

Université de Strasbourg
Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

THÈSE

Présentée pour le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

Discipline : aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Spécialité : pharmacologie cellulaire et moléculaire

Par

Valérian DORMOY

Du développement au cancer : implication des voies néphrogéniques dans la croissance du carcinome à cellules rénales humain

Soutenue publiquement le 12 novembre 2010

Devant les membres du jury

Docteur Thierry MASSFELDER	CR INSERM, Strasbourg	Directeur de thèse
Professeur Nathalie RIOUX-LECLERCQ	PUPH, Rennes	Rapporteur externe
Professeur Stéphane OUDARD	PUPH, Paris	Rapporteur externe
Professeur Jean-Pierre BERGERAT	PUPH, Strasbourg	Rapporteur interne

ABRÉVIATIONS

ADN :	Acide désoxyribonucléique
angptl4 :	<i>angiopoietin-like 4</i>
ARN :	Acide ribonucléique
BHD :	Birt-Hogg-Dube
BMP :	<i>Bone morphogen protein</i>
CAIX :	anhydrase carboxylase IX
CCC :	Carcinome rénal à cellules conventionnelles
CCR :	Carcinome à cellules rénales
DMEM :	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
ECOG :	<i>Eastern Cooperative Oncology Group</i>
EGF :	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EMA (ou EMEA) :	Agence européenne du médicament (<i>European Medicines Agency</i>)
EYA :	<i>Eyes absent homologue</i>
FACS :	Cytomètre en flux (<i>Fluorescence-Activated Cell Sorting</i>)
FBS :	Serum de vœu fœtal (<i>Fetal Bovin Serum</i>)
FDA :	<i>Food and Drug Administration</i>
FH :	Fumarate hydratase
GAPDH :	Glycéraldéhyde phosphate deshydrogénase
GDNF :	<i>Glial cell line-derived neurotrophic factor</i>
GLI :	<i>Glioma-associated oncogene homolog</i>
GSK3 :	Glycogène synthase Kinase-3
HH :	Hedgehog
HIF :	Facteur induit par l'hypoxie (<i>Hypoxia-induced Factor</i>)
HOXA11 :	<i>Homeobox protein Hox-A11</i>
HRP :	<i>Horse radish peroxidase</i>
IL :	Interleukine
IFN :	Interféron
i.p. :	intra-péritonéal
I.P. :	Iodure de propidium
kDa :	Kilo Dalton
LDH :	Lactate déshydrogénase

Lim1 :	LIM-class homeobox gene 1
MAPK :	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MSKCC :	<i>Memorial Sloan-Kettering Cancer Center</i>
mTOR :	<i>mamalian Target Of Rapamycin</i>
NF-κB :	<i>Nuclear Factor-κB</i>
Pax :	<i>Paired box gene</i>
PBS :	Solution tamponnée à pH 7,4 (<i>Phosphate-Buffered Saline</i>)
PCR :	Réaction de polymérisation en chaîne (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PDGF :	<i>Platelet-derived growth factor</i>
PI3K :	Phosphoinositide 3-kinase
PTC :	<i>Patched receptor</i>
PTEN :	<i>Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10</i>
PTHrP :	Protéine apparentée à l'hormone parathyroïdienne (<i>Parathyroid hormone-related protein</i>)
pTNM :	<i>pathologic Tumor Node Metastase</i>
RET :	<i>Rearranged during transfection</i>
s.c. :	sous-cutané
SMO :	<i>Smoothened receptor</i>
SHH :	Sonic hedgehog
SIX :	<i>Six homeobox</i>
TBS :	<i>Tris-buffered saline</i>
TBST :	<i>Tris-buffered saline / tween 0,05%</i>
TGF :	Facteur de croissance tumorale (<i>Tumor growth factor</i>)
TMA :	<i>Tissue microarray</i>
TNF :	<i>Tumor necrosis factor</i>
TSC :	<i>Tuberous sclerosis complex</i>
TUNEL :	<i>Terminal deoxyribonucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labelling</i>
VEGF :	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (<i>Vascular endothelial growth factor</i>)
VHL :	von Hippel-Lindau
WT-1 :	<i>Wilms' tumor suppressor gene 1</i>

REMERCIEMENTS

Merci à mon directeur de thèse, Dr. Thierry Masssfelder, de m'avoir permis de réaliser mon doctorat au sein de son équipe. Merci pour la confiance que tu m'as toujours témoignée et pour ton soutien dans les différents projets scientifiques ou les congrès.

Merci aux Pr. Nathalie Rioux-Leclercq, Pr. Stéphane Oudard et Pr. Jean-Pierre Bergerat d'avoir accepté de faire partie du jury de thèse. Merci pour votre disponibilité et pour votre temps consacré à étudier ce manuscrit.

Merci à tous les membres présents, passés et à venir de l'équipe 3 de l'unité U682 pour leur sympathie, leur aide et leur motivation. Compagnons de paillasses, de paperasse et de strass d'un jour, d'une semaine, de plusieurs mois, voire d'années : Sabrina, Thomas, Raoul, Denis, Mazène, Claire, Audrey, Lionel, Sylvie, Alain, Jacques, Mariette, Jean-Jacques, Stéphanie et Catherine...

Merci aux collègues de différentes équipes pour leur aide scientifique et matérielle : Véronique, Jochen, Vincent, Hugues, Jean-Noël, Jocelyn...

Merci à Roula pour son anglais sans failles.

Merci au Dr. A. Donai pour ses conseils indispensables.

Merci à tous les relecteurs de ce manuscrit. Votre participation à la rédaction de cet ouvrage a permis de le rendre plus agréable aux yeux des littéraires les plus féroces.

Merci à tous les membres de ma famille et à mes amis. Chacun de vous a contribué à construire ma progression « scolaristique »...jusqu'au doctorat.

Merci à ma femme Lili pour son soutien dans tout ce que j'entreprends. Tu dresses des dauphins, j'expérimente sur des souris, nous sommes la preuve que les animaux sont les meilleurs amis de l'homme.

Merci à la machine à café qui a su faire émerger des myriades de réflexions constructives et de nombreuses résolutions de problèmes scientifiques par le rassemblement d'esprits assoiffés qu'elle abreuve.

TABLE DES MATIÈRES

ABRÉVIATIONS	1
REMERCIEMENTS	3
TABLE DES ILLUSTRATIONS	8
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	9
1 LE CARCINOME À CELLULES RÉNALES	10
1.1 Physiopathologie	10
1.1.1 Épidémiologie	10
1.1.2 Origines histologiques	11
1.1.3 Facteurs de risques	12
1.2 Classification	12
1.2.1 Les formes héréditaires de cancers du rein	12
1.2.1.1 La maladie de von Hippel-Lindau	12
1.2.1.2 Les autres pathologies	13
1.2.2 Les formes sporadiques de tumeurs rénales	14
1.2.2.1 Le carcinome rénal à cellules claires	14
1.2.2.2 Les carcinomes papillaires	14
1.2.2.3 Les carcinomes à cellules chromophobes	15
1.2.2.4 Le carcinome de type canal collecteur ou de Bellini	15
1.2.2.5 Les carcinomes non classés	15
1.3 Marqueurs pronostiques	15
1.3.1 Histologiques	15
1.3.1.1 Le stade pTNM	15
1.3.1.2 Le grade de Führman	16
1.3.1.3 Complexité de leur utilisation	16
1.3.2 Cliniques	17
1.3.2.1 L'ECOG performance status	17
1.3.2.2 L'échelle de Karnofsky	17
1.3.2.3 Les systèmes pronostiques après néphrectomie	18
1.3.3 Génétiques	18
1.4 État actuel des thérapies	20
1.4.1 Généralités	20
1.4.2 Thérapies classiques	20
1.4.2.1 La chirurgie	20
1.4.2.2 L'arsenal anticancéreux	21
1.4.3 Thérapies ciblées	21
1.5 Le système VHL/HIF : pôle de recherches pour lutter contre le CCR	24
1.5.1 Le gène suppresseur de tumeur VHL	24
1.5.2 Rôles du système VHL/HIF	24
1.5.3 Implication et ciblage du système dans le CCR	25
1.6 Expliquer la cancérogénicité associée au CCR : un défi à plusieurs facettes	26
1.6.1 D'autres événements requis (PI3K/Akt, NF-κB)	26

1.6.2	Et bien d'autres à découvrir (PTHrP, Pax2...)	26
2	LE DÉVELOPPEMENT DU REIN	28
2.1	Un processus en plusieurs étapes...	28
2.1.1	Généralités	28
2.1.2	Evolution du blastème et néphron	29
2.2	...faisant intervenir de nombreux facteurs	29
2.3	Pathologies rénales et anomalies génétiques	30
2.3.1	Altération des gènes au cours du développement	30
2.3.2	L'exemple de l'agenèse rénale	31
2.4	Exemple des gènes PAX	32
2.4.1	Pax-2 dans le développement du rein	32
2.4.2	Pax-2 dans le CCR	32
3	LA VOIE HEDGEHOG (HH)	34
3.1	Découverte de la voie HH	34
3.2	Description de la voie HH	34
3.2.1	Les ligands de la voie HH	34
3.2.2	Sonic HH	35
3.2.3	Transduction du signal	35
3.3	La voie HH dans le développement	36
3.3.1	Fonctions essentielles pour de nombreux organes	36
3.3.2	La voie HH dans le développement du rein	36
3.4	La voie HH : médiateur de la tumorigénèse	37
3.4.1	Une classification des tumeurs en fonction de la voie HH ?	37
3.4.2	Dissémination : un rôle dans l'EMT ?	38
3.4.3	Applications cliniques	38
4	LE FACTEUR DE TRANSCRIPTION <i>Lim1</i>	40
4.1	Découverte de <i>Lim1</i>	40
4.1.1	Les gènes homeobox	40
4.1.2	Le gène homeobox <i>Lim1</i>	40
4.2	Description du facteur de transcription	41
4.2.1	Structure	41
4.2.2	Régulation	41
4.3	<i>Lim1</i> dans le développement	42
4.3.1	Localisation et rôles	42
4.3.2	<i>Lim1</i> dans le développement du rein	43
4.4	<i>Lim1</i> et pathologies rénales	43
4.4.1	Du développement à l'anomalie congénitale	43
4.4.2	Un rôle dans le cancer ?	44
5	OBJECTIFS	45
	CHAPITRE 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODES	47

1	MODÈLES D'ÉTUDE	48
1.1	Les lignées cellulaires humaines	48
1.2	Les tissus humains	48
1.3	Les souris xéno greffées	48
1.3.1	Protocole d'implantation et de traitement des souris nude	48
1.3.2	Analyses immunohistochimiques	50
2	ÉTUDE DE L'EXPRESSION DES ARNs	51
2.1	Extraction	51
2.2	Transcription inverse	51
2.3	Quantification	52
3	ÉTUDE DE L'EXPRESSION PROTÉIQUE	52
3.1	Extractions	52
3.2	Dosage	53
3.3	Western-blot	53
4	LES INHIBITEURS	54
5	TRANSFERTS DE GÈNES	55
5.1	Extinction de gènes	55
5.2	Surexpression de gènes	55
5.2.1	Multiplication des plasmides d'intérêts	55
5.2.2	Transfection	56
6	ÉTUDES IN VITRO DE LA CROISSANCE CELLULAIRE	56
6.1	La densité cellulaire	56
6.2	La prolifération cellulaire	56
7	ÉTUDES IN VITRO DE LA MORT CELLULAIRE	57
7.1	L'apoptose	57
7.2	La sénescence	58
8	ÉTUDES IN VITRO DE LA MIGRATION ET DE L'INVASION CELLULAIRE	58
8.1	« Wound assay »	58
8.2	Les chambres de Boyden	59
9	STATISTIQUES	59
	CHAPITRE 3 : IMPLICATION DE VOIES NÉPHROGÉNIQUES DANS LE CCC	60
1	ETUDE DE LA VOIE SHH	61
1.1	Publication	61

1.2	Résumé	78
1.3	Discussion	79
2	ETUDE DU FACTEUR DE TRANSCRIPTION <i>Lim1</i>	82
2.1	Publication	82
2.2	Résumé	113
2.3	Discussion	114
CHAPITRE 4 : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES		117
CHAPITRE 5 : RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES		121
CHAPITRE 6 : ANNEXES		136
1	RÉSUMÉ EN FRANÇAIS	137
2	RÉSUMÉ EN ANGLAIS	138
3	PUBLICATIONS	139
4	POSTERS ET COMMUNICATIONS	140

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figures

Figure 1. Physiologie rénale et cancers du rein

Figure 2. Histologie des CCR

Figure 3. Chirurgie du CCR

Figure 4. Les traitements du CCR

Figure 5. Schéma classique clinique et thérapeutique du CCR

Figure 6. Le système VHL/HIF

Figure 7. Les voies oncogéniques impliquées dans le CCC

Figure 8. Développement du rein : acteurs moléculaires impliqués

Figure 9. Description de la voie HH

Figure 10. La voie HH dans le cancer

Figure 11. Structure du gène Lhx1

Figure 12. Protocole d'implantation de xénogreffes et de traitement des souris nude

Figure 13. Les inhibiteurs des différentes voies étudiées

Tableaux

Tableau 1. Classification des cancers du rein

Tableau 2. La classification pTNM

Tableau 3. Classification des CCR

Tableau 4. L'ECOG performance status

Tableau 5. L'échelle de Karnofsky

Tableau 6. CCR et essais cliniques : les études du premier semestre 2010

Tableau 7. Liste des amorces utilisées dans les études

Tableau 8. Liste des anticorps utilisés dans les études

INTRODUCTION

BIBLIOGRAPHIQUE



CHAPITRE 1



1 LE CARCINOME À CELLULES RÉNALES

1.1 Physiopathologie

1.1.1 Épidémiologie

Le cancer du rein constitue un groupe hétérogène de tumeurs représentant 3% des tumeurs malignes chez l'adulte. Il s'agit du troisième cancer urologique après ceux de la prostate et de la vessie. Son incidence est en constante augmentation de 2 % à 4 % par an.

