifiques (Moreno-Bueno *et al.* 2006; Bermejo-Rodriguez *et al.* 2006) (Tableau 2). Parmi les cibles communes de ces facteurs, les premières études *in vitro* ont essentiellement documenté leur capacité à réprimer la cadhérine E en association avec une augmentation des propriétés invasives. Ainsi, la caractérisation en 2000 du facteur Snail, en tant que répresseur transcriptionnel de la cadhérine E et initiateur de la TEM, a permis un nouvel aperçu du mécanisme moléculaire de l'invasion tumorale (Batlle *et al.* 2000; Cano *et al.* 2000). Depuis, la capacité à réprimer la cadhérine E a été démontrée pour tous les membres des facteurs de transcription des familles Snail et ZEB (Slug (Hajra *et al.* 2002; Bolos *et al.* 2003), δ EF1 (Eger *et al.* 2005) et SIP1 (Comijn *et al.* 2001)).

En outre, les facteurs de transcription de la famille Snail ou ZEB apparaissent être impliqués dans la régulation de la cadhérine E observée en réponse à divers stimuli exogènes.

Par exemple, SIP1 médie la régulation de la cadhérine E par le collagène de type I (Imamichi *et al.* 2007), les facteurs Snail interviennent dans la régulation de la cadhérine E par l'œstradiol-17 β (Park *et al.* 2008a), les facteurs ZEB sont impliqués dans la répression de la cadhérine E par NF- κ B (Chua *et al.* 2007), et tous les membres de la famille Snail et ZEB seraient impliqués dans le mécanisme de répression de la cadhérine E par HIF (Hypoxia Inducible Factor α) (Imai *et al.* 2003; Kurrey *et al.* 2005; Krishnamachary *et al.* 2006; Evans *et al.* 2007). D'autres études impliquent δ EF1 et Snail dans la répression de la cadhérine E par la cyclooxygénase-2 (COX2) (Dohadwala *et al.* 2006).

De plus en plus de données démontrent que ces facteurs de transcription ne répriment pas seulement la cadhérine E, mais fragilisent également d'autres complexes intercellulaires, tels que les jonctions serrées, les desmosomes ou les jonctions « gap », en réprimant l'expression de certains de leurs constituants moléculaires. Ainsi, il a été montré que Snail réprime les gènes codant pour les claudines-1, -3, -4 et -7, l'occludine ou ZO1 (Zonula occludens 1), des composants essentiels des jonctions serrées (Ikenouchi *et al.* 2003; Ohkubo & Ozawa 2004; De Craene *et al.* 2005; Kurrey *et al.* 2005; Martinez-Estrada *et al.* 2006). Cette régulation entraîne une dissociation des complexes jonctionnels et une relocalisation cytoplasmique de certains de leurs composants comme ZO1 ou p120. De manière similaire, Snail peut également induire une dissociation des desmosomes en réprimant l'expression de la desmoplakine et de la plakophiline, et en provoquant une redistribution de la plakoglobine (Savagner *et al.* 1997; Cano *et al.* 2000; De Craene *et al.* 2005; Kurrey *et al.* 2005). Slug réprime également l'expression de la claudine-1, l'occludine et ZO1 (Kajita *et al.* 2004; Kurrey *et al.* 2005; Martinez-Estrada *et al.* 2006; Wang *et al.* 2007b), ainsi que des composants de desmosome, comme la desmoplakine et la desmogléine entraînant leur dissociation (Savagner *et al.* 1997; Kurrey *et al.* 2005). Une signature transcriptionnelle similaire a été démontrée pour les membres de la famille ZEB. Ainsi, SIP1 réprime l'expression de la claudine-4 et de ZO3 au niveau des jonctions serrées, et au niveau des desmosomes, elle inhibe l'expression de la plakophiline-2 (Savagner *et al.* 1997; Vandewalle *et al.* 2005; De Craene *et al.* 2005). Une diminution de l'expression de δ EF1, quant à elle, mène à une expression accrue de la plakophiline-3 (Aigner *et al.* 2007b).

Les membres des familles Snail et ZEB répriment également l'expression d'autres marqueurs épithéliaux, tels que des molécules impliquées dans le maintien de la polarité épithéliale comme il a été démontré pour Snail (Whiteman *et al.* 2008) et δ EF1 (Aigner *et al.* 2007a; Spaderna *et al.* 2008). Les membres de la famille Snail régulent également négativement l'expression de certaines cytokératines, affectant ainsi l'organisation du

cytosquelette épithélial (Guaita *et al.* 2002; Ikenouchi *et al.* 2003; De Craene *et al.* 2005; Tripathi *et al.* 2005). Par ailleurs, δ EF1 peut réprimer l'expression de composants de la membrane basale comme la chaîne $\alpha 3$ de la laminine et le collagène IV (Spaderna *et al.* 2006).

Des études récentes montrent que les membres de la famille ZEB répriment des micro-RNAs impliqués dans la différenciation épithéliale et dont l'expression est diminuée dans les cancers. Ainsi, la transcription du miRNA primaire 200b-200a-429 est inhibée par SIP1 et δ EF1 (Bracken *et al.* 2008), et δ EF1 réprime également la transcription de miR141 et miR200c. (Burk *et al.* 2008).

Bien que ces facteurs de transcription aient initialement été caractérisés en tant que répresseurs de l'expression génique de marqueurs épithéliaux, les membres de la famille Snail et ZEB sont efficacement impliqués dans la régulation positive de molécules principalement exprimées par des cellules mésenchymateuses. Ainsi, l'expression de la vimentine peut être régulée positivement par Snail (Cano *et al.* 2000; Yokoyama *et al.* 2003; Taki *et al.* 2006), Slug (Bolos *et al.* 2003), δ EF1 (Eger *et al.* 2005) et SIP1, comme nous le démontrons dans notre travail (Bindels *et al.* 2006). L'expression de la cadhérine N est induite par les facteurs ZEB (Vandewalle *et al.* 2005; Graham *et al.* 2008) ainsi que par Snail (Moreno-Bueno *et al.* 2006). L'expression des métalloprotéinases matricielles peut également être régulée par ces différents facteurs de transcription. Ainsi, MMP-1, MMP-2 et MT1-MMP sont induites par Snail et SIP1 et MMP-7 et MMP-9 par Snail (Miyoshi *et al.* 2004; Taki *et al.* 2006; Olmeda *et al.* 2007a). Slug, quant à lui, accroît l'expression de la MMP-2 (Shih *et al.* 2005). Les membres de la famille Snail peuvent également activer l'expression d'autres protéines impliquées dans la migration et l'invasion, telle que PAI-1 (Plasminogen Activator Inhibitor 1) (Moreno-Bueno *et al.* 2006; Fabre-Guillevin *et al.* 2008) et des protéines de la MEC telle que le collagène de type II, III et V (Seki *et al.* 2003; Moreno-Bueno *et al.* 2006), la fibronectine (Cano *et al.* 2000; Olmeda *et al.* 2007a) et la vitronectine (Olmeda *et al.* 2007a).

De plus, les protéines Snail et ZEB peuvent réguler l'expression d'autres facteurs de transcription, de ces mêmes familles ou d'autres familles. Ainsi, Snail induit l'expression de Twist et des Ids, tous deux des protéines bHLH (Helix-Loop-Helix), eux-mêmes impliqués dans les processus de TEM (Moreno-Bueno *et al.* 2006), ainsi que des membres de la famille ZEB (Guaita *et al.* 2002; Taki *et al.* 2006; Takkunen *et al.* 2006; Beltran *et al.* 2008). En outre, Snail possède la capacité de s'autoréguler en liant et réprimant son propre promoteur (Peiro *et al.* 2006).

En plus de réguler des gènes épithéliaux ou mésenchymateux et de favoriser ainsi la plasticité cellulaire nécessaire au processus d'invasion tumorale, ces facteurs de transcription régulent également d'autres gènes impliqués dans d'autres étapes de la progression tumorale. Ainsi, les facteurs Snail et ZEB modifient l'expression de gènes nécessaires à la prolifération et à la survie cellulaire (Barrallo-Gimeno & Nieto 2005). La transcription des cyclines D est réprimée par Snail (Vega *et al.* 2004) et SIP1 (Mejlvang *et al.* 2007), et l'expression du PCNA (« Proliferating Cell Nuclear Antigen ») est réprimée par Snail (Park *et al.* 2005), ce qui mène à un arrêt du cycle cellulaire. Slug régule la prolifération en inhibant ERK (Extracellular signal-Regulated Kinases) (Turner *et al.* 2006). En ce qui concerne la survie cellulaire, SIP1 protège les cellules tumorales de l'apoptose induite par des lésions d'ADN (Sayan *et al.* 2009). Dans différents systèmes, Snail et Slug agissent également en tant que facteurs de survie en interférant avec les voies de signalisation p53 et Akt (Kajita *et al.* 2004; Vega *et al.* 2004; Escriva *et al.* 2008). En outre, la répression de l'expression de PTEN (Phosphatase and Tensin homolog) semble être une partie de la signalisation anti-apoptotique activée par Snail (Escriva *et al.* 2008). SIP1 peut également freiner la sénescence répllicative (Lin & Elledge 2003; Ozturk *et al.* 2006). Dans ce contexte, SIP1 agit comme régulateur négatif de l'expression de hTERT (human Telomerase Reverse Transcriptase), qui code pour une sous-unité catalytique de la télomérase.

Par conséquent, en régulant la TEM, la prolifération, la survie, et la sénescence cellulaire, ces facteurs de transcription peuvent être impliqués à différents stades de la progression métastatique, résultant en une forte contribution au phénotype malin.

Fdt	Gènes associés à la TEM		D'autres gènes
	↓expression	↑expression	↓expression
Snail	Cadhérine E ; Claudines-1, -3, -4 et -7 ; Occludine ; ZO1 ; Desmoplakine ; Plakophiline ; Cytokératine-17 et -18 ;	Vimentine ; Cadhérine N ; MMP-1, -2, -7, -9 ; MT1-MMP ; PAI-1 ; Fibronectine ; Vitronectine ; Collagène II ; Twist ; Ids ; δ EF1 ; SIP1 ;	Cycline D2 ; PCNA ; TP53 ; VDR ;
Slug	Cadhérine E, Claudine-1 ; Occludine ; ZO1, Desmoplakine, Desmogléine ; Cytokératine-8 et -19 ; Collagène 2 α 1 ; Intégrine α 3 ;	Vimentine ; PAI-1 ;	PUMA ; TP53 ; BRCA2 ; VDR ;
δEF1	Cadhérine E ; Plakophiline-3 ; Laminine α 3 ; Collagène IV ; ZO1	Vimentine ; Cadhérine N ; Laminine γ 2 ;	VDR ; Ovalbumine ; Crumbs3 ; SEMA3F
SIP1	Claudine-4 ; ZO3 ; Plakophiline-2 ;	Vimentine ; Cadhérine N ; MMP-1, -2, MT1-MMP ;	Cycline D1 ; hTERT ; Intégrine α 4

Tableau 2 : Gènes cibles des différents facteurs de transcription (Fdt).

V.7. Implication des facteurs Snail et ZEB dans la TEM liée à la progression métastatique

Un nombre important de données, obtenues suite à la modification d'expression des facteurs (transfection ou interférence à l'ARN) dans des lignées tumorales, démontre aujourd'hui le rôle des facteurs Snail et ZEB dans l'expression d'un phénotype invasif dans de nombreux modèles cellulaires *in vitro* (Snail (Cano *et al.* 2000; Miyoshi *et al.* 2004; Peinado *et al.* 2004b; Kurrey *et al.* 2005; Yin *et al.* 2007; Olmeda *et al.* 2007a; Fabre-Guillevin *et al.* 2008; Kudo-Saito *et al.* 2009), Slug (Bolos *et al.* 2003; Kurrey *et al.* 2005; Shih *et al.* 2005; Vitali *et al.* 2008) δ EF1 (Aigner *et al.* 2007a; Burk *et al.* 2008; Graham *et al.* 2008; Spaderna *et al.* 2008), SIP1 (Miyoshi *et al.* 2004; Vandewalle *et al.* 2005; Bindels *et al.* 2006; Mejlvang *et al.* 2007; Ohta *et al.* 2009; Isohata *et al.* 2009)).

Si la plupart des données liant les facteurs de transcription Snail et ZEB à l'invasivité ont été obtenues *in vitro*, de nombreuses études d'expression *in vivo* ont également été réalisées sur des biopsies tumorales et montrent le rôle spécifique de chaque facteur de transcription dans des types et des grades de tumeurs différents. Ainsi, l'expression de ces facteurs de transcription est surexprimée dans de nombreux types de cancers et est associée à plusieurs paramètres clinico-pathologiques ainsi qu'à l'expression d'autres gènes, telle que la perte de la cadhérine E, largement reconnue comme marqueur précoce de la TEM. Toutes ces données sont rassemblées sous forme synthétique dans le tableau 3.

La surexpression des différents répresseurs transcriptionnels a été démontrée dans plusieurs types de cancers par RT-PCR. Toutefois, comme les mécanismes post-transcriptionnels sont des facteurs importants dans le contrôle du niveau de ces facteurs, le degré d'expression de l'ARNm ne reflète pas nécessairement l'expression protéique, par conséquent, les données obtenues par RT-PCR doivent être interprétées avec prudence. Dans l'ensemble, ces données indiquent que les facteurs Snail et ZEB sont des promoteurs critiques de la progression cancéreuse.

Fdt	Type de cancer	Paramètres clinico-pathologiques	Références
Snail	Cancer du sein	Dédifférenciation Mauvais pronostic Ganglions lymphatiques + ↓ Cadhérine E ↓ Récepteur à l'œstrogène α ↓ GSK3 β	(Blanco <i>et al.</i> 2002) (Elloul <i>et al.</i> 2005; Moody <i>et al.</i> 2005) (Blanco <i>et al.</i> 2002; Come <i>et al.</i> 2006) (Cheng <i>et al.</i> 2001; Blanco <i>et al.</i> 2002; Zhou <i>et al.</i> 2004; Elloul <i>et al.</i> 2005) (Fujita <i>et al.</i> 2003) (Zhou <i>et al.</i> 2004)
	Cancer de l'ovaire	Dédifférenciation Mauvais pronostic ↓ Cadhérine E	(Yoshida <i>et al.</i> 2009; Tuhkanen <i>et al.</i> 2009) (Blechsmidt <i>et al.</i> 2008; Yoshida <i>et al.</i> 2009) (Yoshida <i>et al.</i> 2009)
	Cancer gastrique de type diffus	↓ Cadhérine E	(Rosivatz <i>et al.</i> 2002)
	Cancer du colon	↓ Cadhérine E ↓ VDR	(Palmer <i>et al.</i> 2004; Pena <i>et al.</i> 2005)
	Cancer de l'endomètre	Dédifférenciation ↓ Cadhérine E	(Blechsmidt <i>et al.</i> 2007)
	Cancer de la sphère O.R.L.	Métastases à distance Nodules cervicaux	(Yang <i>et al.</i> 2007)
	Cancer hépatocellulaire	Dédifférenciation Métastases à distance Mauvais pronostic ↓ Cadhérine E ↑ MT1-MMP	(Miyoshi <i>et al.</i> 2005) (Sugimachi <i>et al.</i> 2003) (Miyoshi <i>et al.</i> 2005)
	Cancer du pancréas	Dédifférenciation Ganglions lymphatiques + Métastases à distance	(Yin <i>et al.</i> 2007)
	Mésothéliome malin	↑MT1-MMP et TIMP2	(Sivertsen <i>et al.</i> 2006)

Fdt	Type de cancer	Paramètres clinico-pathologiques	Références
Slug	Cancer du sein	Dédifférenciation Mauvais pronostic Ganglions lymphatiques + ↓ Cadhérine E membranaire	(Martin <i>et al.</i> 2005) (Martin <i>et al.</i> 2005; Come <i>et al.</i> 2006) (Prasad <i>et al.</i> 2009)
	Cancer de l'ovaire	Dédifférenciation ↑MMP-2	(Yoshida <i>et al.</i> 2009) (Elloul <i>et al.</i> 2005)
	Cancer gastrique	Dédifférenciation Métastases à distance ↓ Cadhérine E ↑ Snail (type diffus) ↑ SIP1 (type intestinal)	(Castro <i>et al.</i> 2007)
	Cancer colorectal	Dédifférenciation Métastases à distance Mauvais pronostic	(Shioiri <i>et al.</i> 2006)
	Cancer hépatocellulaire	↓ Cadhérine E localisation nucléaire caténine-β	(Giannelli <i>et al.</i> 2005)
	Cancer de l'œsophage	Dédifférenciation Ganglions lymphatiques + Mauvais pronostic ↓ Cadhérine E	(Uchikado <i>et al.</i> 2005)
	Cancer du poumon	Mauvais pronostic	(Shih <i>et al.</i> 2005)
δEF1	Cancer du sein	Dédifférenciation	(Aigner <i>et al.</i> 2007a)
	Cancer de l'endomètre	Dédifférenciation Mauvais pronostic ↓ Cadhérine E	(Spoelstra <i>et al.</i> 2006; Singh <i>et al.</i> 2008) (Singh <i>et al.</i> 2008)
	Cancer du colon	Dédifférenciation	(Aigner <i>et al.</i> 2007a)
	Cancer de la prostate	Dédifférenciation Métastases à distance	(Graham <i>et al.</i> 2008), (Anose <i>et al.</i> 2008)
	Cancer du poumon	↓ Cadhérine E ↑ COX2	(Dohadwala <i>et al.</i> 2006)

Fdt	Type de cancer	Paramètres clinico-pathologiques	Références
SIP1	Cancer de l'ovaire	Dédifférenciation Mauvais pronostic ↓ Cadhérine E	(Yoshida <i>et al.</i> 2009) (Elloul <i>et al.</i> 2005; Yoshihara <i>et al.</i> 2009)
	Cancer gastrique de type intestinal	↓ Cadhérine E	(Rosivatz <i>et al.</i> 2002)
	Cancer du pancréas	Dédifférenciation ↓ Cadhérine E	(Imamichi <i>et al.</i> 2007)
	Cancer de la sphère O.R.L.	Mauvais pronostic ↓ Cadhérine E	(Maeda <i>et al.</i> 2005)
	Cancer de la vessie	Mauvais pronostic	(Sayan <i>et al.</i> 2009)
	Cancer du rein à cellules claires	↓ Cadhérine E ↓ miR-141 et -200c ↑ Vimentine	(Nakada <i>et al.</i> 2008)
	Cancer du poumon	Croissance tumorale Mauvais pronostic ↓ Cadhérine E ↑ Cadhérine N	(Miura <i>et al.</i> 2009)

Tableau 3 : Expression des facteurs de transcription (Fdt) dans les différents cancers humains (↓ Corrélation inverse ; ↑ Corrélation directe).

Les facteurs de transcription de la TEM semblent agir d'une manière hiérarchique dans le développement et la progression tumorale. Peinado et al. (Peinado *et al.* 2004c) ont ainsi proposé un modèle de l'implication respective des différents répresseurs de la cadhérine E lors de l'invasion tumorale. Une affinité de liaison différente est un mécanisme possible par lequel ces facteurs pourraient cibler des promoteurs spécifiques. Bien que tous ces facteurs de transcription se lient aux « E-box », Snail et SIP1 semblent reconnaître les « E-box » avec une plus grande affinité que Slug, E47 et δ EF1, respectivement (Comijn *et al.* 2001; Bolos *et al.* 2003; Postigo 2003). Ainsi, les répresseurs SIP1 et Snail joueraient un rôle dans les premières étapes de la progression tumorale menant à l'initiation du processus invasif par répression de la cadhérine E et d'autres marqueurs épithéliaux, et l'induction de marqueurs mésenchymateux qui favorisent l'invasion. D'autres répresseurs, comme Slug, E47 et ZEB1, contribueraient au maintien du phénotype malin en continuant à réprimer la cadhérine E et en induisant la dégradation de la MEC et la migration cellulaire, provoquant l'apparition de cellules potentiellement métastatiques (Figure 15).

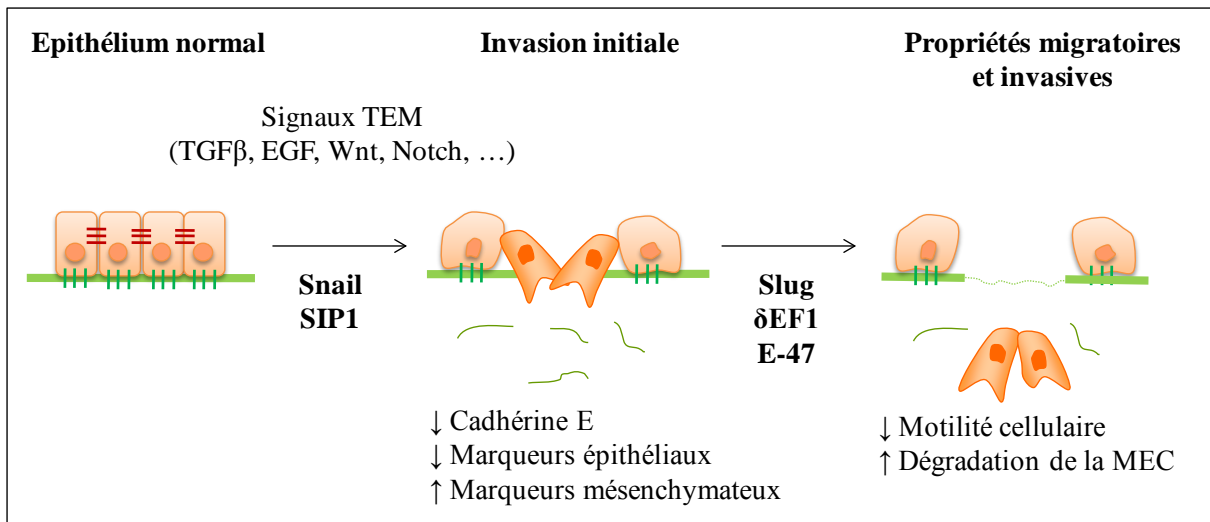


Figure 15 : Modèle de participation des différents répresseurs de la cadhérine E au cours de l'invasion tumorale. (D'après Peinado et al., 2004c).

Buts et plan du travail

Au moment où nous avons commencé ce travail, les gènes cibles des facteurs de transcription de la famille Snail et ZEB étaient encore peu connus. Le mécanisme de régulation le plus détaillé était la répression directe de la cadhérine E, un marqueur épithélial de la TEM (Cano *et al.* 2000; Comijn *et al.* 2001; Hajra *et al.* 2002). La régulation positive de marqueurs mésenchymateux par ces facteurs de transcription était encore peu explorée. Ainsi, notre objectif principal a été d'examiner la régulation potentielle de marqueurs mésenchymateux par ces facteurs de transcription ainsi que d'étudier leur implication potentielle dans la progression métastatique dans des modèles *in vivo*.

Une étude en collaboration nous a également amené à étudier le rôle de Fhit dans la régulation de gènes impliqués dans la TEM.

Les résultats sont présentés en trois parties.

1) Régulation de marqueurs mésenchymateux de la TEM par SIP1 dans des cellules tumorales mammaires *in vitro*

a. Régulation de la vimentine par SIP1 dans des cellules tumorales mammaires

Puisque l'expression des facteurs de transcription de la famille Snail et ZEB et de la vimentine sont clairement associées aux processus de TEM, nous avons examiné, dans cette première partie du travail, l'implication de ces facteurs de transcription, et plus particulièrement, de SIP1 dans l'induction de l'expression de la vimentine associée à la migration et l'invasion des cellules épithéliales. Nous avons également étudié le rôle potentiel de la voie caténine- β /TCF dans cette régulation. (Publication 1 : Bindels *et al.*, *Oncogene*, 2006).

b. Régulation de PAI-1 par SIP1 dans des cellules tumorales mammaires

Malgré son rôle d'inhibiteur sur l'activation de la plasmine, PAI-1 (Plasminogen Activator Inhibitor type 1) possède un rôle promoteur dans la progression tumorale (Bajou *et al.* 1998; Bajou *et al.* 2001; Devy *et al.* 2002; Sidenius & Blasi 2003) et a été récemment reconnu comme marqueur de la TEM (Moreno-Bueno *et al.* 2006; Fabre-Guillevin *et al.* 2008). Ainsi, nous avons également examiné l'implication de SIP1 dans l'induction de l'expression de PAI-1.

2) Influence de SIP1 sur l'invasion et la dissémination métastatique *in vivo*

Les données de la littérature, ainsi que celles obtenues lors de la première partie de notre travail, montrent que SIP1 peut réguler l'expression de gènes impliqués dans l'invasion tumorale et favorise la migration dans de nombreux systèmes *in vitro*. Le deuxième volet de nos études a dès lors été consacré à explorer l'implication potentielle de SIP1 dans la progression métastatique *in vivo*.

3) Fhit régule les capacités invasives des cellules tumorales pulmonaires

Parallèlement à notre axe de recherche principal, centré sur la régulation de la TEM par SIP1, nous avons également participé à des travaux explorant le rôle potentiel de Fhit, un gène suppresseur de tumeur au cours de l'invasion des cellules tumorales pulmonaires. Un troisième chapitre de résultats est consacré à l'exposé de ce travail. (Publication 2 : Joannes et al., *Oncogene*, 2009).

Chacun des chapitres est présenté sous forme d'une introduction, d'un résumé des principaux résultats et d'une discussion. Les deux publications originales correspondantes sont présentées en annexe au document. La revue référencée dans l'introduction (p11) est également annexée (Publication 3 : Polette et al., *Cells Tissues Organs*, 2007) (Annexe 1). Pour le chapitre 2, les résultats n'ayant pas encore fait l'objet d'une publication, une section « Matériel et Méthodes » est fournie (Annexe 2).

Résultats

I. Régulation de marqueurs mésenchymateux de la TEM par SIP1 dans des cellules tumorales mammaires

I.1 Régulation de la vimentine par SIP1 dans des cellules tumorales mammaires (Publication 1)

I.1.1 Introduction

De nombreuses études montrent que les facteurs de transcription des familles Snail et ZEB sont impliqués dans la régulation des processus de la TEM. La capacité de réprimer la cadhérine E est un mécanisme par lequel ces facteurs de transcription contribuent à ces processus de TEM. Conjointement à la désorganisation des complexes jonctionnels de la cadhérine E, l'expression *de novo* de la vimentine est également fréquemment associée aux processus de la TEM et à la conversion métastatique des cellules épithéliales.

Puisque l'expression des facteurs de transcription de la famille Snail et ZEB et de la vimentine est clairement associée aux processus de la TEM, nous avons examiné, dans cette première partie du travail, l'implication potentielle de ces facteurs de transcription dans la régulation de la vimentine associée à la migration et l'invasion des cellules épithéliales.

I.1.2. Résultats

I.1.2.1. L'expression de la vimentine est corrélée à l'expression de SIP1 dans des lignées tumorales mammaires migratoires/invasives.

Afin d'examiner la relation entre les facteurs de transcription et la vimentine, nous avons, dans un premier temps, analysé l'expression des facteurs de transcription Snail, Slug, δ EF1 et SIP1 en relation avec celle de la vimentine ainsi que du degré d'invasivité de ces lignées. Le degré d'invasivité des différentes lignées tumorales mammaires humaines a déjà été déterminé par des études antérieures mais a été confirmé par nos résultats en chambre de Boyden (Figure 16A). Ainsi, nous avons examiné deux lignées tumorales mammaires non-invasives (MCF-7, T47D) et trois lignées invasives (MDA-231, BT549, Hs578T). Nos analyses par RT-PCR montrent que les ARNm de la vimentine, de δ EF1, de SIP1 et de Slug sont uniquement synthétisés par les lignées invasives. L'ARNm de Snail est quant à lui

exprimé dans toutes les lignées (Figure 16B). Ainsi, ces résultats nous ont permis d'établir une corrélation entre l'expression des facteurs de transcription $\delta EF1$, SIP1 et Slug, l'expression de la vimentine et des propriétés invasives élevées.

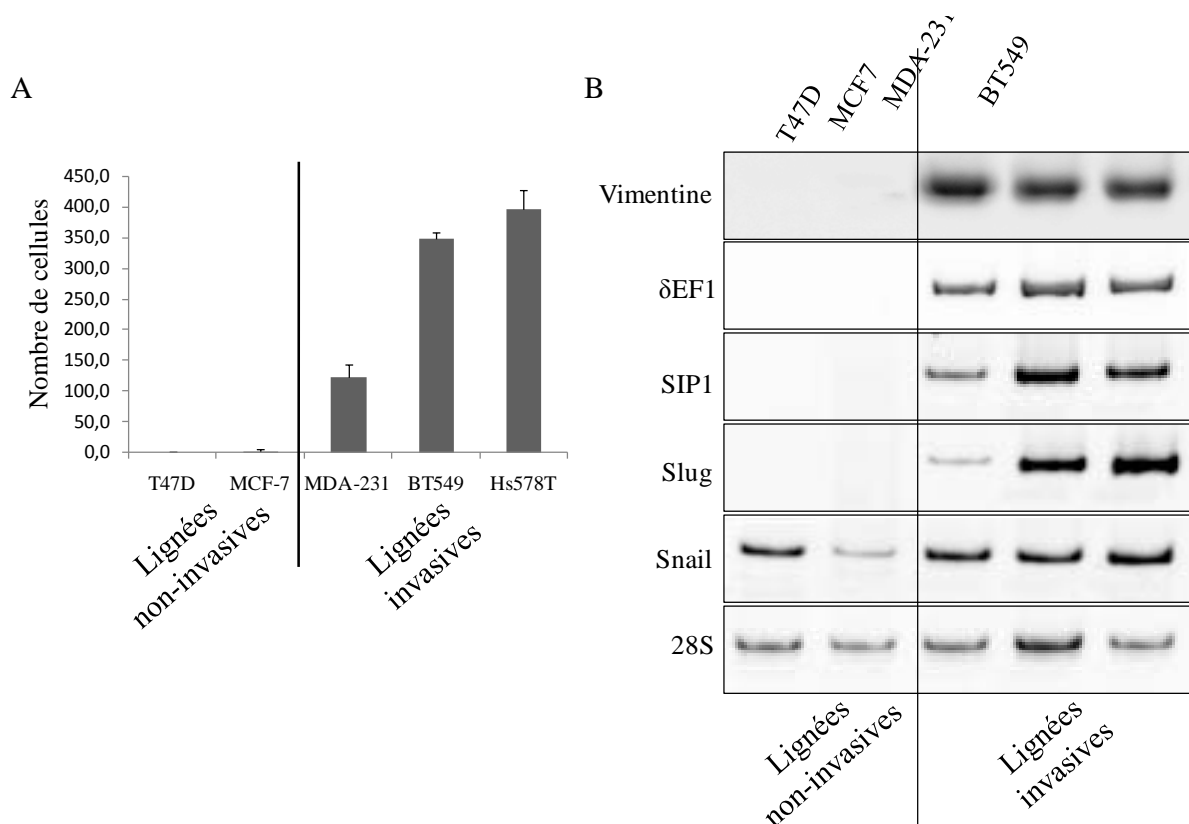


Figure 16 : La vimentine, $\delta EF1$, SIP1 et Slug sont uniquement synthétisés par les lignées invasives. (A) Analyses en chambre de Boyden réalisées sur différentes lignées tumorales mammaires humaines (T47D, MCF-7, MDA-MB-231, BT549, Hs578T). (B) Analyses par RT-PCR de l'expression des ARNm codant pour la vimentine, les facteurs de transcription $\delta EF1$, SIP1, Slug et Snail, et pour le 28S dans les lignées tumorales mammaires.

Nous avons également étudié l'expression de $\delta EF1$, SIP1, Slug et Snail en relation avec celle de la vimentine dans un modèle de migration en deux dimensions précédemment mis au point dans le laboratoire qui permet d'étudier la dynamique de la migration cellulaire (Gilles *et al.* 1999). Brièvement, dans ce modèle de migration, des cellules mammaires humaines MCF10A sontensemencées dans un anneau en verre. Une fois les cellules attachées à leur support, le cylindre est enlevé et les cellules sont ainsi amenées à migrer hors de la zone initialement délimitée par le cylindre. On distingue dans ce modèle des cellules stationnaires (dans la zone initialement délimitée par le cylindre en verre) et des cellules en migration présentes à la périphérie. En utilisant des techniques de vidéomicroscopie, nous avons montré précédemment que la sous-population à la périphérie est impliquée dans une migration orientée et subit des processus de TEM caractérisés par l'expression *de novo* de la vimentine

et une relocalisation cytoplasmique de la cadhérine E et de la caténine- β (Gilles *et al.* 1999; Gilles *et al.* 2003). Au contraire, les cellules plus distantes de la périphérie sont stationnaires, n'expriment pas la vimentine et présentent un motif typique en nid d'abeilles de la cadhérine E et la caténine- β . Dans l'étude présente, nous avons utilisé deux clones (#11 et #12) de MCF10A transfectés de manière stable avec un plasmide contenant le promoteur de la vimentine contrôlant l'expression du gène GFP (cellules VP-EGFP MCF10A décrites précédemment (Gilles *et al.* 1999)). Afin de comparer l'expression des facteurs Snail et ZEB dans les sous-populations de cellules migratoires et stationnaires, les cellules #11 et #12,ensemencées dans le modèle de migration, ont été triées par FACS sur base de l'expression de la GFP (Figure 17A). Des analyses par RT-PCR, réalisées sur les populations cellulaires ainsi séparées, montrent clairement une co-expression des facteurs ZEB (SIP1 et δ EF1) et de la vimentine dans la sous-population de cellules migratoires (Figure 17B). Aucune différence significative n'a été observée concernant l'expression des facteurs Snail dans les deux sous-populations.

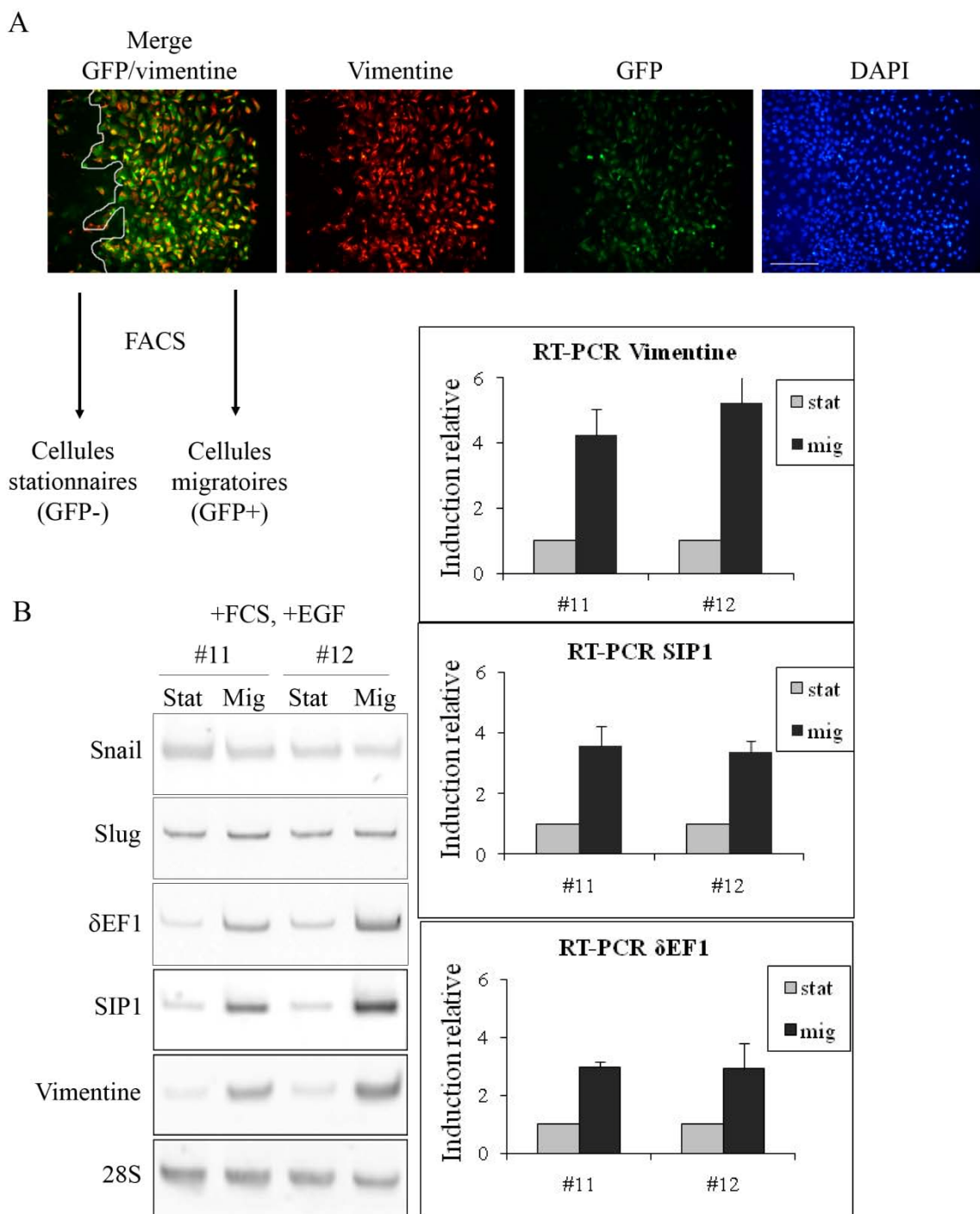


Figure 17 : Co-expression de SIP1 et de la vimentine dans la sous-population de cellules migratoires. (A) Analyses par immunofluorescence de l'expression de la vimentine (en rouge) et visualisation de la GFP (vert) dans des cellules MCF10A VP-EGFP, ensemencées dans le modèle de migration. La présence du DAPI est visible en bleu. La ligne blanche représente la limite entre les populations cellulaires vimentine-positives et vimentine-négatives. Barre = 80 μ m. (B) Analyses par RT-PCR de δ EF1, SIP1, Slug, Snail et la vimentine dans les sous-populations migratoires (mig) et stationnaires (stat) de deux clones (#11 et #12) de MCF10A VP-EGFP ensemencées dans le modèle de migration et triées par FACS selon l'expression de la GFP. L'analyse de l'ARNr 28S est montrée comme contrôle. Les valeurs d'expression de la vimentine et des facteurs ZEB (SIP1 et δ EF1) ont été normalisées en fonction des valeurs du 28S. Les valeurs sont exprimées en « Induction relative » dans la sous-population migratoire par rapport à la sous-population stationnaire ($p < 0,05$).