Chaque année dans le monde, 200 000 nouveaux cas de cancer du rein sont diagnostiqués et le nombre de décès associé est estimé à 100 000 selon les données statistiques les plus récentes disponibles (Clark, 2007; Woldrich *et al.*, 2008). Le *sex-ratio* international est de 2 hommes pour 1 femme, et si les taux d'incidences standardisés sont respectivement de 11,9 pour 100 000 chez l'homme et de 5,1 pour 100 000 chez la femme, il est cependant à noter que ces taux varient considérablement d'un pays à l'autre dans les pays industrialisés (Levi *et al.*, 2008; Parkin *et al.*, 2005). En Europe par exemple, les taux d'incidence varient de 21,7 pour 100 000 chez les hommes, et 10,3 chez les femmes en République tchèque ; contre 6,8 pour 100 000 chez les hommes, et 4,2 pour 100 000 chez les femmes en Suède (Levi *et al.*, 2008). Aux Etats-Unis, où les taux d'incidence sont très élevés, ils peuvent atteindre jusqu'à 27,4 pour 100 000 chez les hommes de certaines ethnies (notamment d'origine asiatique) et 6,8 pour 100 000 chez les femmes (Jemal *et al.*, 2009).

Selon l'institut de veille sanitaire français, et d'après une étude menée de 1952 à 2006, chez l'homme, la mortalité par cancer du rein a beaucoup augmenté jusqu'en 1987 et est stable depuis. Chez la femme, la mortalité a augmenté jusqu'en 1990 et diminue depuis de 0,8 % par an. La surmortalité masculine est de 2,8. Ce type de cancer est responsable de 3 754 décès en 2006, ce qui représente 2,8 décès sur 100 par cancer chez l'homme et 2,1 chez la femme. Une tendance à la stabilisation de l'incidence du cancer du rein est à noter, mais il faut pondérer ce constat tout d'abord par les disparités importantes liées à la localisation géographique et l'ethnie considérée, et par l'amélioration des techniques de diagnostic qui modifie en permanence les statistiques épidémiologiques (Levi *et al.*, 2008).

Le cancer du rein chez l'adulte est représenté à 90% par le carcinome à cellules rénales (CCR) (Pantuck *et al.*, 2001). Le CCR conventionnel (CCC) est le principal sous-type de CCR, représentant environ 75 % de tous les CCR (Kovacs *et al.*, 1997). Le taux de survie à 5 ans est de 70 % pour un CCR localisé, mais chute à seulement 5 % dans le cas d'un CCR métastatique (Cohen and Zhou, 2005). Avec les dernières avancées au niveau du diagnostic, les données statistiques 2009 concernant le taux de survie à 5 ans pour un CCR nouvellement diagnostiqué est de 67 à 94 % pour le stade pT1, de 39 à 67 % pour le stade pT2, de 23 à 39 % pour le stade pT3, et de 0 à 23 % pour le stade pT4 (Downs *et al.*, 2009).

1.1.2 Origines histologiques

Figure 1

On distingue les différents types de tumeurs rénales en fonction de leur origine histologique. Quatre catégories ont été définies par la Société française de pathologie :

- **Les tumeurs d'origine épithéliale :**
 - *Bénignes* : Adénomes corticaux, oncocytomes, tumeurs de l'appareil juxtaglomérulaire, adénomes métanéphriques.
 - *Malignes* : Appelées carcinomes à cellules rénales (CCR), ces tumeurs sont les plus fréquentes, elles représentent 90% des tumeurs du rein. Pour cette raison, le laboratoire se focalise principalement sur ce type de tumeur, qui constitue le matériel pour répondre aux objectifs de cette thèse.
 - *Endocrines* : Appelées tumeurs carcinoïdes ou carcinomes, elles peuvent être bénignes ou malignes
- **Les tumeurs d'origine mésenchymateuse :**
 - *Bénignes* : Angiomyolipomes, léiomyélomes, lipomes
 - *Malignes* : Sarcomes
- **Les tumeurs blastémateuses :**
 - *Malignes* : Néphromes mésoblastiques, néphroblastomes de l'adulte et sarcomes à cellules claires
- **Les métastases :**

- Elles sont souvent multiples et parfois bilatérales. Le carcinome secondaire est le plus souvent pulmonaire, hépatique, mammaire ou digestif.

1.1.3 Facteurs de risques

Les principaux facteurs de risques associés à tous types de cancer sont le tabac, l'obésité et l'hypertension (Pan and DesMeules, 2009).

Concernant le cancer du rein, il est généralement accepté que 50% des cancers sont attribuables à ces principaux facteurs de risques (Brock *et al.*, 2009; Flaherty *et al.*, 2005; Lipworth *et al.*, 2006). Il faut cependant nuancer ces statistiques : l'association entre un facteur de risques et le développement d'un cancer du rein n'est pas concluante en comparaison avec des études ciblant d'autres cancers, et ceux-ci peuvent varier énormément d'une zone géographique à une autre ou d'une ethnie à une autre (Dhote *et al.*, 2004). Parmi les autres facteurs de risques associés au cancer du rein, nous pouvons également citer les infections urinaires, ou encore l'exposition à différents composés chimiques comme les hydrocarbures, l'amiante et le cadmium.

Inversement, il est intéressant de noter que des mesures hygiéno-diététiques telles qu'un régime alimentaire pauvre en graisse et en cholestérol mais riche en fibres (Hu *et al.*, 2008), ou encore une activité physique régulière (Chiu *et al.*, 2006), pourraient diminuer le risque de développer un cancer du rein.

1.2 Classification

Tableau 1

1.2.1 Les formes héréditaires de cancers du rein

1.2.1.1 La maladie de von Hippel-Lindau

La maladie de von Hippel-Lindau (VHL) est une pathologie autosomique dominante prédisposant au développement de tumeurs richement vascularisées du système nerveux central, de la rétine, du rein, de la médullosurrénale et du pancréas (Richard *et al.*, 2004). Ce syndrome a été décrit pour la première fois par Eugène Von Hippel, ophtalmologiste allemand, qui en 1904, décrivit une maladie familiale à l'origine

d'un hémangioblastome rétinien. Plus tard, en 1926, Arvid Lindau décrit le caractère systémique de cette maladie et notamment l'association qui existe avec l'hémangioblastome cérébelleux. Cette maladie est la forme héréditaire dominante de cancer du rein, qui est la principale cause de mortalité chez les patients atteints de la maladie de VHL (Cohen and Zhou, 2005). Elle se révèle en général chez le jeune adulte, entre 18 et 30 ans, mais peut également se manifester dès l'enfance. 80 % des malades le sont par l'hérédité et 20 % possèdent une nouvelle mutation (Lonser *et al.*, 2003).

1.2.1.2 Les autres pathologies

➤ **Le syndrome de carcinome papillaire héréditaire :**

Affection autosomique dominante rare induisant la survenue de carcinomes papillaires multiples et bilatéraux. Elle est caractérisée par des mutations activatrices du proto-oncogène MET qui code pour un récepteur à activité tyrosine-kinase normalement activé par le facteur de croissance hépatocytaire HGF (Lubensky *et al.*, 1999).

➤ **Le carcinome papillaire héréditaire associé à une léiomyomatose cutanée et utérine (HLRCC) :**

Il est caractérisé par une mutation du gène de la fumarate hydratase (FH), enzyme du cycle de Krebs impliquée dans les phénomènes d'oxydation dans les mitochondries (Baldewijns *et al.*; Ratcliffe, 2007). Il a été montré que la perte de cette enzyme conduit également à une activation de la voie HIF (*Hypoxia Induced Factor*). Les patients porteurs de mutations germinales de ce gène développent des CCR papillaires de type 2, mais aucune relation n'a été démontrée entre les mutations somatiques de ce gène et les cas sporadiques de CCR.

➤ **Le syndrome de Birt-Hogg-Dube :**

Il s'agit d'une génodermatose autosomale dominante prédisposant notamment les patients à développer des tumeurs rénales dans 15 à 30 % des cas. Le gène BHD code pour la fulliculine, une mutation du gène entraîne la formation d'une fulliculine tronquée qui ne peut plus agir comme suppresseur de tumeur (Toro *et al.*, 2008). Il semble que le gène BHD pourrait jouer un rôle dans l'ensemble des CCR.

➤ **La sclérose tubéreuse de Bourneville :**

Cette maladie autosomique dominante est caractérisée par l'apparition de tumeurs bénignes, notamment dans le rein. Elle est due à des mutations des gènes suppresseurs de tumeurs TSC1 ou 2 (*Tuberous Sclerosis Complex*) impliqués précocement dans le développement du rein. En effet, les produits de ces deux gènes, l'hamartine et la tubérine, s'associent pour former un complexe régulant la prolifération cellulaire en inhibant la voie mTOR (Mak and Yeung, 2004).

1.2.2 Les formes sporadiques de tumeurs rénales

Figure 2

La majorité des tumeurs du rein sont d'origine sporadique.

1.2.2.1 Le carcinome rénal à cellules claires

Il s'agit du type de tumeurs rénales le plus fréquemment observé. Il représente environ 65 % des tumeurs du rein et 75 % des CCR. A l'examen histologique, le carcinome rénal à cellules claires (CCC) est constitué de cellules de tailles variables, classiquement claires, disposées en agrégats, en nappes, en travées ou en formation tubulo-kystiques. Le stroma est généralement très vascularisé. Sur le plan génétique, les tumeurs sont caractérisées par une délétion spécifique du chromosome 3p, siège du gène VHL dont les mutations sont retrouvées exclusivement dans ce sous-type : mutation/délétion de la région 3p25 dans 78% des CCR et hyperméthylation de cette région dans 20% des cas (Banks *et al.*, 2006; Yoshimoto *et al.*, 2007).

1.2.2.2 Les carcinomes papillaires

Ils représentent 10 à 15% des carcinomes rénaux. Par définition, les papilles sont des structures centrées par un axe vasculaire bordé par du tissu épithélial. Ils se divisent en deux groupes : les carcinomes papillaires de type 1 qui sont constitués de papilles bien dessinées, bordées de cellules basophiles de bas grade de Führman avec des axes papillaires renfermant des macrophages spumeux, et les carcinomes papillaires non de type 1 à grandes cellules éosinophiles et atypiques, de haut grade, que l'on retrouve généralement chez des patients jeunes (Kosaka *et al.*, 2008; Pignot *et al.*, 2007). Si les carcinomes papillaires de type 1 sont généralement de bon pronostic, les carcinomes

papillaires non de type 1 ont un pronostic le plus souvent défavorable. L'agressivité des carcinomes papillaires demeure cependant moindre que celle des CCC.

1.2.2.3 Les carcinomes à cellules chromophobes

Ils représentent 5 à 10 % des carcinomes rénaux et se forment à partir des cellules intercalaires B du canal collecteur. Il s'agit d'une tumeur arrondie, compacte, homogène, typiquement plus claire que le parenchyme rénal voisin et faiblement nécrosée (Amin *et al.*, 2008). Les carcinomes à cellules chromophobes sont généralement des tumeurs de bas grade et de bon pronostic, à nuancer en fonction de la présence de zones nécrotiques et de la taille de la tumeur (> 8 cm).

1.2.2.4 Le carcinome de type canal collecteur ou de Bellini

C'est le sous-type de CCR le plus rare (moins de 1 % des cas). Il se développe à partir du canal collecteur, mais son diagnostic est difficile car ses aspects morphologiques sont très variables. Aucun profil génétique particulier n'a pu être établi.

1.2.2.5 Les carcinomes non classés

Les carcinomes qui ne peuvent pas être classés après analyses histologiques représentent environ 5% des carcinomes. Il y a notamment trois dénominations qui ont été décrites :

- le CCR multiloculaire à cellules claires
- le carcinome rénal mucineux tubuleux à cellules fusiformes
- le carcinome rénal associé aux translocations Xp11.2/TFE (gène de fusion).

1.3 Marqueurs pronostiques

1.3.1 Histologiques

1.3.1.1 Le stade pTNM

Tableau 2

Ce système de classification, établi par l'*International Union Against Cancer*, est à l'heure actuelle le plus couramment utilisé et l'un des plus fiables et précis pour déterminer les facteurs de pronostic de survie des patients atteints de CCR. Appelé p (pour *pathological*) *tumor node metastasis* (TNM), il est établi à partir de l'examen anatomopathologique et permet de classer les tumeurs en stades allant de pT1 à pT4, où le T correspond à la tumeur primaire (taille et envahissement), N (Nx, N0, N1, N2) au nombre de ganglions régionaux et M (Mx, M0, M1) à l'existence ou non de métastases à distance. Ce système, en perpétuelle discussion et qui en est à sa sixième édition, a été révisé pour la dernière fois en 2002, date à laquelle le stade pT1 a été subdivisé en pT1a et pT1b afin d'augmenter la pertinence pronostique de ce système (Sagalowsky, 2002).

1.3.1.2 Le grade de Führman

Tableau 3

Il s'agit d'un grade nucléaire simple et reproductible basé sur l'aspect du noyau et du nucléole des prélèvements tumoraux réalisés (Führman *et al.*, 1982). Il s'applique quel que soit le sous-type histologique. Ainsi, quatre grades sont définis, du grade I avec un pronostic favorable jusqu'au grade IV de pronostic défavorable. Le premier grade est identifié par des noyaux ronds d'environ 10 µm, réguliers avec un nucléole absent ou peu visible. Le deuxième grade décrit des noyaux ronds d'environ 15 µm, peu réguliers avec un nucléole visible mais petit. Concernant le troisième grade, les noyaux de 20 µm sont irréguliers et possèdent un nucléole large et visible. Finalement, le dernier grade est caractérisé par des noyaux de formes multiples, multilobés, de plus de 20 µm avec un nucléole très visible. L'attribution du grade est définie sur le contingent de grade le plus élevé à l'examen, quelle que soit sa proportion au sein du tissu tumoral. Le grade de Führman possède une forte valeur pronostique, indépendante des autres paramètres. Bien que certaines études lui reprochent un manque de reproductibilité interindividuelle (Al-Aynati *et al.*, 2003; Ficarra *et al.*, 2005), il reste reconnu comme la méthode la plus fiable pour l'évaluation histologique tumorale (Lang *et al.*, 2005).

1.3.1.3 Complexité de leur utilisation

Les classements du CCR basés sur l'histologie sont d'une importance capitale pour l'aspect clinique, car ils fournissent un langage commun pour décrire les

caractéristiques tumorales. Ils permettent de décrire des groupes distincts séparés par un risque de récurrence ou de survie différent, une surveillance différente et une sélection pour des traitements ou des essais différents (Mancini *et al.*, 2008; Shuch *et al.*, 2008). Ainsi, l'utilisation de ces marqueurs pronostiques est en constante évolution afin de regrouper plus précisément les patients en fonction du type de tumeur qu'ils développent. En plus d'utiliser les autres marqueurs qui seront décrits dans les sous-parties suivantes afin de caractériser et de classer les patients atteints de CCR, le stade pTNM et le grade de Führman sont utilisés conjointement et sont constamment modifiés pour augmenter leur pertinence ; c'est ainsi que sont notamment apparues une reclassification du stade pT3 de la classification pTNM (Ficarra *et al.*, 2007) ou la nécessité de regrouper les grades de Führman deux par deux pour augmenter la reproductibilité de l'analyse histologique (Letourneux *et al.*, 2006).

1.3.2 Cliniques

1.3.2.1 L'ECOG performance status

Tableau 4

L'état général du patient, évalué à travers le statut des performances (« *performance status* » PS) de l'*Eastern Cooperative Oncology Group* (ECOG), est un facteur pronostique indépendant, valable aussi bien pour les tumeurs localisées que pour les tumeurs métastatiques (Zisman *et al.*, 2001).

1.3.2.2 L'échelle de Karnofsky

Tableau 5

Utilisée en clinique, elle permet au médecin d'évaluer l'évolution de l'état du malade avant et après un traitement (Yates *et al.*, 1980). Elle est particulièrement employée dans le pronostic et le suivi des cancers. Elle se base sur les capacités du patient à accomplir certaines tâches, son degré d'autonomie. L'échelle d'évaluation doit son nom au médecin américain D. A. Karnofsky.

1.3.2.3 Les systèmes pronostiques après néphrectomie

Le grade de Führman et la classification pTNM sont souvent pris en défaut en raison de l'évolution imprévisible des cancers du rein. Dans le but de mieux traduire la complexité biologique des tumeurs, différentes variables pronostiques sont combinées dans des algorithmes afin d'obtenir des modèles pronostiques plus pertinents sur l'évolution de la maladie.

➤ Dans les cancers du rein localisés :

Nombreux sont les systèmes à être développés. Parmi eux figure notamment celui de Kattan associant les symptômes au moment du diagnostic, le sous-type histologique, l'ECOG, la taille de la tumeur et le stade pTNM. Il fut le premier d'une longue série représenté par l'UISS (*UCLA Integrated Staging System*) intégrant stade pTNM, grade de Führman et statut ECOG (Zisman *et al.*, 2002), le SSIGN (*Stage Size Grade Necrosis*), ou encore plus récemment, un modèle proposé par Karakiewicz divergeant du modèle de Kattan par le remplacement de l'ECOG par la classification symptomatique, et l'utilisation de la taille tumorale comme variable continue (Karakiewicz *et al.*, 2007; Patard *et al.*, 2004).

➤ Dans les cancers du rein métastatiques :

Le modèle le plus largement utilisé est le MSKCC (*Memorial Sloan-Kettering Cancer Center*) décrit par Motzer (Motzer *et al.*, 1999). Il permet principalement de définir des groupes pronostiques dans les essais cliniques. Il intègre notamment comme variables les taux de LDH, d'hémoglobine, de calcium et l'échelle de Karnofsky (Mekhail *et al.*, 2005; Motzer *et al.*, 2006; Thompson Coon *et al.*).

1.3.3 Génétiques

L'identification de gènes associés à des cancers plus ou moins agressifs pourrait conduire à la détermination d'un pronostic personnalisé de chaque tumeur rénale et de sa potentielle réponse aux thérapies disponibles. Takahashi *et al.* (Takahashi *et al.*, 2001) ont collecté et analysé les tissus normaux et tumoraux de 29 patients avec un CCC afin de réaliser des puces à ADN comptabilisant 21 632 amorces. Les résultats permettent de décrire 32 gènes surexprimés et 77 réprimés plus de trois fois dans 75 % des tumeurs analysées. Pour ne prendre que quelques exemples, il est ainsi à noter que

le TNF α est surexprimé en moyenne 10 fois dans tous les tissus tumoraux et le VEGF voit son expression augmentée de 5 fois dans 96,4% des tissus tumoraux.

Le profil moléculaire d'un cancer permettrait de prédire un schéma thérapeutique pour chaque patient et d'identifier ceux qui présentent le plus haut risque de récurrence. L'obtention de marqueurs moléculaires comme indicateur pronostique permettrait non seulement de déterminer l'agressivité d'une tumeur, ses capacités de dispersion en métastases, mais également d'identifier la capacité d'une tumeur à être reconnue ou non par le système immunitaire de l'hôte et de prédire la réponse à un traitement chez les patients (Leppert *et al.*, 2007). Les études les plus récentes concernant l'obtention de marqueurs moléculaires dans le cancer du rein ont montré beaucoup d'enthousiasme concernant l'anhydrase carboxylase IX (CAIX). Son rôle essentiel est de réguler le pH intra- et extracellulaire des cellules tumorales en phase hypoxique (Lam *et al.*, 2005). Il a été observé que 94 % des CCC sont marqués positivement par la CAIX (Bui *et al.*, 2003). Un faible marquage de cette anhydrase est associé avec un taux de survie faible et un taux de réponse faible aux immunothérapies chez des patients avec un CCR métastatique (Atkins *et al.*, 2005).

Les récepteurs à l'EGF représentent des régulateurs positifs impliqués dans l'invasion du CCR. Avec la découverte récente de l'inhibiteur de la différenciation Id-1, des études ont montré qu'une surexpression de celui-ci est corrélée à l'expression des récepteurs à l'EGF. Il représenterait ainsi un nouveau marqueur d'un CCR avancé.

De nombreuses autres molécules ont donné des résultats significatifs en termes de marqueurs potentiels pour le CCR, il s'agit notamment de certaines molécules d'adhésion comme les cadhérines, ou encore des protéines régulant le cycle cellulaire comme p53, Akt, ou PTEN (Nogueira and Kim, 2008; Tunuguntla and Jorda, 2008). Plus récemment, des études sur l'angiopoïétin-like 4 (angptl4), un gène induit par l'hypoxie et fortement exprimé dans le CCC, semblent faire émerger ce marqueur en tant que nouvel outil de diagnostic pour ce type de cancer du rein (Verine *et al.*).

Il faut cependant relativiser l'impact de ces marqueurs pronostiques génétiques et moléculaires découverts récemment; la capacité à introduire des signatures génétiques complètes et pertinentes cliniquement, pour une prise en charge rapide des patients, n'existe toujours pas. Cette innovation prendra sûrement beaucoup de temps à être mise en place, limitée par des coûts relativement élevés.

1.4 État actuel des thérapies

1.4.1 Généralités

Au moment du diagnostic du cancer du rein, à 67 ans en moyenne chez les hommes et 70 ans chez les femmes, 30 % des patients sont à un stade métastatique et 30 % vont développer des métastases (Belot *et al.*, 2008). Si le nombre de morts associé aux cancers ne cesse d'augmenter chaque année, il est à noter cependant que le taux de mortalité concernant le cancer du rein en Europe a tendance à se stabiliser, voire à diminuer depuis les années 2000, et ceci notamment en raison de l'amélioration des techniques de diagnostic, de chirurgie et de l'innovation thérapeutique (Levi *et al.*, 2008).

1.4.2 Thérapies classiques

1.4.2.1 La chirurgie

Figure 3

La chirurgie d'exérèse est l'option thérapeutique de première ligne quel que soit le stade tumoral. Après néphrectomie, le taux de récurrence peut atteindre jusqu'à 30 % (Heldwein *et al.*, 2008). Depuis la première néphrectomie totale réalisée en 1882 par Czerni, les techniques et instruments médicaux ont profondément évolué, afin d'optimiser les opérations chirurgicales au niveau du rein. Ainsi, en 1990, la première néphrectomie totale en laparoscopie était réalisée, apportant de nombreux bénéfices pour le patient et l'hôpital (Burgess *et al.*, 2007; Meraney and Gill, 2002). En fonction de certains paramètres, dont les plus importants sont la taille et l'envahissement de la tumeur, une néphrectomie partielle peut être réalisée ; on parle alors de chirurgie épargnante du rein (Miller *et al.*, 2006). Plus récemment, des techniques très peu invasives ont été mises en place pour des patients ayant des critères de co-morbidité élevés. Il s'agit notamment de la cryoablation (Daval *et al.*, 2006) et de l'ablation par radiofréquence (Zagoria *et al.*, 2007). Par ailleurs, la chirurgie permet également les métastectomies, particulièrement dans un but palliatif. Le taux de survie à 5 ans des patients ayant reçu une seconde chirurgie à visée curative pour des métastases, varie de 35 à 60 % selon les études (Russo *et al.*, 2007). De plus, elle ne peut se faire que pour un

groupe de patients particuliers, d'un âge inférieur à 60 ans et n'ayant pas plus de deux sites de métastases par exemple.

1.4.2.2 L'arsenal anticancéreux

Figure 4

Les CCR métastatiques sont résistants aux thérapies anticancéreuses classiques que sont la radiothérapie, l'hormonothérapie et la chimiothérapie, notamment avec l'utilisation du 5-Fluorouracile, de la floxuridine, de la vinblastine ou encore du taxol (Motzer and Russo, 2000). En effet, des taux de réponse inférieurs à 5 % ont été recensés sur des dizaines d'essais cliniques concernant ces différentes thérapeutiques.

L'immunothérapie à base d'interleukine 2 (IL-2) et/ou l'interféron- α (IFN- α) donne des taux de réponse ne dépassant pas les 15 %. A l'heure actuelle, elle n'est administrée qu'à une sous-population de patients présentant un bon état clinique général et dont la tumeur métastatique est de bon pronostic (Drucker, 2005; McDermott, 2009; Motzer and Russo, 2000). De plus, les effets secondaires de ce type de thérapie sont très nombreux : fièvres, nausées, diarrhées, éruptions cutanées ou encore confusion mentale.