I.1.2.2. SIP1 régule l'expression de la vimentine.

Au vu de la corrélation entre l'expression de la vimentine et de SIP1 dans les différentes lignées cellulaires mammaires et dans le modèle de migration, nous avons étudié la régulation potentielle de la vimentine par SIP1.

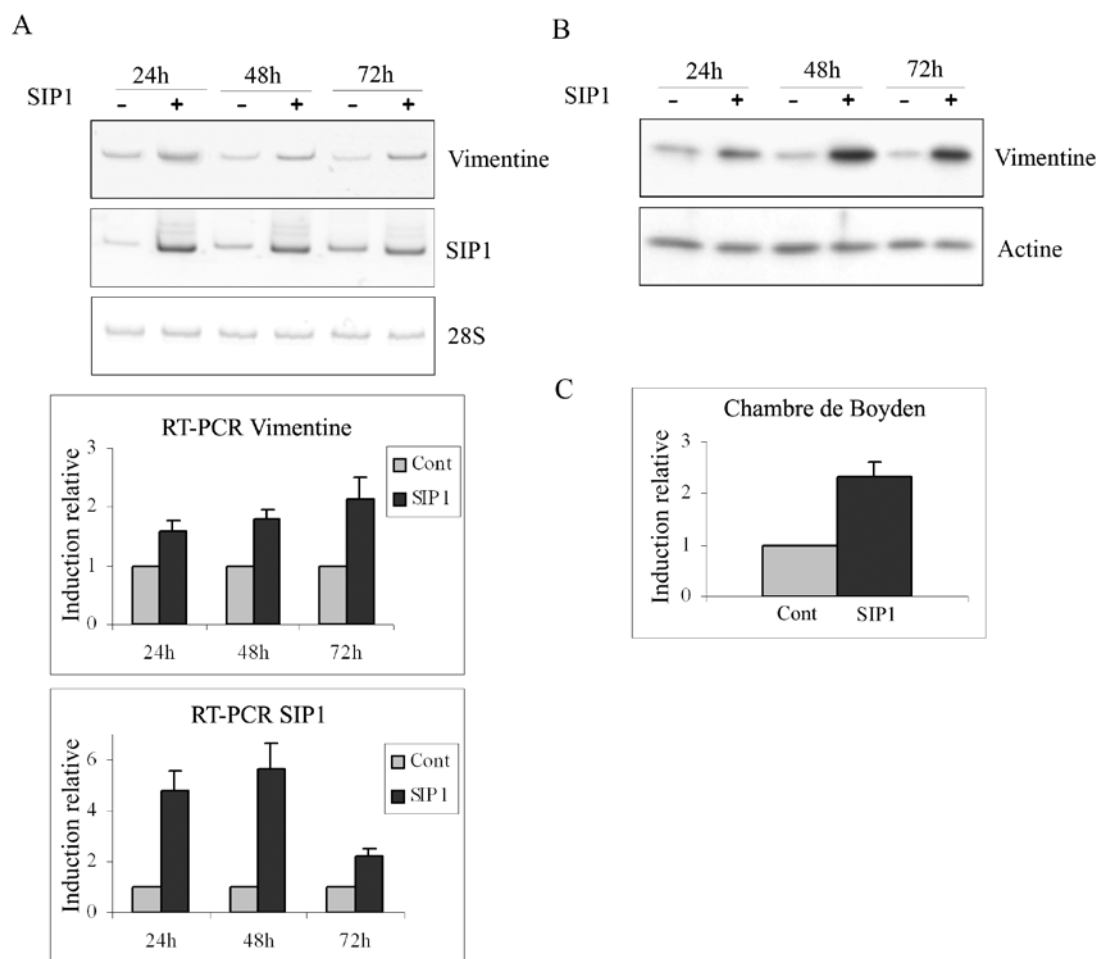


Figure 18 : La transfection de SIP1 régule l'expression de la vimentine.

(A) Analyse par RT-PCR de l'expression de la vimentine et de SIP1 dans des cellules MCF10A transfectées transitoirement avec un vecteur d'expression comportant l'ADNc de SIP1 pendant 24, 48 ou 72h. La quantification des analyses par RT-PCR sur 3 expériences indépendantes est montrée. Les valeurs obtenues pour la vimentine et SIP1 ont été normalisées en fonction des valeurs du 28S. Les valeurs sont exprimées en « Induction relative » dans des cellules transfectées avec l'ADNc SIP1 par rapport aux cellules transfectées avec le vecteur contrôle ($p < 0,05$). (B) Analyse par « Western blotting » de l'expression de la vimentine dans des cellules MCF10A transitoirement transfectées avec l'ADNc de SIP1 pendant 24h, 48h ou 72h. L'actine est montrée comme contrôle. (C) Analyse des capacités migratoires des cellules MCF10A transfectées avec SIP1 (SIP1) pendant 48h comparées aux cellules transfectées avec le vecteur contrôle (Cont) dans un modèle de migration en chambre de Boyden. Les valeurs sont exprimées en « Induction relative » dans des cellules transfectées avec l'ADNc SIP1 par rapport au vecteur contrôle ($p < 0,05$).

La transfection transitoire de l'ADNc de SIP1 pendant 24h, 48h et 72h induit clairement l'expression de la vimentine au niveau de l'ARNm (Figure 18A) et des protéines (Figure 18B). Cette induction de la vimentine est également corrélée à une augmentation des

capacités migratoires des cellules, comme démontré par des analyses de migration en chambre de Boyden (Figure 18C).

Inversement, nous avons analysé l'effet d'une inhibition de l'expression de SIP1 sur la vimentine en utilisant des stratégies d'ARN interférence sur des cellules MCF10A et des cellules tumorales mammaires (BT549) exprimant la vimentine.

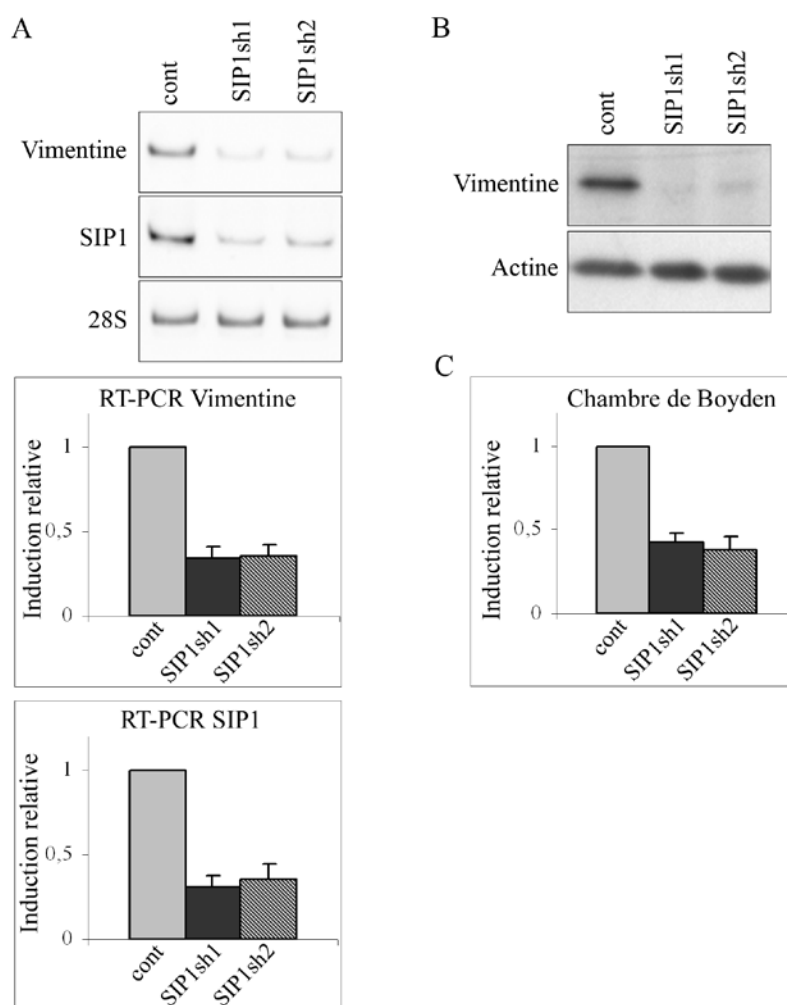


Figure 19 : La transfection de shRNAs dirigés contre SIP1 diminue l'expression de la vimentine et les capacités migratoires dans les cellules MCF10A. Les cellules MCF10A ont été transfectées avec deux constructions lentivirales exprimant des séquences de shRNA dirigées contre SIP1 (SIP1sh1, SIP1sh2), ou avec un vecteur contrôle (Cont). (A) Analyses par RT-PCR de l'expression de la vimentine et de SIP1 dans des cellules transfectées avec les shRNAs SIP1 et le shRNA contrôle. La quantification des analyses par RT-PCR sur 3 expériences indépendantes est montrée. Les valeurs obtenues pour la vimentine et SIP1 ont été normalisées en fonction des valeurs du 28S. Les valeurs sont exprimées en « Induction relative » dans des cellules transfectées avec les shRNAs SIP1 par rapport aux cellules transfectées avec les shRNAs contrôles ($p < 0,01$). (B) Analyses par « Western blotting » de l'expression de la vimentine dans les cellules MCF10A transfectées avec les shRNAs SIP1 ou le shRNA contrôle. L'actine est montrée comme contrôle. (C) Analyses des capacités migratoires des cellules MCF10A exprimant les shRNA SIP1 par rapport aux cellules contrôles dans le modèle de migration en chambre de Boyden. Les valeurs sont exprimées en « Induction relative » dans des cellules transfectées avec les shRNAs SIP1 par rapport aux cellules transfectées avec les shRNAs contrôles ($p < 0,05$).

N'ayant pas obtenu de diminution significative de SIP1 en transfection transitoire de siRNA SIP1 dans les MCF10A, ces cellules ont été transfectées avec deux constructions lentivirales exprimant des séquences shRNA qui diminuent efficacement l'expression de l'ARNm de SIP1. Cette diminution de SIP1 entraîne également la diminution de l'expression de la vimentine au niveau de l'ARNm (diminution de 60% comparé aux cellules contrôles) ainsi qu'au niveau protéique (Figure 19A, B). Cette diminution de SIP1 est associée à une diminution des propriétés migratoires dans le modèle de migration en chambre de Boyden (Figure 19C).

En accord avec les résultats obtenus avec les MCF10A, la transfection transitoire de deux siRNAs contre SIP1 dans des cellules tumorales exprimant la vimentine (BT549), diminue significativement l'expression de la vimentine au niveau de l'ARNm (diminution de 34% et 28% pour le siRNA1 et 2 respectivement) ainsi qu'au niveau protéique (Figure 20).

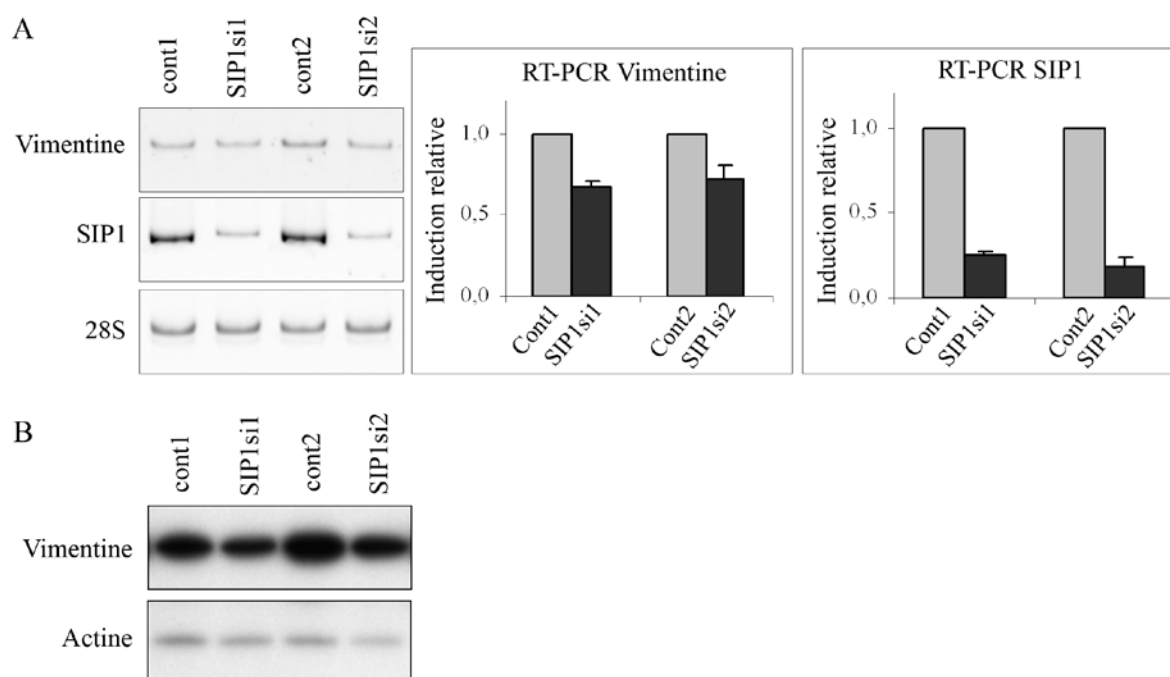


Figure 20 : La transfection de siRNAs dirigés contre SIP1 diminue l'expression de la vimentine dans les cellules BT549. Les cellules BT549 ont été transfectées avec deux séquences de siRNA dirigées contre SIP1 (SIPsi1, SIPsi2) et avec deux siRNAs contrôles (cont1 et cont2). (A) Analyses par RT-PCR de l'expression de la vimentine et de SIP1 dans des cellules transfectées avec les siRNAs SIP1 et les siRNAs contrôles. La quantification des analyses par RT-PCR sur 3 expériences indépendantes est montrée. Les valeurs obtenues pour la vimentine ont été normalisées en fonction des valeurs du 28S. Les valeurs sont exprimées en « Induction relative » dans des cellules transfectées avec les siRNAs SIP1 par rapport aux cellules transfectées avec les siRNAs contrôles ($p < 0,01$). (B) Analyses par « Western blotting » de l'expression de la vimentine dans les cellules BT549 transfectées avec les siRNAs SIP1 ou les siRNAs contrôles. L'actine est montrée comme contrôle.

Etant donné que la vimentine est une cible de la voie caténine- β /TCF (Gilles *et al.* 2003), et que SIP1 a été décrit comme un répresseur potentiel de la cadhérine E (Comijn *et al.* 2001; van Grunsven *et al.* 2003), nous avons examiné la possibilité que la régulation de la vimentine par SIP1 implique la voie de signalisation caténine- β /TCF. En effet, la caténine β , une fois délocalisée des complexes membranaires d'adhérence où elle est séquestrée par la cadhérine E, peut gagner le noyau cellulaire et y réguler la transcription génique de certains gènes en s'associant à des facteurs de transcription de la famille TCF/LEF. Une répression de la cadhérine E pourrait donc générer une augmentation du taux de la caténine- β nucléaire et de son activité transcriptionnelle.

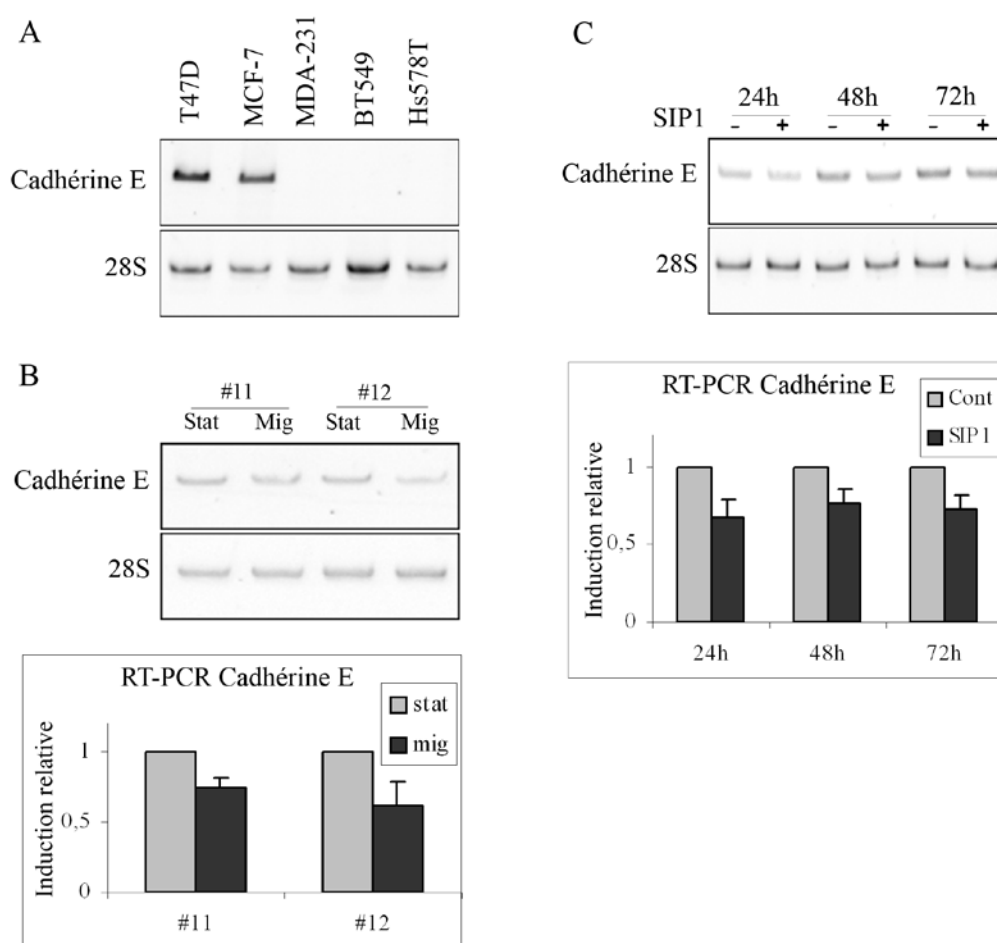


Figure 21 : L'expression de SIP1 est inversement corrélée à l'expression de la cadhérine E. Analyses par RT-PCR de l'expression de l'ARNm codant pour la cadhérine E dans les lignées tumorales mammaires (MCF-7, T47D, MDA-MB-231, BT549, Hs578T) (A), dans les sous-populations migratoires (mig) et stationnaires (stat) de deux clones (#11 et #12) de MCF10A VP-EGFP, ensemencées dans le modèle de migration (B), et dans des cellules MCF10A transitoirement transfectées avec un vecteur d'expression pour l'ADNc de SIP1 pendant 24h, 48h ou 72h (C). La quantification des analyses par RT-PCR sur 3 expériences indépendantes est montrée pour (B) et (C). Les valeurs obtenues pour la cadhérine E ont été normalisées en fonction des valeurs du 28S. Les valeurs sont exprimées en « Induction relative » dans la sous-population migratoire par rapport à la sous-population stationnaire pour (B) ($p < 0,05$) et dans des cellules transfectées avec l'ADNc SIP1 par rapport aux cellules transfectées avec le vecteur contrôle pour (C) ($p < 0,05$).

Nous avons donc tout d'abord confirmé que l'expression de SIP1 et celle de la cadhérine E sont inversement corrélées dans les lignées cellulaires tumorales mammaires (Figure 21A) et dans le modèle de migration MCF10A (Figure 21B). De plus, la transfection de l'ADNc SIP1 dans les cellules MCF10A diminue le niveau d'expression de l'ARNm de la cadhérine E dans ces cellules (Figure 21C).

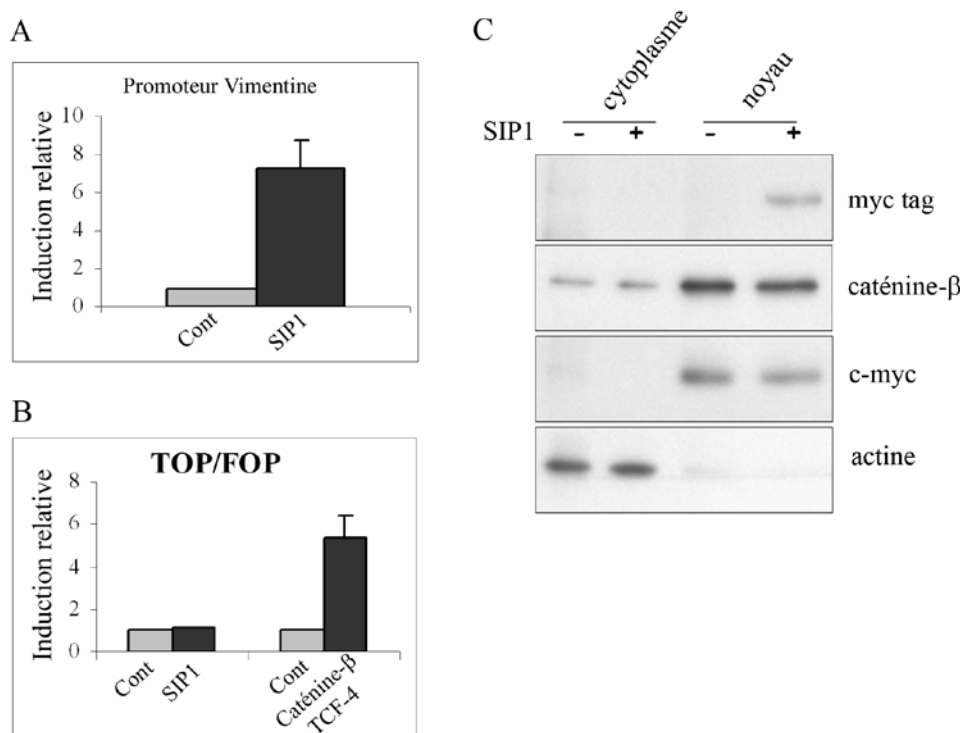


Figure 22 : La voie caténine- β /TCF n'est pas impliquée dans la régulation de la vimentine par SIP1. (A) Etude de l'activité du promoteur de la vimentine. Un plasmide contenant le promoteur humain de la vimentine contrôlant le gène rapporteur de la luciférase est co-transfecté de manière transitoire avec le vecteur d'expression de l'ADNc de SIP1 (SIP1) ou avec le vecteur contrôle correspondant (Cont). Les données sont exprimées en « Induction relative » de la condition transfectée avec l'ADNc de SIP1 par rapport à la condition contrôle ($p < 0,01$). (B) Etude de la transactivation du plasmide TOP-FLASH. Les plasmides TOP-FLASH ou FOP-FLASH ont été co-transfectés avec le vecteur d'expression de l'ADNc de SIP1 (SIP1) ou le vecteur correspondant vide (Cont). Les valeurs d'activité luciférase obtenues avec le plasmide FOP-FLASH ont été soustraites des valeurs obtenues avec le plasmide TOP-FLASH. Les données sont exprimées en « Induction relative » de la condition transfectée avec l'ADNc de SIP1 par rapport à la condition contrôle ($P < 0,05$). La co-transfection de l'ADNc SIP1 avec les vecteurs d'expression caténine- β et TCF-4 est utilisée comme contrôle ($p < 0,02$). (C) Analyse par « Western blotting » de l'expression de la caténine- β dans des fractions cytosoliques et nucléaires de cellules MCF10A transfectées soit avec le vecteur d'expression SIP1 (SIP1) soit avec le plasmide correspondant vide (Cont). La présence de SIP1 (fusionnée au « tag » myc) est également observée dans la fraction nucléaire des cellules transfectées par le vecteur d'expression de SIP1. L'expression de l'actine et de c-myc endogène a été analysée comme contrôle.

Afin d'analyser l'implication de la voie de signalisation caténine- β /TCF dans la régulation de la vimentine induite par SIP1, nous avons examiné la capacité de SIP1 à transactiver un plasmide rapporteur luciférase (TOP-FLASH) contenant des sites de fixation des complexes caténine- β /TCF comme éléments de régulation. Le vecteur FOP-FLASH, contenant les mêmes éléments de régulations mais rendus inactifs en raison de mutations ponctuelles, a été utilisé comme contrôle. Bien que la transfection de l'ADNc de SIP1 active clairement un vecteur rapporteur luciférase contenant le promoteur de la vimentine (Figure 22A), elle n'active pas le système rapporteur TOP-FLASH (Figure 22B). Cela suggère que SIP1 n'active pas la voie caténine- β /TCF. En accord avec ces résultats, nous n'avons observé aucune accumulation de la caténine- β dans la fraction nucléaire des cellules transfectées avec l'ADNc de SIP1 bien qu'on détecte la présence du « tag » myc attestant de l'accumulation de SIP1 dans la fraction nucléaire des cellules transfectées (Figure 22C).

Comme il a été suggéré que la forme de la caténine- β NH₂-non-phosphorylée soit majoritairement impliquée dans l'activité transcriptionnelle de la caténine- β (Staal *et al.* 2002), nous avons également examiné cette forme particulière de la caténine- β dans les différentes fractions cellulaires. Nous n'observons aucune accumulation de cette forme de la caténine- β dans la fraction nucléaire des cellules transfectées avec l'ADNc de SIP1 (Figure 23).

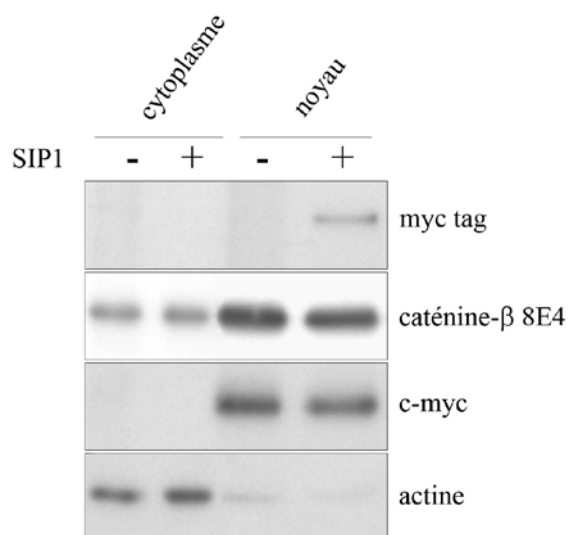


Figure 23 : Analyse de la caténine- β non-phosphorylée.

Analyse par « Western blotting » de l'expression de la forme non-phosphorylée de la caténine- β (clone 8E4) dans des fractions cytosoliques et nucléaires de cellules MCF10A transfectées soit avec le vecteur d'expression SIP1 (SIP1) soit avec le plasmide correspondant vide (Cont). La présence de SIP1 (fusionnée au « tag » myc) est également observée dans la fraction nucléaire des cellules transfectées par le vecteur d'expression de SIP1. L'expression de l'actine et de c-myc endogène a été analysée comme contrôle.

1.1.3. Conclusions

Les résultats obtenus dans ce chapitre démontrent donc une implication de SIP1 dans la régulation de la vimentine observée lors de la TEM associée à la migration et l'invasion des cellules tumorales mammaires.

Au cours de notre travail, nous avons ainsi montré que :

- l'expression de δ EF1, SIP1 et de Slug coïncide avec l'expression de la vimentine dans des lignées tumorales mammaires invasives.
- l'expression de SIP1 et de la vimentine est spécifiquement induite dans des cellules épithéliales en migration.
- la transfection de l'ADNc de SIP1 augmente l'expression de la vimentine dans les cellules MCF10A.
- la transfection de l'ADNc de SIP1 accroît les capacités migratoires des cellules MCF10A.
- la transfection de siRNAs dirigés contre SIP1 diminue l'expression de la vimentine dans des lignées tumorales mammaires invasives.
- l'activation du promoteur de la vimentine par SIP1 n'est pas associée à l'activation de la voie caténine- β /TCF/LEF.

Ces résultats démontrent donc une implication de SIP1 dans la régulation de la vimentine observée lors de la TEM associée à la migration et l'invasion des cellules tumorales mammaires et ont fait l'objet d'une publication (Bindels *et al.* 2006).

I.2. Régulation de PAI-1 par SIP1 dans des cellules tumorales mammaires

I.2.1. Introduction

La régulation positive de la vimentine par SIP1 nous a amenés à examiner l'expression d'autres gènes associés à la TEM qui pourraient également être régulés positivement par SIP1 et favoriser la progression tumorale. Nous avons ainsi obtenu des résultats préliminaires concernant l'implication potentielle des facteurs de transcription SIP1 sur la régulation de PAI-1 (Plasminogen Activator Inhibitor type 1), un membre du système protéolytique plasminogène/plasmine.

La régulation de PAI-1 lors de processus de TEM revêt un intérêt particulier. Le système plasminogène/plasmine intervient en effet dans de nombreux processus physiologiques, comme la protéolyse, l'adhérence ou la migration cellulaire (Figure 24). La plasmine est une protéase à sérine impliquée initialement dans la fibrinolyse. Elle est capable de dégrader de nombreux composants de la MEC et peut également catalyser l'activation de nombreuses métalloprotéinases (Noel *et al.* 1997; Andreasen *et al.* 2000). La conversion du plasminogène en plasmine est catalysée par des protéases à sérine, les activateurs du plasminogène (PA): le type tissulaire (tPA) et le type urokinase (uPA) (Andreasen *et al.* 1997). Cette conversion active la protéolyse péricellulaire et la migration cellulaire. L'activité de ces PA peut être inhibée par les PAI-1 et PAI-2 (Plasminogen Activator Inhibitor 1 and 2).

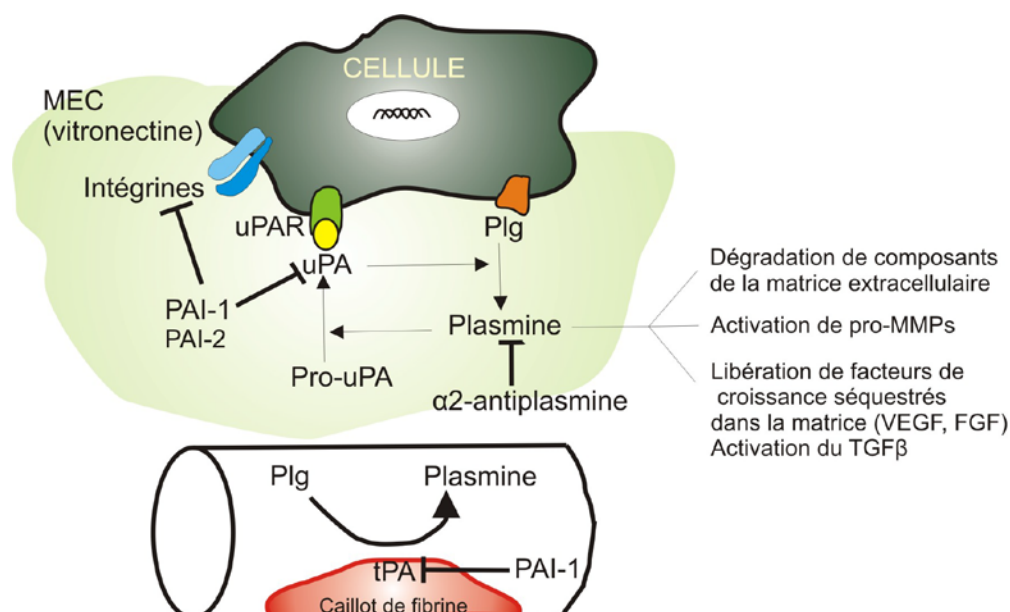


Figure 24 : Représentation schématique du système plasminogène (Plg)/plasmine. (image réalisée par C. Maillard).

Malgré son rôle d'inhibiteur de l'activation du plasminogène en plasmine, PAI-1 possède également un rôle pro-tumoral. En effet, de nombreuses études démontrent qu'un taux élevé de PAI-1 est un marqueur de mauvais pronostic dans de nombreux types de cancers (Sidenius and Blasi, 2003)(Duffy & Duggan 2004; Harbeck *et al.* 2004; Hildenbrand *et al.* 2009). D'autres études ont par ailleurs montré que PAI-1 est important voire essentiel à l'angiogenèse et l'invasion tumorale (Bajou *et al.* 1998; Bajou *et al.* 2001; Devy *et al.* 2002; Maillard *et al.* 2005; Maillard *et al.* 2008; Bajou *et al.* 2008). De même, un rôle de PAI-1 dans la migration cellulaire a été montré. Même si les gènes du système plasminogène ne sont pas à proprement parlé des gènes « mésoenchymateux », ce système protéolytique est particulièrement activé dans les cellules mésoenchymateuses dans les phénomènes physiologiques. De même, dans l'invasion tumorale, le système plasmine, ainsi que d'autres systèmes protéolytiques comme celui des MMPs, sont particulièrement importants dans les cellules stromales de l'hôte (fibroblastes, cellules inflammatoires, cellules endothéliales) (Maillard *et al.* 2005; Bajou *et al.* 2008). Ainsi, PAI-1 est actuellement reconnu comme un gène cible de la TEM (Moreno-Bueno *et al.* 2006; Fabre-Guillevin *et al.* 2008).

1.2.2. Résultats

1.2.2.1. L'expression des membres du système plasminogène est corrélée à l'expression de SIP1 dans des lignées tumorales mammaires migratoires/invasives.

Comme pour la vimentine, nous avons analysé l'expression des membres du système plasminogène/plasmine dans les différentes lignées tumorales mammaires utilisées précédemment. Nos résultats obtenus par RT-PCR montrent que les ARNm de PAI-1, uPA et uPAR, sont majoritairement synthétisés par les lignées invasives (Figure 25).

Ainsi, ces résultats nous ont permis d'établir une corrélation entre l'expression du facteur de transcription SIP1, les membres du système plasminogène, et l'expression d'un phénotype invasif par les cellules tumorales mammaires.

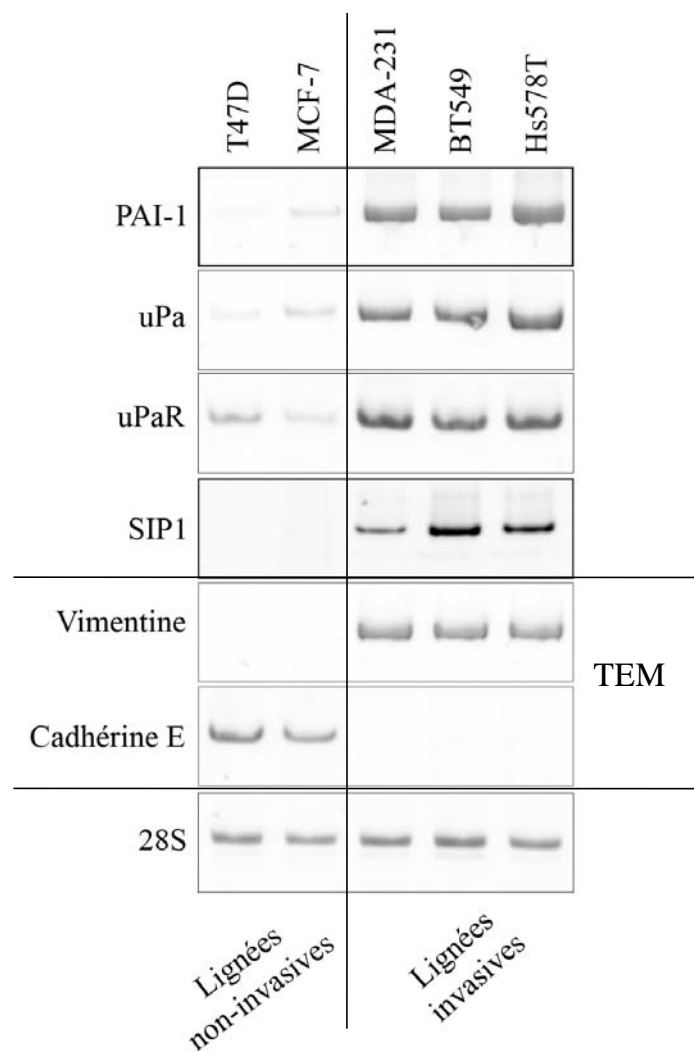


Figure 25 : Les membres du système plasminogène PAI-1, uPA et uPAR sont majoritairement synthétisés par les lignées invasives. Analyses par RT-PCR de l'expression des ARNm codant pour PAI-1, uPA, uPAR, SIP1, la vimentine, la cadherine E et 28S dans différentes lignées tumorales mammaires (T47D, MCF-7, MDA-MB-231, BT549, Hs578T).