1.4.3 Thérapies ciblées

Figure 5 et Tableau 6

Des avancées récentes, notamment associées à la description et à la compréhension du système VHL/HIF, ont conduit à la mise en place de nouvelles stratégies thérapeutiques avec des inhibiteurs des tyrosines kinases comme le sunitinib ou le sorafenib. Ces deux produits, approuvés par la *Food and Drug Administration* (FDA) aux Etats-Unis en 2006 et par l'*European Medicines Agency* (EMA) en Europe en 2007, stabilisent momentanément la prolifération tumorale, mais ne semblent pas avoir d'effets sur la survie (Escudier *et al.*, 2007a; Escudier *et al.*, 2009; Motzer *et al.*, 2007a; Motzer *et al.*, 2007b). De plus, la réponse biologique à ces agents est limitée dans le temps (environ sept mois) en raison du développement d'une résistance tumorale par des mécanismes encore inconnus. Enfin, d'importants effets toxiques sont induits par ces agents. Ainsi, les thérapies pour cette maladie réfractaire restent inappropriées et de nouvelles options thérapeutiques pour le CCR sont à développer d'urgence.

➤ **Les inhibiteurs des activités tyrosine kinase**

Ils inhibent non seulement les récepteurs au VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), mais également d'autres récepteurs à activité tyrosine kinase. Un des avantages de leur utilisation réside dans leur mode d'administration oral qui doit cependant être journalier. De part leur activité multi-cibles, ils peuvent agir sur l'angiogenèse, mais également sur la prolifération cellulaire et l'apoptose. Les principaux effets secondaires sont l'asthénie, l'apparition de rashes cutanés, de vomissements, de diarrhées, d'une hypertension artérielle ou encore du syndrome main-pied (Motzer *et al.*, 2009).

○ *Sunitinib*

Le Sutent® (Pfizer) inhibe également le récepteur PDGF-R α/β , c-kit ou encore Flt3 (*Fms-like tyrosine kinase*) (Chow and Eckhardt, 2007). Par rapport au traitement par l'IFN en première ligne du cancer de rein métastatique après chirurgie d'exérèse, le sunitinib a montré une augmentation du taux de réponse partielle de plus de 30 % et une augmentation de la survie sans progression tumorale de plus de six mois (Stein and Flaherty, 2007).

○ *Sorafenib*

Le Nexavar® (Bayer) inhibe également Raf-1, PDGF-R β , Flt3 et c-kit (Wilhelm *et al.*, 2006). En traitement de deuxième ligne après échec des cytokines, le sorafenib double la survie sans progression et améliore la survie globale par rapport à un placebo (Escudier *et al.*, 2007a).

○ *Autres*

Plus récemment sont apparus 2 nouveaux inhibiteurs des récepteurs à activité tyrosine kinase ayant une affinité plus élevée pour les récepteurs au VEGF : l'*axitinib* (Pfizer Inc.) et le *pazopanib* (GlaxoSmithKline). Les essais cliniques sont en cours et menés notamment chez des patients ne répondant pas aux autres traitements secondaires à la chirurgie (Facchini *et al.*, 2009; Rini, 2009).

➤ **Le ciblage du récepteur au VEGF**

○ *Bevacizumab*

Il s'agit d'un anticorps monoclonal recombinant humanisé (à 93 % humain). L'Avastin® (Roche) inhibe spécifiquement toutes les formes circulantes de VEGF, neutralisant ainsi l'activation du récepteur au VEGF (Shih and Lindley, 2006). Il

est administré par voie intra veineuse (i.v.) toutes les deux à trois semaines en fonction de la dose. Classiquement, il est associé à l'IFN- α en traitement de première ligne suite à la chirurgie (10 mg/kg i.v. toutes les deux semaines) et améliore le taux de réponse des patients de 18 % et la survie sans progression de cinq mois par rapport à l'IFN seul (Escudier *et al.*, 2007b). Le *bevacizumab* s'accompagne de nombreux effets secondaires, tels que l'augmentation de l'hypertension artérielle, d'une hématurie, d'épisodes d'épistaxis, ou encore d'une protéinurie asymptomatique.

➤ **Le ciblage de la voie mTOR**

○ *Temsirolimus*

Le Torisel® (Wyeth Pharmaceuticals) est dérivé d'un immunosuppresseur, la rapamycine. Il bloque l'activité sérine/thréonine kinase de mTOR en formant un complexe avec l'immunophiline FKBP. Injecté en i.v. en traitement de première ligne après chirurgie chez des patients de mauvais pronostic, il permet en comparaison à l'IFN, un doublement de la survie sans progression tumorale et une augmentation de la survie globale (Facchini *et al.*, 2009).

○ *Everolimus*

L'évérolimus (Novartis) bloque également l'activité sérine/thréonine kinase de mTOR en formant un complexe de haute affinité avec FKBP12. Il est administré par voie orale. En 2009, il a reçu l'approbation par la FDA et l'EMA pour le traitement en deuxième ligne des patients avec un cancer du rein avancé après échec de la thérapie par les inhibiteurs des récepteurs à activité tyrosine kinase (Agarwala and Case).

Les principaux effets secondaires des médicaments ciblant la voie mTOR sont l'asthénie, les rashes cutanés, les oedèmes périphériques, la stomatite et la dyspnée (Hudes, 2007).

1.5 Le système VHL/HIF : pôle de recherches pour lutter contre le CCR

1.5.1 Le gène suppresseur de tumeur VHL

Figure 6

Des mutations inactivatrices bialléliques du gène suppresseur de tumeur VHL, à l'origine de la maladie de VHL, sont retrouvées chez la majorité (plus de 60 %) des patients atteints de CCC (Clark, 2007). Dans les cas sporadiques, ce gène peut être rendu silencieux par méthylation du promoteur ou par mutations/délétions (Friedrich, 1999). Les produits du gène VHL (pVHL) sont impliqués dans la dégradation, en condition normoxique, des facteurs de transcription induits par l'hypoxie (HIFs). Ceci conduit à la régulation négative de nombreuses cibles des HIFs intervenant dans l'angiogénèse, la croissance cellulaire ou encore le métabolisme cellulaire, incluant le VEGF, les TGFs α et β (*Transforming Growth Factors*), la PTHrP (*Parathyroid Hormone-related Protein*), l'érythropoïétine, les transporteurs du glucose et la transferrine (Kaelin, 2007; Sourbier and Massfelder, 2006). Tous sont décrits comme des acteurs potentiels dans la tumorigénèse du CCR. Pour montrer le rôle suppresseur de tumeur du gène VHL, il a été démontré que la réintroduction du VHL dans des cellules VHL (-/-) est suffisante pour empêcher le développement de tumeurs chez la souris nude xénotreffée (Iliopoulos *et al.*, 1995). De plus, les souris VHL (-/-) meurent à mi-gestation en raison d'un défaut de vascularisation du placenta et les souris hétérozygotes VHL (-/+) sont viables, mais développent de nombreuses tumeurs vascularisées dans le foie (Kapitsinou and Haase, 2008).

1.5.2 Rôles du système VHL/HIF

La principale activité biologique des produits du gène VHL (pVHL) est la dégradation dépendante de l'oxygène de HIF- α . En effet, par association avec notamment la culline 2 et les élongines B et C, il y a formation d'un complexe à activité ubiquitine ligase E3. Les facteurs HIF- α sont les principales cibles de ce complexe. Le rôle majeur du pVHL est donc de reconnaître les facteurs HIF- α qui seront alors polyubiquitinylés puis dégradés par le protéasome 26S (Haase, 2006). Les facteurs HIF ont normalement pour rôle d'aider la cellule à résister aux conditions hypoxiques, leur régulation est donc conditionnée par la présence d'oxygène : ils doivent être hydroxylés

pour être reconnus par pVHL. Ainsi, en conditions hypoxiques, ou en l'absence d'un pVHL fonctionnel, comme dans la majorité des CCC, ces facteurs ne seront pas dégradés. Ils s'accumulent dans le cytoplasme et se transloquent dans le noyau où ils interagissent avec les facteurs HIF-1 β pour induire la transcription de nombreux gènes. Parallèlement à cette régulation transcriptionnelle, le système VHL/HIF peut également réguler ces mêmes cibles au niveau post-transcriptionnel, comme c'est le cas par exemple pour le VEGF. D'autres cibles, comme les TGF- α et β , sont régulées exclusivement de façon post-transcriptionnelle par ce système, au niveau de la stabilité de leur messenger (Clark, 2009). Le système étant basé sur la non-dégradation des facteurs HIF- α et donc leur activation, les cibles de ce système VHL/HIF sont les produits des gènes cibles des facteurs HIF-1 et 2 α . Il a également été démontré une activité anti-tumorale de HIF-3, produit par épissage alternatif, dans la régulation des autres facteurs induits par l'hypoxie comme HIF-2 (Maynard *et al.*, 2007). Ainsi, lorsque le VHL est inactivé, de nombreux gènes cibles vont être activés (Hickey and Simon, 2006). Les protéines ainsi surexprimées vont notamment intervenir dans de nombreux processus cellulaires favorisant la croissance tumorale : l'angiogenèse avec le VEGF et le PDGF- β ; la croissance cellulaire et l'apoptose avec les TGF- α et β et la PTHrP ; le métabolisme du glucose (Glut1) ; l'érythropoïèse (EPO) ; la formation de la matrice extracellulaire (fibronectine) ; la survie cellulaire avec IGF-2, IGF-BP2 et NOS2 ; l'équilibre acido-basique (anhydrase carbonique 9 et 12) ; ou encore le métabolisme des lipides (leptine).

1.5.3 Implication et ciblage du système dans le CCR

Le gène VHL est l'acteur majeur de la régulation des facteurs HIF et le système VHL/HIF régule de façon transcriptionnelle et/ou post-transcriptionnelle de nombreuses molécules dont des facteurs de croissance largement impliqués dans la croissance tumorale. Ainsi, l'étude de VHL et des facteurs HIFs a contribué à la mise sur le marché de traitements dirigés contre le VEGF ou mTOR, acteurs impliqués dans le fonctionnement du système (Clark, 2009). Plus récemment, l'étude de protéines stabilisatrices/déstabilisatrices de l'ARNm, cibles du système VHL/HIF, a montré un rôle de ces protéines dans la croissance cellulaire du CCC (Danilin *et al.*).

1.6 Expliquer la cancérogénicité associée au CCR : un défi à plusieurs facettes

1.6.1 D'autres événements requis (PI3K/Akt, NF-κB)

Figure 7

Le CCR présente une résistance intrinsèque *in vivo* aux thérapies, mais cette résistance n'est pas retrouvée *in vitro*. Les stratégies thérapeutiques sont basées sur l'implication des voies prolifératives et de survie (constitutives ou induites par la thérapie). Ainsi, pour obtenir une régression tumorale, les options thérapeutiques sont focalisées sur les voies anti-apoptotiques et l'angiogénèse. Les voies anti-apoptotiques et prolifératives de PI3K/Akt (*Phosphatidyl-Inositol-3-Phosphate/Akt*), du NF-κB (*Nuclear Factor κB*) et des MAPK (*Mitogen-activated Protein Kinase*) ont été démontrées comme étant activées constitutivement dans le CCC et comme étant cruciales à la tumorigénèse du rein (Huang *et al.*, 2008; Sourbier *et al.*, 2007; Sourbier *et al.*, 2006).

1.6.2 Et bien d'autres à découvrir (PTHrP, Pax2...)

Le ciblage du système VHL/HIF s'est révélé efficace mais insuffisant pour l'innovation thérapeutique concernant le cancer du rein. Celui des voies oncogéniques ne permet pas non plus d'obtenir des régressions tumorales *in vivo* chez des modèles murins, même si l'effet sur la prolifération cellulaire ou la mort cellulaire *in vitro* est impressionnant. Ainsi, pour espérer une forte activité antitumorale, une approche multi-cibles doit être adoptée, d'où la nécessité de découvrir de nouvelles voies et de nouveaux acteurs potentiellement impliqués dans la cancérogénèse associée au CCR. L'hypothèse des voies impliquées au cours du développement du rein a été explorée depuis quelques années. Ainsi, il a été montré que la PTHrP, protéine essentielle au cours de la néphrogenèse, joue un rôle critique pour la croissance du CCR (Sourbier and Massfelder, 2006). Encore plus récemment, le gène PAX2 (*Paired box gene 2*), impliqué très tôt au cours du développement du rein, s'est révélé être une cible intéressante pour une future thérapie du cancer du rein (Hueber *et al.*, 2008). Pour généraliser au niveau du cancer, nous pouvons également évoquer les signalisations cellulaires liées à Notch et à Wnt, qui sont largement impliquées au cours du développement (rénal y compris), et qui jouent un rôle au niveau de la croissance tumorale et des processus métastatiques (Bailey *et al.*, 2007; McCright, 2003; Pulkkinen *et al.*, 2008; Sjolund *et al.*, 2008).

Ces différentes études ont ainsi ouvert la porte à de nouvelles possibilités pour cibler les cellules cancéreuses, notamment au niveau du cancer du rein : des acteurs impliqués au cours du développement pourraient être réexprimés ou régulés différemment dans cette pathologie et prendre part activement à sa propagation, voire aux phénomènes de résistance.

2 LE DÉVELOPPEMENT DU REIN

2.1 *Un processus en plusieurs étapes...*

2.1.1 Généralités

Le développement de l'appareil urinaire est lié à celui de l'appareil génital. L'appareil urinaire comprend les reins (assurant entre autres fonctions celle de l'excrétion de l'urine), les uretères (qui transportent l'urine des reins à la vessie), la vessie (qui stocke temporairement l'urine) et l'urètre (qui transporte l'urine depuis la vessie vers l'extérieur).

Chez l'ensemble des vertébrés, le système urinaire dérive du feuillet mésodermique intermédiaire (reins, uretères) et du sinus urogénital (vessie, urètre). À partir de la quatrième semaine de développement fœtal, le rein se développe selon une séquence cranio-caudale. Ainsi, trois parties inscrites dans une séquence temporelle bien déterminée se développent : le pronéphros, le mésonéphros et le métanéphros. Les deux premières ébauches auront une existence transitoire (le pronéphros régresse à la cinquième semaine et le mésonéphros à la huitième), alors que le métanéphros deviendra le rein définitif. Le métanéphros se développe dans le mésoblaste intermédiaire de la région sacrée, à partir de trois structures : le bourgeon urétéral (diverticule épithélial dérivant du canal de Wolff, il est à l'origine des voies excrétrices extra rénales et du tube collecteur intrarénal), le blastème métanéphrogène (tissu mésenchymateux donnant naissance aux futurs néphrons), et le réseau capillaire glomérulaire. L'unité fonctionnelle du rein est le néphron, c'est lui qui a notamment comme rôle de filtrer l'urine. Il est composé de plusieurs parties ayant une fonction particulière dans les processus d'absorption/réabsorption : le corpuscule de Malpighi ou glomérule, le tubule contourné proximal, le tubule droit proximal, l'anse de Henlé, le tubule droit distal et le tubule contourné distal. Le tube contourné distal se jette dans le tube collecteur. La néphrogenèse se termine chez l'homme à 36 semaines de gestation, il s'agit donc d'un long processus qui commence dès les premières étapes du développement jusqu'à son terme.

2.1.2 Evolution du blastème et néphron

Le processus aboutissant à la formation du néphron est complexe et peut se dissocier en plusieurs étapes. Le blastème métanéphrogène recouvre chaque tube collecteur nouvellement formé et se condense pour former des agrégats cellulaires périlitubulaires. Les cellules mésenchymateuses subiront ensuite une transformation épithéliale et formeront des vésicules, il s'agit de la transition mésenchyme/épithélium. Ces vésicules vont tout d'abord s'allonger en tubules en forme de virgule puis de «S» avec très schématiquement 3 segments : développement du segment supérieur en tubule distal (tubule contourné et droit distal, partie ascendante du tubule intermédiaire), développement du segment moyen en tubule proximal (tubule contourné et droit proximal, partie descendante du tubule intermédiaire) et développement du segment inférieur qui va former la capsule rénale. Les vésicules épithéliales expriment des facteurs angiogéniques et attirent les cellules endothéliales dans la capsule rénale en voie de développement. Au contact d'une artériole afférente, l'épithélium tubulaire s'amincit et s'invagine, pour former à ce niveau une coiffe à double feuillet, la capsule de Bowman.

Finalement, en même temps que se développe le corpuscule rénal, le côté opposé de la vésicule fusionne avec le tube collecteur qui lui est adjacent. Le métanéphros devient alors fonctionnel, filtrant le plasma des capillaires glomérulaires dans les corpuscules rénaux. Le filtrat glomérulaire (urine primaire) s'écoulera dans les tubules proximaux, intermédiaires et distaux où il sera concentré et traité pour former l'urine secondaire. Celle-ci sera excrétée en passant par les tubes collecteurs, le bassinet et l'uretère qui donnent dans la vessie.

2.2 ...faisant intervenir de nombreux facteurs

Figure 8

Pour que l'ensemble des transformations ayant lieu au niveau du rein se déroule dans une cinétique et une homéostasie permettant l'obtention d'un rein fonctionnel, différents facteurs interviennent au cours du développement rénal. Ainsi, les phénomènes de migration/invasion, prolifération ou différenciation cellulaire sont sous le contrôle de nombreux facteurs de transcription et voies signalétiques associées, tels que *Odd1*, *WT1*, *Eya1*, *Sall1*, *Pax2*, *Wnts*, et *Lim1* pour n'en citer que quelques-uns (Reidy and Rosenblum, 2009; Venegas-Ferrin *et al.*). Si au cours du développement, l'un

ou l'autre de ces facteurs est dérégulé, il en résulte des perturbations graves au niveau du système urinaire. Ceci a notamment été étudié sur des souris « *knock-out* » (KO), c'est-à-dire où le génome a été manipulé pour éteindre l'expression d'un gène. Par exemple, chez une souris KO pour le gène *Eya1*, le mésenchyme métanéphrique ne se formera pas, il n'y aura donc pas formation de reins. La liste des modèles de souris où l'expression d'un gène jouant un rôle au cours du développement du rein a été modifiée est à ce jour très étendue. La conclusion générale est que l'altération d'un gène du développement rénal induit la construction d'un rein non fonctionnel, hypotrophique ou une absence de rein. La liste des modèles animaux disponibles, mise à jour en juillet 2009, est disponible à cette adresse : <http://golgi.ana.ed.ac.uk/mutantk.html>.

2.3 Pathologies rénales et anomalies génétiques

Il devenait ainsi évident que si des gènes jouaient un rôle essentiel au cours du développement du rein, leur activité, ou tout du moins une régulation négative de leur activité au cours de la vie adulte, devait également participer à l'homéostasie tissulaire. Du développement du rein à l'obtention d'un phénotype pathologique, il ne restait que quelques pas à franchir pour faire la démonstration du concept...et l'appliquer aux situations cancéreuses.

2.3.1 Altération des gènes au cours du développement

Les anomalies congénitales du rein et du système urinaire, CAKUT en anglais (*Congenital Abnormalities of the Kidney and Urinary Tract*) concernent un nouveau-né sur 500 (Schedl, 2007). Ces anomalies représentent ainsi jusqu'à 30 % de toutes les anomalies identifiées dans la période prénatale.

Les principales anomalies sont l'agenèse rénale (absence de rein), l'apparition d'uretères multiples ou trop gros, une hypoplasie rénale (diminution de la taille du rein), une dysplasie (un rein contenant des structures anormales) ou encore l'apparition d'un rein polykystique (normalement dû à un dysfonctionnement des cils cellulaires). Chacune de ces anomalies s'accompagne d'une dérégulation d'un ou plusieurs gènes, tels que *WT1* (*Wilms' tumor suppressor gene*), *PAX2*, *EYA1* (*Eyes absent homologue 1*), *GLI3*, *SIX1* (*Six homeobox 1*)...Les pathologies qui en résultent chez l'enfant ou l'adulte prennent le nom de syndrome de Nail-Patella, de Pierson, de Pallister-Hall ou encore de

Senio-Loken pour n'en citer que quelques uns (Schedl, 2007). Elles s'accompagnent le plus souvent d'une prise en charge hospitalière lourde et de traitements très importants.

2.3.2 L'exemple de l'agenèse rénale

L'absence de formation d'un rein au cours du développement a lieu chez un nouveau-né pour 5000, et chez un nouveau-né pour 30 000 sur les deux reins. Dans la plupart des cas, ceci semble lié à un défaut de la signalisation faisant intervenir un complexe régulant GDNF (*Glial cell line-derived neurotrophic factor*) et requérant notamment l'intervention de EYA1, SIX1/4 et PAX2 (Schedl, 2007). L'expression de GDNF est particulièrement sous la dépendance du gène HOXA11 (*Homeobox protein Hox-A11*). Le GDNF libéré par les cellules mésenchymateuses peut se fixer à son récepteur RET (*rearranged during transfection*) ou GFRA1 (*Glial cell line-derived neurotrophic factor receptor A1*), activant ainsi une cascade d'évènements conduisant à la prolifération des cellules épithéliales liée à la voie PI3K/Akt. Des mutations sur les gènes GDNF ou RET n'ont pas été retrouvées, en revanche des mutations sur EYA1 ou SIX1 induisent le syndrome branchio-oto-rénal (syndrome BOR) caractérisé par des anomalies du développement rénal (Abdelhak *et al.*, 1997; Hoskins *et al.*, 2007; Ruf *et al.*, 2004). Hors du mésenchyme métanéphrique, BMP4 (*Bone morphogen protein 4*) est très abondant, ce qui induit l'inactivation du GDNF. L'expression de GREM1, l'inhibiteur de BMP4 dans ce mésenchyme, suffit à rendre son activité à GDNF. Les souris mutées pour le gène GREM1 montrent une agenèse rénale due à une inhibition BMP4 dépendante du GDNF (Michos *et al.*, 2007). Ainsi, l'anomalie congénitale qu'est l'absence de formation d'un rein est liée à une anomalie génétique régulant GDNF.

Si la dérégulation d'un gène au cours du développement pouvait entraîner l'apparition rapide d'une anomalie physiologique, cela montrait clairement que ces gènes jouent un rôle régulateur très important dès les stades précoces de la vie. Il semblerait donc possible que ces mêmes gènes puissent participer à la mise en place ou au développement d'autres pathologies comme le cancer, où des phénomènes cellulaires identiques à ceux intervenant au cours du développement sont requis.

2.4 Exemple des gènes PAX

2.4.1 Pax-2 dans le développement du rein

Une famille de gènes, nommée par la présence d'un motif conservé de l'ADN appelé « *paired box* », est impliquée au cours de l'embryogénèse. Des mutations dans l'un ou l'autre de ces neuf gènes sont associées à des anomalies du développement au sein de l'organe concerné. De plus, certains gènes sont exprimés à l'âge adulte avec une distribution différente (Eccles *et al.*, 2002). L'expression de Pax-2 au cours de l'embryogénèse est trouvée dans le tractus optique, le cerveau, la moelle épinière et le rein. Plus particulièrement au niveau de cet organe, Pax-2 est détecté spécifiquement dans les conduits mésonéphriques, les bourgeons de l'uretère et plus tard dans les agrégats de cellules mésenchymateuses. A des stades plus tardifs, Pax-2 est restreint à la partie distale du corps en forme de S et l'expression est éteinte lorsque les cellules sont différenciées (Narlis *et al.*, 2007). L'absence de Pax-2 chez la souris résulte en l'apparition d'anomalies graves du système urogénital : absence de rein, d'uretère ou d'organes génitaux, en plus de problèmes ophtalmologiques et auditifs (Chi and Epstein, 2002). Chez l'homme, une modification de l'expression de Pax-2 induit l'apparition d'un syndrome rénal coloboma, une maladie autosomale caractérisée par des anomalies rénales et oculaires. Une surexpression de Pax-2 est associée à une malformation rénale embryonnaire ou infantile, l'apparition d'un phénotype rénal polykystique, d'une tumeur de Wilm ou encore d'un CCR. La tumeur de Wilm résulte d'anomalies dans le développement précoce du rein, alors que les carcinomes qui affectent le rein adulte proviennent du tubule proximal et du canal collecteur.

2.4.2 Pax-2 dans le CCR

Alors que l'expression de Pax-2 n'est plus détectée dans les cellules rénales adultes, elle est présente dans 73 % des lignées cellulaires dérivées de carcinomes rénaux et dans 90% des cas de CCR humains (Beland and Bouchard, 2006).

La régénération de l'épithélium tubulaire, qui survient après un dommage causé au rein chez l'adulte, est caractérisée par la présence de cellules dédifférenciées (mésenchymateuses) ayant retrouvé leur capacité de prolifération. Ce phénomène transitoire survient avec la réactivation de l'expression de Pax-2, qui perdure jusqu'à la

reconstitution de l'épithélium. Cela suggère donc une fonction pour Pax-2 dans le maintien de l'état prolifératif. Parallèlement, Pax-2 exerce un contrôle sur la croissance des cellules cancéreuses. Une corrélation a été établie entre l'expression du gène PAX2 dans les carcinomes rénaux de type conventionnel et l'index de prolifération (Beland and Bouchard, 2006). De plus, il a été montré que Pax-2 inhibe l'apoptose induite par le cisplatine dans des cultures de lignées cellulaires rénales (Hueber *et al.*, 2006). Finalement, Pax-2 a été validé comme cible pour le traitement du cancer du rein et comme cible thérapeutique potentielle pour augmenter l'efficacité d'agents chimiques (Hueber *et al.*, 2008).

C'est ainsi qu'un acteur essentiel au cours du développement du rein, régulant les processus de prolifération et de différenciation cellulaire de l'embryogénèse précoce, se retrouve impliqué dans une pathologie qui apparaît chez l'adulte. Pour expliquer la cancérogénicité et l'apparition de phénomènes de résistance suite à l'utilisation d'un traitement pour le CCR, il est désormais utile et essentiel d'étudier les voies développementales et d'analyser leur rôle dans la tumorigénèse au sein des cellules cancéreuses. Cela pourrait également aboutir à l'identification et la caractérisation de potentiels marqueurs pronostiques ou diagnostiques comme le suggère l'étude de Pax-2 (Ozcan *et al.*, 2009).