I.2.2.2. SIP1 régule l'expression de PAI-1.

Au vu de la corrélation entre l'expression des membres du système plasminogène et de SIP1 dans les différentes lignées cellulaires mammaires, nous avons étudié leur régulation potentielle par SIP1 dans des lignées tumorales mammaires non-invasives, telles que les MCF7 et les BT20.

Nous avons ainsi observé que la transfection transitoire de l'ADNc de SIP1 dans les cellules BT20 et les MCF7 pendant 24h, 48h et 72h induit clairement l'expression de PAI-1 au niveau de l'ARNm (Figure 26A, B), tandis que SIP1 ne semble pas avoir d'effets sur l'expression d'uPA et uPAR dans ce modèle (données non illustrées).

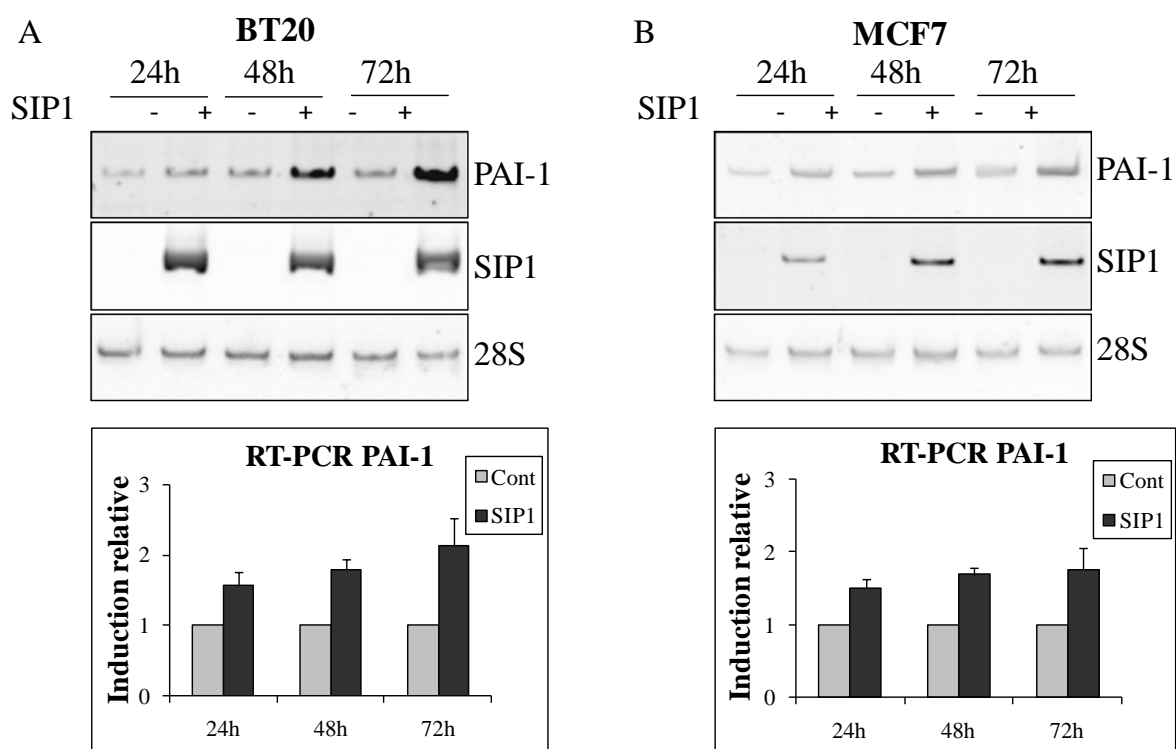


Figure 26 : La transfection de SIP1 régule l'expression de PAI-1.

(A) Analyse par RT-PCR de l'expression de PAI-1 et de SIP1 dans des cellules BT20 et MCF7 transitoirement transfectées avec un plasmide contenant l'ADNc de SIP1 pendant 24h, 48h ou 72h. La quantification des analyses par RT-PCR sur 3 expériences indépendantes est montrée. Les valeurs obtenues pour PAI-1 et SIP1 ont été normalisées en fonction des valeurs du 28S. Les valeurs sont exprimées en « Induction relative » dans des cellules transfectées avec l'ADNc SIP1 par rapport aux cellules transfectées avec le vecteur contrôle ($p < 0,05$).

Inversement, nous avons analysé l'effet d'une inhibition de l'expression de SIP1 sur PAI-1 en utilisant des stratégies d'ARN interférence sur des cellules tumorales mammaires (BT549) exprimant PAI-1. Les résultats ont ainsi montré que cette diminution de SIP1 entraîne également la diminution de l'expression de PAI-1 au niveau de l'ARNm (Figure 27A) et protéique (Figure 27B).

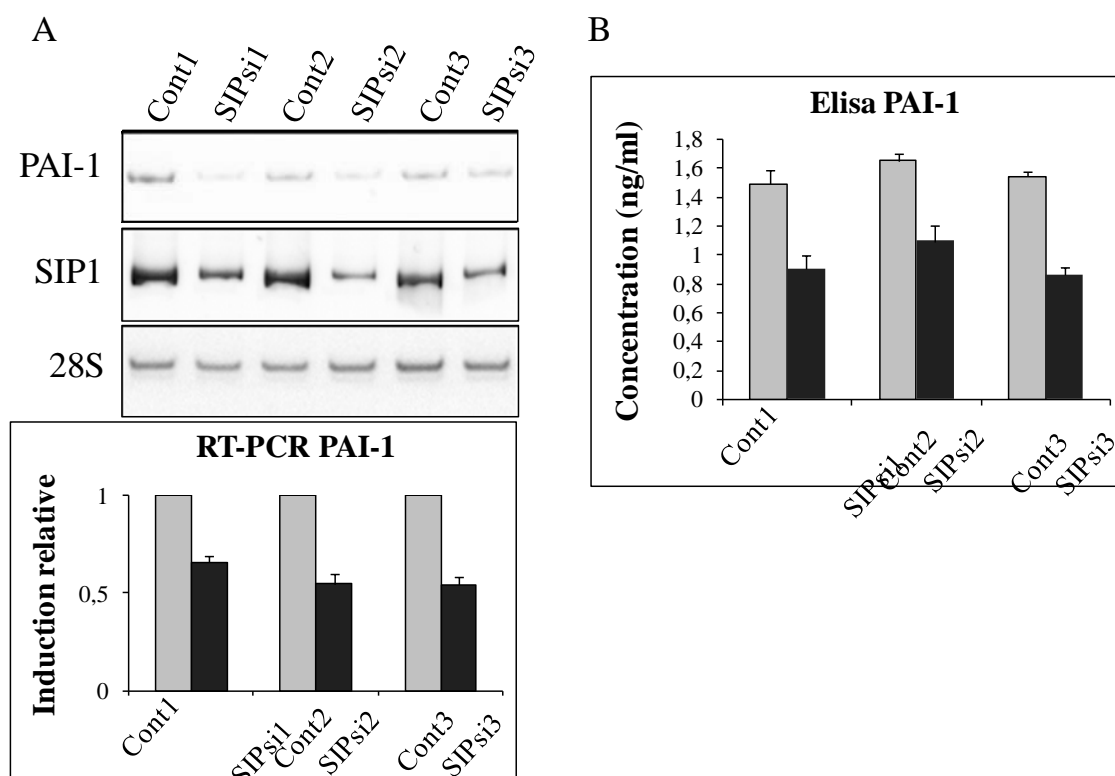


Figure 27 : La transfection de siRNAs dirigées contre SIP1 diminue l'expression de PAI-1.
 Les cellules BT549 ont été transfectées avec trois séquences de siRNA dirigées contre SIP1 (SIPsi1, SIPsi2, SIPsi3) et avec trois siRNAs contrôles (cont1, cont2 et cont3). (A) Analyses par RT-PCR de l'expression de PAI-1 et de SIP1 dans des cellules transfectées avec les siRNAs SIP1 et les siRNAs contrôles. La quantification des analyses par RT-PCR sur 3 expériences indépendantes est montrée. Les valeurs obtenues pour PAI-1 ont été normalisées en fonction des valeurs du 28S. Les valeurs sont exprimées en « Induction relative » dans des cellules transfectées avec les siRNAs SIP1 par rapport aux cellules transfectées avec les siRNAs contrôles ($p < 0,05$). (B) Analyses par « ELISA » de l'expression de PAI-1 dans les cellules BT549 transfectées avec les siRNAs SIP1 ou les siRNAs contrôles.

1.2.3. Conclusions

Au point 2, nous avons observé que:

- l'expression de SIP1 est corrélée à l'expression de PAI-1, uPA et uPAR dans les lignées tumorales mammaires invasives.
- la transfection de l'ADNc de SIP1 augmente l'expression de PAI-1 au niveau de l'ARNm dans les cellules BT20 et MCF7.
- la transfection de siRNAs dirigés contre SIP1, diminue l'expression de PAI-1 au niveau de l'ARNm et de la protéine dans les cellules BT549.

I.3. Discussion

Dans leur ensemble, les données de la première partie démontrent que SIP1 peut réguler positivement l'expression de gènes, tels que la vimentine ou certains membres du système plasminogène/plasmine impliqués dans les processus de TEM associés à la migration et l'invasion de cellules épithéliales tumorales.

Association entre l'expression de SIP1 et des propriétés invasives élevées.

En comparant plusieurs lignées tumorales mammaires humaines présentant des degrés d'invasivité différents, nous avons observé une corrélation nette entre l'expression de la vimentine, l'absence de la cadhérine E et l'expression des facteurs de transcription Snail, SIP1 et Slug dans les lignées invasives. L'utilisation d'un test de migration dynamique en 2 dimensions avec les cellules mammaires MCF10A a également permis de démontrer que SIP1 est induite spécifiquement dans les cellules migratoires qui présentent une expression *de novo* de la vimentine et une diminution d'expression de la cadhérine E (Gilles *et al.* 1999). Les facteurs Snail, Slug et δ EF1 sont exprimés aussi bien dans la sous-population migratoire que dans la sous-population stationnaire.

Parmi les 4 facteurs de transcription de la TEM examinés dans nos modèles, l'expression de SIP1 apparaît la plus nettement associée aux propriétés migratoires et invasives de cellules mammaires, à une faible expression de la cadhérine E et à une expression accrue de la vimentine. En accord avec ces résultats, des études plus récentes ont montré une expression accrue de SIP1 en l'absence d'expression de la cadhérine E dans les lignées tumorales mammaires invasives, y compris celles utilisées dans notre travail (Lacroix & Leclercq 2004; Lombaerts *et al.* 2006; Gregory *et al.* 2008; Beltran *et al.* 2008; Park *et al.* 2008b), ainsi que dans d'autres types de lignées cellulaires invasives (Comijn *et al.* 2001; Miyoshi *et al.* 2004; Taki *et al.* 2006; Sayan *et al.* 2009). Dans certains de ces modèles de lignées tumorales, une corrélation entre l'expression de SIP1 et celle de la vimentine a également été rapportée comme dans des lignées tumorales mammaires (Lombaerts *et al.* 2006) et dans des cellules de carcinome épidermoïde de phénotype mésenchymateux (Taki *et al.* 2006). Une autre étude comparant l'expression de SIP1 dans 90 lignées cellulaires humaines établies à partir de 9 types de cancers, y compris des cancers mammaires, a clairement montré une association inverse entre l'expression de SIP1 et le rapport d'expression cadhérine E/vimentine dans ces lignées (Park *et al.* 2008b). Allant dans le même sens, une corrélation inverse entre l'expression de SIP1 et de la cadhérine E a été observée *in vivo* dans le cancer ovarien

(Yoshihara *et al.* 2009), gastrique (Rosivatz *et al.* 2002), pancréatique (Imamichi *et al.* 2007), rénal (Nakada *et al.* 2008) et épidermoïde (Maeda *et al.* 2005). Dans le cas du cancer rénal à cellules claires, l'expression de SIP1 est, de plus, directement corrélée à l'expression de la vimentine (Nakada *et al.* 2008).

Même si l'expression des facteurs de transcription δ EF1 et Slug n'est pas associée aux propriétés de TEM dans notre modèle de migration, elle l'est dans les lignées tumorales mammaires. Ces résultats sont en accord avec de nombreuses études rapportant également une corrélation inverse entre l'expression de ces facteurs de transcription et l'expression de la cadhérine E dans des lignées épithéliales tumorales de diverses origines y compris des lignées tumorales mammaires (δ EF1 (Ohira *et al.* 2003; Eger *et al.* 2005; Taki *et al.* 2006; Gregory *et al.* 2008; Park *et al.* 2008b; Sayan *et al.* 2009; Li *et al.* 2009) et Slug (Hajra *et al.* 2002; Lombaerts *et al.* 2006)). Dans certains de ces systèmes cellulaires, une association a également été établie entre l'expression de ces facteurs de transcription et celle de la vimentine (Taki *et al.* 2006) (Lombaerts *et al.* 2006; Park *et al.* 2008b; Li *et al.* 2009). De telles corrélations ont également été observées *in vivo* sur des biopsies de cancers de diverses origines. Ainsi, l'expression de Slug a été inversement corrélée à l'expression de la cadhérine E dans le cancer mammaire (Prasad *et al.* 2009), ovarien (Elloul *et al.* 2005), gastrique (Castro *et al.* 2007), et hépatocellulaire (Giannelli *et al.* 2005), ainsi que dans le carcinome à cellules squameuses œsophagiennes (Uchikado *et al.* 2005). L'expression accrue de δ EF1, quant à elle, corrèle avec la perte d'expression de la cadhérine E dans le cancer de l'endomètre (Singh *et al.* 2008) et du poumon (Dohadwala *et al.* 2006).

Contrairement aux ARNm de δ EF1, SIP1 et Slug, nous avons étudié l'ARNm de Snail dans toutes les lignées tumorales mammaires que nous avons étudiées, indépendamment de leur degré d'invasivité, de l'expression de la cadhérine E ou de la vimentine. Ces résultats sont contradictoires avec bon nombre de données de la littérature montrant une corrélation inverse entre l'expression de Snail et l'expression de la cadhérine E dans des lignées épithéliales tumorales de diverses origines, y compris des lignées tumorales mammaires (Batlle *et al.* 2000; Cano *et al.* 2000; Yokoyama *et al.* 2001; Poser *et al.* 2001; Jiao *et al.* 2002; Miyoshi *et al.* 2004; Taki *et al.* 2006; Come *et al.* 2006; Beltran *et al.* 2008). De plus, une expression accrue de Snail, accompagnée de la perte d'expression de la cadhérine E, a également été montrée dans un nombre considérable de types de cancers humains, notamment des cancers mammaires (Cheng *et al.* 2001; Blanco *et al.* 2002; Zhou *et al.* 2004; Elloul *et al.* 2005), ovariens (Yoshida *et al.* 2009), gastriques (Rosivatz *et al.* 2002), du colon (Pena *et al.* 2005; Pena *et al.* 2006), de l'utérus (Blehschmidt *et al.* 2007), et hépatocellulaires

(Sugimachi *et al.* 2003). Néanmoins, en accord avec nos résultats, deux études comparant entre autres l'expression de Snail dans un grand nombre de lignées tumorales mammaires (y compris celles utilisées dans notre travail), ont clairement montré une expression relativement ubiquitaire de Snail indépendamment de l'expression de la cadhérine E et de la vimentine (Hajra *et al.* 2002; Lombaerts *et al.* 2006). L'expression endogène de Snail, dans un contexte cellulaire donné, pourrait donc ne pas suffire à inhiber la cadhérine E et induire des propriétés invasives. Il faut également mentionner que les études citées ci-dessus, y compris la nôtre, ont examiné la présence de Snail au niveau de l'ARNm. Or, des études récentes impliquent de nombreuses régulations post-transcriptionnelles de Snail. Une discordance entre la présence de l'ARNm et de la protéine ne peut donc être exclue.

Dans le deuxième chapitre, nous avons également examiné l'expression des membres du système plasminogène dans les mêmes lignées tumorales mammaires, ce qui nous a permis d'établir une corrélation entre l'expression du facteur de transcription SIP1, des membres du système plasminogène PAI-1, uPA et uPAR, et l'expression d'un phénotype invasif caractéristique d'une TEM par les cellules tumorales mammaires. En accord avec nos résultats, une autre étude a également démontrée que l'expression de PAI-1 et de uPA est corrélée à la TEM dans des lignées tumorales mammaires, y compris celles utilisées dans notre travail (Lombaerts *et al.* 2006). Ces données sont en accord avec bon nombre d'études montrant l'implication des composants du système plasminogène dans la progression tumorale (Binder & Mihaly 2008; Duffy *et al.* 2008) y compris la TEM (Friedl 2004; Malo *et al.* 2006; Santibanez 2006; Wilkins-Port & Higgins 2007; Yoshino *et al.* 2007). De plus, l'expression de PAI-1 est corrélée à un mauvais pronostic et aux métastases (Harbeck *et al.* 2004; Biermann *et al.* 2008).

Les données de la littérature associées à nos résultats nous permettent d'établir une relation entre l'expression du facteur de transcription SIP1 et l'expression d'un phénotype migratoire et invasif par les cellules tumorales, et suggèrent un rôle de ce facteur dans le contrôle de gènes associés à la migration et à l'invasion des cellules tumorales.

Induction de la vimentine et de PAI-1 par SIP1.

Au vu de la corrélation entre l'expression de la vimentine et des membres du système plasminogène, et l'expression de SIP1 dans les différentes lignées cellulaires, nous avons étudié la régulation potentielle de la vimentine et de ces membres du système plasminogène par SIP1.

En ce qui concerne la régulation de la vimentine par SIP1, nous avons montré que la transfection de l'ADNc de SIP1 dans les cellules MCF10A accroît l'expression de la vimentine au niveau de l'ARNm et de la protéine. Cela s'accompagne également d'une augmentation des capacités migratoires des cellules. Inversement, l'expression de shRNAs dirigés contre SIP1 dans les cellules MCF10A, diminue clairement l'expression de la vimentine ainsi que leurs propriétés migratoires. Consolidant ces données, une diminution de l'expression de la vimentine suivant une transfection de siRNAs SIP1 a également été rapportée dans des cellules tumorales mammaires BT549.

En ce qui concerne les membres du système plasminogène, la transfection de l'ADNc de SIP1 dans les cellules tumorales mammaires MCF7 et BT20 accroît l'expression de PAI-1 au niveau de l'ARNm. Inversement, une diminution de l'expression de PAI-1, en plus de la diminution de l'expression de la vimentine, suite à une transfection de siRNAs SIP1, a également été rapportée dans les cellules tumorales mammaires invasives BT549.

Au moment où nous avons entamé ce travail, l'implication de SIP1 dans des phénomènes de TEM associés à l'invasion des cellules tumorales était plus particulièrement attribuée à ses capacités de réprimer la cadhérine E, comme montré dans les cellules MDCK et dans des cellules de carcinomes hépatocellulaires et épidermoïdes du colon transfectés avec SIP1. (Comijn *et al.* 2001; Miyoshi *et al.* 2004; Vandewalle *et al.* 2005). En accord avec ces données, une répression de la cadhérine E par SIP1 est également observée dans nos systèmes cellulaires. D'une manière générale, la répression de la cadhérine E a été le premier mécanisme de régulation décrit pour tous les membres des familles Snail et ZEB (Peinado *et al.* 2007). L'expression exogène de ces facteurs dans divers systèmes cellulaires épithéliaux favorise en effet des processus de TEM caractérisés par une réduction de l'expression de la cadhérine E, et par un accroissement des propriétés migratoires/invasives (Cano *et al.* 2000; Hajra *et al.* 2002; Nieto 2002; Come *et al.* 2004; Peinado *et al.* 2004c; Eger *et al.* 2005; Peinado *et al.* 2007). Néanmoins, la cadhérine E n'apparaît pas aujourd'hui comme l'unique cible de ces facteurs de transcription. Ainsi, la liste des gènes cibles de ces facteurs ne cesse d'augmenter et inclut d'autres molécules de contacts intercellulaires, ainsi que des gènes caractérisant un phénotype mésenchymateux (voir introduction p35). Plus spécifiquement en ce qui concerne SIP1, une répression de la claudine-4 et de ZO3 au niveau des jonctions serrées, et de la plakophiline-2 au niveau des desmosomes a été démontrée dans des cellules MDCK surexprimant SIP1 (Vandewalle *et al.* 2005). De plus, la TEM induite par SIP1 dans des cellules de carcinomes hépatocellulaires et épidermoïdes du colon est également associée

à une expression accrue de la cadhérine N et d'isoformes mésenchymateuses de p120^{ctn} (Vandewalle *et al.* 2005), ainsi que de certains membres de la famille des MMPs (MT1-MMP, MMP-1 et MMP-2) (Miyoshi *et al.* 2004). La régulation de la vimentine et de PAI-1 par SIP1 n'avait jamais été documentée auparavant. Depuis la publication de notre manuscrit (Bindels *et al.* 2006), la régulation de la vimentine par SIP1, associée à une augmentation des propriétés SIP1 a été également décrite dans d'autres modèles cellulaires tumoraux (Mejlvang *et al.* 2007; Ohta *et al.* 2009; Isohata *et al.* 2009) (Taki *et al.* 2006). En accord avec nos résultats concernant la régulation de PAI-1 par SIP1, une régulation de PAI-1 par Snail a également été rapportée. Ainsi, la surexpression de Snail et Slug dans des cellules MDCK (canine kidney epithelial cells) mène à une surexpression de PAI-1 (Moreno-Bueno *et al.* 2006), et dans des cellules tumorales mammaires MDA-MB-231, l'inhibition de Snail diminue l'expression du transcrit PAI-1 (Fabre-Guillevin *et al.* 2008).

Il est important de noter que la régulation positive de PAI-1 et de SIP1 a été observée dans des lignées cellulaires différentes. Ainsi, aucune régulation de la vimentine n'a été observée dans les lignées cellulaires MCF7 et BT20 transfectées par SIP1, et aucune régulation de PAI-1 n'a été observée dans les MCF10A transfectées par SIP1, même si une tendance non significative a été observée. Ces données suggèrent que la régulation de la vimentine et de PAI-1 par SIP1 implique différents mécanismes. Le fond génétique des lignées influence donc probablement ces régulations et atteste de l'importance de co-facteurs dans de telles régulations. Ainsi, dans ces cellules, la vimentine ne serait pas une cible de SIP1 et/ou les co-régulateurs nécessaires à son activation seraient absents dans ces cellules.

Mécanismes de régulation de la vimentine et de PAI-1 par SIP1.

Les mécanismes impliqués dans la régulation de la vimentine et de PAI-1 par le facteur de transcription SIP1 sont encore méconnus. SIP1 a initialement été décrit comme répresseur transcriptionnel réprimant l'expression de ses gènes cibles par fixation directe d'éléments bipartite composés d'une séquence 5'-CACCT-3', et d'une séquence 5'-CACCTG-3' (Remacle *et al.* 1999).

En ce qui concerne la régulation de la vimentine par SIP1, nous avons ainsi investigué la possibilité d'une régulation via la voie caténine- β . Compte tenu de l'effet répressif de SIP1 sur la cadhérine E (Comijn *et al.* 2001; van Grunsven *et al.* 2003), il était en effet logique de penser que l'induction de la vimentine par SIP1 pourrait dépendre de l'activation de la voie caténine- β /TCF. Bien que ce ne soit pas toujours le cas, une ~~expression~~ ^{surexpression} de la cadhérine E peut favoriser la translocation de la caténine- β dans le noyau où il peut

déclencher la transcription de plusieurs gènes cibles par fixation aux membres des facteurs de transcription de la famille TCF/LEF (Hecht & Kemler 2000; Giles *et al.* 2003). En outre, des données du laboratoire ont montré que la vimentine est une cible de la voie caténine- β /TCF (Gilles *et al.* 2003). Toutefois, nos résultats suggèrent plutôt que la voie caténine- β /TCF n'est pas activée suite à la transfection de SIP1, comme également observé par Comijn *et al.* (2001) dans des cellules MDCK. En effet, la transfection de l'ADNc de SIP1 dans des cellules MCF10A ne mène pas à l'accroissement de l'activité du système rapporteur TOP-FLASH, bien qu'il active le promoteur de la vimentine. De plus, en accord avec nos résultats TOP-FLASH, nous n'avons pas observé d'accumulation de la caténine- β nucléaire dans des cellules MCF10A transfectées avec SIP1. Il est également à noter qu'une diminution de l'expression de SIP1 par des siRNAs dans des cellules BT549, n'exprimant pas de cadhérine E, peut également moduler l'expression de la vimentine. Dans l'ensemble, ces données suggèrent donc que la régulation de la vimentine par SIP1 est indépendante de l'influence de SIP1 sur la cadhérine E et de l'activation de la voie de la caténine- β . La régulation positive de la vimentine par SIP1 impliquerait donc un autre mécanisme que nous n'avons pas encore identifié et qui pourrait impliquer d'autres voies de transcription.

Dans ce sens, des études ont montré que certains facteurs de transcription de la famille Ets, ainsi que AP-1, contribuent à la régulation de la vimentine dans des cellules tumorales épithéliales (Pieper *et al.* 1992; Sommers *et al.* 1994b; Chen *et al.* 1996). En accord avec ces données, une association a également été observée entre l'expression de Ets-1 et l'expression de la vimentine dans les lignées tumorales mammaires (Gilles *et al.* 1997). Ainsi, des données postérieures à notre étude suggèrent une implication de Ets-1 dans l'induction de l'expression de la MMP-2 par SIP1 (Taki *et al.* 2006). Ce mécanisme semble également être utilisé par d'autres facteurs de transcription de la famille Snail. Ainsi, le facteur Snail peut induire l'expression de la MMP-2 et de la MMP-9 via l'augmentation de l'expression des membres de la famille Ets (Ets-1 ou Sp-1) (Jorda *et al.* 2005; Taki *et al.* 2006). Toutefois, la régulation de la vimentine par ces facteurs de transcription ferait intervenir d'autres facteurs (Taki *et al.* 2006). Ainsi, l'expression de la vimentine n'est pas induite par Ets-1 dans les cellules de carcinome épidermoïde, même si SIP1 est capable d'induire l'expression de Ets-1 dans ces cellules (Taki *et al.* 2006).

D'autres facteurs de transcription pourraient également être impliqués. Ainsi, il a été montré que la perte de la cadhérine E mène à une régulation positive de l'activité de NF- κ B (Kuphal *et al.* 2004). Par ailleurs, une autre étude montre que l'activité de NF- κ B peut induire l'expression de PAI-1 (Hou *et al.* 2004). De plus, Munshi *et al.* (2002) ont observé que

l'expression *de novo* de la cadhérine E mène à une expression réduite de PAI-1 (Munshi *et al.* 2002). La vimentine possède également un site de fixation pour NF- κ B, et une étude récente montre l'implication de NF- κ B dans l'induction de la vimentine par le TGF β (Zhang *et al.* 2009a). De ce fait, un schéma de régulation pourrait être proposé dans lequel SIP1, diminuerait l'expression de la cadhérine E, augmentant ainsi l'activité de NF- κ B et menant à une expression accrue de PAI-1 et de la vimentine.

Ainsi, SIP1 apparaît réguler positivement bon nombre de facteurs de transcription qui pourraient eux-mêmes être impliqués dans la régulation de gènes cibles de la TEM, comme la vimentine et PAI-1. Il est difficile néanmoins d'imaginer que de telles régulations positives soient toutes médiées par un mécanisme indirect impliquant une action répressive de SIP1.

De plus en plus d'études récentes démontrent dans ce sens que δ EF1, l'autre membre de la famille ZEB, peut agir directement en tant qu'activateur transcriptionnel en se liant aux mêmes séquences « E-box ». C'est le recrutement des coactivateurs de transcription p300/pCAF qui causerait un déplacement du corépresseur CtBP, menant ainsi à une régulation positive, comme cela a été montré pour l'activation du récepteur à la vitamine D (Lazarova *et al.* 2001; Pena *et al.* 2006), de l'ovalbumine (Chamberlain & Sanders 1999) et de la α -SMA (Smooth Muscle Actin) (Nishimura *et al.* 2006). Le mécanisme moléculaire qui détermine le choix entre la répression et l'activation par δ EF1 n'est pas connu à ce jour, mais le niveau d'expression des co-régulateurs CtBP et p300 apparaît être responsable en partie, du statut répresseur ou activateur de δ EF1. Ce mécanisme pourrait également impliquer des modifications post-transcriptionnelles dépendantes du type cellulaire. En effet, des formes hyper- et hypo-phosphorylées de δ EF1 ont été observées dans des lignées cellulaires différentes. L'expression différentielle de ces deux formes pourrait contribuer à des activités transcriptionnelles spécifiques (Costantino *et al.* 2002). La phosphorylation pourrait en outre modifier la capacité de δ EF1 d'interagir avec certains répresseurs ou coactivateurs, (Vandewalle *et al.* 2009). Dans ce contexte, il est important de noter qu'Allen *et al.* (2005) suggèrent que les motifs « E-box » dans le promoteur de PAI-1 pourraient agir en tant que plateforme pour le recrutement de régulateurs négatifs et positifs de l'expression de PAI-1 (Allen *et al.* 2005). Ainsi, la possibilité que SIP1 puisse directement lier et activer le promoteur de la vimentine et de PAI-1 ne peut pas être exclue. Le promoteur de PAI-1 possède des motifs « E-box » bipartite consensus reconnu par SIP1. Un tel élément bipartite n'a pas été trouvé dans la séquence du promoteur de la vimentine où SIP1 pourrait se fixer à un motif simple CACCT ou à un autre motif similaire.

Il apparaît donc que SIP1 peut intervenir positivement dans la régulation de gènes, tels que la vimentine et PAI-1, impliqués dans les processus de TEM associés à la migration et l'invasion de cellules épithéliales tumorales, alors que les données de la littérature le décrivent essentiellement comme un répresseur (Comijn *et al.* 2001). Les données montrent par ailleurs que cette régulation n'implique pas nécessairement l'activation de la voie de la caténine- β en ce qui concerne la régulation de la vimentine, comme le laissait supposer la capacité de SIP1 à réprimer la cadhérine E.

II. Influence de SIP1 sur l'invasion et la dissémination métastatique *in vivo*

II.1. Introduction

Les données de la littérature ainsi que celles obtenues dans la première partie du travail montrent que SIP1 peut réguler l'expression de gènes impliqués dans l'invasion tumorale et favorise la migration dans de nombreux systèmes *in vitro*. Des données obtenues sur des biopsies tumorales humaines, détaillées dans l'introduction (p 37-39), ont clairement montré une surexpression des facteurs Snail et ZEB dans divers types de cancers. Néanmoins, leur implication fonctionnelle dans le processus métastatique *in vivo* est encore peu détaillée. Nous avons dès lors entrepris d'examiner l'implication fonctionnelle de SIP1 dans la progression métastatique *in vivo* en souris. Pour ce faire, nous avons utilisé un système d'imagerie *in vivo* sur petits animaux (Xenogen, IVIS 200). Cet appareil permet de détecter, sur des petits animaux vivants anesthésiés, les signaux luminescents générés par l'oxydation de la luciférine par la luciférase. Dès lors, en injectant en souris, des cellules exprimant la luciférase, il est possible de visualiser avec cet équipement la formation et la croissance de la tumeur primaire, mais aussi la formation de métastases dans différents organes (poumons, foie, rein,...).

II.2. Résultats

II.2.1. Injection sous-cutanée de cellules stablement transfectées avec l'ADNc de SIP1 en souris immunodéficientes

Dans un premier temps, nous avons transfecté de manière stable des cellules tumorales mammaires à faible potentiel métastatique (BT20) avec un vecteur d'expression pour la luciférase. Ensuite, nous avons réalisé des transfections stables de l'ADNc de SIP1 dans un clone de BT20 exprimant fortement la luciférase (Figure 28A). Lors de nos premières expériences, des injections sous-cutanées ont été réalisées dans le flanc de souris immunodéficientes avec les cellules transfectées. L'évolution de la formation de métastases a été évaluée en visualisant les souris *in toto* périodiquement sur l'appareil d'imagerie. Lorsque des « signaux internes » ont été visualisés *in toto*, les souris ont été sacrifiées. Les organes ont également été analysés sur l'appareil d'imagerie (Figure 28B).

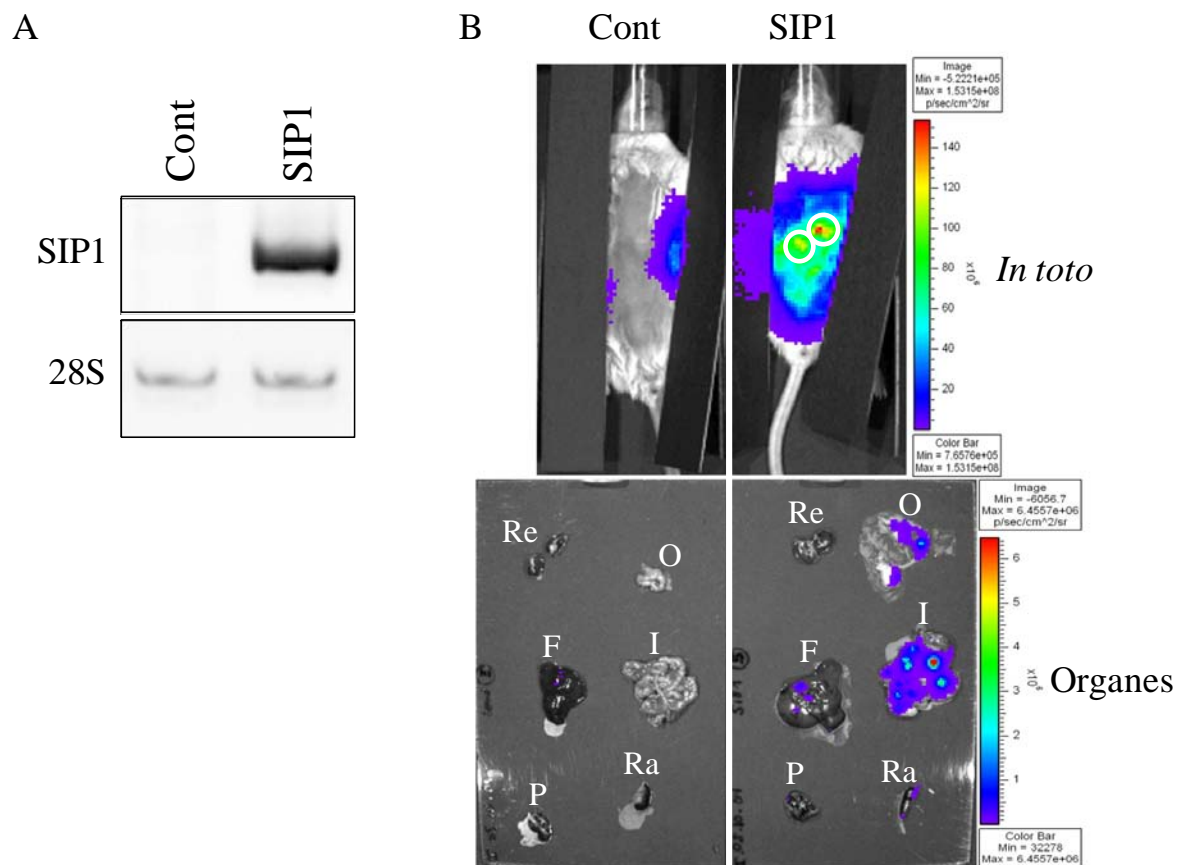


Figure 28 : SIP1 influence la progression métastatique en souris immunodéficientes.