Dans mon travail de thèse, je m'intéresserai plus particulièrement à la voie HH et au facteur de transcription Lim1, intervenant de manière substantielle dans l'embryogénèse, pour en analyser l'implication dans le CCR. Cette voie et ce facteur de transcription sont très importants lors de la néphrogenèse, et sont en outre directement impliqués dans l'expression notamment de Pax2, et dans ses effets biologiques. Précisons maintenant pourquoi cette voie et ce facteur nous apparaissent intéressants à étudier dans le CCR humain.

3 LA VOIE HEDGEHOG (HH)

3.1 Découverte de la voie HH

La voie hedgehog (HH) est une voie de signalisation récente découverte en 1993 (Echelard *et al.*, 1993; Tashiro *et al.*, 1993). Elle est impliquée dans la différenciation et la prolifération cellulaire (Wang *et al.*, 2007) au cours de l'embryogénèse (Gill and Rosenblum, 2006), et dans certaines situations physiopathologiques comme le cancer. En 1995, Edward B. Lewis, Christiane Nüsslein-Volhard et Eric F. Wieschaus obtenaient le prix Nobel pour leurs études sur les mutations génétiques au cours de l'embryogénèse chez la drosophile. Le gène hedgehog avait notamment été identifié comme acteur essentiel de l'orientation rostro-caudale, étape précoce du développement.

3.2 Description de la voie HH

3.2.1 Les ligands de la voie HH

La voie HH est caractérisée par l'existence de trois ligands endogènes (Sonic HH, Indian HH et Desert HH). Ces protéines ont des effets physiologiques similaires, les spécificités dans leurs rôles proviennent d'un profil d'expression différent.

- L'expression de DHH est restreinte aux gonades, plus particulièrement dans les cellules de Sertoli au niveau des testicules, et dans les cellules de la granulosa au niveau des ovaires. Une défaillance de la voie HH via le ligand DHH provoque des cas d'infertilité chez l'homme.
- Le ligand IHH est principalement restreint à l'endoderme primitif, à l'intestin et aux chondrocytes au sein des zones de croissance osseuse.
- SHH est le ligand le plus répandu de la voie HH. Au cours de l'embryogénèse, il est exprimé dans différents tissus lors de la segmentation et lors de la mise en place de l'orientation dorso-ventrale et latérale de l'embryon. Plus tardivement, SHH est exprimé et affecte le développement de la plupart des tissus épithéliaux (Varjosalo and Taipale, 2008).

3.2.2 Sonic HH

Après traduction, SHH subit de nombreuses transformations pour être sécrété sous sa forme active. L'ensemble de ces mécanismes est conservé au cours de l'évolution (Ma *et al.*, 2002). La première étape est un clivage catalysé par sa propre extrémité C-terminale, afin d'obtenir une partie C-terminale sans activité connue et une partie N-terminale qui contient le domaine de signalisation HH, de même qu'un cholestérol dans son extrémité C-terminale permettant l'association à la membrane cytoplasmique. Puis, un groupement palmitate requis pour l'activité du ligand est ajouté à la partie N-terminale. Le ligand HH sous sa forme active contient ainsi un groupement cholestérol du côté C-terminal et un groupement acétate du côté N-terminal (Buglino and Resh, 2008).

3.2.3 Transduction du signal

Figure 9

Le ligand de la voie interagit avec le récepteur *Patched* (PTC), une protéine à 12 domaines transmembranaires, qui contrôle un récepteur couplé aux protéines G (*Smoothened*, SMO), ainsi que des facteurs de transcription Gli (*Glioma-associated oncogene homologue*, Gli1, Gli2 et Gli3) (Ruiz i Altaba *et al.*, 2002). Bien que les modalités d'activation de la voie HH ne soient pas encore bien connues, la présence ou l'absence de l'agoniste sur son récepteur induit une régulation différente des cibles transcriptionnelles (Evangelista *et al.*, 2006).

PTC et SMO sont localisés sur la membrane plasmique. En l'absence du ligand, PTC réprime SMO et la voie HH ne peut être activée (Briscoe, 2006). Gli3 forme un large complexe protéique séquestré dans le cytoplasme avec Costal2, Fused (Fu) et le suppresseur de Fused (SuFu). Costal2 peut induire la protéolyse de Gli3 et ainsi générer une forme inhibitrice de Gli3 (Rep-Gli3). La translocation de Rep-Gli3 dans le noyau inhibe la transcription des gènes cibles de la voie HH, tels que PTC et Gli1, il agit ainsi en tant que répresseur de la transcription des cibles de la voie HH, tandis que Gli1 et Gli2 sont les activateurs de cette transcription.

La fixation du ligand à PTC induit la suppression de sa fonction inhibitrice, ceci conduisant à l'activation de la voie HH. Bien que les mécanismes ne soient pas encore bien connus, il semble qu'une forme active de Gli (Act-Gli), relarguée par le complexe protéique, soit transportée dans le noyau pour activer la transcription des gènes cibles

de la voie HH (Kasper *et al.*, 2006), tels que Gli1, cycline D1, Wnt, IGF2 (*Insulin Growth Factor 2*), PDGF (*Platelet-Derived Growth Factor*), EGF (*Epidermal Growth Factor*) ou encore VEGF (Duman-Scheel *et al.*, 2002; Pola *et al.*, 2001). Jusqu'à présent, le ligand de la voie ainsi que la protéine Gli1 sont considérés comme les marqueurs de l'activation de la voie HH (Dahmane *et al.*, 1997).

3.3 La voie HH dans le développement

3.3.1 Fonctions essentielles pour de nombreux organes

La voie HH est fondamentale pour un large éventail de processus impliqués dans le développement des vertébrés, mais également des invertébrés (Varjosalo and Taipale, 2008). Le ligand de la voie sous sa forme sécrétée programme le développement et la différenciation de nombreuses cellules de l'embryon qui prolifèrent rapidement de manière concentration-dépendante. En tant que morphogène, c'est-à-dire en produisant un gradient de concentration induisant une différenciation dans le temps et l'espace de cellules particulières, la voie HH participe à l'orchestration très précise des événements de l'embryogénèse. Chez l'homme, un dysfonctionnement de SHH conduit à l'apparition d'une holoprosencéphalie. Des anomalies retrouvées dans d'autres acteurs de la voie sont également associées à des malformations congénitales et aux cancers. En effet, si la voie HH est perturbée, l'ensemble du développement est perturbé et chacun des organes est susceptible d'être anormal (Villavicencio *et al.*, 2000).

3.3.2 La voie HH dans le développement du rein

La voie HH contrôle principalement l'expression de trois classes de gènes cruciaux pour le développement rénal normal : les gènes intervenant dans l'organisation spatiale et la segmentation (Pax2 et Sall1) ; les modulateurs du cycle cellulaire (cycline D1 et N-myc) ; les effecteurs de la voie HH eux-mêmes : Gli1 et Gli2. Il est à noter qu'une déficience en ligand SHH induit une diminution de l'expression des protéines Gli1 et Gli2, alors qu'une augmentation de l'expression de la protéine Gli3 est observée (Gill and Rosenblum, 2006).

3.4 La voie HH : médiateur de la tumorigénèse

Figure 10

Des études récentes décrivent des interactions entre la voie HH et la PTHrP. En effet, SHH peut induire des modifications dans l'expression du gène de la PTHrP (Jemtland *et al.*, 2003), protéine qui peut agir en tant que régulateur de la voie HH (Torday and Rehan, 2006). Ceci est intéressant, car il a été démontré par le laboratoire d'accueil que la PTHrP est cruciale dans la croissance du CCC humain (Massfelder *et al.*, 2004; Talon *et al.*, 2006). Dans le cancer, il est décrit que le blocage de la voie HH induit la mort des cellules cancéreuses *in vitro*. De plus, des régressions tumorales qui pouvaient être complètes ont été démontrées *in vivo* dans le modèle de souris « *nude* » xénogreffées par des lignées humaines et traitées par la cyclopamine, un inhibiteur sélectif de la voie HH (Incardona *et al.*, 1998). Il a été rapporté qu'une administration de cyclopamine a des effets antitumoraux sur les néoplasmes malins du tube digestif (Berman *et al.*, 2003), du pancréas (Nakashima *et al.*, 2006; Thayer *et al.*, 2003), de la prostate (Karhadkar *et al.*, 2004), du colon (Qualtrough *et al.*, 2004), du sein (Katano, 2005), ou encore des médulloblastomes (Berman *et al.*, 2002). Cependant, son efficacité thérapeutique dans le CCR humain n'a pas encore été testée. Ainsi, le ciblage de différents acteurs de la voie HH pourrait constituer une stratégie pour traiter le CCR, d'autant plus que la voie HH est très importante dans la néphrogénèse chez l'homme et d'autres espèces animales (Gill and Rosenblum, 2006).

3.4.1 Une classification des tumeurs en fonction de la voie HH ?

Trois modèles principaux ont été proposés pour décrire la place de la voie HH dans le cancer :

- Le cancer de type I, le premier découvert, caractérisé par des mutations des divers acteurs de la voie, le rendant ainsi ligand indépendant, comme le carcinome à cellules basales.
- Le type II est ligand-dépendant et autocrine (ou juxtacrine) : le ligand est produit et agit sur la même cellule cancéreuse ou ses voisines immédiates.
- Le type III est également ligand-dépendant mais paracrine : le ligand sécrété par l'épithélium tumoral agit sur le stroma pour induire une cascade d'évènements aboutissant à des signaux provoquant la croissance et la survie tumorale.

- Un modèle alternatif, apparu récemment, postule que la signalisation liée à la voie HH (autocrine ou paracrine) est uniquement importante pour maintenir des cellules souches potentielles au sein de la tumeur (Scales and de Sauvage, 2009).

3.4.2 Dissémination : un rôle dans l'EMT ?

L'apparition de métastases est responsable d'environ 90 % des décès associés aux cancers. Un des processus fondamentaux impliqués est la transition épithélio-mésenchymateuse (ou EMT en anglais pour *Epithelial to Mesenchymal Transition*). L'EMT, l'homéostasie tissulaire ainsi que la carcinogénèse sont particulièrement caractérisées par un changement de type de cadhérines, des protéines impliquées dans l'interaction cellulaire et tissulaire. Les cadhérines de la classe N, caractéristiques des cellules mésenchymateuses, sont synthétisées à partir des E cadhérines, caractéristiques des cellules épithéliales. De plus, certains gènes, dont SNAI1/2/3, ZEB1/2, KLF8 et TWIST1/2, sont des régulateurs de l'EMT, puisqu'ils répriment l'expression des E-cadhérines. Enfin, la voie HH induit une régulation positive de JAG2 pour obtenir une surexpression de SNAI1 via la voie Notch, de même qu'une surexpression de ZEB1/2 via le récepteur au TGF- β et NF- κ B. Ainsi, la voie HH conduit indirectement à l'EMT en agissant sur les voies Notch ou du TGF- β (Katoh and Katoh, 2008).

Concrètement, il a été montré au niveau clinique que la cyclopamine inhibe l'EMT des cellules cancéreuses pancréatiques, et l'expression de Gli1 est associée avec la métastase lymphatique dans le carcinome à cellules squameuses oesophagial (Bailey *et al.*, 2007).

3.4.3 Applications cliniques

Si les recherches sur la voie HH n'ont commencé que très récemment, il n'en demeure pas moins que des essais cliniques sont en cours, principalement dans des cancers métastatiques. Il semble ainsi possible que des applications thérapeutiques nombreuses voient le jour si les premiers essais paraissent concluants, et si les recherches au niveau de la compréhension des mécanismes moléculaires relatifs à la voie HH impliqués dans les pathologies progressent.

Le premier médicament ayant fait son apparition est le GDC-0449, commercialisé par trois géants du paysage industriel pharmaceutique : Genetech, Roche et Chugai

Pharmaceuticals. Il s'agit d'un inhibiteur du récepteur SMO qui possède une IC_{50} de 0,003 μ M (Molckovsky and Siu, 2008).

Les principaux essais cliniques impliquant son utilisation sont les suivants :

- Pour les cancers de la peau localement avancés, multifocaux ou métastatiques (phase I) (Von Hoff *et al.*, 2009).
- Pour des patients en échec thérapeutique total avec des tumeurs solides localement avancées ou métastatiques (Doggrell).
- En première ligne, en association avec le bevacizumab et la chimiothérapie pour le cancer colorectal métastatique (phase II) (Yoshikawa *et al.*, 2009).
- Pour le médulloblastome (Rudin *et al.*, 2009).

4 LE FACTEUR DE TRANSCRIPTION Lim1

4.1 Découverte de Lim1

4.1.1 Les gènes homeobox

Les gènes comportant une séquence d'ADN spécifique appelée homéotique, ou gènes « homeobox », représentent une grande famille de gènes classés en onze catégories (ANTP, PRD, LIM, POU, PNF, SINE, TALE, CUT, PROS, ZF, et CERS). Le dernier criblage génétique a comptabilisé 300 loci homéotiques, comportant 265 gènes fonctionnels et 35 pseudogènes répartis sur l'ensemble des chromosomes humains (Holland *et al.*, 2007). Des analyses phylogénétiques approfondies ont déterminé qu'il existe douze gènes LIM répartis en six familles dérivant d'un gène ancestral commun. Ainsi, l'ensemble du règne animal, des spongiaires aux vertébrés, possède les protéines codées par les gènes homeobox (Yasuoka *et al.*, 2009). Ils possèdent au moins deux domaines LIM et sont classés en fonction de la nature du deuxième type de domaine qu'ils contiennent : un domaine homéotique (LIM-hd), un domaine kinase (LIM-kinase) ou des domaines LIM supplémentaires (LIMO pour LIM-only) (Retaux and Bachy, 2002).

4.1.2 Le gène homeobox Lim1

Le gène Lim1 a été identifié pour la première fois chez *Xenopus*, d'où le nom donné à ce gène : *lhx1* pour LIM-domain homeobox xenopus 1. Il appartient à la classe LIM-hd et se situe sur le chromosome 17, plus précisément à l'emplacement 17q12 (entrez gene ID 3975)(Holland *et al.*, 2007). Chez la souris, il est localisé sur le chromosome 11 (48.0 cM) et chez le rat à la position 10q26. *Lhx1* est exprimé dans la région blastopore pendant la gastrulation chez l'ensemble des vertébrés et certains bilateria (Yasuoka *et al.*, 2009).

4.2 Description du facteur de transcription

4.2.1 Structure

Figure 11

Le gène *Lhx1* mesure approximativement 6 kb. Il contient cinq exons de 160 à 602 kb et quatre introns de 93 paires de bases à 2,3 kb les séparant (Bozzi *et al.*, 1996). Le facteur de transcription *Lim1* se caractérise par la présence de deux domaines LIM compris entièrement dans le premier et le deuxième exon, et d'un domaine homéotique compris dans les exons 3 et 4.

Les domaines LIM sont des motifs riches en cystéine : CxxCx(17-19)HxxCxxCxxCx(16-20)Cxx(D/H/C)x. Ils ont été identifiés pour la première fois dans des protéines issues de trois gènes différents : *mec-3* et *lin-11* chez *Caenorhabditis elegans* (Freyd *et al.*, 1990; Way and Chalfie, 1988) et *Isl-1* chez le rat (Karlsson *et al.*, 1990). C'est pourquoi il a été donné le nom de protéines Lim par la suite aux protéines issues des gènes *Lim*, pour facteurs de transcription contenant les domaines LIM *Lin-11*, *Isl-1* et *Mec-3*. Les domaines LIM constituent des domaines d'interaction protéine/protéine d'environ 55 acides aminés comportant deux doigts de zinc en tandem (Holland *et al.*, 2007) similaires à ceux retrouvés pour les domaines en doigts de zinc de type GATA, excepté le fait qu'ils ne se fixent pas à l'ADN.

4.2.2 Régulation

A partir des premières observations sur les domaines LIM en 1993, il a été montré que leur rôle était d'être inhibiteur d'activités, à travers les interactions protéines/protéines. Les domaines LIM bloquent l'association de l'ADN avec les homéodomains associés et interfèrent avec la transactivation de la transcription. Il semblait dès lors que l'action de cofacteurs (activateurs et/ou répresseurs) était nécessaire pour réguler les facteurs Lim (Sanchez-Garcia *et al.*, 1993). Depuis, quelques études ont suggéré que la régulation spatiale et temporelle des facteurs de transcription Lim est relayée par l'interaction des domaines LIM avec des cofacteurs, des compétiteurs et d'autres facteurs de transcription, ceci en fonction du contexte moléculaire, du processus étudié et de la localisation considérée (Retaux and Bachy, 2002). L'effet activateur ou inhibiteur de Lim sur ses cibles est ensuite directement lié à

la stoechiométrie des éléments le régulant. Ainsi, comme dans de nombreux processus développementaux, la balance activation/inhibition est critique pour réguler Lim. D'autres gènes ou voies intervenant au cours du développement font partie de ces régulateurs de Lim1, on y retrouve notamment Pax2, Gli1 ou encore Odd1 (Reidy and Rosenblum, 2009).

Plus récemment, l'implication de micro ARN (miARN), des ARN non codants régulant l'expression de gènes au niveau post-transcriptionnel, a été décrite concernant le développement rénal. La famille de miARN miR-30 inhibe l'expression de Lhx1 lors de la néphrogénèse, se désignant ainsi en tant que régulateur des processus développementaux par son activité sur Lhx1 (Agrawal *et al.*, 2009).

4.3 Lim1 dans le développement

4.3.1 Localisation et rôles

Au cours de l'embryogénèse chez la souris, Lim1 est exprimé très tôt dans le mésoderme puis au cours du développement de l'appareil urogénital, des reins, du foie et du système nerveux (Barnes *et al.*, 1994; Dong *et al.*, 1997; Fujii *et al.*, 1994). Une délétion du gène Lim1 dans des embryons de souris provoque l'apparition d'un phénotype acéphalique avec des animaux qui n'ont pas de développement des structures antérieures de la tête, pas de reins, ni de gonades, mais un développement normal du reste du corps ainsi que de la queue (Shawlot and Behringer, 1995). Au cours du développement du système nerveux, Lim1 est nécessaire à l'organisation de la trajectoire des motoneurones dans les membres (Kania *et al.*, 2000). Lim1 est également exprimé dans les canaux de Müller des souris en développement ; des souris KO pour Lim1 n'ont pas les structures dérivées de ces canaux, c'est-à-dire les oviductes et utérus (Kobayashi *et al.*, 2004). Ces premières observations ont permis de mettre en évidence que Lim1 est requis pour réguler l'organisation céphalique des vertébrés, le système nerveux ainsi que le système reproducteur chez la femelle. Les protéines humaines Lim1 partagent 87 % d'homologie de séquence avec les protéines de souris. Jusqu'à présent, l'expression de Lim1 a été observée dans les tissus humains adultes au niveau du cerveau, de la cavité buccale, du thymus et dans une lignée cellulaire leucémique (Hunter and Rhodes, 2005).

4.3.2 Lim1 dans le développement du rein

Le développement embryonnaire des amniotes du pronéphros au métanéphros récapitule l'évolution du système urogénital (Saxen and Sariola, 1987). Alors qu'il existe de nombreux gènes avec un profil d'expression restreint à divers tissus régulant un aspect particulier du développement rénal, très peu sont exprimés dans l'ensemble des trois reins qui se succèdent : Pax2, Pax8 et Lim1 (Vainio and Lin, 2002).

Le facteur de transcription Lim1 est exprimé tout au long du développement du système urinaire (Barnes *et al.*, 1994; Fujii *et al.*, 1994; Karavanov *et al.*, 1998; Kobayashi *et al.*, 2004; Kume *et al.*, 2000; Tsang *et al.*, 2000). Chez la souris, Lim1 est exprimé dans le mésoderme intermédiaire à E7,5, dans les canaux de Wolf et les tubules mésonéphriques à E10,5. Lim1 est également exprimé dans le métanéphros, dans la partie terminale de la région corticale des bourgeons urétéraux (Kobayashi *et al.*, 2005). Dans les tissus métanéphriques dérivés du mésenchyme, Lim1 est observé dans les agrégats pré-tubulaires, les corps en virgule et en « S », ainsi que dans les podocytes des glomérules (Karavanov *et al.*, 1998; Sariola, 2002). Bien que la quasi-totalité des mutants pour Lim1 meurent au dixième jour de développement embryonnaire en raison d'une incapacité à former le placenta, les rares nouveaux-nés sont caractérisés par une absence de reins (Shawlot and Behringer, 1995), due à une incapacité à former les conduits néphrologiques (Tsang *et al.*, 2000). En raison de cette mortalité embryonnaire survenant très tôt lors du développement et une absence de conduits néphrogéniques pour les mutants arrivant à terme, la liste des fonctions de Lim1 décrites au cours du développement est loin d'être exhaustive.

4.4 Lim1 et pathologies rénales

4.4.1 Du développement à l'anomalie congénitale

Les anomalies au niveau du développement rénal et du système urinaire, telles que l'aplasie/dysplasie, le reflux vésicule/uretère, ou encore les pathologies urinaires obstructives, sont les causes les plus communes d'une défaillance rénale chez les enfants dans les pays industrialisés (Reidy and Rosenblum, 2009). Si la plupart de ces anomalies est due à un dysfonctionnement des gènes jouant un rôle dans les étapes du développement, il n'y a cependant jusqu'à ce jour aucune mutation identifiée concernant

le gène Lhx1 chez l'homme, contrairement aux autres facteurs de transcription de la même famille (Hunter and Rhodes, 2005).

4.4.2 Un rôle dans le cancer ?

Si la découverte de Lim1 n'est pas plus récente que celle de la voie HH, il n'en demeure pas moins que le nombre d'études concernant ce facteur est relativement restreint. Si son implication dans les processus développementaux n'est plus à démontrer, au niveau des pathologies notamment cancéreuses, la littérature ne fait mention que rarement de ce facteur de transcription. Il est à supposer, cependant, que Lim1 puisse avoir un rôle dans les processus de cancérogenèse par des analyses génomiques étendues sur les cancers gastriques, le cancer du pancréas et la leucémie lymphocytaire chronique. En effet, il a été montré que Lim1 est surexprimé dans les cancers gastriques (Varis *et al.*, 2002), et des méthylations aberrantes sur ce gène pourraient être impliquées dans la tumorigenèse et la croissance du cancer du pancréas et de la leucémie lymphocytaire chronique (Sato *et al.*, 2008; Sato *et al.*, 2003; Tong *et al.*). La recherche de Lim1 en tant qu'acteur potentiel de la cancérogenèse ou en tant que marqueur diagnostique et/ou pronostique n'en est qu'à son début, mais les premières études semblent encourageantes pour poursuivre les recherches fondamentales et cliniques sur ce facteur de transcription.

5 OBJECTIFS

Dans un contexte clinique toujours très délicat concernant le cancer du rein, la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans le système VHL/HIF a permis de faire évoluer les traitements pour cette pathologie malheureusement connue pour être réfractaire à toutes les thérapies anti-cancéreuses ainsi qu'aux traitements adjuvants. Cependant, le ciblage de ce système ne suffit pas à bloquer la progression tumorale ou le processus métastatique. D'autres mécanismes cellulaires doivent intervenir pour expliquer notamment la croissance du CCR. Le laboratoire d'accueil a tout d'abord démontré l'implication des voies oncogéniques PI3K/Akt et NF- κ B dans la prolifération et la résistance à l'apoptose des tumeurs rénales. Si de telles voies sont impliquées dans ces phénomènes cancéreux, l'hypothèse que des voies responsables du développement en contrôlant la différenciation, la prolifération et la migration cellulaire puissent être (ré)activées dans les cellules cancéreuses devient un point de réflexion fondamental dans la compréhension des mécanismes impliqués au niveau de la genèse tumorale, de la croissance tumorale et de sa dissémination. Du développement au cancer, l'implication de voies néphrogéniques dans la croissance du CCR semblait dessiner un axe de recherche très intéressant et pertinent dans le contexte international actuel concernant l'innovation thérapeutique pour traiter ce cancer.

De nombreux gènes sont indispensables à la formation du rein au cours de la néphrogenèse. Pour répondre à notre hypothèse de travail et sachant que la voie HH joue un rôle fondamental dans les processus développementaux du rein, notre intérêt s'est tout d'abord porté sur cette voie, qui par ailleurs commençait à être décrite dans la littérature comme une voie responsable de la tumorigenèse d'autres cancers sans qu'aucune donnée ne soit disponible concernant son implication potentielle dans le cancer du rein. En effet, si une voie du développement permet la croissance (prolifération et mort) et la migration cellulaire, il semble possible que cette même voie puisse être réexprimée par les cellules cancéreuses pour atteindre les mêmes objectifs.

- Le premier objectif de mes travaux de thèse a donc consisté à mettre en évidence une potentielle réactivation de la voie HH dans le CCR humain, ainsi qu'à caractériser les effets liés au blocage de cette voie *in vitro* et *in vivo*.

- Les résultats obtenus lors de cette étude m'ont ensuite conduit à me focaliser sur un autre acteur du développement pouvant jouer un rôle dans les processus cancéreux : le facteur de transcription Lim1. En effet, l'étude de la voie HH dans le CCR a notamment permis de mettre en évidence une expression quasi exclusive de ce facteur de transcription dans les tissus tumoraux de patients, et la voie HH semblait interagir avec lui, tout comme lors du développement rénal. Il nous a donc paru important dans la seconde partie de mon travail de thèse de considérer le facteur de transcription Lim1 comme un axe de recherche fondamental pour l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques dans le traitement du CCR humain, mais aussi potentiellement en tant que marqueur pronostique et/ou diagnostique dans cette pathologie.