(A) Analyse par RT-PCR de l'expression de SIP1 dans des cellules BT20 transfectées de manière stable avec un vecteur d'expression pour l'ADNc de SIP1. (B) Analyse de la dissémination métastatique dans des souris immunodéficientes, suite à des injections sous cutanées des cellules transfectées en A. L'analyse du potentiel métastatique est réalisée sur un appareil d'imagerie in vivo sur petits animaux (IVIS 200, Xenogen, Caliper) en utilisant des cellules exprimant stablement un gène rapporteur luciférase. En haut: visualisation des souris in toto. Les « signaux internes » attestant de la présence de cellules tumorales en dehors des sites d'injection sont entourés. En bas: visualisation des organes internes après dissection. Re=reins, O=ovaires, F=foie, I=intestins, P=poumon, Ra=rate.

La quantification du potentiel métastatique a été réalisée en attribuant un score correspondant à l'intensité de luminescence lue pour chaque organe (Figure 29A). La présence de métastases dans les différents organes est ensuite confirmée par analyses histologiques (Figure 29B).

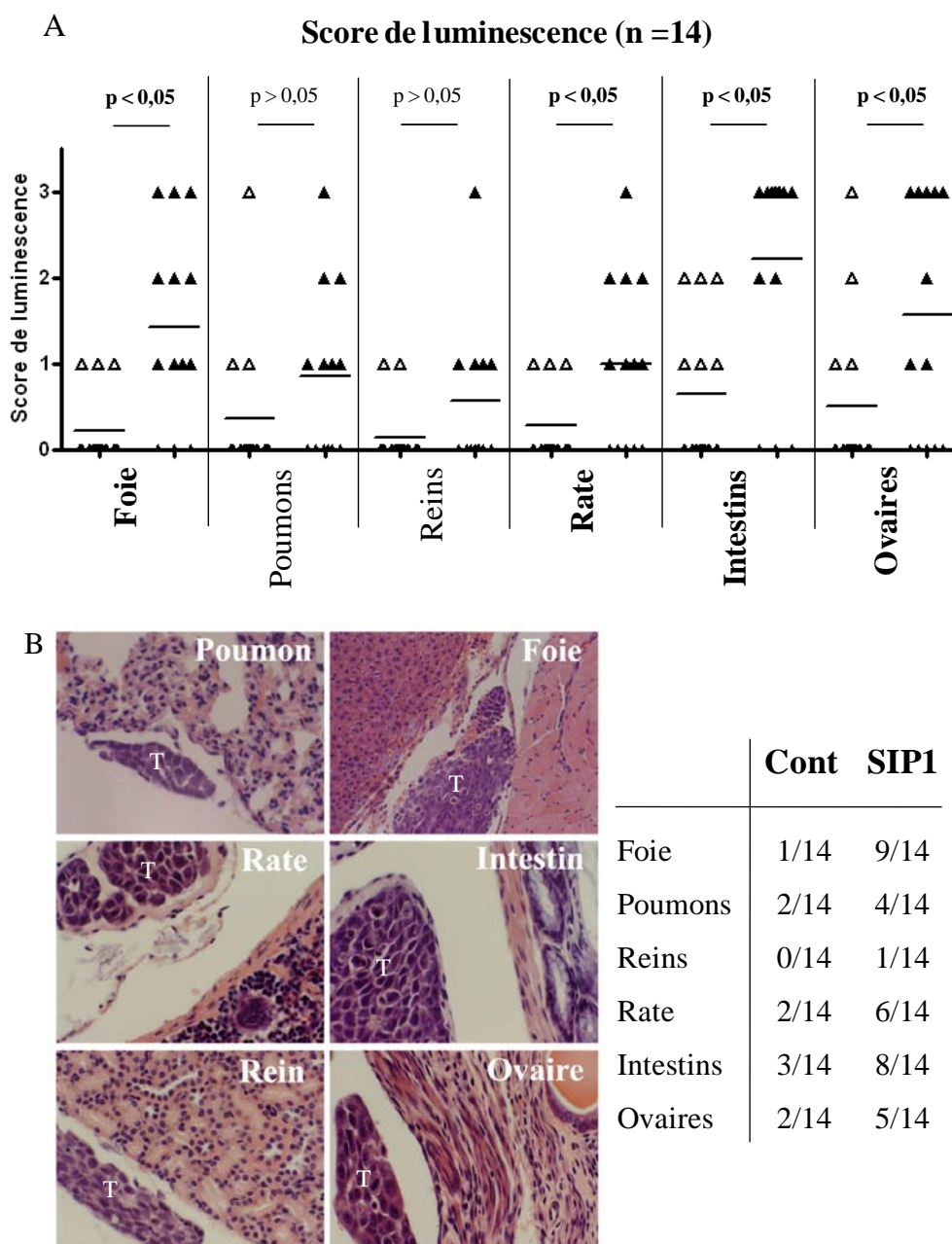


Figure 29 : SIP1 influence la progression métastatique en souris immunodéficientes.

(A) La quantification du potentiel métastatique est réalisée en attribuant un score correspondant à l'intensité de la luminescence lue pour chaque organe. (B) Coupes histologiques et colorations H-E réalisées dans les différents organes. T : Cellules tumorales.

Les résultats ont permis de montrer une augmentation du potentiel métastatique des cellules transfectées par SIP1, particulièrement au niveau du foie, de la rate et de l'intestin (Figure 29A). Nous n'avons pas observé de différences au niveau de la croissance tumorale (données non présentées).

En observant les coupes histologiques, nous avons remarqué que les tumeurs secondaires se trouvent rarement dans les organes et qu'elles sont plutôt accolées aux organes. Cette observation laisse suggérer que dans notre modèle, les cellules tumorales, une fois injectées

en sous-cutané dans les deux flancs de la souris, ne disséminent pas par voie systémique, mais directement de proche-en-proche, à travers le péritoine, vers les organes de l'abdomen. Afin de limiter ce phénomène, nous avons injecté les cellules tumorales à un niveau plus dorsal. Les résultats, suite à cette injection, nous ont également permis de montrer une augmentation du potentiel métastatique des cellules transfectées par SIP1. Les métastases ont néanmoins été essentiellement observées au niveau du poumon, plaidant en faveur de l'implication d'une dissémination systémique des cellules tumorales (Figure 30).

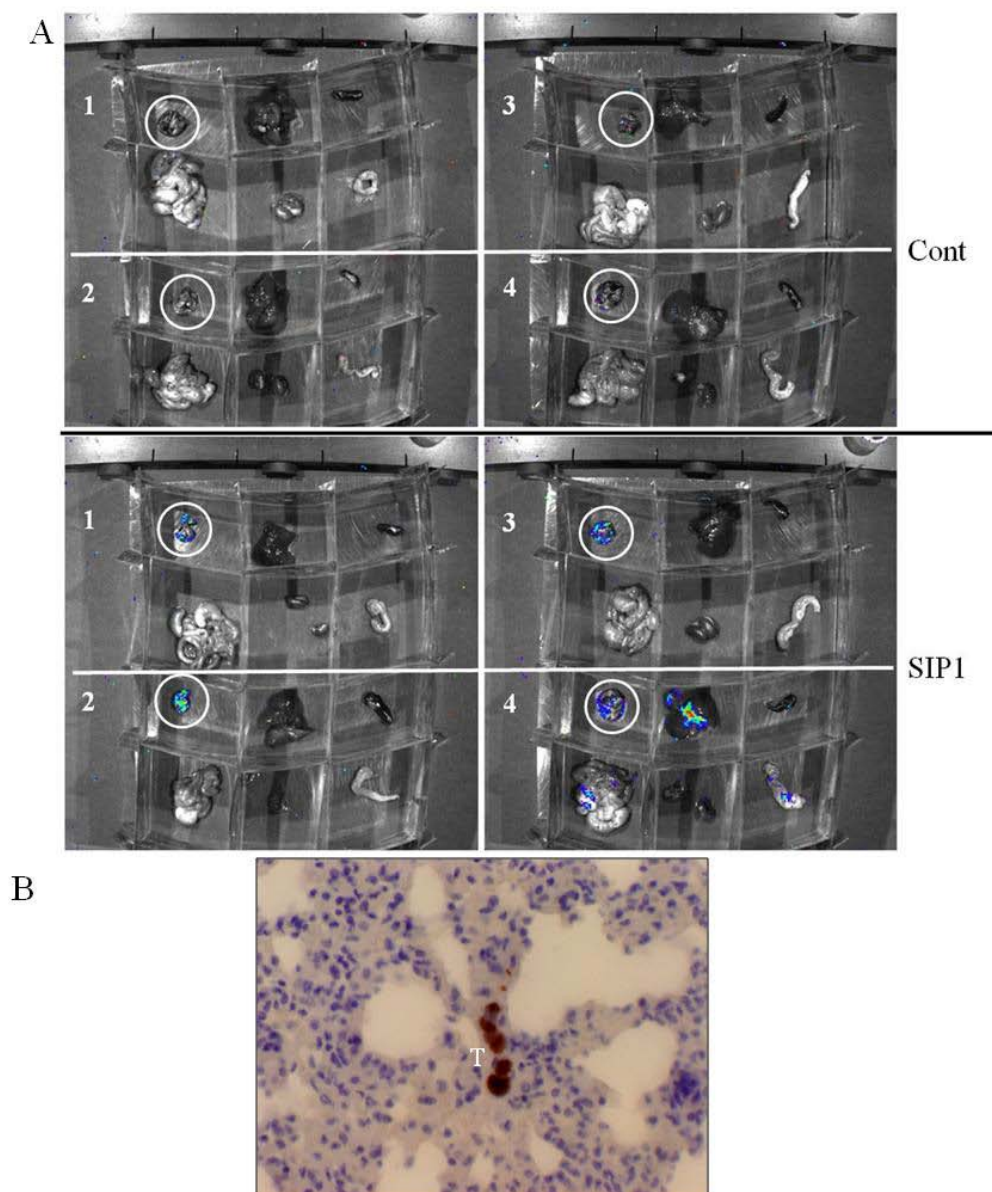


Figure 30 : SIP1 influence la progression métastatique en souris immunodéficientes.

(A) Analyse du potentiel métastatique par visualisation des organes internes après dissection dans les souris 1 à 4 du groupe contrôle (Cont) ou dans les souris 1-4 du groupe de souris injectées avec les transfectants SIP1 (SIP1). L'organe entouré est le poumon. (B) Analyse immunohistochimique du Ki-67 dans une coupe de poumon d'une souris injectée avec les transfectants SIP1. T : Cellules tumorales.

De manière intéressante, nous avons également observé une augmentation de la croissance tumorale chez les souris injectées avec les transfectants SIP1 par rapport au contrôle (Figure 31). Une telle augmentation de la croissance tumorale n'avait pas été observée lors des injections au niveau des flancs des souris.

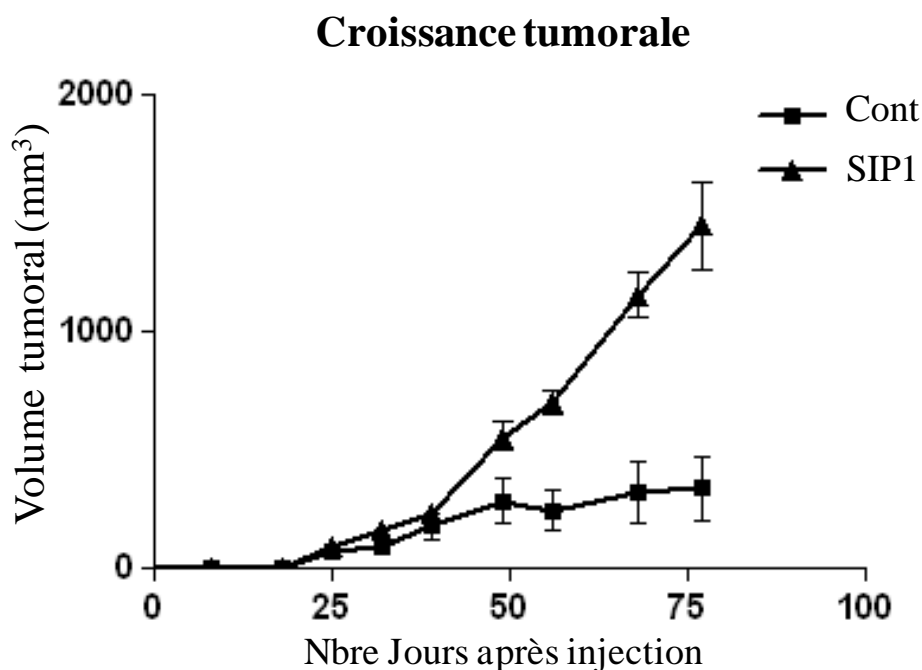


Figure 31 : SIP1 favorise la croissance tumorale.

Analyse du volume tumoral des tumeurs chez les souris contrôle (Cont) et les souris injectées avec les transfectants SIP1 (SIP1).

III.2.2.2. Injection sous-cutanée de cellules transfectées avec des si/shRNAs SIP1

Nous avons également utilisé la stratégie d'interférence à l'ARN afin d'évaluer l'impact d'une régulation négative de SIP1 dans des cellules invasives sur leur potentiel métastatique. Dans un premier temps, nous avons utilisé la lignée de mélanome murine B16F10 que nous avons transfectée avec le gène de la luciférase. Contrairement aux lignées humaines, cette lignée murine représente un modèle très court et très rapide de la progression métastatique. La formation de métastases est en effet observable dès la deuxième semaine après injection sous-cutanée permettant ainsi d'évaluer l'influence de SIP1 sur le comportement métastatique en transfectant des séquences de siRNA *in vitro* avant l'injection en souris. La formation de métastases a été évaluée dans des souris C57BL/6. L'évolution de la croissance tumorale et de la dissémination métastatique a été suivie de manière hebdomadaire à l'aide de l'appareil d'imagerie. Nos premiers résultats obtenus avec le modèle de B16F10 montrent une tendance à une diminution du nombre de métastases suite à la transfection des siRNAs SIP1 (Figure 32).

Néanmoins, la reproductibilité des résultats ne s'est pas avérée satisfaisante. Nous avons alors envisagé la technologie des shRNAs afin d'obtenir une répression stable et durable de SIP1. Ainsi, nous avons généré une lignée tumorale mammaire humaine à fort potentiel métastatique (MDA-MB-435) exprimant la luciférase. Cette lignée a été transfectée de manière stable par des constructions plasmidiennes « Sure Silencing » (SABiosciences, Frederick, MD, USA) exprimant des séquences de shRNA, afin d'évaluer l'impact d'une inhibition stable de SIP1 sur leur potentiel métastatique. Malheureusement, nous n'avons pu obtenir de clones présentant une inhibition satisfaisante de SIP1. Ces expériences sont donc toujours en cours.

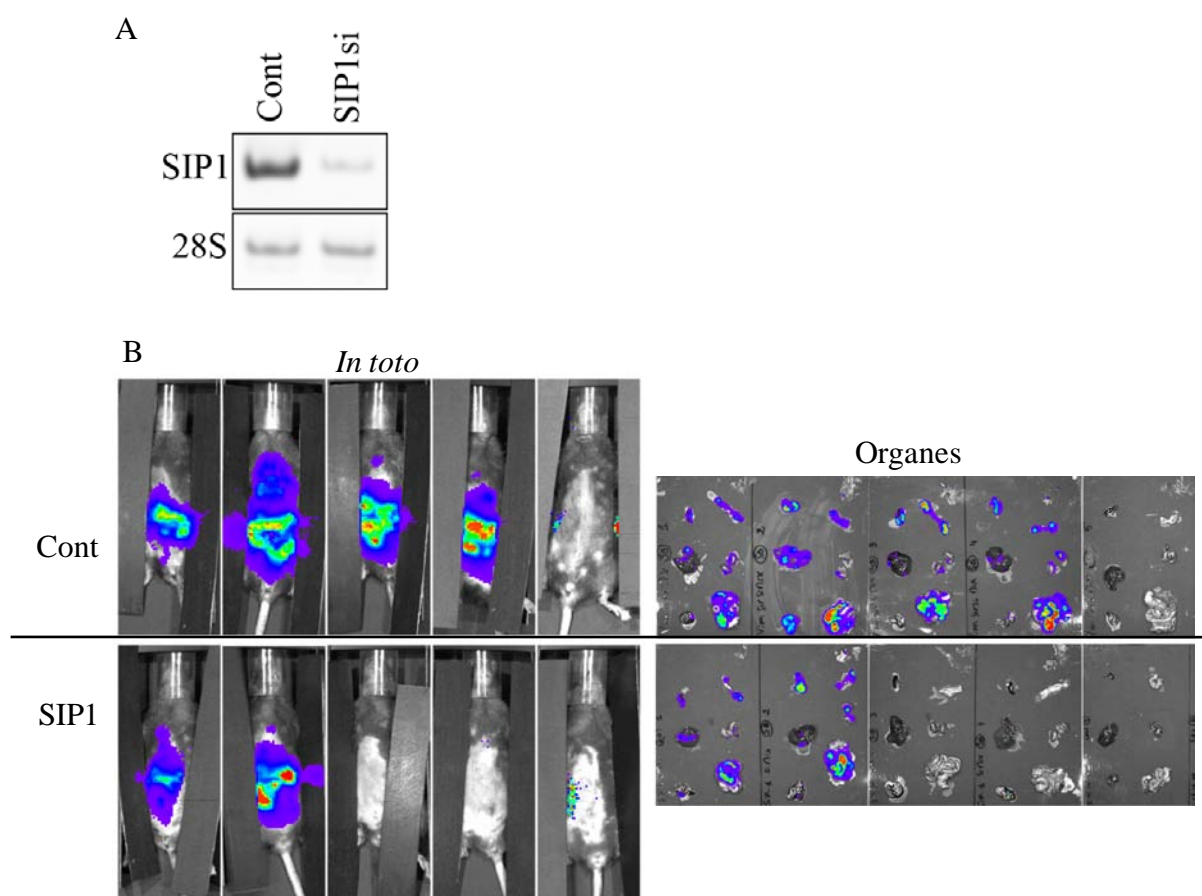


Figure 32 : *SIP1si influence la progression métastatique de cellules B16F10 en souris C57Bl/6. (A) Analyse par RT-PCR de l'expression de SIP1 dans des cellules B16F10 transfectées avec des siRNAs SIP1. (B) Analyse de la dissémination métastatique dans des souris C57BL/6, suite à des injections sous cutanées des cellules B16F10 transfectées en A. L'analyse du potentiel métastatique est réalisée sur un appareil d'imagerie in vivo sur petits animaux (IVIS 200, Xenogen, Caliper), en utilisant des cellules exprimant stablement un gène rapporteur luciférase.*

III.2.3. Conclusions et discussion

Les résultats obtenus à ce jour, toujours préliminaires, nous ont permis de montrer une augmentation du potentiel métastatique ainsi que de la croissance tumorale des cellules tumorales mammaires transfectées par SIP1.

Ces résultats sont en accord avec d'autres études également réalisées *in vivo* dans des modèles d'animaux qui montrent une implication des autres facteurs de transcription à doigt de zinc dans la progression tumorale. Ainsi, une surexpression de Snail dans des MDCK (Peinado *et al.* 2004b) et des cellules tumorales ovariennes (Kurrey *et al.* 2005), accroît la croissance tumorale après injection sous-cutanée en souris immunodéficientes. Dans le cas des cellules tumorales ovariennes surexprimant Snail, on observe, de plus, un accroissement du nombre de métastases. Par ailleurs, des cellules tumorales pancréatiques transfectées avec Snail produisent plus de métastases que des cellules non-transfectées après injection orthotopique dans le pancréas de souris nude (Yin *et al.* 2007). A l'inverse, la suppression de l'expression de Snail dans la lignée tumorale mammaire invasive MDA-MB-231 (Olmeda *et al.* 2007b), ainsi que dans des cellules tumorales de carcinome épidermoïde murin (Olmeda *et al.* 2007a), diminue considérablement la croissance tumorale après injection en sous-cutanée. De plus, l'injection intra-tumorale de siRNAs dirigés contre Snail inhibe la croissance tumorale ainsi que la formation de métastases de cellules de mélanome (B16F10) chez la souris (Kudo-Saito *et al.* 2009).

Des données similaires ont été obtenues avec Slug. Ainsi, sa surexpression dans des cellules tumorales pulmonaires (Shih *et al.* 2005) et ovariennes (Kurrey *et al.* 2005) accroît la croissance tumorale chez la souris. L'inhibition de Slug dans des cellules de neuroblastomes diminue leur capacité métastatique après injection intra veineuse en souris (Vitali *et al.* 2008).

A ce jour, une seule étude *in vivo* en souris a été publiée concernant l'implication des facteurs ZEB dans la formation des métastases. Ainsi, Spaderna *et al.* (2008) ont montré que la suppression de δ EF1 inhibe la dissémination métastatique des cellules tumorales colorectales injectées de manière intrasplénique ou intraveineuse dans des souris nude (Spaderna *et al.* 2008). Aucune donnée à ce jour ne documente le rôle de SIP1 sur la progression métastatique en modèles animaux. Comme pour tous les autres répresseurs de la cadhérine E, une expression accrue de SIP1 a été observée dans des biopsies de nombreux types de cancers humains, y compris le cancer mammaire, indiquant sa relevance physiopathologique (Rosivatz *et al.* 2002; Elloul *et al.* 2005; Maeda *et al.* 2005; Imamichi *et al.* 2007; Nakada *et al.* 2008; Sayan *et al.* 2009; Yoshihara *et al.* 2009; Yoshida *et al.* 2009; Miura *et al.* 2009). Bien qu'une expression accrue de SIP1 a été corrélée à la dédifférenciation de la tumeur dans

le cancer ovarien (Yoshida *et al.* 2009) et pancréatique (Imamichi *et al.* 2007), SIP1 est le seul facteur des familles Snail et ZEB qui n'a pas encore été associé significativement au grade de la tumeur ainsi qu'à la dissémination métastatique *in vivo*.

Dans les modèles de souris détaillés ci-dessus, y compris le nôtre, les facteurs Snail et ZEB favorisent la croissance tumorale. Ces données *in vivo* vont apparemment à l'encontre de données *in vitro* qui démontrent une inhibition de la prolifération par ces facteurs (Vega *et al.* 2004; Barrallo-Gimeno & Nieto 2005; Park *et al.* 2005; Turner *et al.* 2006; Mejlvang *et al.* 2007). Il est probable que le contexte « *in vivo* » génère d'autres stimuli et implique d'autres mécanismes qui pourraient favoriser la croissance tumorale, tels que l'angiogenèse. Ainsi, une angiogenèse plus développée a été observée dans les tumeurs primaires formées par des cellules surexprimant Snail ou Slug par rapport aux tumeurs formées par les cellules contrôles (Peinado *et al.* 2004b; Shih *et al.* 2005; Olmeda *et al.* 2007a; Olmeda *et al.* 2007b). Les facteurs angiogènes impliqués dans ce processus d'angiogenèse *in vivo* n'ont pas encore été déterminés. Néanmoins, *in vitro*, Snail apparaît réguler positivement certains facteurs pro-angiogènes, notamment PAI-1 (Moreno-Bueno *et al.* 2006; Fabre-Guillevin *et al.* 2008). Ces données sont en accord avec nos propres résultats montrant une surexpression de PAI-1 dans les cellules BT20 transfectées avec SIP1. En outre, δ EF1 est capable d'induire l'angiogenèse dans un système de CAM (membrane chorioallantoïde) chez le poulet en réprimant directement l'expression de SEM3F (Semaphorin 3F), un anti-angiogène (Clarhaut *et al.* 2009).

Dans notre premier modèle de souris, dans lequel nous avons injecté les cellules dans les deux flancs des souris, nous avons observé que les cellules tumorales transfectées avec SIP1 donnent plutôt des métastases au niveau des organes tels que le foie, la rate et l'intestin, plaidant en faveur d'une dissémination péritonéale. Nous n'avons pas pu observer de métastases au niveau du poumon. En accord avec ces observations, une dissémination péritonéale a été observée dans une autre étude pour des cellules tumorales ovariennes. Ainsi, la dissémination métastatique des cellules tumorales ovariennes transfectées stablement avec Slug ou Snail est également péritonéale et les organes atteints sont l'estomac, le foie et les reins (Kurrey *et al.* 2005).

Dans l'ensemble, nos résultats obtenus *in vivo* chez les souris et les données de la littérature, suggèrent un rôle fonctionnel des membres des facteurs Snail et ZEB dans la croissance tumorale ainsi que dans la formation des métastases.

III. Fhit régule les capacités invasives des cellules tumorales pulmonaires

III.1. Introduction

En parallèle à l'étude sur SIP1, nous avons également collaboré avec le laboratoire INSERM 903 de Reims pour l'étude de Fhit dans l'invasion et la TEM des cellules tumorales pulmonaires, qui a fait l'objet d'un papier (Joannes *et al.* 2009). Les principaux résultats de cette étude sont exposés ci-dessous.

Le gène Fhit (Fragile Histidine Triad) est localisé sur la région chromosomique 3p14.2 englobant le site fragile commun FRA3B sur environ 2 Mb du génome humain. Fhit code pour un ARNm de 1,1kb et pour une protéine de 16,8 kDa constamment exprimée dans les tissus épithéliaux (Ohta *et al.* 1996). *In vitro*, Fhit se comporte typiquement comme une hydrolase diadénosine triphosphate (Ap3A), mais peu d'éléments sont connus sur son rôle physiologique (Barnes *et al.* 1996; Pekarsky *et al.* 2002). L'absence ou la diminution de l'expression de Fhit peut être la conséquence d'aberrations chromosomiques telles que des délétions, la perte d'hétérozygotie, la méthylation du promoteur ou des transcrits anormaux, qui sont autant d'événements communs à la plupart des cancers humains (Ishii *et al.* 2001; Pekarsky *et al.* 2002; Huebner & Croce 2003). En fait, plusieurs études ont montré que Fhit est inactivé dans des carcinomes touchant les poumons, le sein, l'œsophage, l'estomac, les reins et le col de l'utérus (Ohta *et al.* 1996; Negrini *et al.* 1996; Sozzi *et al.* 1996; Ishii *et al.* 2001; Huebner & Croce 2003). En fait, plusieurs études ont montré que Fhit est inactivé dans des carcinomes du poumon, du sein, de l'œsophage, de l'estomac, des reins et du col de l'utérus (Ohta *et al.* 1996; Negrini *et al.* 1996; Sozzi *et al.* 1996; Ishii *et al.* 2001; Huebner & Croce 2003). Depuis son identification en 1996 (Ohta *et al.* 1996), Fhit a été rapidement proposé comme gène suppresseur de tumeur (Siprashvili *et al.* 1997; Ishii *et al.* 2001). Des données obtenues *in vitro*, montrent, que Fhit induit l'apoptose par l'intermédiaire de caspases et inhibe la prolifération (Siprashvili *et al.* 1997; Ji *et al.* 1999; Dumon *et al.* 2001; Roz *et al.* 2002; Cavazzoni *et al.* 2004; Campiglio *et al.* 2006). La présence de l'allèle Fhit, sous forme homozygote (Fhit +/+) en souris, réduit très significativement la possibilité de développer des tumeurs induites après traitement avec un carcinogène, par rapport aux souris hétérozygotes Fhit +/- (Fong *et al.*, 2000). Par ailleurs, l'administration de vecteurs viraux exprimant Fhit prévient le développement des tumeurs induites dans les souris Fhit +/- (Dumon *et al.* 2001). De même, les souris Fhit +/+ développent beaucoup moins fréquemment de tumeurs

spontanées que les souris Fhit +/- et Fhit -/- (Zanessi et al., 2001). Les voies moléculaires empruntées par Fhit pour jouer son rôle de suppresseur de tumeur ne sont pas clairement définies. De façon intéressante, l'activité enzymatique de Fhit n'est pas indispensable, mais la fixation à son substrat Ap3A semble être nécessaire (Siprashvili *et al.* 1997; Pace *et al.* 1998; Trapasso *et al.* 2003; Campiglio *et al.* 2006). En outre, l'expression réduite de Fhit a été corrélée à un faible taux de différenciation des tumeurs, à un grade histologique plus élevé, à la présence de métastases ganglionnaires, à la présence de métastases à distance et à un mauvais pronostic dans différents cancers, tels que les carcinomes de la langue, de l'estomac, du colon, du col, du sein et des poumons (Huebner & Croce 2003; Nakata *et al.* 2006). Ces données, qui montrent que l'inactivation de Fhit est associée à l'agressivité tumorale, suggèrent que Fhit peut jouer un rôle dans l'invasion des cellules tumorales.

Dans cette troisième partie, nous avons examiné le rôle potentiel de Fhit au cours de l'invasion tumorale, et particulièrement, ses capacités à réguler des gènes de la TEM impliqués dans le phénotype invasif des cellules tumorales.

III.3.2. Résultats

III.3.2.1. La diminution de l'expression de Fhit est associée à l'invasion tumorale in vivo et in vitro

Dans un premier temps, l'expression de l'ARNm de Fhit a été évaluée par RT-PCR dans une série de cancers pulmonaires épidermoïdes. Nous avons ainsi observé que Fhit est significativement moins exprimé dans les tissus tumoraux que dans les tissus normaux (Figure 33A). Nous avons également observé que l'expression de Fhit est significativement réduite dans des tumeurs associées à des métastases ganglionnaires (stade N1 et N2) comparées à des tumeurs sans métastases ganglionnaires (stade N0) (Figure 33B). Selon la classification TNM (Tumeur, Nodule, Métastases), le niveau d'ARNm de Fhit est également plus faible dans les cancers épidermoïdes de grades II/III, que dans les carcinomes de grade I (Figure 33C). De plus, les patients présentant un degré élevé de l'ARNm de Fhit ont une espérance de vie plus longue que les patients avec un degré plus faible (données non illustrées). En outre, dans des carcinomes épidermoïdes, une expression réduite de Fhit a été observée au front invasif et dans des cellules tumorales infiltrant le stroma, comme démontré par immunohistochimie (Figure 33D).

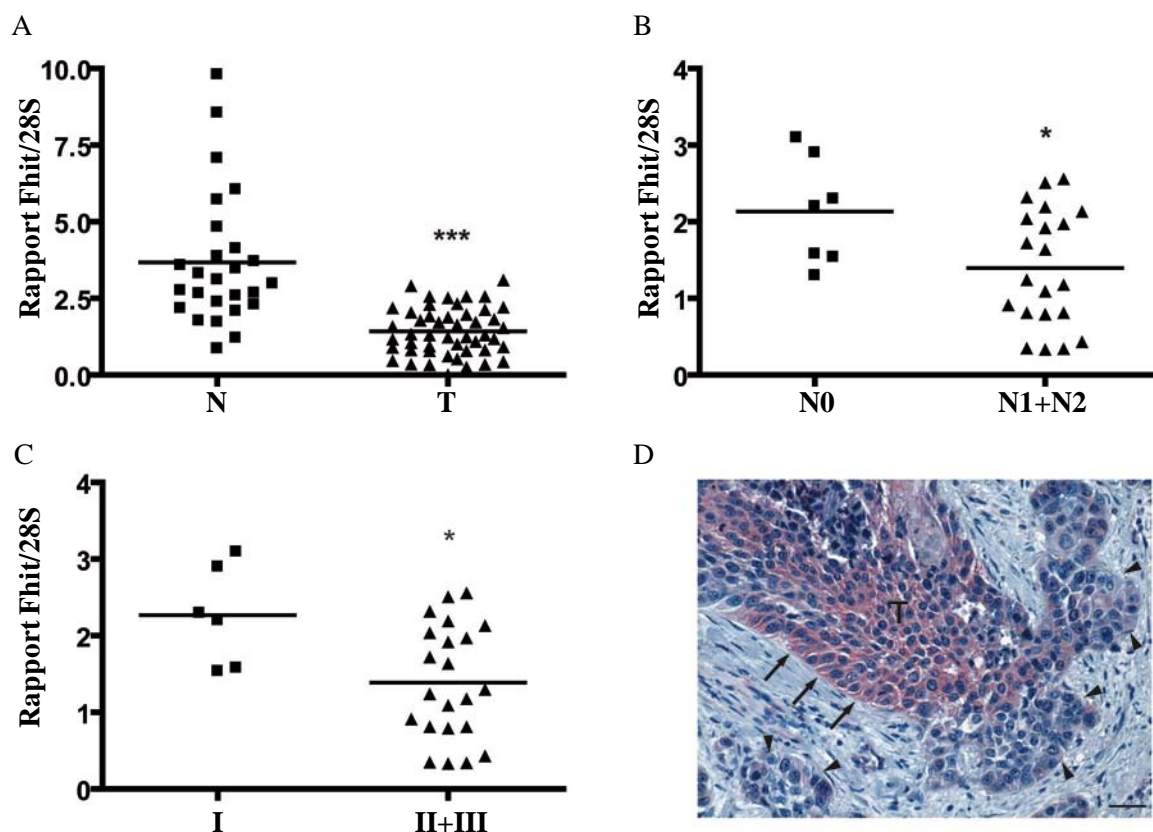


Figure 33 : La perte d'expression de *Fhit* est associée à l'agressivité des tumeurs dans les carcinomes épidermoïdes de poumons. Analyse par RT-PCR de l'expression de l'ARNm de *Fhit* normalisée sur base des valeurs du 28S dans des tissus normaux (N) et tumoraux (T) (A), en rapport avec le développement des métastases ganglionnaires (N0, N1 ou N2) (B), et en relation avec la classification TNM (Tumeur-Nodule-Métastases) (C). * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$. (D) Analyse immunohistochimique de *Fhit* dans des tissus de carcinomes épidermoïdes. La membrane basale est indiquée par des flèches et le front d'invasion est annoté par des têtes de flèches. Barre, 56 μ m.

Afin d'examiner la relation entre l'expression de *Fhit* et les capacités invasives *in vitro*, nous avons comparé les niveaux d'expression de *Fhit* (Figure 34A) dans diverses lignées tumorales pulmonaires (HBE4-E6/E7, A549, Beas-2B, BZR et BZR-T33, NCI-H1299) et mammaires (MCF-7, T47D, BT-20, MDA-MB-231, Hs578T), dont les capacités invasives ont été déterminées par test en chambres de Boyden (Figure 34B). Par des analyses en Western blotting, nous avons observé que *Fhit* n'est pas exprimé par les lignées cellulaires les plus invasives (Hs578T, BEAS-2B, BZR, BZR-T33 et NCI-H1299).

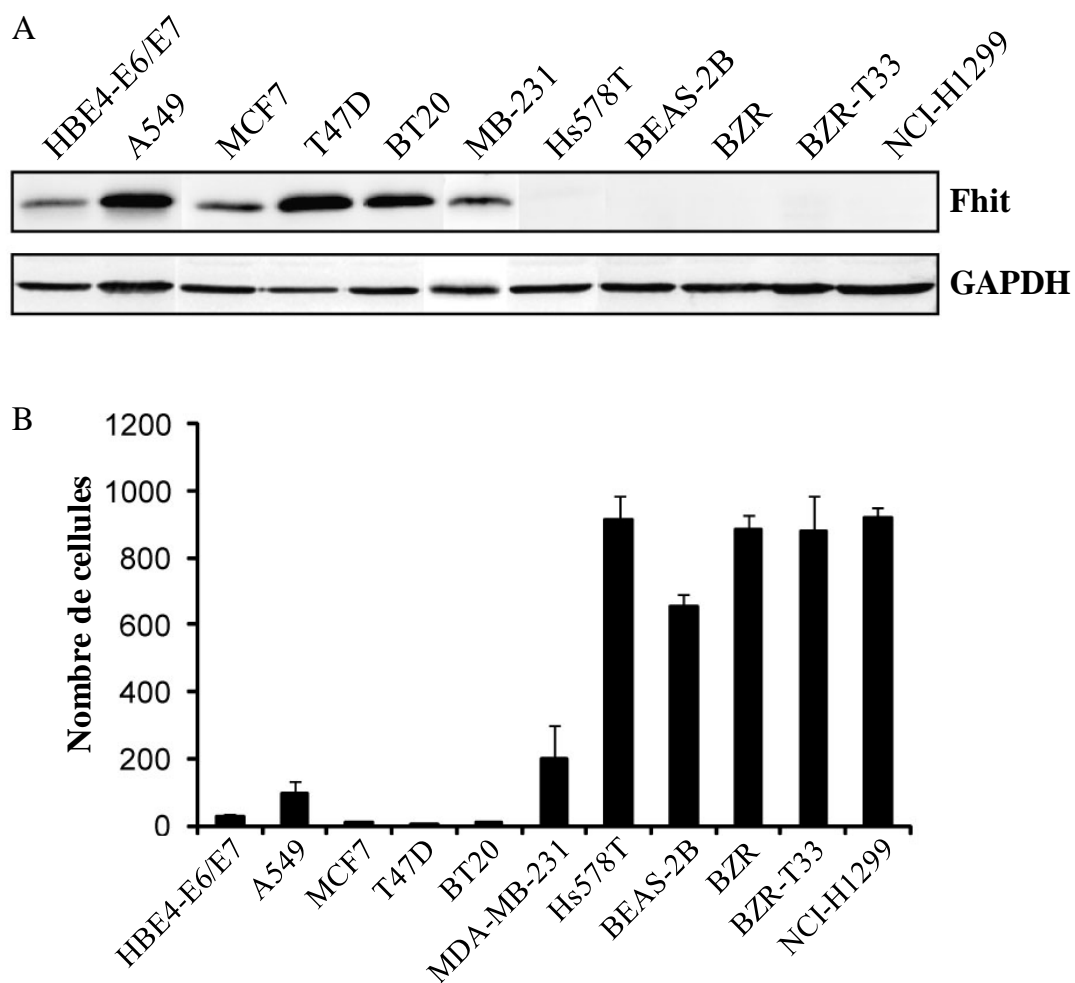


Figure 34 : La perte d'expression de Fhit est associée à l'invasion cellulaire in vitro.

(A) Analyses par « Western blotting » de Fhit dans les lignées cellulaires HBE4-E6/E7, A549, MCF7, T47D, BT20, MDA-MB-231, Hs578T, BEAS-2B, BZR, BZR-T33 et NCI-H1299. La GAPDH est analysée comme contrôle. (B) Analyses en chambre de Boyden réalisées sur les différentes lignées.

III.3.2.2. Fhit régule la localisation subcellulaire de molécules d'adhérence

Afin d'explorer le rôle potentiel de Fhit dans l'invasion des cellules tumorales, nous avons choisi les cellules NCI-H1299 n'exprimant pas Fhit comme modèle de cellules tumorales très invasives, et les cellules HBE4-E6/E7 exprimant Fhit comme modèle de cellules tumorales faiblement invasives pour induire respectivement l'expression de Fhit par transfection stable de l'ADNc de Fhit ou l'inhiber par transfection transitoire de siRNAs dirigés contre Fhit.

D'abord, nous avons observé qu'une surexpression de Fhit dans les NCI-H1299 et qu'une inhibition de Fhit dans les HBE4-E6/E7 induit des modifications morphologiques (Figure 35A). Les cellules NCI-H1299-Fhit montrent un phénotype plus cohésif et épithélial que les cellules NCI-H1299-contrôles. Inversement, les cellules HBE4-E6/E7 transfectées avec les siRNAs Fhit sont moins cohésives et montrent des extensions de type lamellipode, caractéristique d'un phénotype migratoire, comparées aux cellules HBE4-E6/E7 transfectées avec les siRNA contrôles correspondant. De plus, nous avons démontré, par immunohistochimie, que la modulation de l'expression de Fhit influence la localisation subcellulaire de molécules impliquées dans les jonctions adhérentes et serrées (Figure 35B). Nous observons ainsi une localisation préférentielle de l'occludine, ZO1, et de la caténine- β à la membrane cellulaire dans des cellules NCI-H1299-Fhit comparées aux cellules NCI-H1299-contrôles qui présentent essentiellement une expression cytoplasmique de ces molécules d'adhérence. La cadhérine E n'est pas exprimée par les cellules NCI-H1299 et aucune modification n'a été observée quand l'expression de Fhit est induite. Inversement, l'occludine, ZO1, la cadhérine E et la caténine- β sont délocalisés de la membrane cellulaire vers le cytoplasme et/ou le noyau dans les cellules transfectées HBE4-E6/E7 siRNA-Fhit comparées aux cellules contrôles. Comme démontré par « Western blotting », le niveau d'expression des protéines des jonctions cellulaires ne varie pas, à l'exception de la caténine- β qui est régulée de façon positive dans les cellules NCI-H1299-Fhit (Figure 35C).

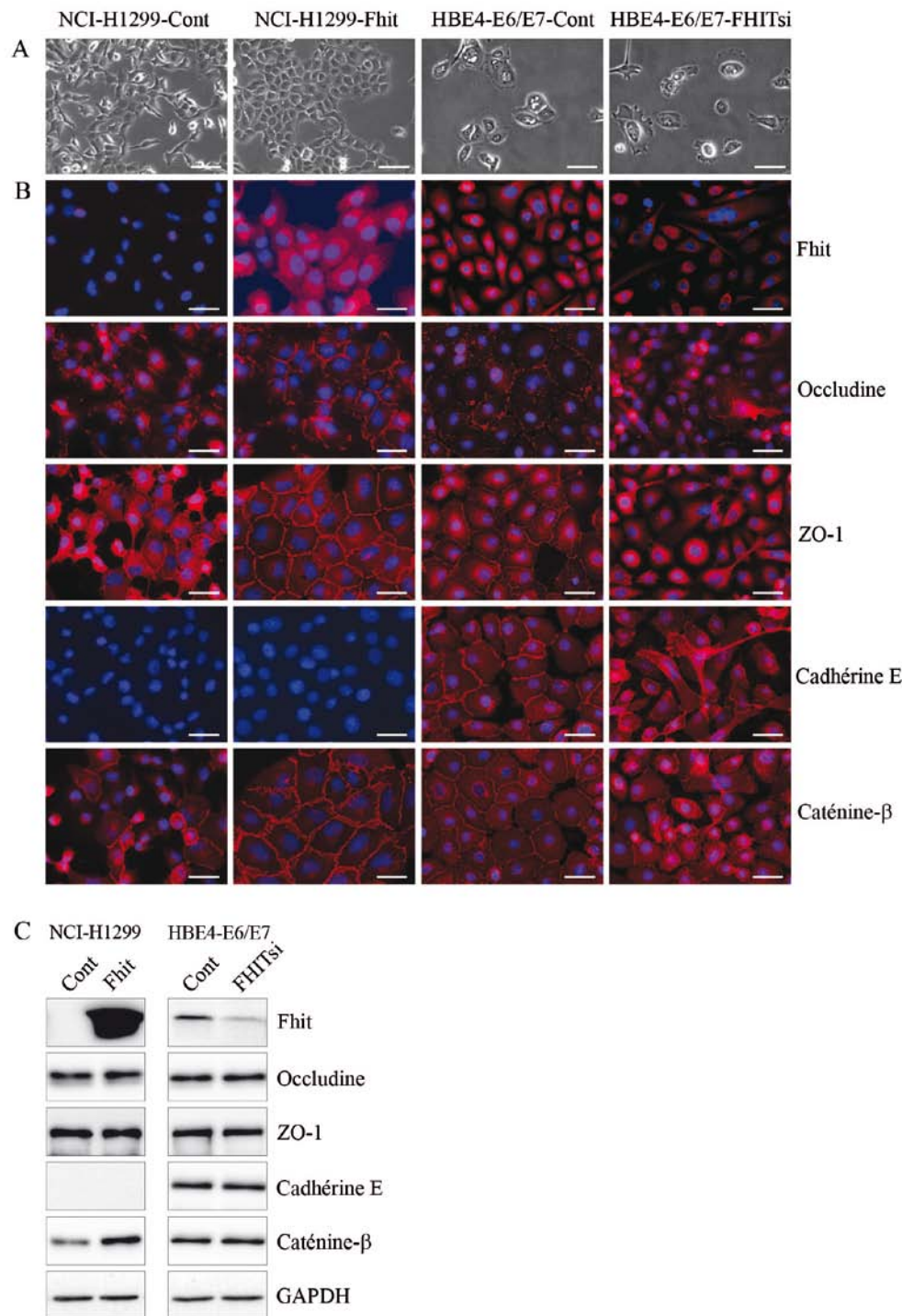


Figure 35 : Fhit régule l'adhérence intercellulaire dans des lignées tumorales pulmonaires.
 (A) Images en contraste de phase montrant la morphologie des cellules NCI-H1299 transfectées avec le vecteur vide (NCI-H1299-contrôles) ou l'ADNc de Fhit (NCIH-H1299-Fhit) et des cellules HBE4-E6/E7 transfectées avec les siRNA contrôles (HBE4-E6/E7-Cont) ou les siRNA Fhit (HBE4-E6/E7-FHITsi). Barres, 106 μm pour les cellules NCI-H1299 et 53 μm pour les cellules HBE4-E6/E7. (B) Analyse par immunofluorescence de l'expression de Fhit, de l'occludine, ZO1, de la cadhérine E et de la caténine-β dans les transfectants NCI-H1299 et HBE4-E6/E7. Les noyaux sont colorés au Dapi. Barres, 37 μm. (C) Analyse par « Western Blotting » de Fhit et des molécules d'adhérence cellulaire dans les cellules NCI-H1299 transfectées avec le vecteur contrôle (NCI-H1299-Cont) ou l'ADNc de Fhit (NCIH-H1299-Fhit) et des cellules HBE4-E6/E7 transfectées avec les siRNAs contrôles (HBE4-E6/E7-Cont) ou les siRNA Fhit (HBE4-E6/E7-FHITsi). La GAPDH est analysée comme contrôle.

III.3.2.3. Fhit régule la migration et l'invasion

Puisque la modification de l'expression de Fhit affecte la morphologie et la localisation subcellulaire de molécules d'adhérence, l'effet de la modulation de Fhit sur le comportement migratoire des cellules a été analysé dans des tests de migration. Dans un test de migration en deux dimensions, les trajectoires des cellules NCI-H1299-Fhit sont plus courtes et la vitesse de migration est significativement réduite comparée aux cellules NCI-H1299 contrôles. Les trajectoires des cellules HBE4-E6/E7 transfectées avec les siRNAs Fhit sont au contraire plus longues et leur vitesse de migration est significativement plus élevée par rapport aux cellules contrôles ($p < 0,05$) (Figure 36).

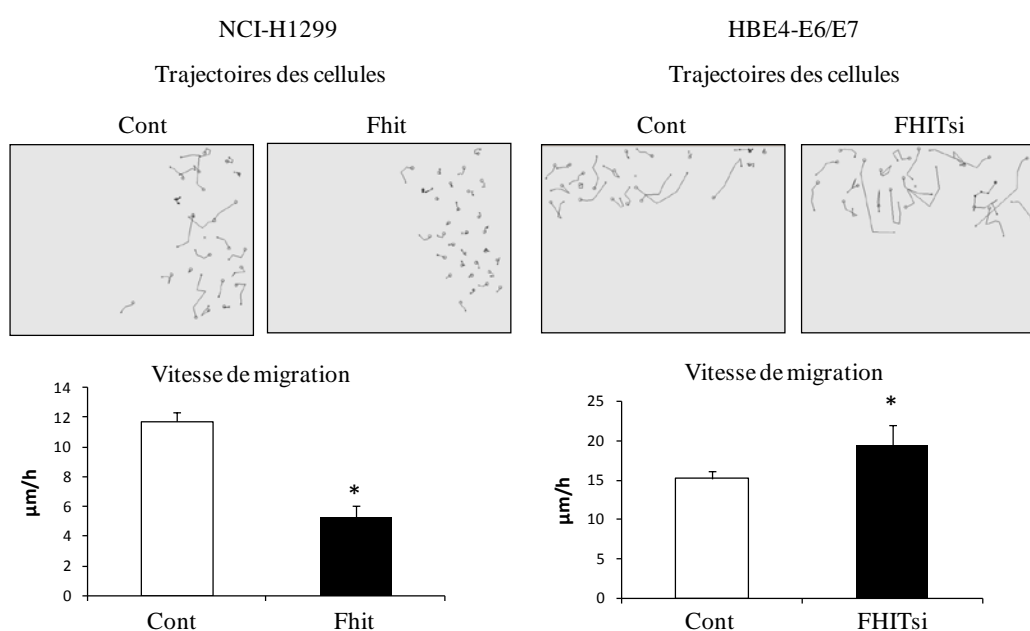


Figure 36 : Fhit régule la migration de cellules tumorales pulmonaires. Comparaison des trajectoires et des vitesses de migration des cellules NCI-H1299 transfectées avec le vecteur vide (NCI-H1299-contrôles) ou l'ADNc de Fhit (NCIH-H1299-Fhit) et des cellules HBE4-E6/E7 transfectées avec les siRNAs contrôles (HBE4-E6/E7 + contrôles) ou les siRNAs Fhit (HBE4-E6/E7 + siRNA Fhit) dans un test de migration en deux dimensions. * $p < 0,05$

Les capacités invasives des différentes cellules transfectées ont également été analysées par tests en chambre de Boyden. Les transfectants NCI-H1299-Fhit sont moins invasifs que les transfectants contrôles, tandis que les transfectants HBE4-E6/E7 siRNA-Fhit sont plus invasifs que les transfectants HBE4-E6/E7-FHITsi (Figure 37A). Nous avons également montré que l'inhibiteur de MMPs GM6001 induit une diminution dose-dépendante des capacités invasives des cellules HBE4-E6/E7 transfectées avec le siRNA-Fhit, démontrant ainsi que ce processus est dépendant de cette famille de protéases (Figure 37B).

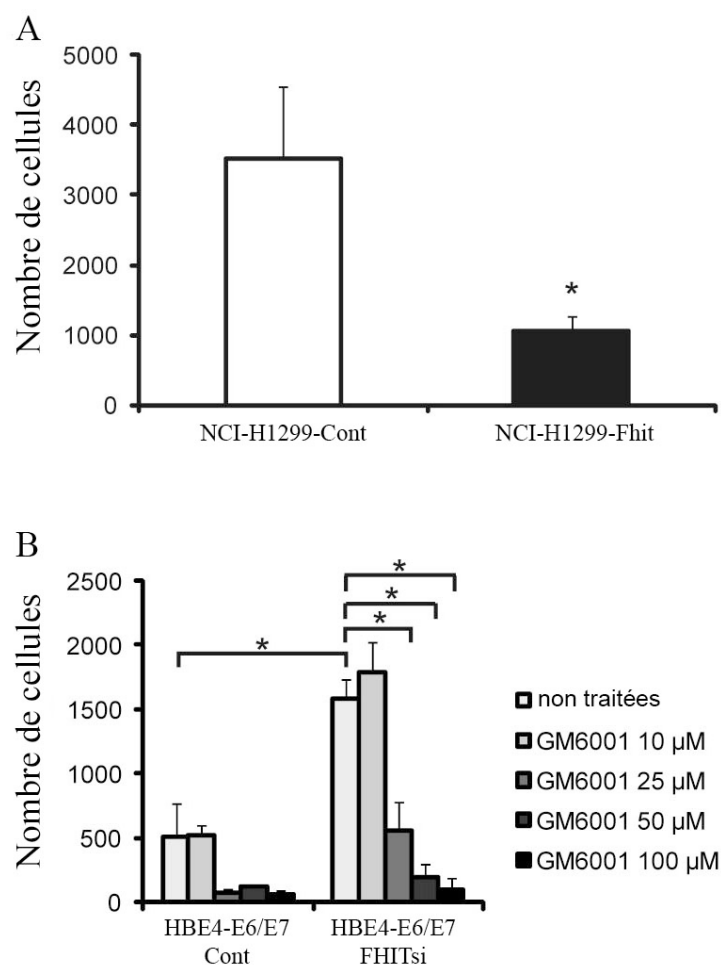


Figure 37 : Fhit régule la capacité invasive des cellules tumorales pulmonaires en chambre de Boyden. (A) Comparaison des propriétés invasives des cellules NCI-H1299 transfectées avec le vecteur vide (NCI-H1299-Cont) ou l'ADNc de Fhit (NCI-H1299-Fhit). (B) Comparaison de propriétés invasives dans des cellules HBE4-E6/E7 transfectées avec les siRNA contrôles (HBE4-E6/E7-Cont) ou les siRNA Fhit (HBE4-E6/E7-FHITSi). Un inhibiteur synthétique des MMP, GM6001, a été utilisé à des doses croissantes (de 10µM à 100µM). * $p < 0,05$

III.3.2.4. Fhit régule l'expression de MMPs et de la vimentine dans des cellules tumorales du poumon.

Comme la modification de l'expression de Fhit influence le comportement migratoire et invasif des cellules d'une manière dépendante des MMPs, nous avons examiné le rôle de Fhit dans la régulation de l'expression de certaines de ces protéases. Nous avons ainsi observé par analyses RT-PCR que les cellules NCI-H1299-Fhit expriment moins d'ARNm de la MMP-2 et de la MMP-9, et que les cellules HBE4-E6/E7 transfectées avec le siRNA-Fhit expriment plus d'ARNm de la MMP-2 et de la MMP-9 que leur contrôle respectif (Figure 38A).

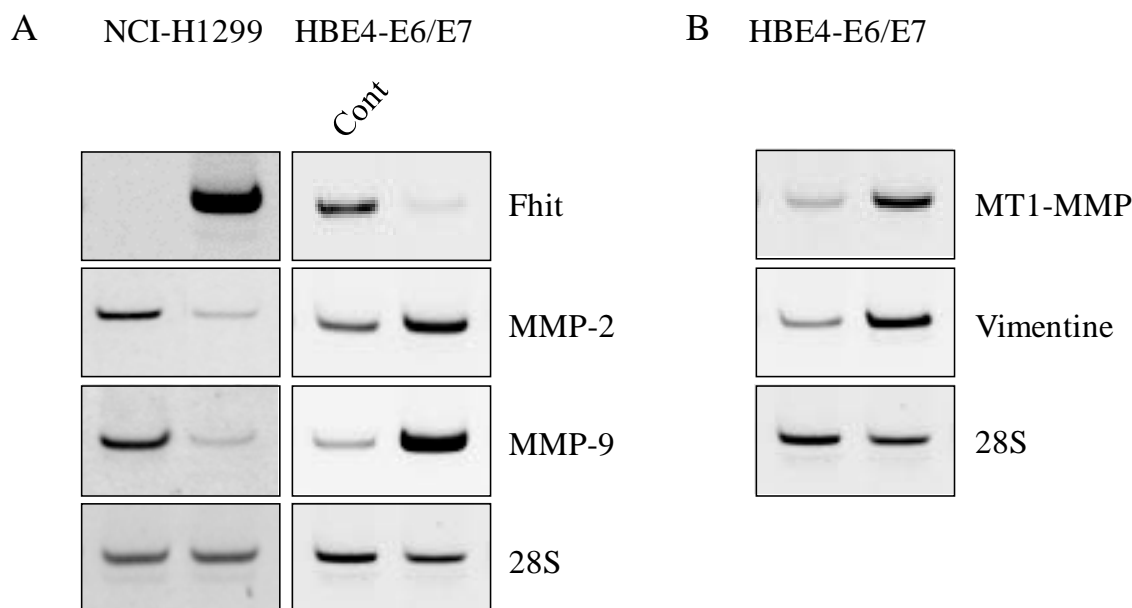


Figure 38 : Fhit régule l'expression de MMPs et de la vimentine dans des cellules tumorales pulmonaires. (A) Analyse par RT-PCR des niveaux des ARNm de Fhit, MMP-2 et MMP-9 dans les cellules NCI-H1299 transfectées avec le vecteur vide (Cont) ou l'ADNc de Fhit (Fhit) (A) et dans des cellules HBE4-E6/E7 transfectées avec lse siRNA contrôles (Cont) ou les siRNA Fhit (FHITsi). (B) Analyse par RT-PCR des niveaux des ARNm de la MT1-MMP et de la vimentine dans des cellules HBE4-E6/E7 transfectées avec les siRNA contrôles (Cont) ou les siRNA Fhit (FHITsi).

La MT1-MMP est également surexprimée au niveau de l'ARNm et de la protéine après inhibition de Fhit dans les cellules HBE4-E6/E7, comme nous le montrons par des analyses RT-PCR (Figure 38B). Nous avons également examiné la régulation potentielle de la vimentine. Nous avons ainsi montré une augmentation de l'expression de la vimentine au niveau de l'ARNm dans les transfectants HBE4-E6/E7 siRNA-Fhit (Figure 38B).

III.3.3. Conclusions et discussion

Dans cette troisième partie, nous avons démontré que Fhit contrôle le phénotype invasif des cellules tumorales pulmonaires.

Ainsi, nous avons montré que :

- une faible expression de Fhit est corrélée à l'invasion tumorale *in vivo* et *in vitro*
- Fhit régule l'adhérence cellulaire
- Fhit régule la migration et l'invasion cellulaires
- Fhit régule l'expression des MMPs ainsi que de la vimentine

Ces résultats démontrent que Fhit module le phénotype invasif de cellules tumorales pulmonaires en régulant l'expression de gènes associés à la transition épithélio-mésenchymateuse.

Dans un premier temps, nous avons démontré que l'expression de Fhit est réduite dans des biopsies de cancers pulmonaires épidermoïdes comparées aux tissus pulmonaires normaux, ce qui peut être attribué au rôle de Fhit en tant que gène suppresseur de tumeur (Pekarsky *et al.* 2002). De plus, sa faible expression est corrélée à l'agressivité tumorale ainsi qu'à l'importance des métastases ganglionnaires et le grade TNM dans les carcinomes épidermoïdes. En plus d'études antérieures rapportant une corrélation entre une faible expression de Fhit, une faible différenciation, la présence de métastases ganglionnaires et une mauvaise espérance de vie (Pylkkanen *et al.* 2002; Maruyama *et al.* 2004; Nakata *et al.* 2006), ces données suggèrent clairement une implication de Fhit dans des étapes tardives de la progression tumorale. Ces données sont en accord avec nos résultats *in vitro* qui montrent une absence d'expression de Fhit dans les lignées tumorales pulmonaires et mammaires hautement invasives. Ainsi, ces résultats *in vivo* et *in vitro* suggèrent que l'inactivation de Fhit est impliquée dans l'invasion tumorale.

Nous avons également montré un rôle fonctionnel de Fhit dans la modulation du phénotype invasif. Ainsi, nous avons démontré que la surexpression de Fhit dans la lignée cellulaire invasive NCI-H1299 et l'inhibition de l'expression de Fhit dans la lignée HBE4-E6/E7 faiblement invasive induit respectivement une diminution et un accroissement des capacités migratoires et invasives. En outre, l'invasion cellulaire induite par l'inhibition de Fhit est dépendante des MMPs. En accord avec ces modifications du comportement cellulaire, nous avons également observé des changements dans la localisation subcellulaire des molécules des jonctions adhérentes et serrées, ainsi qu'une régulation de l'expression de MMPs et de la vimentine. Toutes ces molécules régulées par Fhit sont impliquées dans l'invasion tumorale associée aux processus de TEM (Polette *et al.* 2004; Lee *et al.* 2006; Polette *et al.* 2007; Gavert & Ben Ze'ev 2007; Gavert & Ben Ze'ev 2008).

Bien que les mécanismes par lesquels Fhit régule la TEM dans ces cellules tumorales pulmonaires ne soient pas encore élucidés, sa capacité à réorganiser les complexes d'adhérence cellulaire peut directement contribuer à la modulation des molécules cibles de la TEM tels que les MMPs et la vimentine. En effet, des données de la littérature ont montré que la réexpression de la cadhérine E dans des cellules tumorales invasives répriment l'expression de MMPs probablement via une inhibition de la voie de signalisation caténine- β /TCF (Luo *et al.* 1999; Nawrocki-Raby *et al.* 2003b). En effet, la MT1-MMP est une cible

du complexe caténine- β /TCF, ainsi que la MMP-7 et la MMP-26 (Crawford *et al.* 1999; Brabletz *et al.* 1999; Marchenko *et al.* 2002; Takahashi *et al.* 2002). De plus, les promoteurs des MMP-1, MMP-3 et MMP-9 contiennent des sites de liaison au TCF et sont donc des cibles potentielles des complexes caténine- β /TCF. Des données de notre laboratoire ont également montré que la vimentine est également une cible de la voie caténine- β /TCF (Gilles *et al.* 2003). Par ailleurs, les modulations de localisation de ZO1, induites par Fhit, pourraient également contribuer à médier la régulation des gènes cibles de la TEM. Ainsi, il a été montré que ZO1 régule l'expression de la MT1-MMP dans des cellules tumorales mammaires et que l'activation du promoteur de la MT1-MMP par ZO1 est associée à l'activation de la voie de signalisation caténine- β /TCF (Polette *et al.*, 2005). Par conséquent, le mécanisme par lequel Fhit diminue les capacités invasives de ces cellules pourrait impliquer la voie de signalisation caténine- β /TCF. En accord avec cette hypothèse, Weiske *et al.* ont démontré que Fhit est un répresseur de l'activité transcriptionnelle de la caténine- β . Fhit est en effet capable de s'associer au complexe caténine- β /TCF en liant directement la caténine- β , et réprime l'activité des promoteurs de gènes cibles, tels que la cycline D1, l'axine 2, la survivine et la MT1-MMP (Weiske *et al.* 2007). Toutefois, nous avons décrit ici une régulation de l'expression de la MMP-2 par Fhit. A notre connaissance, le promoteur de la MMP-2 ne contient pas de site de liaison pour le TCF. Ces données suggèrent que Fhit régule le phénotype invasif de ces cellules tumorales par un ou plusieurs autres mécanismes. Ainsi, Fhit réprime l'expression de NF- κ B ainsi que les voies de signalisation PI3K-Akt-survivine et Ras/Rho GTPase, et est une cible de la protéine kinase Src (Pekarsky *et al.* 2004; Nakagawa & Akao 2006; Semba *et al.* 2006; Jayachandran *et al.* 2007).

En conclusion, cette étude démontre que Fhit contrôle le phénotype invasif de cellules tumorales pulmonaires en régulant divers événements clés de la TEM tels que l'adhérence cellulaire et l'expression de MMPs et de la vimentine. Ainsi, Fhit participerait à plusieurs étapes de la progression métastatique. En plus de ses fonctions suppressives sur la croissance tumorale, Fhit serait également un gène suppresseur de l'invasion tumorale.

Conclusions et perspectives

Notre travail a permis de disséquer certains mécanismes liés à l'acquisition de propriétés métastatiques par des cellules épithéliales. Il a en outre abouti à une meilleure compréhension de l'implication fonctionnelle de SIP1 et de Fhit dans la régulation de gènes de la TEM associés aux processus métastatiques tels que ceux de la vimentine, de certaines MMPs et des membres du système plasminogène/plasmine. Nous avons également pu révéler une implication de SIP1 et de Fhit dans la progression métastatique *in vivo*.

Ainsi, les résultats obtenus dans le premier chapitre démontrent une implication du facteur de transcription SIP1 dans la régulation positive de gènes, tels que la vimentine ou certains membres du système plasminogène/plasmine impliqués dans des processus de TEM associés à la migration et l'invasion de cellules épithéliales tumorales. Nous avons également montré que la régulation de la vimentine par SIP1 ne semble pas impliquer la voie de la caténine- β (Bindels *et al.* 2006). L'analyse du potentiel métastatique de SIP1 *in vivo* dans des modèles de souris, en utilisant un système d'imagerie *in vivo* sur petits animaux, a permis de conclure que SIP1 joue un rôle dans la tumorigenèse des cellules tumorales mammaires *in vivo*.

Parallèlement à notre axe de recherche principal, centré sur la régulation de la TEM par SIP1, nous avons également participé à des travaux ayant démontré une implication de Fhit dans le contrôle du phénotype invasif de cellules tumorales pulmonaires en régulant l'expression de gènes associés à la transition épithélio-mésenchymateuse, tels que la vimentine et certaines MMPs (Joannes *et al.* 2009).

Comme cela a été discuté en détails dans le chapitre qui lui est consacré (page 25), au moment où nous avons commencé ce travail, les gènes cibles des facteurs de transcription de la famille Snail et ZEB étaient encore peu connus. Le mécanisme de régulation le plus détaillé était la répression directe de la cadhérine E, un marqueur épithélial de la TEM (Cano *et al.* 2000; Comijn *et al.* 2001; Hajra *et al.* 2002). La régulation positive de marqueurs mésenchymateux par ces facteurs de transcription était encore peu explorée. Ainsi, notre travail a été le premier à démontrer une régulation positive de la vimentine par SIP1 dans des cellules tumorales mammaires. Cette régulation a été confirmée ensuite, par une autre équipe dans des cellules de carcinome épidermoïde (Taki *et al.* 2006). La régulation de PAI-1 par SIP1 n'a toujours pas été observée dans d'autres études, par contre, sa régulation par les

membres de la famille Snail a été démontrée dans cellules tumorales mammaires invasives MDA-MB-231, ainsi que dans des cellules MDCK (Moreno-Bueno *et al.* 2006; Fabre-Guillevin *et al.* 2008). Les résultats de la troisième partie montrent que Fhit peut également réguler des gènes, tels que certaines MMPs, ainsi que la vimentine, des molécules largement inscrites dans le programme de la TEM (Polette *et al.* 2004; Lee *et al.* 2006; Polette *et al.* 2007; Gavert & Ben Ze'ev 2007; Gavert & Ben Ze'ev 2008).

Pris dans leur ensemble avec les données de la littérature, nos résultats identifient donc une série de gènes cibles régulés positivement ou négativement par le facteur SIP1 et le facteur Fhit. Ces gènes incluent la vimentine, la MMP-2, la MMP-9 et la MT1-MMP (Miyoshi *et al.* 2004; Bindels *et al.* 2006; Joannes *et al.* 2009). Au vu de nos données montrant que SIP1 n'active pas la voie de la caténine- β , il serait tentant de postuler que Fhit et SIP1 régulent les gènes cibles de la TEM par des mécanismes différents. Néanmoins, à ce stade de notre travail, nous ne pouvons pas exclure que SIP1, ou d'autres facteurs de transcription de la TEM, puissent être impliqués dans les régulations des gènes de la TEM induites par Fhit. Une régulation de Fhit par SIP1 pourrait également intervenir.

D'une manière générale, nos travaux s'inscrivent dans les données de la littérature qui rapportent aujourd'hui que SIP1 accroît l'invasivité des cellules tumorales dans de nombreux systèmes *in vitro*. Nos données *in vivo*, encore préliminaires, tendent à démontrer un rôle fonctionnel de SIP1 dans la croissance tumorale et la dissémination en souris. Les données *in vivo* de la littérature concernant SIP1 ont en effet, à ce jour, été uniquement collectées sur des biopsies de tumeurs humaines, et montrent que SIP1 est un marqueur de mauvais pronostic majoritairement exprimé dans des tumeurs peu différenciées (Elloul *et al.* 2005; Maeda *et al.* 2005; Imamichi *et al.* 2007; Sayan *et al.* 2009; Yoshihara *et al.* 2009; Yoshida *et al.* 2009; Miura *et al.* 2009).

Nos résultats nous laissent entrevoir de nombreuses perspectives.

Afin de déterminer les mécanismes par lesquels SIP1 régule la vimentine, nous examinerons si SIP1 peut réguler positivement la vimentine en se fixant directement à sa région promotrice. L'identification des sites de fixation de SIP1 au sein du génome par ChipSeq est, par ailleurs, en cours, en collaboration avec Benjamin Koopmansch et le Professeur Rosita Winkler.

Afin d'identifier d'autres mécanismes de régulation et d'autres gènes cibles de la TEM, qui pourraient être modulés par SIP1, nous envisageons également des analyses en microarray des différents transfectants utilisés dans notre étude. En outre, les relations régulatrices qui pourraient exister entre SIP1 et Fhit seront également examinées.

Dans le but de compléter les résultats obtenus *in vivo* en souris, nous effectuerons des analyses histologiques des tumeurs formées, suite à l'injection de nos transfectants SIP1. Nous examinerons particulièrement la prolifération tumorale et l'angiogenèse. En fonction des résultats obtenus, nous envisagerons de tester l'éventuelle implication de PAI-1 dans l'accroissement d'angiogenèse dans la tumeur primaire. En ce qui concerne la formation de métastases, nous rechercherons la présence de cellules tumorales en circulation dans le sang de la souris.

Nous envisageons également d'étudier l'expression de SIP1 en relation avec l'expression de la vimentine et d'autres gènes cibles identifiés dans des biopsies de tumeurs du sein.

La poursuite de ce travail devrait permettre d'aboutir à une meilleure compréhension de l'implication fonctionnelle de SIP1 dans la régulation de gènes impliqués dans les processus métastatiques, mais aussi d'évaluer l'intérêt potentiel de SIP1 en tant que marqueur pronostic ou cible thérapeutique.

Références

- Aigner,K., Dampier,B., Descovich,L., Mikula,M., Sultan,A., Schreiber,M., Mikulits,W., Brabletz,T., Strand,D., Obrist,P., Sommergruber,W., Schweifer,N., Wernitznig,A., Beug,H., Foisner,R. & Eger,A. 2007a. The transcription factor ZEB1 (deltaEF1) promotes tumour cell dedifferentiation by repressing master regulators of epithelial polarity. *Oncogene*, **26**, 6979-6988.
- Aigner,K., Descovich,L., Mikula,M., Sultan,A., Dampier,B., Bonne,S., Van Roy,F., Mikulits,W., Schreiber,M., Brabletz,T., Sommergruber,W., Schweifer,N., Wernitznig,A., Beug,H., Foisner,R. & Eger,A. 2007b. The transcription factor ZEB1 (deltaEF1) represses Plakophilin 3 during human cancer progression. *FEBS Lett.*, **581**, 1617-1624.
- Allen,R.R., Qi,L. & Higgins,P.J. 2005. Upstream stimulatory factor regulates E box-dependent PAI-1 transcription in human epidermal keratinocytes. *J.Cell Physiol*, **203**, 156-165.
- Andl,C.D.& Rustgi,A.K. 2005. No one-way street: cross-talk between e-cadherin and receptor tyrosine kinase (RTK) signaling: a mechanism to regulate RTK activity. *Cancer Biol.Ther.*, **4**, 28-31.
- Andreasen,P.A., Egelund,R. & Petersen,H.H. 2000. The plasminogen activation system in tumor growth, invasion, and metastasis. *Cell Mol.Life Sci.*, **57**, 25-40.
- Andreasen,P.A., Kjoller,L., Christensen,L. & Duffy,M.J. 1997. The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review. *Int.J.Cancer*, **72**, 1-22.
- Anose,B.M., LaGoo,L. & Schwendinger,J. 2008. Characterization of androgen regulation of ZEB-1 and PSA in 22RV1 prostate cancer cells. *Adv.Exp.Med.Biol.*, **617**, 541-546.
- Auerkari,E.I. 2006. Methylation of tumor suppressor genes p16(INK4a), p27(Kip1) and E-cadherin in carcinogenesis. *Oral Oncol.*, **42**, 5-13.
- Badwaik,N.K., Rasweiler,J.J. & Muradali,F. 1998. Co-expression of cytokeratins and vimentin by highly invasive trophoblast in the white-winged vampire bat, *Diaemus youngi*, and the black mastiff bat, *Molossus ater*, with observations on intermediate filament proteins in the decidua and intraplacental trophoblast. *J.Reprod.Fertil.*, **114**, 307-325.
- Bailey,C.K., Misra,S., Mittal,M.K. & Chaudhuri,G. 2007. Human SLUG does not directly bind to CtBP1. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, **353**, 661-664.
- Bajou,K., Masson,V., Gerard,R.D., Schmitt,P.M., Albert,V., Praus,M., Lund,L.R., Frandsen,T.L., Brunner,N., Dano,K., Fusenig,N.E., Weidle,U., Carmeliet,G., Loskutoff,D., Collen,D., Carmeliet,P., Foidart,J.M. & Noel,A.S. 2001. The plasminogen activator inhibitor PAI-1 controls in vivo tumor vascularization by interaction with proteases, not vitronectin: Implications for antiangiogenic strategies. *Journal of Cell Biology*, **152**, 777-784.
- Bajou,K., Noel,A., Gerard,R.D., Masson,V., Brunner,N., Holst-Hansen,C., Skobe,M., Fusenig,N.E., Carmeliet,P., Collen,D. & Foidart,J.M. 1998. Absence of host plasminogen activator inhibitor 1 prevents cancer invasion and vascularization. *Nature Medicine*, **4**, 923-928.
- Bajou,K., Peng,H., Laug,W.E., Maillard,C., Noel,A., Foidart,J.M., Martial,J.A. & DeClerck,Y.A. 2008. Plasminogen activator inhibitor-1 protects endothelial cells from FasL-mediated apoptosis. *Cancer Cell*, **14**, 324-334.
- Barnes,L.D., Garrison,P.N., Siprashvili,Z., Guranowski,A., Robinson,A.K., Ingram,S.W., Croce,C.M., Ohta,M. & Huebner,K. 1996. Fhit, a putative tumor suppressor in humans, is a dinucleoside 5',5''-P1,P3-triphosphate hydrolase. *Biochemistry*, **35**, 11529-11535.
- Barrallo-Gimeno,A.& Nieto,M.A. 2005. The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer. *Development*, **132**, 3151-3161.

- Barrallo-Gimeno,A.& Nieto,M.A. 2009. Evolutionary history of the Snail/Scratch superfamily. *Trends Genet.*, **25**, 248-252.
- Batlle,E., Sancho,E., Franci,C., Dominguez,D., Monfar,M., Baulida,J. & Garcia,D.H. 2000. The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat.Cell Biol.*, **2**, 84-89.
- Beavon,I.R. 2000. The E-cadherin-catenin complex in tumour metastasis: structure, function and regulation. *Eur.J.Cancer*, **36**, 1607-1620.
- Behrens,J., Frixen,U., Schipper,J., Weidner,M. & Birchmeier,W. 1992. Cell adhesion in invasion and metastasis. *Semin.Cell Biol.*, **3**, 169-178.
- Behrens,J., Mareel,M.M., Van Roy,F.M. & Birchmeier,W. 1989. Dissecting tumor cell invasion: epithelial cells acquire invasive properties after the loss of uvomorulin-mediated cell-cell adhesion. *J.Cell Biol.*, **108**, 2435-2447.
- Behrens,J., von Kries,J.P., Kuhl,M., Bruhn,L., Wedlich,D., Grosschedl,R. & Birchmeier,W. 1996. Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature*, **382**, 638-642.
- Beltran,M., Puig,I., Pena,C., Garcia,J.M., Alvarez,A.B., Pena,R., Bonilla,F. & De Herreros,A.G. 2008. A natural antisense transcript regulates Zeb2/Sip1 gene expression during Snail1-induced epithelial-mesenchymal transition. *Genes Dev.*, **22**, 756-769.
- Ben Ze'ev,A.& Geiger,B. 1998. Differential molecular interactions of beta-catenin and plakoglobin in adhesion, signaling and cancer. *Curr.Opin.Cell Biol.*, **10**, 629-639.
- Benjamin,E., Law,S. & Bobrow,L.G. 1987. Intermediate filaments cytokeratin and vimentin in ovarian sex cord-stromal tumours with correlative studies in adult and fetal ovaries. *J.Pathol.*, **152**, 253-263.
- Bermejo-Rodriguez,C., Perez-Caro,M., Perez-Mancera,P.A., Sanchez-Beato,M., Piris,M.A. & Sanchez-Garcia,I. 2006. Mouse cDNA microarray analysis uncovers Slug targets in mouse embryonic fibroblasts. *Genomics*, **87**, 113-118.
- Berx,G., Becker,K.F., Hofler,H. & Van Roy,F. 1998. Mutations of the human E-cadherin (CDH1) gene. *Hum.Mutat.*, **12**, 226-237.
- Berx,G., Raspe,E., Christofori,G., Thiery,J.P. & Sleeman,J.P. 2007. Pre-EMTing metastasis? Recapitulation of morphogenetic processes in cancer. *Clin.Exp.Metastasis*, **24**, 587-597.
- Berx,G.& Van Roy,F. 2001. The E-cadherin/catenin complex: an important gatekeeper in breast cancer tumorigenesis and malignant progression. *Breast Cancer Res.*, **3**, 289-293.
- Bhattacharya,R., Gonzalez,A.M., Debiase,P.J., Trejo,H.E., Goldman,R.D., Flitney,F.W. & Jones,J.C. 2009. Recruitment of vimentin to the cell surface by beta3 integrin and plectin mediates adhesion strength. *J.Cell Sci.*, **122**, 1390-1400.
- Bienz,M. 2005. beta-Catenin: a pivot between cell adhesion and Wnt signalling. *Curr.Biol.*, **15**, R64-R67.
- Biermann,J.C., Holzscheiter,L., Kotzsch,M., Luther,T., Kiechle-Bahat,M., Sweep,F.C., Span,P.N., Schmitt,M. & Magdolen,V. 2008. Quantitative RT-PCR assays for the determination of urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type 1 mRNA in primary tumor tissue of breast cancer patients: comparison to antigen quantification by ELISA. *Int.J.Mol.Med.*, **21**, 251-259.
- Bindels,S., Mestdagt,M., Vandewalle,C., Jacobs,N., Volders,L., Noel,A., Roy,F.V., Berx,G., Foidart,J.M. & Gilles,C. 2006. Regulation of vimentin by SIP1 in human epithelial breast tumor cells. *Oncogene*.
- Binder,B.R.& Mihaly,J. 2008. The plasminogen activator inhibitor "paradox" in cancer. *Immunol.Lett.*, **118**, 116-124.

- Birchmeier,W.& Behrens,J. 1994. Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. *Biochim.Biophys.Acta*, **1198**, 11-26.
- Blanco,M.J., Moreno-Bueno,G., Sarrio,D., Locascio,A., Cano,A., Palacios,J. & Nieto,M.A. 2002. Correlation of Snail expression with histological grade and lymph node status in breast carcinomas. *Oncogene*, **21**, 3241-3246.
- Blehschmidt,K., Kremmer,E., Hollweck,R., Mylonas,I., Hofler,H., Kremer,M. & Becker,K.F. 2007. The E-cadherin repressor snail plays a role in tumor progression of endometrioid adenocarcinomas. *Diagn.Mol.Pathol.*, **16**, 222-228.
- Blehschmidt,K., Sassen,S., Schmalfeldt,B., Schuster,T., Hofler,H. & Becker,K.F. 2008. The E-cadherin repressor Snail is associated with lower overall survival of ovarian cancer patients. *Br.J.Cancer*, **98**, 489-495.
- Bolos,V., Peinado,H., Perez-Moreno,M.A., Fraga,M.F., Esteller,M. & Cano,A. 2003. The transcription factor Slug represses E-cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transitions: a comparison with Snail and E47 repressors. *J.Cell Sci.*, **116**, 499-511.
- Brabletz,T., Jung,A., Dag,S., Hlubek,F. & Kirchner,T. 1999. beta-catenin regulates the expression of the matrix metalloproteinase-7 in human colorectal cancer. *Am.J.Pathol.*, **155**, 1033-1038.
- Bracke,M.E., Van Roy,F.M. & Mareel,M.M. 1996. The E-cadherin/catenin complex in invasion and metastasis. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.*, **213 (Pt 1)**, 123-161.
- Bracken,C.P., Gregory,P.A., Kolesnikoff,N., Bert,A.G., Wang,J., Shannon,M.F. & Goodall,G.J. 2008. A double-negative feedback loop between ZEB1-SIP1 and the microRNA-200 family regulates epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Res.*, **68**, 7846-7854.
- Brannon,M., Gomperts,M., Sumoy,L., Moon,R.T. & Kimelman,D. 1997. A beta-catenin/XTcf-3 complex binds to the siamois promoter to regulate dorsal axis specification in *Xenopus*. *Genes Dev.*, **11**, 2359-2370.
- Brembeck,F.H., Rosario,M. & Birchmeier,W. 2006. Balancing cell adhesion and Wnt signaling, the key role of beta-catenin. *Curr.Opin.Genet.Dev.*, **16**, 51-59.
- Brembeck,F.H., Schwarz-Romond,T., Bakkers,J., Wilhelm,S., Hammerschmidt,M. & Birchmeier,W. 2004. Essential role of BCL9-2 in the switch between beta-catenin's adhesive and transcriptional functions. *Genes Dev.*, **18**, 2225-2230.
- Buley,I.D., Gatter,K.C., Heryet,A. & Mason,D.Y. 1987. Expression of intermediate filament proteins in normal and diseased thyroid glands. *J.Clin.Pathol.*, **40**, 136-142.
- Burk,U., Schubert,J., Wellner,U., Schmalhofer,O., Vincan,E., Spaderna,S. & Brabletz,T. 2008. A reciprocal repression between ZEB1 and members of the miR-200 family promotes EMT and invasion in cancer cells. *EMBO Rep.*, **9**, 582-589.
- Caldeira,J.R., Prando,E.C., Quevedo,F.C., Neto,F.A., Rainho,C.A. & Rogatto,S.R. 2006. CDH1 promoter hypermethylation and E-cadherin protein expression in infiltrating breast cancer. *BMC.Cancer*, **6**, 48.
- Campiglio,M., Bianchi,F., Andriani,F., Sozzi,G., Tagliabue,E., Menard,S. & Roz,L. 2006. Diadenosines as FHIT-ness instructors. *J.Cell Physiol*, **208**, 274-281.
- Cano,A., Perez-Moreno,M.A., Rodrigo,I., Locascio,A., Blanco,M.J., del Barrio,M.G., Portillo,F. & Nieto,M.A. 2000. The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat.Cell Biol.*, **2**, 76-83.
- Castro,A.C., Rosivatz,E., Schott,C., Hollweck,R., Becker,I., Sarbia,M., Carneiro,F. & Becker,K.F. 2007. Slug is overexpressed in gastric carcinomas and may act synergistically with SIP1 and Snail in the down-regulation of E-cadherin. *J.Pathol.*, **211**, 507-515.
- Cavallaro,U., Schaffhauser,B. & Christofori,G. 2002. Cadherins and the tumour progression: is it all in a switch? *Cancer Lett.*, **176**, 123-128.

- Cavallo,R.A., Cox,R.T., Moline,M.M., Roose,J., Polevoy,G.A., Clevers,H., Peifer,M. & Bejsovec,A. 1998. *Drosophila* Tcf and Groucho interact to repress Wingless signalling activity. *Nature*, **395**, 604-608.
- Cavazzoni,A., Petronini,P.G., Galetti,M., Roz,L., Andriani,F., Carbognani,P., Rusca,M., Fumarola,C., Alfieri,R. & Sozzi,G. 2004. Dose-dependent effect of FHIT-inducible expression in Calu-1 lung cancer cell line. *Oncogene*, **23**, 8439-8446.
- Chamberlain,E.M.& Sanders,M.M. 1999. Identification of the novel player deltaEF1 in estrogen transcriptional cascades. *Mol.Cell Biol.*, **19**, 3600-3606.
- Chen,J.H., Vercamer,C., Li,Z., Paulin,D., Vandebunder,B. & Stehelin,D. 1996. PEA3 transactivates vimentin promoter in mammary epithelial and tumor cells. *Oncogene*, **13**, 1667-1675.
- Chen,W.C.& Obrink,B. 1991. Cell-cell contacts mediated by E-cadherin (uvomorulin) restrict invasive behavior of L-cells. *J.Cell Biol.*, **114**, 319-327.
- Cheng,C.W., Wu,P.E., Yu,J.C., Huang,C.S., Yue,C.T., Wu,C.W. & Shen,C.Y. 2001. Mechanisms of inactivation of E-cadherin in breast carcinoma: modification of the two-hit hypothesis of tumor suppressor gene. *Oncogene*, **20**, 3814-3823.
- Chou,Y.H., Skalli,O. & Goldman,R.D. 1997. Intermediate filaments and cytoplasmic networking: new connections and more functions. *Curr.Opin.Cell Biol.*, **9**, 49-53.
- Christoffersen,N.R., Silaharoglu,A., Orom,U.A., Kauppinen,S. & Lund,A.H. 2007. miR-200b mediates post-transcriptional repression of ZFH1B. *RNA*, **13**, 1172-1178.
- Christofori,G.& Semb,H. 1999. The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene. *Trends Biochem.Sci.*, **24**, 73-76.
- Chua,H.L., Bhat-Nakshatri,P., Clare,S.E., Morimiya,A., Badve,S. & Nakshatri,H. 2007. NF-kappaB represses E-cadherin expression and enhances epithelial to mesenchymal transition of mammary epithelial cells: potential involvement of ZEB-1 and ZEB-2. *Oncogene*, **26**, 711-724.
- Clarhaut,J., Gemmill,R.M., Potiron,V.A., Ait-Si-Ali,S., Imbert,J., Drabkin,H.A. & Roche,J. 2009. ZEB-1, a repressor of the semaphorin 3F tumor suppressor gene in lung cancer cells. *Neoplasia*, **11**, 157-166.
- Clarke,E.J.& Allan,V. 2002. Intermediate filaments: vimentin moves in. *Curr.Biol.*, **12**, R596-R598.
- Come,C., Arnoux,V., Bibeau,F. & Savagner,P. 2004. Roles of the transcription factors snail and slug during mammary morphogenesis and breast carcinoma progression. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, **9**, 183-193.
- Come,C., Magnino,F., Bibeau,F., De Santa,B.P., Becker,K.F., Theillet,C. & Savagner,P. 2006. Snail and slug play distinct roles during breast carcinoma progression. *Clin.Cancer Res.*, **12**, 5395-5402.
- Comijn,J., Berx,G., Vermassen,P., Verschuere,K., van Grunsven,L., Bruyneel,E., Mareel,M., Huylebroeck,D. & Van Roy,F. 2001. The two-handed E box binding zinc finger protein SIP1 downregulates E-cadherin and induces invasion. *Mol.Cell*, **7**, 1267-1278.
- Comoglio,P.M., Boccaccio,C. & Trusolino,L. 2003. Interactions between growth factor receptors and adhesion molecules: breaking the rules. *Curr.Opin.Cell Biol.*, **15**, 565-571.
- Conacci-Sorrell,M., Simcha,I., Ben Yedidia,T., Blechman,J., Savagner,P. & Ben Ze'ev,A. 2003. Autoregulation of E-cadherin expression by cadherin-cadherin interactions: the roles of beta-catenin signaling, Slug, and MAPK. *J.Cell Biol.*, **163**, 847-857.
- Conacci-Sorrell,M., Zhurinsky,J. & Ben Ze'ev,A. 2002. The cadherin-catenin adhesion system in signaling and cancer. *J.Clin.Invest*, **109**, 987-991.

- Costantino,M.E., Stearman,R.P., Smith,G.E. & Darling,D.S. 2002. Cell-specific phosphorylation of Zfphep transcription factor. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, **296**, 368-373.
- Cowin,P., Rowlands,T.M. & Hatsell,S.J. 2005. Cadherins and catenins in breast cancer. *Curr.Opin.Cell Biol.*, **17**, 499-508.
- Crawford,H.C., Fingleton,B.M., Rudolph-Owen,L.A., Goss,K.J., Rubinfeld,B., Polakis,P. & Matrisian,L.M. 1999. The metalloproteinase matrilysin is a target of beta-catenin transactivation in intestinal tumors. *Oncogene*, **18**, 2883-2891.
- Danen,E.H., de Vries,T.J., Morandini,R., Ghanem,G.G., Ruiter,D.J. & van Muijen,G.N. 1996. E-cadherin expression in human melanoma. *Melanoma Res.*, **6**, 127-131.
- Davidson,G., Wu,W., Shen,J., Bilic,J., Fenger,U., Stannek,P., Glinka,A. & Niehrs,C. 2005. Casein kinase 1 gamma couples Wnt receptor activation to cytoplasmic signal transduction. *Nature*, **438**, 867-872.
- De Craene,B., Gilbert,B., Stove,C., Bruyneel,E., Van Roy,F. & Bex,G. 2005. The transcription factor snail induces tumor cell invasion through modulation of the epithelial cell differentiation program. *Cancer Res.*, **65**, 6237-6244.
- De Wever,O., Pauwels,P., De Craene,B., Sabbah,M., Emami,S., Redeuilh,G., Gespach,C., Bracke,M. & Bex,G. 2008. Molecular and pathological signatures of epithelial-mesenchymal transitions at the cancer invasion front. *Histochem.Cell Biol.*, **130**, 481-494.
- Debruyne,P., Vermeulen,S. & Mareel,M. 1999. The role of the E-cadherin/catenin complex in gastrointestinal cancer. *Acta Gastroenterol.Belg.*, **62**, 393-402.
- Derynck,R., Zhang,Y. & Feng,X.H. 1998. Smads: transcriptional activators of TGF-beta responses. *Cell*, **95**, 737-740.
- Devy,L., Blacher,S., Grignet-Debrus,C., Bajou,K., Masson,R., Gerard,R.D., Gils,A., Carmeliet,G., Carmeliet,P., Declerck,P.J., Noel,A. & Foidart,J.M. 2002. The pro- or antiangiogenic effect of plasminogen activator inhibitor 1 is dose dependent. *Faseb Journal*, **16**.
- Djabali,K. 1999. Cytoskeletal proteins connecting intermediate filaments to cytoplasmic and nuclear periphery. *Histol.Histopathol.*, **14**, 501-509.
- Dogliani,C., Dell'Orto,P., Coggi,G., Iuzzolino,P., Bontempini,L. & Viale,G. 1987. Choroid plexus tumors. An immunocytochemical study with particular reference to the coexpression of intermediate filament proteins. *Am.J.Pathol.*, **127**, 519-529.
- Dohadwala,M., Yang,S.C., Luo,J., Sharma,S., Batra,R.K., Huang,M., Lin,Y., Goodglick,L., Krysan,K., Fishbein,M.C., Hong,L., Lai,C., Cameron,R.B., Gemmill,R.M., Drabkin,H.A. & Dubinett,S.M. 2006. Cyclooxygenase-2-dependent regulation of E-cadherin: prostaglandin E(2) induces transcriptional repressors ZEB1 and snail in non-small cell lung cancer. *Cancer Res.*, **66**, 5338-5345.
- Domagala,W., Striker,G., Szadowska,A., Dukowicz,A., Harezga,B. & Osborn,M. 1994. p53 protein and vimentin in invasive ductal NOS breast carcinoma-- relationship with survival and sites of metastases. *Eur.J.Cancer*, **30A**, 1527-1534.
- Domagala,W., Wozniak,L., Lasota,J., Weber,K. & Osborn,M. 1990. Vimentin is preferentially expressed in high-grade ductal and medullary, but not in lobular breast carcinomas. *Am.J.Pathol.*, **137**, 1059-1064.
- Dominguez,D., Montserrat-Sentis,B., Virgos-Soler,A., Guaita,S., Grueso,J., Porta,M., Puig,I., Baulida,J., Franci,C. & Garcia,D.H. 2003. Phosphorylation regulates the subcellular location and activity of the snail transcriptional repressor. *Mol.Cell Biol.*, **23**, 5078-5089.
- Duffy,M.J. & Duggan,C. 2004. The urokinase plasminogen activator system: a rich source of tumour markers for the individualised management of patients with cancer. *Clin.Biochem.*, **37**, 541-548.

- Duffy,M.J., McGowan,P.M. & Gallagher,W.M. 2008. Cancer invasion and metastasis: changing views. *J.Pathol.*, **214**, 283-293.
- Dumon,K.R., Ishii,H., Vecchione,A., Trapasso,F., Baldassarre,G., Chakrani,F., Druck,T., Rosato,E.F., Williams,N.N., Baffa,R., During,M.J., Huebner,K. & Croce,C.M. 2001. Fragile histidine triad expression delays tumor development and induces apoptosis in human pancreatic cancer. *Cancer Res.*, **61**, 4827-4836.
- Easwaran,V., Lee,S.H., Inge,L., Guo,L., Goldbeck,C., Garrett,E., Wiesmann,M., Garcia,P.D., Fuller,J.H., Chan,V., Randazzo,F., Gundel,R., Warren,R.S., Escobedo,J., Aukerman,S.L., Taylor,R.N. & Fantl,W.J. 2003. beta-Catenin regulates vascular endothelial growth factor expression in colon cancer. *Cancer Res.*, **63**, 3145-3153.
- Eckes,B., Colucci-Guyon,E., Smola,H., Nodder,S., Babinet,C., Krieg,T. & Martin,P. 2000. Impaired wound healing in embryonic and adult mice lacking vimentin. *J.Cell Sci.*, **113**, 2455-2462.
- Eckes,B., Dogic,D., Colucci-Guyon,E., Wang,N., Maniotis,A., Ingber,D., Merckling,A., Langa,F., Aumailley,M., Delouvee,A., Koteliansky,V., Babinet,C. & Krieg,T. 1998. Impaired mechanical stability, migration and contractile capacity in vimentin-deficient fibroblasts. *J.Cell Sci.*, **111** (Pt 13), 1897-1907.
- Eger,A., Aigner,K., Sonderegger,S., Dampier,B., Oehler,S., Schreiber,M., Berx,G., Cano,A., Beug,H. & Foisner,R. 2005. DeltaEF1 is a transcriptional repressor of E-cadherin and regulates epithelial plasticity in breast cancer cells. *Oncogene*, **24**, 2375-2385.
- Elloul,S., Elstrand,M.B., Nesland,J.M., Trope,C.G., Kvalheim,G., Goldberg,I., Reich,R. & Davidson,B. 2005. Snail, Slug, and Smad-interacting protein 1 as novel parameters of disease aggressiveness in metastatic ovarian and breast carcinoma. *Cancer*, **103**, 1631-1643.
- Escriva,M., Peiro,S., Herranz,N., Villagrasa,P., Dave,N., Montserrat-Sentis,B., Murray,S.A., Franci,C., Gridley,T., Virtanen,I. & Garcia,D.H. 2008. Repression of PTEN phosphatase by Snail1 transcriptional factor during gamma radiation-induced apoptosis. *Mol.Cell Biol.*, **28**, 1528-1540.
- Evans,A.J., Russell,R.C., Roche,O., Burry,T.N., Fish,J.E., Chow,V.W., Kim,W.Y., Saravanan,A., Maynard,M.A., Gervais,M.L., Sufan,R.I., Roberts,A.M., Wilson,L.A., Betten,M., Vandewalle,C., Berx,G., Marsden,P.A., Irwin,M.S., Teh,B.T., Jewett,M.A. & Ohh,M. 2007. VHL promotes E2 box-dependent E-cadherin transcription by HIF-mediated regulation of SIP1 and snail. *Mol.Cell Biol.*, **27**, 157-169.
- Fabre-Guillevin,E., Malo,M., Cartier-Michaud,A., Peinado,H., Moreno-Bueno,G., Vallee,B., Lawrence,D.A., Palacios,J., Cano,A., Barlovatz-Meimon,G. & Charriere-Bertrand,C. 2008. PAI-1 and functional blockade of SNAI1 in breast cancer cell migration. *Breast Cancer Res.*, **10**, R100.
- Fata,J.E., Werb,Z. & Bissell,M.J. 2004. Regulation of mammary gland branching morphogenesis by the extracellular matrix and its remodeling enzymes. *Breast Cancer Res.*, **6**, 1-11.
- Fodde,R. & Brabletz,T. 2007. Wnt/beta-catenin signaling in cancer stemness and malignant behavior. *Curr.Opin.Cell Biol.*, **19**, 150-158.
- Friedl,P. 2004. Preshpecification and plasticity: shifting mechanisms of cell migration. *Curr.Opin.Cell Biol.*, **16**, 14-23.
- Frixen,U.H., Behrens,J., Sachs,M., Eberle,G., Voss,B., Warda,A., Lochner,D. & Birchmeier,W. 1991. E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. *J.Cell Biol.*, **113**, 173-185.
- Fuchs,I.B., Lichtenegger,W., Buehler,H., Henrich,W., Stein,H., Kleine-Tebbe,A. & Schaller,G. 2002. The prognostic significance of epithelial-mesenchymal transition in breast cancer. *Anticancer Res.*, **22**, 3415-3419.
- Fujita,N., Jaye,D.L., Kajita,M., Geigerman,C., Moreno,C.S. & Wade,P.A. 2003. MTA3, a Mi-2/NuRD complex subunit, regulates an invasive growth pathway in breast cancer. *Cell*, **113**, 207-219.

- Funahashi,J., Sekido,R., Murai,K., Kamachi,Y. & Kondoh,H. 1993. Delta-crystallin enhancer binding protein delta EF1 is a zinc finger-homeodomain protein implicated in postgastrulation embryogenesis. *Development*, **119**, 433-446.
- Gatter,K.C., Dunnill,M.S., van Muijen,G.N. & Mason,D.Y. 1986. Human lung tumours may coexpress different classes of intermediate filaments. *J.Clin.Pathol.*, **39**, 950-954.
- Gavert,N.& Ben Ze'ev,A. 2007. beta-Catenin signaling in biological control and cancer. *J.Cell Biochem.*, **102**, 820-828.
- Gavert,N.& Ben Ze'ev,A. 2008. Epithelial-mesenchymal transition and the invasive potential of tumors. *Trends Mol.Med.*, **14**, 199-209.
- Gavert,N., Sheffer,M., Raveh,S., Spaderna,S., Shtutman,M., Brabletz,T., Barany,F., Paty,P., Notterman,D., Domany,E. & Ben Ze'ev,A. 2007. Expression of L1-CAM and ADAM10 in human colon cancer cells induces metastasis. *Cancer Res.*, **67**, 7703-7712.
- Georgatos,S.D.& Blobel,G. 1987. Lamin B constitutes an intermediate filament attachment site at the nuclear envelope. *J.Cell Biol.*, **105**, 117-125.
- Gerashchenko,M.V., Chernovivanenko,I.S., Moldaver,M.V. & Minin,A.A. 2009. Dynein is a motor for nuclear rotation while vimentin IFs is a "brake". *Cell Biol.Int.*, **33**, 1057-1064.
- Giannelli,G., Bergamini,C., Fransvea,E., Sgarra,C. & Antonaci,S. 2005. Laminin-5 with transforming growth factor-beta1 induces epithelial to mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, **129**, 1375-1383.
- Giles,R.H., van Es,J.H. & Clevers,H. 2003. Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochim.Biophys.Acta*, **1653**, 1-24.
- Gilles, C., Newgreen, D., Sato, H., and Thompson, E. W. Matrix Metalloproteases and Epithelial-to-Mesenchymal Transition: Implications for Carcinoma Metastasis. In: Rise and Fall of Epithelial Phenotype. Savagner P (Ed). Eurekah.com and Kluwer Academic/Plenum Publishers: Chapter 2. 2004.
Ref Type: Generic
- Gilles,C., Piette,J., Peter,W., Fusenig,N.E. & Foidart,J.M. 1994a. Differentiation ability and oncogenic potential of HPV-33- and HPV-33 + ras-transfected keratinocytes. *Int.J.Cancer*, **58**, 847-854.
- Gilles,C., Polette,M., Birembaut,P., Brunner,N. & Thompson,E.W. 1997. Expression of c-ets-1 mRNA is associated with an invasive, EMT-derived phenotype in breast carcinoma cell lines. *Clin.Exp.Metastasis*, **15**, 519-526.
- Gilles,C., Polette,M., Mestdagt,M., Nawrocki-Raby,B., Ruggeri,P., Birembaut,P. & Foidart,J.M. 2003. Transactivation of vimentin by beta-catenin in human breast cancer cells. *Cancer Res.*, **63**, 2658-2664.
- Gilles,C., Polette,M., Piette,J., Birembaut,P. & Foidart,J.M. 1994b. Epithelial-to-mesenchymal transition in HPV-33-transfected cervical keratinocytes is associated with increased invasiveness and expression of gelatinase A. *Int.J.Cancer*, **59**, 661-666.
- Gilles,C., Polette,M., Piette,J., Delvigne,A.C., Thompson,E.W., Foidart,J.M. & Birembaut,P. 1996. Vimentin expression in cervical carcinomas: association with invasive and migratory potential. *J.Pathol.*, **180**, 175-180.
- Gilles,C., Polette,M., Zahm,J.M., Tournier,J.M., Volders,L., Foidart,J.M. & Birembaut,P. 1999. Vimentin contributes to human mammary epithelial cell migration. *J.Cell Sci.*, **112 (Pt 24)**, 4615-4625.
- Gilles,C.& Thompson,E.W. 1996. The epithelial to mesenchymal transition and metastatic progression in carcinoma. *The Breast J.*, **2**, 83-96.

- Goldman,R.D., Goldman,A.E., Green,K.J., Jones,J.C., Jones,S.M. & Yang,H.Y. 1986. Intermediate filament networks: organization and possible functions of a diverse group of cytoskeletal elements. *J.Cell Sci.Suppl*, **5**, 69-97.
- Gonzales,M., Weksler,B., Tsuruta,D., Goldman,R.D., Yoon,K.J., Hopkinson,S.B., Flitney,F.W. & Jones,J.C. 2001. Structure and function of a vimentin-associated matrix adhesion in endothelial cells. *Mol.Biol.Cell*, **12**, 85-100.
- Gottardi,C.J., Wong,E. & Gumbiner,B.M. 2001. E-cadherin suppresses cellular transformation by inhibiting beta-catenin signaling in an adhesion-independent manner. *J.Cell Biol.*, **153**, 1049-1060.
- Gotzmann,J., Mario,M., Eger,A., Schulte-Hermann,R., Foisner,R., Beug,H. & Mikulits,W. 2004. Molecular aspects of epithelial cell plasticity: implications for local tumor invasion and metastasis. *Mutation Research-Reviews in Mutation Research*, **566**, 9-20.
- Gradi,D., Kuhl,M. & Wedlich,D. 1999. The Wnt/Wg signal transducer beta-catenin controls fibronectin expression. *Mol.Cell Biol.*, **19**, 5576-5587.
- Grady,W.M., Willis,J., Guilford,P.J., Dunbier,A.K., Toro,T.T., Lynch,H., Wiesner,G., Ferguson,K., Eng,C., Park,J.G., Kim,S.J. & Markowitz,S. 2000. Methylation of the CDH1 promoter as the second genetic hit in hereditary diffuse gastric cancer. *Nat.Genet.*, **26**, 16-17.
- Graff,J.R., Gabrielson,E., Fujii,H., Baylin,S.B. & Herman,J.G. 2000. Methylation patterns of the E-cadherin 5' CpG island are unstable and reflect the dynamic, heterogeneous loss of E-cadherin expression during metastatic progression. *J.Biol.Chem.*, **275**, 2727-2732.
- Graham,T.R., Zhau,H.E., Odero-Marah,V.A., Osunkoya,A.O., Kimbro,K.S., Tighiouart,M., Liu,T., Simons,J.W. & O'Regan,R.M. 2008. Insulin-like growth factor-I-dependent up-regulation of ZEB1 drives epithelial-to-mesenchymal transition in human prostate cancer cells. *Cancer Res.*, **68**, 2479-2488.
- Green,K.J., Bohringer,M., Gocken,T. & Jones,J.C. 2005. Intermediate filament associated proteins. *Adv.Protein Chem.*, **70**, 143-202.
- Green,K.J.& Goldman,R.D. 1986. Evidence for an interaction between the cell surface and intermediate filaments in cultured fibroblasts. *Cell Motil.Cytoskeleton*, **6**, 389-405.
- Gregory,P.A., Bert,A.G., Paterson,E.L., Barry,S.C., Tsykin,A., Farshid,G., Vadas,M.A., Khew-Goodall,Y. & Goodall,G.J. 2008. The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. *Nat.Cell Biol.*, **10**, 593-601.
- Grooteclaes,M.L.& Frisch,S.M. 2000. Evidence for a function of CtBP in epithelial gene regulation and anoikis. *Oncogene*, **19**, 3823-3828.
- Guaita,S., Puig,I., Franci,C., Garrido,M., Dominguez,D., Batlle,E., Sancho,E., Dedhar,S., De Herreros,A.G. & Baulida,J. 2002. Snail induction of epithelial to mesenchymal transition in tumor cells is accompanied by MUC1 repression and ZEB1 expression. *J.Biol.Chem.*, **277**, 39209-39216.
- Guarino,M. 1995. Epithelial-to-mesenchymal change of differentiation. From embryogenetic mechanism to pathological patterns. *Histol.Histopathol.*, **10**, 171-184.
- Guarino,M., Rubino,B. & Ballabio,G. 2007. The role of epithelial-mesenchymal transition in cancer pathology. *Pathology*, **39**, 305-318.
- Gurland,G.& Gundersen,G.G. 1995. Stable, detyrosinated microtubules function to localize vimentin intermediate filaments in fibroblasts. *J.Cell Biol.*, **131**, 1275-1290.
- Hajra,K.M., Chen,D.Y. & Fearon,E.R. 2002. The SLUG zinc-finger protein represses E-cadherin in breast cancer. *Cancer Res.*, **62**, 1613-1618.

- Harbeck,N., Kates,R.E., Gauger,K., Willems,A., Kiechle,M., Magdolen,V. & Schmitt,M. 2004. Urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its inhibitor PAI-I: novel tumor-derived factors with a high prognostic and predictive impact in breast cancer. *Thromb.Haemost.*, **91**, 450-456.
- Harris,T.J.& Peifer,M. 2005. Decisions, decisions: beta-catenin chooses between adhesion and transcription. *Trends Cell Biol.*, **15**, 234-237.
- Hartsock,A.& Nelson,W.J. 2008. Adherens and tight junctions: structure, function and connections to the actin cytoskeleton. *Biochim.Biophys.Acta*, **1778**, 660-669.
- Hay,E.D. 1995. An overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Acta Anat.(Basel)*, **154**, 8-20.
- He,T.C., Sparks,A.B., Rago,C., Hermeking,H., Zawel,L., da Costa,L.T., Morin,P.J., Vogelstein,B. & Kinzler,K.W. 1998. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science*, **281**, 1509-1512.
- He,X., Semenov,M., Tamai,K. & Zeng,X. 2004. LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/beta-catenin signaling: arrows point the way. *Development*, **131**, 1663-1677.
- Hecht,A.& Kemler,R. 2000. Curbing the nuclear activities of beta-catenin. Control over Wnt target gene expression. *EMBO Rep.*, **1**, 24-28.
- Helfand,B.T., Chang,L. & Goldman,R.D. 2004. Intermediate filaments are dynamic and motile elements of cellular architecture. *J.Cell Sci.*, **117**, 133-141.
- Hemavathy,K., Ashraf,S.I. & Ip,Y.T. 2000. Snail/slugg family of repressors: slowly going into the fast lane of development and cancer. *Gene*, **257**, 1-12.
- Hendrix,M.J., Seftor,E.A., Chu,Y.W., Trevor,K.T. & Seftor,R.E. 1996. Role of intermediate filaments in migration, invasion and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.*, **15**, 507-525.
- Hendrix,M.J., Seftor,E.A., Seftor,R.E. & Trevor,K.T. 1997. Experimental co-expression of vimentin and keratin intermediate filaments in human breast cancer cells results in phenotypic interconversion and increased invasive behavior. *Am.J.Pathol.*, **150**, 483-495.
- Herrmann,H.& Aebi,U. 2004. Intermediate filaments: molecular structure, assembly mechanism, and integration into functionally distinct intracellular Scaffolds. *Annu.Rev.Biochem.*, **73**, 749-789.
- Herrmann,H., Strelkov,S.V., Burkhard,P. & Aebi,U. 2009. Intermediate filaments: primary determinants of cell architecture and plasticity. *J.Clin.Invest*, **119**, 1772-1783.
- Hildenbrand,R., Schaaf,A., Dorn-Beineke,A., Allgayer,H., Sutterlin,M., Marx,A. & Stroebel,P. 2009. Tumor stroma is the predominant uPA-, uPAR-, PAI-1-expressing tissue in human breast cancer: prognostic impact. *Histol.Histopathol.*, **24**, 869-877.
- Hirohashi,S. 1998. Inactivation of the E-cadherin-mediated cell adhesion system in human cancers. *Am.J.Pathol.*, **153**, 333-339.
- Hlubek,F., Jung,A., Kotzor,N., Kirchner,T. & Brabletz,T. 2001. Expression of the invasion factor laminin gamma2 in colorectal carcinomas is regulated by beta-catenin. *Cancer Res.*, **61**, 8089-8093.
- Hlubek,F., Spaderna,S., Jung,A., Kirchner,T. & Brabletz,T. 2004. Beta-catenin activates a coordinated expression of the proinvasive factors laminin-5 gamma2 chain and MT1-MMP in colorectal carcinomas. *Int.J.Cancer*, **108**, 321-326.
- Homan,S.M., Martinez,R., Benware,A. & LaFlamme,S.E. 2002. Regulation of the association of alpha 6 beta 4 with vimentin intermediate filaments in endothelial cells. *Exp.Cell Res.*, **281**, 107-114.
- Hou,B., Eren,M., Painter,C.A., Covington,J.W., Dixon,J.D., Schoenhard,J.A. & Vaughan,D.E. 2004. Tumor necrosis factor alpha activates the human plasminogen activator inhibitor-1 gene through a distal nuclear factor kappaB site. *J.Biol.Chem.*, **279**, 18127-18136.

- Howe,L.R.& Brown,A.M. 2004. Wnt signaling and breast cancer. *Cancer Biol.Theer.*, **3**, 36-41.
- Hu,M., Xia,M., Chen,X., Lin,Z., Xu,Y., Ma,Y. & Su,L. 2009. MicroRNA-141 Regulates Smad Interacting Protein 1 (SIP1) and Inhibits Migration and Invasion of Colorectal Cancer Cells. *Dig.Dis.Sci.*
- Huang,D.& Du,X. 2008. Crosstalk between tumor cells and microenvironment via Wnt pathway in colorectal cancer dissemination. *World J.Gastroenterol.*, **14**, 1823-1827.
- Huber,A.H., Nelson,W.J. & Weis,W.I. 1997. Three-dimensional structure of the armadillo repeat region of beta-catenin. *Cell*, **90**, 871-882.
- Huber,A.H., Stewart,D.B., Laurents,D.V., Nelson,W.J. & Weis,W.I. 2001. The cadherin cytoplasmic domain is unstructured in the absence of beta-catenin. A possible mechanism for regulating cadherin turnover. *J.Biol.Chem.*, **276**, 12301-12309.
- Huebner,K.& Croce,C.M. 2003. Cancer and the FRA3B/FHIT fragile locus: it's a HIT. *Br.J.Cancer*, **88**, 1501-1506.
- Hurlstone,A.& Clevers,H. 2002. T-cell factors: turn-ons and turn-offs. *EMBO J.*, **21**, 2303-2311.
- Hurteau,G.J., Carlson,J.A., Spivack,S.D. & Brock,G.J. 2007. Overexpression of the microRNA hsa-miR-200c leads to reduced expression of transcription factor 8 and increased expression of E-cadherin. *Cancer Res.*, **67**, 7972-7976.
- Ikegawa,S., Saida,T., Takizawa,Y., Tokuda,Y., Ito,T., Fujioka,F., Sakaki,T., Uchida,N., Arase,S. & Takeda,K. 1989. Vimentin-positive squamous cell carcinoma arising in a burn scar. A highly malignant neoplasm composed of acantholytic round keratinocytes. *Arch.Dermatol.*, **125**, 1672-1676.
- Ikenouchi,J., Matsuda,M., Furuse,M. & Tsukita,S. 2003. Regulation of tight junctions during the epithelium-mesenchyme transition: direct repression of the gene expression of claudins/occludin by Snail. *J.Cell Sci.*, **116**, 1959-1967.
- Imai,T., Horiuchi,A., Wang,C., Oka,K., Ohira,S., Nikaido,T. & Konishi,I. 2003. Hypoxia attenuates the expression of E-cadherin via up-regulation of SNAIL in ovarian carcinoma cells. *Am.J.Pathol.*, **163**, 1437-1447.
- Imamichi,Y., Konig,A., Gress,T. & Menke,A. 2007. Collagen type I-induced Smad-interacting protein 1 expression downregulates E-cadherin in pancreatic cancer. *Oncogene*, **26**, 2381-2385.
- Ishii,H., Dumon,K.R., Vecchione,A., Fong,L.Y., Baffa,R., Huebner,K. & Croce,C.M. 2001. Potential cancer therapy with the fragile histidine triad gene: review of the preclinical studies. *JAMA*, **286**, 2441-2449.
- Isohata,N., Aoyagi,K., Mabuchi,T., Daiko,H., Fukaya,M., Ohta,H., Ogawa,K., Yoshida,T. & Sasaki,H. 2009. Hedgehog and epithelial-mesenchymal transition signaling in normal and malignant epithelial cells of the esophagus. *Int.J.Cancer*, **125**, 1212-1221.
- Itzkowitz,S.H., Jandorf,L., Brand,R., Rabeneck,L., Schroy,P.C., III, Sontag,S., Johnson,D., Skoletsky,J., Durkee,K., Markowitz,S. & Shuber,A. 2007. Improved fecal DNA test for colorectal cancer screening. *Clin.Gastroenterol.Hepatol.*, **5**, 111-117.
- Izawa,I.& Inagaki,M. 2006. Regulatory mechanisms and functions of intermediate filaments: a study using site- and phosphorylation state-specific antibodies. *Cancer Sci.*, **97**, 167-174.
- Jayachandran,G., Sazaki,J., Nishizaki,M., Xu,K., Girard,L., Minna,J.D., Roth,J.A. & Ji,L. 2007. Fragile histidine triad-mediated tumor suppression of lung cancer by targeting multiple components of the Ras/Rho GTPase molecular switch. *Cancer Res.*, **67**, 10379-10388.
- Jeanes,A., Gottardi,C.J. & Yap,A.S. 2008. Cadherins and cancer: how does cadherin dysfunction promote tumor progression? *Oncogene*, **27**, 6920-6929.

- Jechlinger,M., Grunert,S. & Beug,H. 2002. Mechanisms in epithelial plasticity and metastasis: insights from 3D cultures and expression profiling. *J.Mammary.Gland.Biol.Neoplasia.*, **7**, 415-432.
- Ji,L., Fang,B., Yen,N., Fong,K., Minna,J.D. & Roth,J.A. 1999. Induction of apoptosis and inhibition of tumorigenicity and tumor growth by adenovirus vector-mediated fragile histidine triad (FHIT) gene overexpression. *Cancer Res.*, **59**, 3333-3339.
- Jiang,W.G. 1996. E-cadherin and its associated protein catenins, cancer invasion and metastasis. *Br.J.Surg.*, **83**, 437-446.
- Jiang,W.G.& Mansel,R.E. 2000. E-cadherin complex and its abnormalities in human breast cancer. *Surg.Oncol.*, **9**, 151-171.
- Jiao,W., Miyazaki,K. & Kitajima,Y. 2002. Inverse correlation between E-cadherin and Snail expression in hepatocellular carcinoma cell lines in vitro and in vivo. *Br.J.Cancer*, **86**, 98-101.
- Joannes,A., Bonnomet,A., Bindels,S., Polette,M., Gilles,C., Burlet,H., Cutrona,J., Zahm,J.M., Birembaut,P. & Nawrocki-Raby,B. 2009. Fhit regulates invasion of lung tumor cells. *Oncogene*.
- Jones,P.A.& Laird,P.W. 1999. Cancer epigenetics comes of age. *Nat.Genet.*, **21**, 163-167.
- Jorda,M., Olmeda,D., Vinyals,A., Valero,E., Cubillo,E., Llorens,A., Cano,A. & Fabra,A. 2005. Upregulation of MMP-9 in MDCK epithelial cell line in response to expression of the Snail transcription factor. *J.Cell Sci.*, **118**, 3371-3385.
- Kajita,M., McClinic,K.N. & Wade,P.A. 2004. Aberrant expression of the transcription factors snail and slug alters the response to genotoxic stress. *Mol.Cell Biol.*, **24**, 7559-7566.
- Kalluri,R.& Weinberg,R.A. 2009. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J.Clin.Invest*, **119**, 1420-1428.
- Katoh,M. 2005. Epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer (Review). *Int.J.Oncol.*, **27**, 1677-1683.
- Katoh,M.& Katoh,M. 2003. Identification and characterization of human SNAIL3 (SNAI3) gene in silico. *Int.J.Mol.Med.*, **11**, 383-388.
- Kemler,R. 1993. From cadherins to catenins: cytoplasmic protein interactions and regulation of cell adhesion. *Trends Genet.*, **9**, 317-321.
- Kim,K.K., Kugler,M.C., Wolters,P.J., Robillard,L., Galvez,M.G., Brumwell,A.N., Sheppard,D. & Chapman,H.A. 2006. Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops in vivo during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **103**, 13180-13185.
- Kitamura,Y.H., Shirahata,A., Sakata,M., Goto,T., Mizukami,H., Saito,M., Ishibashi,K., Kigawa,G., Nemoto,H., Sanada,Y. & Hibi,K. 2009. Frequent methylation of Vimentin in well-differentiated gastric carcinoma. *Anticancer Res.*, **29**, 2227-2229.
- Klymkowsky,M.W., Bachant,J.B. & Domingo,A. 1989. Functions of intermediate filaments. *Cell Motil.Cytoskeleton*, **14**, 309-331.
- Knudsen,K.A.& Wheelock,M.J. 2005. Cadherins and the mammary gland. *J.Cell Biochem.*, **95**, 488-496.
- Kokudo,T., Suzuki,Y., Yoshimatsu,Y., Yamazaki,T., Watabe,T. & Miyazono,K. 2008. Snail is required for TGFbeta-induced endothelial-mesenchymal transition of embryonic stem cell-derived endothelial cells. *J.Cell Sci.*, **121**, 3317-3324.
- Korinek,V., Barker,N., Morin,P.J., van Wichen,D., de Weger,R., Kinzler,K.W., Vogelstein,B. & Clevers,H. 1997. Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC-/- colon carcinoma. *Science*, **275**, 1784-1787.

- Korpai,M., Lee,E.S., Hu,G. & Kang,Y. 2008. The miR-200 family inhibits epithelial-mesenchymal transition and cancer cell migration by direct targeting of E-cadherin transcriptional repressors ZEB1 and ZEB2. *J.Biol.Chem.*, **283**, 14910-14914.
- Korsching,E., Packeisen,J., Liedtke,C., Hungermann,D., Wulfing,P., van Diest,P.J., Brandt,B., Boecker,W. & Buerger,H. 2005. The origin of vimentin expression in invasive breast cancer: epithelial-mesenchymal transition, myoepithelial histogenesis or histogenesis from progenitor cells with bilinear differentiation potential? *J.Pathol.*, **206**, 451-457.
- Kreis,S., Schonfeld,H.J., Melchior,C., Steiner,B. & Kieffer,N. 2005. The intermediate filament protein vimentin binds specifically to a recombinant integrin alpha2/beta1 cytoplasmic tail complex and co-localizes with native alpha2/beta1 in endothelial cell focal adhesions. *Exp.Cell Res.*, **305**, 110-121.
- Krishnamachary,B., Zagzag,D., Nagasawa,H., Rainey,K., Okuyama,H., Baek,J.H. & Semenza,G.L. 2006. Hypoxia-inducible factor-1-dependent repression of E-cadherin in von Hippel-Lindau tumor suppressor-null renal cell carcinoma mediated by TCF3, ZFHX1A, and ZFHX1B. *Cancer Res.*, **66**, 2725-2731.
- Kudo-Saito,C., Shirako,H., Takeuchi,T. & Kawakami,Y. 2009. Cancer metastasis is accelerated through immunosuppression during Snail-induced EMT of cancer cells. *Cancer Cell*, **15**, 195-206.
- Kuphal,F.& Behrens,J. 2006. E-cadherin modulates Wnt-dependent transcription in colorectal cancer cells but does not alter Wnt-independent gene expression in fibroblasts. *Exp.Cell Res.*, **312**, 457-467.
- Kuphal,S., Poser,I., Jobin,C., Hellerbrand,C. & Bosserhoff,A.K. 2004. Loss of E-cadherin leads to upregulation of NFkappaB activity in malignant melanoma. *Oncogene*, **23**, 8509-8519.
- Kurrey,N.K., K A & Bapat,S.A. 2005. Snail and Slug are major determinants of ovarian cancer invasiveness at the transcription level. *Gynecol.Oncol.*, **97**, 155-165.
- Kusinska,R.U., Kordek,R., Pluciennik,E., Bednarek,A.K., Piekarski,J.H. & Potemski,P. 2009. Does vimentin help to delineate the so-called 'basal type breast cancer'? *J.Exp.Clin.Cancer Res.*, **28**, 118.
- Lacroix,M.& Leclercq,G. 2004. Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update. *Breast Cancer Res.Treat.*, **83**, 249-289.
- Lang,S.H., Hyde,C., Reid,I.N., Hitchcock,I.S., Hart,C.A., Bryden,A.A., Villette,J.M., Stower,M.J. & Maitland,N.J. 2002. Enhanced expression of vimentin in motile prostate cell lines and in poorly differentiated and metastatic prostate carcinoma. *Prostate*, **52**, 253-263.
- Lazarova,D.L., Bordonaro,M. & Sartorelli,A.C. 2001. Transcriptional regulation of the vitamin D(3) receptor gene by ZEB. *Cell Growth Differ.*, **12**, 319-326.
- Lee,J.M., Dedhar,S., Kalluri,R. & Thompson,E.W. 2006. The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *J.Cell Biol.*, **172**, 973-981.
- Leung,C.L., Green,K.J. & Liem,R.K. 2002. Plakins: a family of versatile cytolinker proteins. *Trends Cell Biol.*, **12**, 37-45.
- Levy,L., Neuveut,C., Renard,C.A., Charneau,P., Branchereau,S., Gauthier,F., Van Nhieu,J.T., Cherqui,D., Petit-Bertron,A.F., Mathieu,D. & Buendia,M.A. 2002. Transcriptional activation of interleukin-8 by beta-catenin-Tcf4. *J.Biol.Chem.*, **277**, 42386-42393.
- Li,Y.& Bu,G. 2005. LRP5/6 in Wnt signaling and tumorigenesis. *Future.Oncol.*, **1**, 673-681.
- Li,Y., VandenBoom,T.G., Kong,D., Wang,Z., Ali,S., Philip,P.A. & Sarkar,F.H. 2009. Up-regulation of miR-200 and let-7 by natural agents leads to the reversal of epithelial-to-mesenchymal transition in gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells. *Cancer Res.*, **69**, 6704-6712.
- Lilien,J.& Balsamo,J. 2005. The regulation of cadherin-mediated adhesion by tyrosine phosphorylation/dephosphorylation of beta-catenin. *Curr.Opin.Cell Biol.*, **17**, 459-465.

- Lin,S.Y.& Elledge,S.J. 2003. Multiple tumor suppressor pathways negatively regulate telomerase. *Cell*, **113**, 881-889.
- Lochter,A., Galosy,S., Muschler,J., Freedman,N., Werb,Z. & Bissell,M.J. 1997. Matrix metalloproteinase stromelysin-1 triggers a cascade of molecular alterations that leads to stable epithelial-to-mesenchymal conversion and a premalignant phenotype in mammary epithelial cells. *J.Cell Biol.*, **139**, 1861-1872.
- Lombaerts,M., van Wezel,T., Philippo,K., Dierssen,J.W., Zimmerman,R.M., Oosting,J., van Eijk,R., Eilers,P.H., van de,W.B., Cornelisse,C.J. & Cleton-Jansen,A.M. 2006. E-cadherin transcriptional downregulation by promoter methylation but not mutation is related to epithelial-to-mesenchymal transition in breast cancer cell lines. *Br.J.Cancer*, **94**, 661-671.
- Long,J., Zuo,D. & Park,M. 2005. Pc2-mediated sumoylation of Smad-interacting protein 1 attenuates transcriptional repression of E-cadherin. *J.Biol.Chem.*, **280**, 35477-35489.
- Lu,Z.& Hunter,T. 2004. Wnt-independent beta-catenin transactivation in tumor development. *Cell Cycle*, **3**, 571-573.
- Luo,J., Lubaroff,D.M. & Hendrix,M.J. 1999. Suppression of prostate cancer invasive potential and matrix metalloproteinase activity by E-cadherin transfection. *Cancer Res.*, **59**, 3552-3556.
- Macpherson,M.R., Molina,P., Souchelnytskyi,S., Wernstedt,C., Martin-Perez,J., Portillo,F. & Cano,A. 2009. Phosphorylation of Serine 11 and Serine 92 as New Positive Regulators of Human Snail1 Function: Potential Involvement of Casein Kinase-2 (CK2) and cAMP-activated Kinase (PKA). *Mol.Biol.Cell*.
- Maeda,G., Chiba,T., Okazaki,M., Satoh,T., Taya,Y., Aoba,T., Kato,K., Kawashiri,S. & Imai,K. 2005. Expression of SIP1 in oral squamous cell carcinomas: implications for E-cadherin expression and tumor progression. *Int.J.Oncol.*, **27**, 1535-1541.
- Maillard,C., Jost,M., Romer,M.U., Brunner,N., Houard,X., Lejeune,A., Munaut,C., Bajou,K., Melen,L., Dano,K., Carmeliet,P., Fusenig,N.E., Foidart,J.M. & Noel,A. 2005. Host plasminogen activator inhibitor-1 promotes human skin carcinoma progression in a stage-dependent manner. *Neoplasia.*, **7**, 57-66.
- Maillard,C.M., Bouquet,C., Petitjean,M.M., Mestdagt,M., Frau,E., Jost,M., Masset,A.M., Opolon,P.H., Beermann,F., Abitbol,M.M., Foidart,J.M., Perricaudet,M.J. & Noel,A.C. 2008. Reduction of brain metastases in plasminogen activator inhibitor-1-deficient mice with transgenic ocular tumors. *Carcinogenesis*, **29**, 2236-2242.
- Maison,C., Pyrpasopoulou,A. & Georgatos,S.D. 1995. Vimentin-associated mitotic vesicles interact with chromosomes in a lamin B- and phosphorylation-dependent manner. *EMBO J.*, **14**, 3311-3324.
- Malo,M., Charriere-Bertrand,C., Chettaoui,C., Fabre-Guillevin,E., Maquerlot,F., Lackmy,A., Vallee,B., Delaplace,F. & Barlovatz-Meimon,G. 2006. [The PAI-1 swing: microenvironment and cancer cell migration]. *C.R.Biol.*, **329**, 919-927.
- Mann,B., Gelos,M., Siedow,A., Hanski,M.L., Gratchev,A., Ilyas,M., Bodmer,W.F., Moyer,M.P., Riecken,E.O., Buhr,H.J. & Hanski,C. 1999. Target genes of beta-catenin-T cell-factor/lymphoid-enhancer-factor signaling in human colorectal carcinomas. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **96**, 1603-1608.
- Manzanares,M., Locascio,A. & Nieto,M.A. 2001. The increasing complexity of the Snail gene superfamily in metazoan evolution. *Trends Genet.*, **17**, 178-181.
- Marchenko,G.N., Marchenko,N.D., Leng,J. & Strongin,A.Y. 2002. Promoter characterization of the novel human matrix metalloproteinase- 26 gene: regulation by the T-cell factor-4 implies specific expression of the gene in cancer cells of epithelial origin. *Biochem.J.*, **363**, 253-262.
- Maretzky,T., Reiss,K., Ludwig,A., Buchholz,J., Scholz,F., Proksch,E., de Strooper,B., Hartmann,D. & Saftig,P. 2005. ADAM10 mediates E-cadherin shedding and regulates epithelial cell-cell adhesion, migration, and beta-catenin translocation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **102**, 9182-9187.

- Martin,T.A., Goyal,A., Watkins,G. & Jiang,W.G. 2005. Expression of the transcription factors snail, slug, and twist and their clinical significance in human breast cancer. *Ann.Surg.Oncol.*, **12**, 488-496.
- Martinez-Estrada,O.M., Culleres,A., Soriano,F.X., Peinado,H., Bolos,V., Martinez,F.O., Reina,M., Cano,A., Fabre,M. & Vilaro,S. 2006. The transcription factors Slug and Snail act as repressors of Claudin-1 expression in epithelial cells. *Biochem.J.*, **394**, 449-457.
- Maruyama,R., Sugio,K., Yoshino,I., Maehara,Y. & Gazdar,A.F. 2004. Hypermethylation of FHIT as a prognostic marker in nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer*, **100**, 1472-1477.
- Mazieres,J., He,B., You,L., Xu,Z. & Jablons,D.M. 2005. Wnt signaling in lung cancer. *Cancer Lett.*, **222**, 1-10.
- McCrea,P.D.& Gumbiner,B.M. 1991. Purification of a 92-kDa cytoplasmic protein tightly associated with the cell-cell adhesion molecule E-cadherin (uvomorulin). Characterization and extractability of the protein complex from the cell cytostructure. *J.Biol.Chem.*, **266**, 4514-4520.
- McCrea,P.D., Turck,C.W. & Gumbiner,B. 1991. A homolog of the armadillo protein in Drosophila (plakoglobin) associated with E-cadherin. *Science*, **254**, 1359-1361.
- McNutt,M.A., Bolen,J.W., Gown,A.M., Hammar,S.P. & Vogel,A.M. 1985. Coexpression of intermediate filaments in human epithelial neoplasms. *Ultrastruct.Pathol.*, **9**, 31-43.
- Medici,D., Hay,E.D. & Olsen,B.R. 2008. Snail and Slug promote epithelial-mesenchymal transition through beta-catenin-T-cell factor-4-dependent expression of transforming growth factor-beta3. *Mol.Biol.Cell*, **19**, 4875-4887.
- Mei,J.M., Borchert,G.L., Donald,S.P. & Phang,J.M. 2002. Matrix metalloproteinase(s) mediate(s) NO-induced dissociation of beta-catenin from membrane bound E-cadherin and formation of nuclear beta-catenin/LEF-1 complex. *Carcinogenesis*, **23**, 2119-2122.
- Meiners,S., Brinkmann,V., Naundorf,H. & Birchmeier,W. 1998. Role of morphogenetic factors in metastasis of mammary carcinoma cells. *Oncogene*, **16**, 9-20.
- Mejlvang,J., Kriaevska,M., Vandewalle,C., Chernova,T., Sayan,A.E., Berx,G., Mellon,J.K. & Tulchinsky,E. 2007. Direct repression of cyclin D1 by SIP1 attenuates cell cycle progression in cells undergoing an epithelial mesenchymal transition. *Mol.Biol.Cell*, **18**, 4615-4624.
- Mestdagt,M., Polette,M., Buttice,G., Noel,A., Ueda,A., Foidart,J.M. & Gilles,C. 2006. Transactivation of MCP-1/CCL2 by beta-catenin/TCF-4 in human breast cancer cells. *Int.J.Cancer*, **118**, 35-42.
- Miettinen,M., Franssila,K., Lehto,V.P., Paasivuo,R. & Virtanen,I. 1984. Expression of intermediate filament proteins in thyroid gland and thyroid tumors. *Lab Invest*, **50**, 262-270.
- Miettinen,M., Lehto,V.P. & Virtanen,I. 1983. Expression of intermediate filaments in normal ovaries and ovarian epithelial, sex cord-stromal, and germinal tumors. *Int.J.Gynecol.Pathol.*, **2**, 64-71.
- Miura,N., Yano,T., Shoji,F., Kawano,D., Takenaka,T., Ito,K., Morodomi,Y., Yoshino,I. & Maehara,Y. 2009. Clinicopathological significance of Sip1-associated epithelial mesenchymal transition in non-small cell lung cancer progression. *Anticancer Res.*, **29**, 4099-4106.
- Miwa,N., Furuse,M., Tsukita,S., Niikawa,N., Nakamura,Y. & Furukawa,Y. 2000. Involvement of claudin-1 in the beta-catenin/Tcf signaling pathway and its frequent upregulation in human colorectal cancers. *Oncol.Res.*, **12**, 469-476.
- Miyoshi,A., Kitajima,Y., Kido,S., Shimonishi,T., Matsuyama,S., Kitahara,K. & Miyazaki,K. 2005. Snail accelerates cancer invasion by upregulating MMP expression and is associated with poor prognosis of hepatocellular carcinoma. *Br.J.Cancer*, **92**, 252-258.
- Miyoshi,A., Kitajima,Y., Sumi,K., Sato,K., Hagiwara,A., Koga,Y. & Miyazaki,K. 2004. Snail and SIP1 increase cancer invasion by upregulating MMP family in hepatocellular carcinoma cells. *Br.J.Cancer*, **90**, 1265-1273.

- Moody,S.E., Perez,D., Pan,T.C., Sarkisian,C.J., Portocarrero,C.P., Sterner,C.J., Notorfrancesco,K.L., Cardiff,R.D. & Chodosh,L.A. 2005. The transcriptional repressor Snail promotes mammary tumor recurrence. *Cancer Cell*, **8**, 197-209.
- Moreno-Bueno,G., Cubillo,E., Sarrio,D., Peinado,H., Rodriguez-Pinilla,S.M., Villa,S., Bolos,V., Jorda,M., Fabra,A., Portillo,F., Palacios,J. & Cano,A. 2006. Genetic profiling of epithelial cells expressing E-cadherin repressors reveals a distinct role for Snail, Slug, and E47 factors in epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Res.*, **66**, 9543-9556.
- Munshi,H.G., Ghosh,S., Mukhopadhyay,S., Wu,Y.I., Sen,R., Green,K.J. & Stack,M.S. 2002. Proteinase suppression by E-cadherin-mediated cell-cell attachment in premalignant oral keratinocytes. *J.Biol.Chem.*, **277**, 38159-38167.
- Nagahata,T., Shimada,T., Harada,A., Nagai,H., Onda,M., Yokoyama,S., Shiba,T., Jin,E., Kawanami,O. & Emi,M. 2003. Amplification, up-regulation and over-expression of DVL-1, the human counterpart of the *Drosophila* disheveled gene, in primary breast cancers. *Cancer Sci.*, **94**, 515-518.
- Nagar,B., Overduin,M., Ikura,M. & Rini,J.M. 1996. Structural basis of calcium-induced E-cadherin rigidification and dimerization. *Nature*, **380**, 360-364.
- Nagel,R., le Sage,C., Diosdado,B., van der,W.M., Oude Vrielink,J.A., Bolijn,A., Meijer,G.A. & Agami,R. 2008. Regulation of the adenomatous polyposis coli gene by the miR-135 family in colorectal cancer. *Cancer Res.*, **68**, 5795-5802.
- Najy,A.J., Day,K.C. & Day,M.L. 2008. The ectodomain shedding of E-cadherin by ADAM15 supports ErbB receptor activation. *J.Biol.Chem.*, **283**, 18393-18401.
- Nakada,C., Matsuura,K., Tsukamoto,Y., Tanigawa,M., Yoshimoto,T., Narimatsu,T., Nguyen,L.T., Hijiya,N., Uchida,T., Sato,F., Mimata,H., Seto,M. & Moriyama,M. 2008. Genome-wide microRNA expression profiling in renal cell carcinoma: significant down-regulation of miR-141 and miR-200c. *J.Pathol.*, **216**, 418-427.
- Nakagawa,Y. & Akao,Y. 2006. Fhit protein inhibits cell growth by attenuating the signaling mediated by nuclear factor-kappaB in colon cancer cell lines. *Exp.Cell Res.*, **312**, 2433-2442.
- Nakata,S., Sugio,K., Uramoto,H., Oyama,T., Hanagiri,T., Morita,M. & Yasumoto,K. 2006. The methylation status and protein expression of CDH1, p16(INK4A), and fragile histidine triad in nonsmall cell lung carcinoma: epigenetic silencing, clinical features, and prognostic significance. *Cancer*, **106**, 2190-2199.
- Navarro,P., Gomez,M., Pizarro,A., Gamallo,C., Quintanilla,M. & Cano,A. 1991. A role for the E-cadherin cell-cell adhesion molecule during tumor progression of mouse epidermal carcinogenesis. *J.Cell Biol.*, **115**, 517-533.
- Nawrocki-Raby,B., Gilles,C., Polette,M., Bruyneel,E., Laronze,J.Y., Bonnet,N., Foidart,J.M., Mareel,M. & Birembaut,P. 2003a. Upregulation of MMPs by soluble E-cadherin in human lung tumor cells. *Int.J.Cancer*, **105**, 790-795.
- Nawrocki-Raby,B., Gilles,C., Polette,M., Martinella-Catusse,C., Bonnet,N., Puchelle,E., Foidart,J.M., Van Roy,F. & Birembaut,P. 2003b. E-Cadherin mediates MMP down-regulation in highly invasive bronchial tumor cells. *Am.J.Pathol.*, **163**, 653-661.
- Negrini,M., Monaco,C., Vorechovsky,I., Ohta,M., Druck,T., Baffa,R., Huebner,K. & Croce,C.M. 1996. The FHIT gene at 3p14.2 is abnormal in breast carcinomas. *Cancer Res.*, **56**, 3173-3179.
- Nieminen,M., Henttinen,T., Merinen,M., Marttila-Ichihara,F., Eriksson,J.E. & Jalkanen,S. 2006. Vimentin function in lymphocyte adhesion and transcellular migration. *Nat.Cell Biol.*, **8**, 156-162.
- Niessen,C.M. & Gottardi,C.J. 2008. Molecular components of the adherens junction. *Biochim.Biophys.Acta*, **1778**, 562-571.
- Niessen,K., Fu,Y., Chang,L., Hoodless,P.A., McFadden,D. & Karsan,A. 2008. Slug is a direct Notch target required for initiation of cardiac cushion cellularization. *J.Cell Biol.*, **182**, 315-325.

- Nieto,M.A. 2002. The snail superfamily of zinc-finger transcription factors. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.*, **3**, 155-166.
- Nishimura,G., Manabe,I., Tsushima,K., Fujiu,K., Oishi,Y., Imai,Y., Maemura,K., Miyagishi,M., Higashi,Y., Kondoh,H. & Nagai,R. 2006. DeltaEF1 mediates TGF-beta signaling in vascular smooth muscle cell differentiation. *Dev.Cell*, **11**, 93-104.
- Niveditha,S.R.& Bajaj,P. 2003. Vimentin expression in breast carcinomas. *Indian J.Pathol.Microbiol.*, **46**, 579-584.
- Noe,V., Fingleton,B., Jacobs,K., Crawford,H.C., Vermeulen,S., Steelant,W., Bruyneel,E., Matrisian,L.M. & Mareel,M. 2001. Release of an invasion promoter E-cadherin fragment by matrilysin and stromelysin-1. *J.Cell Sci.*, **114**, 111-118.
- Noel,A., Gilles,C., Bajou,K., Devy,L., Kebers,F., Lewalle,J.M., Maquoi,E., Munaut,C., Remacle,A. & Foidart,J.M. 1997. Emerging roles for proteinases in cancer. *Invasion Metastasis*, **17**, 221-239.
- Nollet,F., Berx,G. & Van Roy,F. 1999. The role of the E-cadherin/catenin adhesion complex in the development and progression of cancer. *Mol.Cell Biol.Res.Commun.*, **2**, 77-85.
- Nose,A., Tsuji,K. & Takeichi,M. 1990. Localization of specificity determining sites in cadherin cell adhesion molecules. *Cell*, **61**, 147-155.
- Ohira,T., Gemmill,R.M., Ferguson,K., Kusy,S., Roche,J., Brambilla,E., Zeng,C., Baron,A., Bemis,L., Erickson,P., Wilder,E., Rustgi,A., Kitajewski,J., Gabrielson,E., Bremnes,R., Franklin,W. & Drabkin,H.A. 2003. WNT7a induces E-cadherin in lung cancer cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **100**, 10429-10434.
- Ohkubo,T.& Ozawa,M. 2004. The transcription factor Snail downregulates the tight junction components independently of E-cadherin downregulation. *J.Cell Sci.*, **117**, 1675-1685.
- Ohta,H., Aoyagi,K., Fukaya,M., Danjoh,I., Ohta,A., Isohata,N., Saeki,N., Taniguchi,H., Sakamoto,H., Shimoda,T., Tani,T., Yoshida,T. & Sasaki,H. 2009. Cross talk between hedgehog and epithelial-mesenchymal transition pathways in gastric pit cells and in diffuse-type gastric cancers. *Br.J.Cancer*, **100**, 389-398.
- Ohta,M., Inoue,H., Cotticelli,M.G., Kastury,K., Baffa,R., Palazzo,J., Siprashvili,Z., Mori,M., McCue,P., Druck,T., Croce,C.M. & Huebner,K. 1996. The FHIT gene, spanning the chromosome 3p14.2 fragile site and renal carcinoma-associated t(3;8) breakpoint, is abnormal in digestive tract cancers. *Cell*, **84**, 587-597.
- Olmeda,D., Jorda,M., Peinado,H., Fabra,A. & Cano,A. 2007a. Snail silencing effectively suppresses tumour growth and invasiveness. *Oncogene*, **26**, 1862-1874.
- Olmeda,D., Moreno-Bueno,G., Flores,J.M., Fabra,A., Portillo,F. & Cano,A. 2007b. SNAIL is required for tumor growth and lymph node metastasis of human breast carcinoma MDA-MB-231 cells. *Cancer Res.*, **67**, 11721-11731.
- Onder,T.T., Gupta,P.B., Mani,S.A., Yang,J., Lander,E.S. & Weinberg,R.A. 2008. Loss of E-cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways. *Cancer Res.*, **68**, 3645-3654.
- Oosterwijk,E., van Muijen,G.N., Oosterwijk-Wakka,J.C. & Warnaar,S.O. 1990. Expression of intermediate-sized filaments in developing and adult human kidney and in renal cell carcinoma. *J.Histochem.Cytochem.*, **38**, 385-392.
- Orsulic,S., Huber,O., Aberle,H., Arnold,S. & Kemler,R. 1999. E-cadherin binding prevents beta-catenin nuclear localization and beta-catenin/LEF-1-mediated transactivation. *J.Cell Sci.*, **112** (Pt 8), 1237-1245.
- Ozturk,N., Erdal,E., Mumcuoglu,M., Akcali,K.C., Yalcin,O., Senturk,S., Arslan-Ergul,A., Gur,B., Yulug,I., Cetin-Atalay,R., Yakicier,C., Yagci,T., Tez,M. & Ozturk,M. 2006. Reprogramming of replicative senescence in hepatocellular carcinoma-derived cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **103**, 2178-2183.
- Pace,H.C., Garrison,P.N., Robinson,A.K., Barnes,L.D., Draganescu,A., Rosler,A., Blackburn,G.M., Siprashvili,Z., Croce,C.M., Huebner,K. & Brenner,C. 1998. Genetic, biochemical, and crystallographic

- characterization of Fhit-substrate complexes as the active signaling form of Fhit. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **95**, 5484-5489.
- Palmer,H.G., Larriba,M.J., Garcia,J.M., Ordonez-Moran,P., Pena,C., Peiro,S., Puig,I., Rodriguez,R., de la,F.R., Bernad,A., Pollan,M., Bonilla,F., Gamallo,C., De Herreros,A.G. & Munoz,A. 2004. The transcription factor SNAIL represses vitamin D receptor expression and responsiveness in human colon cancer. *Nat.Med.*, **10**, 917-919.
- Park,J.H., Sung,I.J., Lee,S.W., Kim,K.W., Kim,Y.S. & Yoo,M.A. 2005. The zinc-finger transcription factor Snail downregulates proliferating cell nuclear antigen expression in colorectal carcinoma cells. *Int.J.Oncol.*, **26**, 1541-1547.
- Park,S.H., Cheung,L.W., Wong,A.S. & Leung,P.C. 2008a. Estrogen regulates Snail and Slug in the down-regulation of E-cadherin and induces metastatic potential of ovarian cancer cells through estrogen receptor alpha. *Mol.Endocrinol.*, **22**, 2085-2098.
- Park,S.M., Gaur,A.B., Lengyel,E. & Peter,M.E. 2008b. The miR-200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by targeting the E-cadherin repressors ZEB1 and ZEB2. *Genes Dev.*, **22**, 894-907.
- Peinado,H., Ballestar,E., Esteller,M. & Cano,A. 2004a. Snail mediates E-cadherin repression by the recruitment of the Sin3A/histone deacetylase 1 (HDAC1)/HDAC2 complex. *Mol.Cell Biol.*, **24**, 306-319.
- Peinado,H., Del Carmen Iglesias-de la Cruz, Olmeda,D., Csiszar,K., Fong,K.S., Vega,S., Nieto,M.A., Cano,A. & Portillo,F. 2005a. A molecular role for lysyl oxidase-like 2 enzyme in snail regulation and tumor progression. *EMBO J.*, **24**, 3446-3458.
- Peinado,H., Marin,F., Cubillo,E., Stark,H.J., Fusenig,N., Nieto,M.A. & Cano,A. 2004b. Snail and E47 repressors of E-cadherin induce distinct invasive and angiogenic properties in vivo. *J.Cell Sci.*, **117**, 2827-2839.
- Peinado,H., Olmeda,D. & Cano,A. 2007. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat.Rev.Cancer*, **7**, 415-428.
- Peinado,H., Portillo,F. & Cano,A. 2005b. Switching on-off Snail: LOXL2 versus GSK3beta. *Cell Cycle*, **4**, 1749-1752.
- Peinado,H.C., Portillo,F. & Cano,A. 2004c. Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis. *International Journal of Developmental Biology*, **48**, 365-375.
- Peiro,S., Escriva,M., Puig,I., Barbera,M.J., Dave,N., Herranz,N., Larriba,M.J., Takkunen,M., Franci,C., Munoz,A., Virtanen,I., Baulida,J. & Garcia,D.H. 2006. Snail1 transcriptional repressor binds to its own promoter and controls its expression. *Nucleic Acids Res.*, **34**, 2077-2084.
- Pekarsky,Y., Garrison,P.N., Palamarchuk,A., Zanesi,N., Aqeilan,R.I., Huebner,K., Barnes,L.D. & Croce,C.M. 2004. Fhit is a physiological target of the protein kinase Src. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **101**, 3775-3779.
- Pekarsky,Y., Zanesi,N., Palamarchuk,A., Huebner,K. & Croce,C.M. 2002. FHIT: from gene discovery to cancer treatment and prevention. *Lancet Oncol.*, **3**, 748-754.
- Pena,C., Garcia,J.M., Garcia,V., Silva,J., Dominguez,G., Rodriguez,R., Maximiano,C., Garcia,D.H., Munoz,A. & Bonilla,F. 2006. The expression levels of the transcriptional regulators p300 and CtBP modulate the correlations between SNAIL, ZEB1, E-cadherin and vitamin D receptor in human colon carcinomas. *Int.J.Cancer*, **119**, 2098-2104.
- Pena,C., Garcia,J.M., Silva,J., Garcia,V., Rodriguez,R., Alonso,I., Millan,I., Salas,C., De Herreros,A.G., Munoz,A. & Bonilla,F. 2005. E-cadherin and vitamin D receptor regulation by SNAIL and ZEB1 in colon cancer: clinicopathological correlations. *Hum.Mol.Genet.*, **14**, 3361-3370.
- Perez-Moreno,M.& Fuchs,E. 2006. Catenins: keeping cells from getting their signals crossed. *Dev.Cell*, **11**, 601-612.

- Perez-Moreno, M.A., Locascio, A., Rodrigo, I., Dhondt, G., Portillo, F., Nieto, M.A. & Cano, A. 2001. A new role for E12/E47 in the repression of E-cadherin expression and epithelial-mesenchymal transitions. *J.Biol.Chem.*, **276**, 27424-27431.
- Perl, A.K., Wilgenbus, P., Dahl, U., Semb, H. & Christofori, G. 1998. A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma. *Nature*, **392**, 190-193.
- Piedra, J., Miravet, S., Castano, J., Palmer, H.G., Heisterkamp, N., Garcia, D.H. & Dunach, M. 2003. p120 Catenin-associated Fer and Fyn tyrosine kinases regulate beta-catenin Tyr-142 phosphorylation and beta-catenin-alpha-catenin interaction. *Mol. Cell Biol.*, **23**, 2287-2297.
- Pieper, F.R., Van de Klundert, F.A., Raats, J.M., Henderik, J.B., Schaart, G., Ramaekers, F.C. & Bloemendal, H. 1992. Regulation of vimentin expression in cultured epithelial cells. *Eur.J.Biochem.*, **210**, 509-519.
- Polakis, P. 2000. Wnt signaling and cancer. *Genes Dev.*, **14**, 1837-1851.
- Polakis, P. 2007. The many ways of Wnt in cancer. *Curr.Opin.Genet.Dev.*, **17**, 45-51.
- Polette, M., Gilles, C., de Bentzmann, S., Gruenert, D., Tournier, J.M. & Birembaut, P. 1998. Association of fibroblastoid features with the invasive phenotype in human bronchial cancer cell lines. *Clin.Exp.Metastasis*, **16**, 105-112.
- Polette, M., Mestdagt, M., Bindels, S., Nawrocki-Raby, B., Hunziker, W., Foidart, J.M., Birembaut, P. & Gilles, C. 2007. beta-Catenin and ZO-1: Shuttle molecules involved in tumor invasion-associated epithelial-mesenchymal transition processes. *Cells Tissues Organs*, **185**, 61-65.
- Polette, M., Nawrocki-Raby, B., Gilles, C., Clavel, C. & Birembaut, P. 2004. Tumour invasion and matrix metalloproteinases. *Crit Rev.Oncol.Hematol.*, **49**, 179-186.
- Polyak, K. & Weinberg, R.A. 2009. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat.Rev.Cancer*, **9**, 265-273.
- Poser, I., Dominguez, D., De Herreros, A.G., Varnai, A., Buettner, R. & Bosserhoff, A.K. 2001. Loss of E-cadherin expression in melanoma cells involves up-regulation of the transcriptional repressor Snail. *J.Biol.Chem.*, **276**, 24661-24666.
- Postigo, A.A. 2003. Opposing functions of ZEB proteins in the regulation of the TGFbeta/BMP signaling pathway. *EMBO J.*, **22**, 2443-2452.
- Postigo, A.A., Depp, J.L., Taylor, J.J. & Kroll, K.L. 2003. Regulation of Smad signaling through a differential recruitment of coactivators and corepressors by ZEB proteins. *EMBO J.*, **22**, 2453-2462.
- Potenta, S., Zeisberg, E. & Kalluri, R. 2008. The role of endothelial-to-mesenchymal transition in cancer progression. *Br.J.Cancer*, **99**, 1375-1379.
- Prasad, C.P., Rath, G., Mathur, S., Bhatnagar, D., Parshad, R. & Ralhan, R. 2009. Expression analysis of E-cadherin, Slug and GSK3beta in invasive ductal carcinoma of breast. *BMC.Cancer*, **9**, 325.
- Przybylo, J.A. & Radisky, D.C. 2007. Matrix metalloproteinase-induced epithelial-mesenchymal transition: tumor progression at Snail's pace. *Int.J.Biochem.Cell Biol.*, **39**, 1082-1088.
- Pylkkanen, L., Wolff, H., Stjernvall, T., Tuominen, P., Sioris, T., Karjalainen, A., Anttila, S. & Husgafvel-Pursiainen, K. 2002. Reduced FHIT protein expression and loss of heterozygosity at FHIT gene in tumours from smoking and asbestos-exposed lung cancer patients. *Int.J.Oncol.*, **20**, 285-290.
- Ramaekers, F.C., Haag, D., Kant, A., Moesker, O., Jap, P.H. & Vooijs, G.P. 1983. Coexpression of ker. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **80**, 2618-2622.

- Reichert,M., Muller,T. & Hunziker,W. 2000. The PDZ domains of zonula occludens-1 induce an epithelial to mesenchymal transition of Madin-Darby canine kidney I cells. Evidence for a role of beta-catenin/Tcf/Lef signaling. *J.Biol.Chem.*, **275**, 9492-9500.
- Reis-Filho,J.S. 2005. Re: Korsching et al. The origin of vimentin expression in invasive breast cancer: epithelial-mesenchymal transition, myoepithelial histogenesis or histogenesis from progenitor cells with bilinear differentiation potential? *J Pathol* 2005; 206: 451-457. *J.Pathol.*, **207**, 367-369.
- Remacle,J.E., Kraft,H., Lerchner,W., Wuytens,G., Collart,C., Verschuere,K., Smith,J.C. & Huylebroeck,D. 1999. New mode of DNA binding of multi-zinc finger transcription factors: deltaEF1 family members bind with two hands to two target sites. *EMBO J.*, **18**, 5073-5084.
- Rosivatz,E., Becker,I., Specht,K., Fricke,E., Lubber,B., Busch,R., Hofler,H. & Becker,K.F. 2002. Differential expression of the epithelial-mesenchymal transition regulators snail, SIP1, and twist in gastric cancer. *Am.J.Pathol.*, **161**, 1881-1891.
- Roura,S., Miravet,S., Piedra,J., Garcia,D.H. & Dunach,M. 1999. Regulation of E-cadherin/Catenin association by tyrosine phosphorylation. *J.Biol.Chem.*, **274**, 36734-36740.
- Roz,L., Gramegna,M., Ishii,H., Croce,C.M. & Sozzi,G. 2002. Restoration of fragile histidine triad (FHIT) expression induces apoptosis and suppresses tumorigenicity in lung and cervical cancer cell lines. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **99**, 3615-3620.
- Rudini,N.& Dejana,E. 2008. Adherens junctions. *Curr.Biol.*, **18**, R1080-R1082.
- Sabbah,M., Emami,S., Redeuilh,G., Julien,S., Prevost,G., Zimmer,A., Ouelaa,R., Bracke,M., De Wever,O. & Gespach,C. 2008. Molecular signature and therapeutic perspective of the epithelial-to-mesenchymal transitions in epithelial cancers. *Drug Resist.Updat.*, **11**, 123-151.
- Sabo,E., Miselevich,I., Bejar,J., Segenreich,M., Wald,M., Moskovitz,B. & Nativ,O. 1997. The role of vimentin expression in predicting the long-term outcome of patients with localized renal cell carcinoma. *Br.J.Urol.*, **80**, 864-868.
- Santibanez,J.F. 2006. JNK mediates TGF-beta1-induced epithelial mesenchymal transdifferentiation of mouse transformed keratinocytes. *FEBS Lett.*, **580**, 5385-5391.
- Savagner,P., Boyer,B., Valles,A.M., Jouanneau,J. & Thiery,J.P. 1994. Modulations of the epithelial phenotype during embryogenesis and cancer progression. *Cancer Treat.Res.*, **71**, 229-249.
- Savagner,P., Yamada,K.M. & Thiery,J.P. 1997. The zinc-finger protein slug causes desmosome dissociation, an initial and necessary step for growth factor-induced epithelial-mesenchymal transition. *J.Cell Biol.*, **137**, 1403-1419.
- Sayan,A.E., Griffiths,T.R., Pal,R., Browne,G.J., Ruddick,A., Yagci,T., Edwards,R., Mayer,N.J., Qazi,H., Goyal,S., Fernandez,S., Straatman,K., Jones,G.D., Bowman,K.J., Colquhoun,A., Mellon,J.K., Kriajevska,M. & Tulchinsky,E. 2009. SIP1 protein protects cells from DNA damage-induced apoptosis and has independent prognostic value in bladder cancer. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*
- Saydam,O., Shen,Y., Wurdinger,T., Senol,O., Boke,E., James,M.F., Tannous,B.A., Stemmer-Rachamimov,A.O., Yi,M., Stephens,R.M., Fraefel,C., Gusella,J.F., Krichevsky,A.M. & Breakefield,X.O. 2009. Down-regulated microRNA-200a in Meningiomas Promotes Tumor Growth by Reducing E-cadherin and Activating the Wnt/{beta} catenin Signaling Pathway. *Mol.Cell Biol.*
- Schmalhofer,O., Brabletz,S. & Brabletz,T. 2009. E-cadherin, beta-catenin, and ZEB1 in malignant progression of cancer. *Cancer Metastasis Rev.*, **28**, 151-166.
- Sefton,M., Sanchez,S. & Nieto,M.A. 1998. Conserved and divergent roles for members of the Snail family of transcription factors in the chick and mouse embryo. *Development*, **125**, 3111-3121.

- Seifert,G.J., Lawson,D. & Wiche,G. 1992. Immunolocalization of the intermediate filament-associated protein plectin at focal contacts and actin stress fibers. *Eur.J.Cell Biol.*, **59**, 138-147.
- Seki,K., Fujimori,T., Savagner,P., Hata,A., Aikawa,T., Ogata,N., Nabeshima,Y. & Kaechoong,L. 2003. Mouse Snail family transcription repressors regulate chondrocyte, extracellular matrix, type II collagen, and aggrecan. *J.Biol.Chem.*, **278**, 41862-41870.
- Semba,S., Trapasso,F., Fabbri,M., McCorkell,K.A., Volinia,S., Druck,T., Iliopoulos,D., Pekarsky,Y., Ishii,H., Garrison,P.N., Barnes,L.D., Croce,C.M. & Huebner,K. 2006. Fhit modulation of the Akt-survivin pathway in lung cancer cells: Fhit-tyrosine 114 (Y114) is essential. *Oncogene*, **25**, 2860-2872.
- Shapiro,L., Fannon,A.M., Kwong,P.D., Thompson,A., Lehmann,M.S., Grubel,G., Legrand,J.F., Als-Nielsen,J., Colman,D.R. & Hendrickson,W.A. 1995. Structural basis of cell-cell adhesion by cadherins. *Nature*, **374**, 327-337.
- Shasby,D.M., Ries,D.R., Shasby,S.S. & Winter,M.C. 2002. Histamine stimulates phosphorylation of adherens junction proteins and alters their link to vimentin. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol*, **282**, L1330-L1338.
- Shi,Y. & Massague,J. 2003. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*, **113**, 685-700.
- Shi,Y., Sawada,J., Sui,G., Affar,e.B., Whetstine,J.R., Lan,F., Ogawa,H., Luke,M.P., Nakatani,Y. & Shi,Y. 2003. Coordinated histone modifications mediated by a CtBP co-repressor complex. *Nature*, **422**, 735-738.
- Shih,J.Y., Tsai,M.F., Chang,T.H., Chang,Y.L., Yuan,A., Yu,C.J., Lin,S.B., Liou,G.Y., Lee,M.L., Chen,J.J., Hong,T.M., Yang,S.C., Su,J.L., Lee,Y.C. & Yang,P.C. 2005. Transcription repressor slug promotes carcinoma invasion and predicts outcome of patients with lung adenocarcinoma. *Clin.Cancer Res.*, **11**, 8070-8078.
- Shimoyama,Y., Hirohashi,S., Hirano,S., Noguchi,M., Shimosato,Y., Takeichi,M. & Abe,O. 1989. Cadherin cell-adhesion molecules in human epithelial tissues and carcinomas. *Cancer Res.*, **49**, 2128-2133.
- Shioiri,M., Shida,T., Koda,K., Oda,K., Seike,K., Nishimura,M., Takano,S. & Miyazaki,M. 2006. Slug expression is an independent prognostic parameter for poor survival in colorectal carcinoma patients. *Br.J.Cancer*, **94**, 1816-1822.
- Shtutman,M., Zhurinsky,J., Simcha,I., Albanese,C., D'Amico,M., Pestell,R. & Ben Ze'ev,A. 1999. The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **96**, 5522-5527.
- Sidenius,N. & Blasi,F. 2003. The urokinase plasminogen activator system in cancer: recent advances and implication for prognosis and therapy. *Cancer Metastasis Rev.*, **22**, 205-222.
- Singh,M., Spoelstra,N.S., Jean,A., Howe,E., Torkko,K.C., Clark,H.R., Darling,D.S., Shroyer,K.R., Horwitz,K.B., Broaddus,R.R. & Richer,J.K. 2008. ZEB1 expression in type I vs type II endometrial cancers: a marker of aggressive disease. *Mod.Pathol.*, **21**, 912-923.
- Singh,S., Sadacharan,S., Su,S., Beldegrun,A., Persad,S. & Singh,G. 2003. Overexpression of vimentin: role in the invasive phenotype in an androgen-independent model of prostate cancer. *Cancer Res.*, **63**, 2306-2311.
- Siprashvili,Z., Sozzi,G., Barnes,L.D., McCue,P., Robinson,A.K., Eryomin,V., Sard,L., Tagliabue,E., Greco,A., Fusetti,L., Schwartz,G., Pierotti,M.A., Croce,C.M. & Huebner,K. 1997. Replacement of Fhit in cancer cells suppresses tumorigenicity. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **94**, 13771-13776.
- Sivertsen,S., Hadar,R., Elloul,S., Vintman,L., Bedrossian,C., Reich,R. & Davidson,B. 2006. Expression of Snail, Slug and Sip1 in malignant mesothelioma effusions is associated with matrix metalloproteinase, but not with cadherin expression. *Lung Cancer*, **54**, 309-317.
- Sommers,C.L., Gelmann,E.P., Kemler,R., Cowin,P. & Byers,S.W. 1994a. Alterations in beta-catenin phosphorylation and plakoglobin expression in human breast cancer cells. *Cancer Res.*, **54**, 3544-3552.

- Sommers,C.L., Heckford,S.E., Skerker,J.M., Worland,P., Torri,J.A., Thompson,E.W., Byers,S.W. & Gelmann,E.P. 1992. Loss of epithelial markers and acquisition of vimentin expression in adriam. *Cancer Res.*, **52**, 5190-5197.
- Sommers,C.L., Skerker,J.M., Chrysogelos,S.A., Bosseler,M. & Gelmann,E.P. 1994b. Regulation of vimentin gene transcription in human breast cancer cell lines. *Cell Growth Differ.*, **5**, 839-846.
- Sommers,C.L., Walker-Jones,D., Heckford,S.E., Worland,P., Valverius,E., Clark,R., McCormick,F., Stampfer,M., Abularach,S. & Gelmann,E.P. 1989. Vimentin rather than keratin expression in some hormone-independent breast cancer cell lines and in oncogene-transformed mammary epithelial cells. *Cancer Res.*, **49**, 4258-4263.
- Sozzi,G., Veronese,M.L., Negrini,M., Baffa,R., Coticelli,M.G., Inoue,H., Torielli,S., Pilotti,S., De Gregorio,L., Pastorino,U., Pierotti,M.A., Ohta,M., Huebner,K. & Croce,C.M. 1996. The FHIT gene 3p14.2 is abnormal in lung cancer. *Cell*, **85**, 17-26.
- Spaderna,S., Schmalhofer,O., Hlubek,F., Berx,G., Eger,A., Merkel,S., Jung,A., Kirchner,T. & Brabletz,T. 2006. A transient, EMT-linked loss of basement membranes indicates metastasis and poor survival in colorectal cancer. *Gastroenterology*, **131**, 830-840.
- Spaderna,S., Schmalhofer,O., Wahlbuhl,M., Dimmler,A., Bauer,K., Sultan,A., Hlubek,F., Jung,A., Strand,D., Eger,A., Kirchner,T., Behrens,J. & Brabletz,T. 2008. The transcriptional repressor ZEB1 promotes metastasis and loss of cell polarity in cancer. *Cancer Res.*, **68**, 537-544.
- Spoelstra,N.S., Manning,N.G., Higashi,Y., Darling,D., Singh,M., Shroyer,K.R., Broaddus,R.R., Horwitz,K.B. & Richer,J.K. 2006. The transcription factor ZEB1 is aberrantly expressed in aggressive uterine cancers. *Cancer Res.*, **66**, 3893-3902.
- Staal,F.J., Noort,M.M., Strous,G.J. & Clevers,H.C. 2002. Wnt signals are transmitted through N-terminally dephosphorylated beta-catenin. *EMBO Rep.*, **3**, 63-68.
- Steinberg,M.S. & McNutt,P.M. 1999. Cadherins and their connections: adhesion junctions have broader functions. *Curr.Opin.Cell Biol.*, **11**, 554-560.
- Steinbock,F.A. & Wiche,G. 1999. Plectin: a cytolinker by design. *Biol.Chem.*, **380**, 151-158.
- Steinert,P.M. & Roop,D.R. 1988. Molecular and cellular biology of intermediate filaments. *Annu.Rev.Biochem.*, **57**, 593-625.
- Stetler-Stevenson, W. G., Aznavoorian, S., and Liotta, L. Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis. *Annu.Rev.Cell Biol.* 9, 541-573. 2000.
Ref Type: Generic
- Sugimachi,K., Tanaka,S., Kameyama,T., Taguchi,K., Aishima,S., Shimada,M., Sugimachi,K. & Tsuneyoshi,M. 2003. Transcriptional repressor snail and progression of human hepatocellular carcinoma. *Clin.Cancer Res.*, **9**, 2657-2664.
- SundarRaj,N., Rizzo,J.D., Anderson,S.C. & Gesiotto,J.P. 1992. Expression of vimentin by rabbit corneal epithelial cells during wound repair. *Cell Tissue Res.*, **267**, 347-356.
- Svitkina,T.M., Verkhovskiy,A.B. & Borisy,G.G. 1996. Plectin sidearms mediate interaction of intermediate filaments with microtubules and other components of the cytoskeleton. *J.Cell Biol.*, **135**, 991-1007.
- Takahashi,M., Tsunoda,T., Seiki,M., Nakamura,Y. & Furukawa,Y. 2002. Identification of membrane-type matrix metalloproteinase-1 as a target of the beta-catenin/Tcf4 complex in human colorectal cancers. *Oncogene*, **21**, 5861-5867.
- Takeichi,M. 1991. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science*, **251**, 1451-1455.

- Takeichi,M. 1993. Cadherins in cancer: implications for invasion and metastasis. *Curr.Opin.Cell Biol.*, **5**, 806-811.
- Taki,M., Verschueren,K., Yokoyama,K., Nagayama,M. & Kamata,N. 2006. Involvement of Ets-1 transcription factor in inducing matrix metalloproteinase-2 expression by epithelial-mesenchymal transition in human squamous carcinoma cells. *Int.J.Oncol.*, **28**, 487-496.
- Takkunen,M., Grenman,R., Hukkanen,M., Korhonen,M., Garcia,D.H. & Virtanen,I. 2006. Snail-dependent and -independent epithelial-mesenchymal transition in oral squamous carcinoma cells. *J.Histochem.Cytochem.*, **54**, 1263-1275.
- Thiery,J.P. 2002. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat.Rev.Cancer*, **2**, 442-454.
- Thiery,J.P. 2003. Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies. *Curr.Opin.Cell Biol.*, **15**, 740-746.
- Thiery,J.P., Acloque,H., Huang,R.Y. & Nieto,M.A. 2009. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*, **139**, 871-890.
- Thiery,J.P.& Sleeman,J.P. 2006. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.*, **7**, 131-142.
- Thompson,E.W., Newgreen,D.F. & Tarin,D. 2005. Carcinoma invasion and metastasis: a role for epithelial-mesenchymal transition? *Cancer Res.*, **65**, 5991-5995.
- Trapasso,F., Krakowiak,A., Cesari,R., Arkles,J., Yendamuri,S., Ishii,H., Vecchione,A., Kuroki,T., Bieganowski,P., Pace,H.C., Huebner,K., Croce,C.M. & Brenner,C. 2003. Designed FHIT alleles establish that Fhit-induced apoptosis in cancer cells is limited by substrate binding. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **100**, 1592-1597.
- Tripathi,M.K., Misra,S. & Chaudhuri,G. 2005. Negative regulation of the expressions of cytokeratins 8 and 19 by SLUG repressor protein in human breast cells. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, **329**, 508-515.
- Tuhkanen,H., Soini,Y., Kosma,V.M., Anttila,M., Sironen,R., Hamalainen,K., Kukkonen,L., Virtanen,I. & Mannermaa,A. 2009. Nuclear expression of Snail1 in borderline and malignant epithelial ovarian tumours is associated with tumour progression. *BMC.Cancer*, **9**, 289.
- Turner,F.E., Broad,S., Khanim,F.L., Jeanes,A., Talma,S., Hughes,S., Tselepis,C. & Hotchin,N.A. 2006. Slug regulates integrin expression and cell proliferation in human epidermal keratinocytes. *J.Biol.Chem.*, **281**, 21321-21331.
- Uchikado,Y., Natsugoe,S., Okumura,H., Setoyama,T., Matsumoto,M., Ishigami,S. & Aikou,T. 2005. Slug Expression in the E-cadherin preserved tumors is related to prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Clin.Cancer Res.*, **11**, 1174-1180.
- Upton,M.P., Hirohashi,S., Tome,Y., Miyazawa,N., Suemasu,K. & Shimosato,Y. 1986. Expression of vimentin in surgically resected adenocarcinomas and large cell carcinomas of lung. *Am.J.Surg.Pathol.*, **10**, 560-567.
- Valgeirsdottir,S., Claesson-Welsh,L., Bongcam-Rudloff,E., Hellman,U., Westermark,B. & Heldin,C.H. 1998. PDGF induces reorganization of vimentin filaments. *J.Cell Sci.*, **111** (Pt 14), 1973-1980.
- van Grunsven,L.A., Michiels,C., Van de,P.T., Nelles,L., Wuytens,G., Verschueren,K. & Huylebroeck,D. 2003. Interaction between Smad-interacting protein-1 and the corepressor C-terminal binding protein is dispensable for transcriptional repression of E-cadherin. *J.Biol.Chem.*, **278**, 26135-26145.
- Van Roy,F.& Berx,G. 2008. The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. *Cell Mol.Life Sci.*, **65**, 3756-3788.
- Vandewalle,C., Comijn,J., De Craene,B., Vermassen,P., Bruyneel,E., Andersen,H., Tulchinsky,E., Van Roy,F. & Berx,G. 2005. SIP1/ZEB2 induces EMT by repressing genes of different epithelial cell-cell junctions. *Nucleic Acids Res.*, **33**, 6566-6578.

- Vandewalle,C., Van Roy,F. & Berx,G. 2009. The role of the ZEB family of transcription factors in development and disease. *Cell Mol.Life Sci.*, **66**, 773-787.
- Vega,S., Morales,A.V., Ocana,O.H., Valdes,F., Fabregat,I. & Nieto,M.A. 2004. Snail blocks the cell cycle and confers resistance to cell death. *Genes Dev.*, **18**, 1131-1143.
- Vernon,A.E.& LaBonne,C. 2006. Slug stability is dynamically regulated during neural crest development by the F-box protein Ppa. *Development*, **133**, 3359-3370.
- Verschueren,K., Remacle,J.E., Collart,C., Kraft,H., Baker,B.S., Tylzanowski,P., Nelles,L., Wuytens,G., Su,M.T., Bodmer,R., Smith,J.C. & Huylebroeck,D. 1999. SIP1, a novel zinc finger/homeodomain repressor, interacts with Smad proteins and binds to 5'-CACCT sequences in candidate target genes. *J.Biol.Chem.*, **274**, 20489-20498.
- Vicovac,L.& Aplin,J.D. 1996. Epithelial-mesenchymal transition during trophoblast differentiation. *Acta Anat.(Basel)*, **156**, 202-216.
- Vincent,T., Neve,E.P., Johnson,J.R., Kukalev,A., Rojo,F., Albanell,J., Pietras,K., Virtanen,I., Philipson,L., Leopold,P.L., Crystal,R.G., De Herreros,A.G., Moustakas,A., Pettersson,R.F. & Fuxe,J. 2009. A SNAIL1-SMAD3/4 transcriptional repressor complex promotes TGF-beta mediated epithelial-mesenchymal transition. *Nat.Cell Biol.*, **11**, 943-950.
- Vitali,R., Mancini,C., Cesi,V., Tanno,B., Mancuso,M., Bossi,G., Zhang,Y., Martinez,R.V., Calabretta,B., Dominici,C. & Raschella,G. 2008. Slug (SNAIL2) down-regulation by RNA interference facilitates apoptosis and inhibits invasive growth in neuroblastoma preclinical models. *Clin.Cancer Res.*, **14**, 4622-4630.
- Vleminckx,K., Vakaet,L., Jr., Mareel,M., Fiers,W. & Van Roy,F. 1991. Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role. *Cell*, **66**, 107-119.
- Vora,H.H., Patel,N.A., Rajvik,K.N., Mehta,S.V., Brahmabhatt,B.V., Shah,M.J., Shukla,S.N. & Shah,P.M. 2009. Cytokeratin and vimentin expression in breast cancer. *Int.J.Biol.Markers*, **24**, 38-46.
- Wang,X., Zheng,M., Liu,G., Xia,W., McKeown-Longo,P.J., Hung,M.C. & Zhao,J. 2007a. Kruppel-like factor 8 induces epithelial to mesenchymal transition and epithelial cell invasion. *Cancer Res.*, **67**, 7184-7193.
- Wang,Z., Wade,P., Mandell,K.J., Akyildiz,A., Parkos,C.A., Mrsny,R.J. & Nusrat,A. 2007b. Raf 1 represses expression of the tight junction protein occludin via activation of the zinc-finger transcription factor slug. *Oncogene*, **26**, 1222-1230.
- Weiske,J., Albring,K.F. & Huber,O. 2007. The tumor suppressor Fhit acts as a repressor of beta-catenin transcriptional activity. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **104**, 20344-20349.
- Wheelock,M.J.& Johnson,K.R. 2003. Cadherins as modulators of cellular phenotype. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.*, **19**, 207-235.
- Whiteman,E.L., Liu,C.J., Fearon,E.R. & Margolis,B. 2008. The transcription factor snail represses Crumbs3 expression and disrupts apico-basal polarity complexes. *Oncogene*, **27**, 3875-3879.
- Wielenga,V.J., Smits,R., Korinek,V., Smit,L., Kielman,M., Fodde,R., Clevers,H. & Pals,S.T. 1999. Expression of CD44 in Apc and Tcf mutant mice implies regulation by the WNT pathway. *Am.J.Pathol.*, **154**, 515-523.
- Wijnhoven,B.P., Dinjens,W.N. & Pignatelli,M. 2000. E-cadherin-catenin cell-cell adhesion complex and human cancer. *Br.J.Surg.*, **87**, 992-1005.
- Wilkins-Port,C.E.& Higgins,P.J. 2007. Regulation of extracellular matrix remodeling following transforming growth factor-beta1/epidermal growth factor-stimulated epithelial-mesenchymal transition in human premalignant keratinocytes. *Cells Tissues.Organs*, **185**, 116-122.
- Wong,S.C., Lo,S.F., Lee,K.C., Yam,J.W., Chan,J.K. & Wendy Hsiao,W.L. 2002. Expression of frizzled-related protein and Wnt-signalling molecules in invasive human breast tumours. *J.Pathol.*, **196**, 145-153.

- Wu,M., Bai,X., Xu,G., Wei,J., Zhu,T., Zhang,Y., Li,Q., Liu,P., Song,A., Zhao,L., Gang,C., Han,Z., Wang,S., Zhou,J., Lu,Y. & Ma,D. 2007. Proteome analysis of human androgen-independent prostate cancer cell lines: variable metastatic potentials correlated with vimentin expression. *Proteomics.*, **7**, 1973-1983.
- Wu,Y., Deng,J., Rychahou,P.G., Qiu,S., Evers,B.M. & Zhou,B.P. 2009a. Stabilization of snail by NF-kappaB is required for inflammation-induced cell migration and invasion. *Cancer Cell*, **15**, 416-428.
- Wu,Y., Evers,B.M. & Zhou,B.P. 2009b. Small C-terminal domain phosphatase enhances snail activity through dephosphorylation. *J.Biol.Chem.*, **284**, 640-648.
- Yamada,S., Pokutta,S., Drees,F., Weis,W.I. & Nelson,W.J. 2005. Deconstructing the cadherin-catenin-actin complex. *Cell*, **123**, 889-901.
- Yamashita,S., Miyagi,C., Fukada,T., Kagara,N., Che,Y.S. & Hirano,T. 2004. Zinc transporter LIV1 controls epithelial-mesenchymal transition in zebrafish gastrula organizer. *Nature*, **429**, 298-302.
- Yanagawa,S., van Leeuwen,F., Wodarz,A., Klingensmith,J. & Nusse,R. 1995. The dishevelled protein is modified by wingless signaling in *Drosophila*. *Genes Dev.*, **9**, 1087-1097.
- Yang,J., Mani,S.A., Donaher,J.L., Ramaswamy,S., Itzykson,R.A., Come,C., Savagner,P., Gitelman,I., Richardson,A. & Weinberg,R.A. 2004. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell*, **117**, 927-939.
- Yang,M.H., Chang,S.Y., Chiou,S.H., Liu,C.J., Chi,C.W., Chen,P.M., Teng,S.C. & Wu,K.J. 2007. Overexpression of NBS1 induces epithelial-mesenchymal transition and co-expression of NBS1 and Snail predicts metastasis of head and neck cancer. *Oncogene*, **26**, 1459-1467.
- Yang,Z., Rayala,S., Nguyen,D., Vadlamudi,R.K., Chen,S. & Kumar,R. 2005. Pak1 phosphorylation of snail, a master regulator of epithelial-to-mesenchyme transition, modulates snail's subcellular localization and functions. *Cancer Res.*, **65**, 3179-3184.
- Yin,T., Wang,C., Liu,T., Zhao,G., Zha,Y. & Yang,M. 2007. Expression of snail in pancreatic cancer promotes metastasis and chemoresistance. *J.Surg.Res.*, **141**, 196-203.
- Yokoyama,K., Kamata,N., Fujimoto,R., Tsutsumi,S., Tomonari,M., Taki,M., Hosokawa,H. & Nagayama,M. 2003. Increased invasion and matrix metalloproteinase-2 expression by Snail-induced mesenchymal transition in squamous cell carcinomas. *Int.J.Oncol.*, **22**, 891-898.
- Yokoyama,K., Kamata,N., Hayashi,E., Hoteiya,T., Ueda,N., Fujimoto,R. & Nagayama,M. 2001. Reverse correlation of E-cadherin and snail expression in oral squamous cell carcinoma cells in vitro. *Oral Oncol.*, **37**, 65-71.
- Yook,J.I., Li,X.Y., Ota,I., Fearon,E.R. & Weiss,S.J. 2005. Wnt-dependent regulation of the E-cadherin repressor snail. *J.Biol.Chem.*, **280**, 11740-11748.
- Yoon,K.H., Yoon,M., Moir,R.D., Khuon,S., Flitney,F.W. & Goldman,R.D. 2001. Insights into the dynamic properties of keratin intermediate filaments in living epithelial cells. *J.Cell Biol.*, **153**, 503-516.
- Yoon,M., Moir,R.D., Prahlad,V. & Goldman,R.D. 1998. Motile properties of vimentin intermediate filament networks in living cells. *J.Cell Biol.*, **143**, 147-157.
- Yoshida,J., Horiuchi,A., Kikuchi,N., Hayashi,A., Osada,R., Ohira,S., Shiozawa,T. & Konishi,I. 2009. Changes in the expression of E-cadherin repressors, Snail, Slug, SIP1, and Twist, in the development and progression of ovarian carcinoma: the important role of Snail in ovarian tumorigenesis and progression. *Med.Mol.Morphol.*, **42**, 82-91.
- Yoshihara,K., Tajima,A., Komata,D., Yamamoto,T., Kodama,S., Fujiwara,H., Suzuki,M., Onishi,Y., Hatae,M., Sueyoshi,K., Fujiwara,H., Kudo,Y., Inoue,I. & Tanaka,K. 2009. Gene expression profiling of advanced-stage serous ovarian cancers distinguishes novel subclasses and implicates ZEB2 in tumor progression and prognosis. *Cancer Sci.*, **100**, 1421-1428.

- Yoshino,I., Kometani,T., Shoji,F., Osoegawa,A., Ohba,T., Kouso,H., Takenaka,T., Yohena,T. & Maehara,Y. 2007. Induction of epithelial-mesenchymal transition-related genes by benzo[a]pyrene in lung cancer cells. *Cancer*, **110**, 369-374.
- Zeisberg,E.M., Tarnavski,O., Zeisberg,M., Dorfman,A.L., McMullen,J.R., Gustafsson,E., Chandraker,A., Yuan,X., Pu,W.T., Roberts,A.B., Neilson,E.G., Sayegh,M.H., Izumo,S. & Kalluri,R. 2007a. Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis. *Nat.Med.*, **13**, 952-961.
- Zeisberg,M., Yang,C., Martino,M., Duncan,M.B., Rieder,F., Tanjore,H. & Kalluri,R. 2007b. Fibroblasts derive from hepatocytes in liver fibrosis via epithelial to mesenchymal transition. *J.Biol.Chem.*, **282**, 23337-23347.
- Zeng,X., Tamai,K., Doble,B., Li,S., Huang,H., Habas,R., Okamura,H., Woodgett,J. & He,X. 2005. A dual-kinase mechanism for Wnt co-receptor phosphorylation and activation. *Nature*, **438**, 873-877.
- Zhang,Q., Helfand,B.T., Jang,T.L., Zhu,L.J., Chen,L., Yang,X.J., Kozlowski,J., Smith,N., Kundu,S.D., Yang,G., Raji,A.A., Javonovic,B., Pins,M., Lindholm,P., Guo,Y., Catalona,W.J. & Lee,C. 2009a. Nuclear factor-kappaB-mediated transforming growth factor-beta-induced expression of vimentin is an independent predictor of biochemical recurrence after radical prostatectomy. *Clin.Cancer Res.*, **15**, 3557-3567.
- Zhang,X., Fournier,M.V., Ware,J.L., Bissell,M.J., Yacoub,A. & Zehner,Z.E. 2009b. Inhibition of vimentin or beta1 integrin reverts morphology of prostate tumor cells grown in laminin-rich extracellular matrix gels and reduces tumor growth in vivo. *Mol.Cancer Ther.*, **8**, 499-508.
- Zheng,G., Lyons,J.G., Tan,T.K., Wang,Y., Hsu,T.T., Min,D., Succar,L., Rangan,G.K., Hu,M., Henderson,B.R., Alexander,S.I. & Harris,D.C. 2009. Disruption of E-cadherin by matrix metalloproteinase directly mediates epithelial-mesenchymal transition downstream of transforming growth factor-beta1 in renal tubular epithelial cells. *Am.J.Pathol.*, **175**, 580-591.
- Zhou,B.P., Deng,J., Xia,W., Xu,J., Li,Y.M., Gunduz,M. & Hung,M.C. 2004. Dual regulation of Snail by GSK-3beta-mediated phosphorylation in control of epithelial-mesenchymal transition. *Nat.Cell Biol.*, **6**, 931-940.
- Zhu,W., Leber,B. & Andrews,D.W. 2001. Cytoplasmic O-glycosylation prevents cell surface transport of E-cadherin during apoptosis. *EMBO J.*, **20**, 5999-6007.

Annexe 1 : Publications

Publication 1 :

Bindels S., Mestdagt M., Vandewalle C., Jacobs N., Volders L., Noel A., Van Roy F., Berx G., Foidart J.-M. and Cilles C. (2006) Regulation of vimentin by SIP1 in human epithelial breast tumor cells. *Oncogene*, 25(36) : 4975-4985.

Publication 2 :

Joannes A., Bonnomet A., Bindels S., Polette M., Gilles C., Burlet H., Cutrona J., Zahm J.-M., Birembaut P. and Nawrocki-Raby B. (2009) Fhit regulates invasion of lung tumor cells. *Oncogene*, sous presse.

Publication 3 :

Polette M., Mestdagt M., Bindels S., Nawrocki-Raby B., Hunziker W., Foidart J.-M., Birembaut P. and Cilles C. (2007) β -catenin and ZO-1: shuttle molecules involved in tumor invasion-associated epithelial-mesenchymal transition processes. *Cells Tissues Organs*, 185(1-3) : 61-5.

(Reichert *et al.* 2000)