MATERIEL ET

METHODES



CHAPITRE 2



1 MODÈLES D'ÉTUDE

1.1 Les lignées cellulaires humaines

Les lignées cellulaires de CCC humain déficientes en VHL (786-O, UOK-126, A498) ou exprimant le VHL (ACHN, Caki-1 et Caki-2) sont obtenues chez ATCC (*American Type Culture Collection*, Manassas, Etats-Unis), exceptée la lignée UOK-126 généreusement donnée par le Dr. P. Anglard (INSERM U575, Strasbourg). Nous avons également utilisé des clones de cellules 786-O transfectées soit avec le gène VHL humain (786-OVHL), soit avec le gène VHL tronqué inactif (786-O Δ VHL), soit par le vecteur seul pCR3-Uni (786-OV), disponibles au laboratoire. L'ensemble des lignées est maintenu dans du DMEM (*Dulbecco Minimal Essential Medium*, Gibco, Auckland, Nouvelle-Zélande), supplémenté avec 10 % de sérum de veau fœtal et 1 % d'un mélange d'antibiotiques (Pénicilline/Streptomycine, Gibco) dans une enceinte à 10 % de CO₂. Les clones de 786-O sont cultivés dans le même milieu supplémenté de gentamycine à 500 μ g/ml (G418, Gibco).

1.2 Les tissus humains

Les tissus tumoraux ainsi que les tissus sains correspondants ont été obtenus en collaboration avec le Service de Chirurgie Urologique (Prs. D. Jacqmin et H. Lang) du Nouvel Hôpital Civil (NHC) de Strasbourg, après obtention du consentement éclairé des patients. Les biopsies prélevées avec un temps d'ischémie inférieur à 1h sont conservées dans l'azote liquide. Les tumeurs ont été classifiées selon la classification pTNM révisée en 2002 et 2005 (Sagalowsky, 2002; Siemer *et al.*, 2005). Les données concernant les caractéristiques des échantillons analysés dans ce manuscrit figurent dans les publications présentées dans les chapitres 3 et 4.

1.3 Les souris xénotreffées

1.3.1 Protocole d'implantation et de traitement des souris nude

Figure 12

L'expérimentation animale est réalisée dans le respect des règles de bioéthique et de la législation française. Les souris nude athymiques SWISS nu-/- (Charles River Laboratories, l'Arbresle, France) mâles sont maintenues dans des conditions aseptisées : les cages, la litière, l'eau et la nourriture sont autoclavées, et les manipulations sont menées dans une pièce dédiée sous un poste de sécurité microbiologique (PSM). Les souris âgées de 4 semaines à leur arrivée subissent une semaine d'habituation avant le début de l'expérimentation. L'implantation des cellules 786-O chez les souris anesthésiées à l'isoflurane (anesthésie gazeuse) est réalisée à partir de cellules en phase exponentielle de croissance (80 % de confluence). Environ dix millions de cellules sont injectés sous la peau du dos des souris (implantation en sous-cutané). Cinq semaines après l'injection des cellules, le volume des tumeurs atteint 100 mm³, ceci permettant l'initiation des traitements. Le volume des tumeurs est mesuré à l'aide d'un pied à coulisse, puis calculé par la formule suivante : longueur x largeur x épaisseur x 0,5236 (Massfelder *et al.*, 2004).

D'une manière générale, les souris sont randomisées en plusieurs groupes de volume tumoral équivalent : des groupes qui recevront le(s) traitement(s) pharmacologique(s) et des groupes contrôles qui recevront le(s) solvant(s) uniquement. Les modalités précises des traitements sont précisées dans chaque manuscrit (type de traitement, voies d'injection, chronologie...). Le nombre de souris par groupe est de sept au minimum afin d'obtenir des résultats exploitables statistiquement et pertinents. Le volume des tumeurs est mesuré à chaque nouvelle injection. Un suivi du poids de chaque souris est effectué, ainsi qu'une surveillance régulière de l'état général. A l'issue du traitement, une partie des souris est anesthésiée puis sacrifiée, tandis que l'autre partie est conservée encore deux semaines en observation pour un suivi identique à celui de la phase de traitement. Le sang est collecté en intra-cardiaque et les tumeurs sont récupérées après dissection des régions nécrotiques : une partie est conservée dans le formol pour les analyses immuno-histochimiques, et l'autre partie est conservée dans l'azote liquide pour les analyses de PCR en temps réel et de Western blot.

1.3.2 Analyses immunohistochimiques

➤ Index prolifératif

Il est déterminé sur les tumeurs de CCR en marquant les tissus avec un anticorps anti Ki67 (Mib-1 ; DAKO). Les coupes sont incubées avec l'anticorps primaire (dilution 1/100) dans du PBST pendant 4h à température ambiante après mise en évidence de l'épitope par choc thermique. Suite à des lavages dans un tampon PBST, le marquage est détecté par le système LSAB2-HRP (DAKO, Trappes, France) selon les recommandations du fournisseur. Finalement, un contre-marquage HxE (Hématoxyline et éosine) de 30 s est effectué. Le nombre total de cellules et le nombre de cellules marquées dans quinze champs de 0,25 mm² chacun, sont quantifiés en double aveugle par une histopathologiste expérimentée (Dr. V. Lindner, Hôpital de Mulhouse) afin de déterminer l'index prolifératif.

➤ Index apoptotique

Il est mesuré dans les tumeurs de CCR par un kit TUNEL (Roche Diagnostics, Meylan, France) selon les instructions du fournisseur. Brièvement, après déparaffinisation et réhydratation, les coupes sont incubées avec la solution TUNEL pendant 1h à 37°C, dans une chambre noire sous atmosphère humide. Les coupes sont ensuite incubées avec la solution de conversion-HRP pendant 30 min à température ambiante. L'index apoptotique est déterminé et quantifié de la même manière que pour la prolifération.

➤ Néovascularisation

Pour mesurer les effets des traitements sur la densité microvasculaire, les coupes sont préparées comme auparavant, puis marquées avec un anticorps anti-facteurVIII (DAKO). Après digestion enzymatique à la protéinase K, les coupes sont incubées avec l'anticorps primaire (dilution 1/40) pendant 30 min à température ambiante. La visualisation du marquage se fait selon une procédure identique à celle décrite ci-dessus pour le Ki-67. La densité microvasculaire est déterminée en double aveugle en comptant pour chaque tumeur, d'une part le nombre d'intersections de vaisseaux, et d'autre part le nombre total de vaisseaux dans cinq champs de 0,25 mm² chacun.

2 ÉTUDE DE L'EXPRESSION DES ARNs

2.1 *Extraction*

L'ARN total est extrait des cellules en culture et des tissus humains par la technique au TRIzol (Invitrogen) selon le protocole défini par le fournisseur. Le TRIzol est une solution mono-phasique de phénol et d'isothiocyanate de guanidine qui permet de lyser les cellules et de dissoudre les composants cellulaires tout en préservant l'intégrité des ARN. Brièvement, les tissus (50 à 100mg) sont broyés à l'aide d'un potter dans 1 ml de TRIzol et les cellules sont lysées dans ce même réactif. Afin d'assurer une dissociation des complexes nucléoprotéiques, les échantillons sont laissés à reposer pendant 5 min à température ambiante. Après addition de 200 µl de chloroforme, le mélange est agité vigoureusement à la main pendant 15 secondes et incubé pendant 10 min à température ambiante. Une séparation de phase est effectuée par centrifugation à 4°C pendant 15 min à 12000 g, puis les ARN contenus dans la phase aqueuse sont récupérés et précipités par addition de 500 µl d'isopropanol. Les tubes sont alors agités, incubés à température ambiante pendant une dizaine de min puis centrifugés à 12000 g pendant 10 min à 4°C. Les culots sont lavés à l'éthanol 75 %, séchés à l'air, puis repris dans 10 à 50 µl d'eau bidistillée additionnée de 0,1 % de diéthyl-pyrocabonate, un inhibiteur de nucléases. Les concentrations sont déterminées par densité optique à 260 nm et la pureté des échantillons d'ARN est calculée par le rapport des densités optiques à 260 et 280 nm. Un rapport égal ou supérieur à 1,8 indique l'absence de contamination de la préparation d'ARN par les protéines.

2.2 *Transcription inverse*

Tableau 7

L'obtention des ADNc totaux est réalisée par transcription réverse (RT) sur 5 µg d'ARN total. Après une première incubation des ARN en présence d'1 µM d'amorces non spécifiques p(dT)15 (Roche Diagnostics, Meylan, France) à 65°C, le mélange réactionnel est complété avec 400 U de transcriptase réverse (Invitrogen), 10 U d'inhibiteur d'ARNase (Invitrogen), 1 mM de désoxynucléotides triphosphates (dNTP, Roche) et de l'eau ARNase free qsp 40 µl. La réaction se fait pendant 1h à 37°C. La transcription réverse est stoppée en chauffant les échantillons à 99°C pendant 5 min.

2.3 Quantification

Les ADNc spécifiques des ARNm étudiés sont amplifiés en utilisant le kit «LightCycler-FastStart DNA Master SYBR (syber) Green » (Roche Diagnostics). Des courbes de standardisation sont obtenues pour chaque gène étudié, par dilutions en cascade d'un mélange d'échantillons d'ADNc, en accord avec le protocole préconisé par le fournisseur du kit (Roche Diagnostics). Le milieu réactionnel (20 µl) contient 4 mM MgCl₂, 0,5 µM de chaque couple d'amorces sens-antisens spécifiques de chaque gène recherché, 0,2 µM de sonde SYBR verte, 0,4 µM de sonde d'hybridation, 1 x de tampon de réaction « *FastStart* » (ADN polymérase, dNTPs, tampon), et 2 µl d'ADNc, selon les recommandations du fournisseur. Après une première dénaturation à 95°C pendant 10 min, la PCR est réalisée en 45 cycles de dénaturation (10 s à 95°C), d'amorçage (5 s à 60°C) et de polymérisation (12 s à 72°C). La taille de chaque amplicon est vérifiée sur gel d'agarose à 1,5 %. Un contrôle négatif est systématiquement réalisé en remplaçant l'ADNc par de l'eau stérile de qualité PCR. Chaque échantillon est analysé trois fois et quantifié avec le logiciel d'analyse pour LightCycler (Roche Diagnostics). L'expression relative des différents gènes est calculée en rapportant les taux d'ARNm à ceux du gène domestique correspondant à l'expérience.

3 ÉTUDE DE L'EXPRESSION PROTÉIQUE

3.1 Extractions

➤ À partir des cellules en culture

Après lavage des cellules adhérentes avec du PBS (« *Phosphate Buffer Saline* »), l'extraction des protéines totales est réalisée dans un tampon de lyse (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,02% azide de sodium, 100 µg/ml PMSF, 1 µg/ml aprotinine, 1% NP-40) : 300 µl pour une boîte de culture de 25 cm². Vingt minutes d'incubation à 4°C sont nécessaires suite à un premier grattage des cellules à l'aide d'un grattoir. Les cellules sont ensuite grattées une deuxième fois et centrifugées à 12000 g pendant 5 min. Le surnageant contenant les protéines est récupéré et conservé à -80°C jusqu'à l'analyse ; un aliquote est utilisé pour le dosage.

➤ **À partir des tissus**

Dans le cas des tissus, une première étape de broyage à l'aide d'un potter dans un tampon A (10% glycérol, 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM PMSF, 0,1 µg/ml aprotinine, 1 mM EDTA, 5 mM orthovanadate de sodium, 1% leupeptine, 760 µg/ml EGTA) est nécessaire. Après centrifugation à 27000 g pendant 30 min à 4°C, les culots sont remis en suspension dans un tampon B (tampon A + 0,1% SDS, 1% NP-40, 1% déoxycholate), puis agités pendant 30 min à 4°C. Une centrifugation à 30000 g pendant 30 min à 4°C permet de récupérer le surnageant contenant les protéines.

3.2 Dosage

Le dosage des protéines contenues dans les surnageants est réalisé par la méthode de Lowry (Lowry *et al.*, 1951). La lecture des échantillons se fait par rapport à une gamme étalon établie à partir d'une solution d'albumine de sérum bovin.

3.3 Western-blot

Tableau 8

Après ajout du tampon de charge de Laemmli (contenant 5% de 2β-mercaptoethanol) à l'échantillon de surnageant contenant les protéines totales (tampon/échantillon v:v), celles-ci sont dénaturées à 100°C et les extraits (15-30 µg) sont déposés sur un gel de polyacrylamide 10% (acrylamide/bisacrylamide 30%, Tris 1M, SDS 10%, APS 10%, TEMED). Les protéines sont séparées par électrophorèse (150 V pendant 1h30). Le transfert est réalisé sur membrane de Polyvinylidene Difluoride en utilisant le système de transfert « iBlot® Dry Blotting System » selon les recommandations du fournisseur (Invitrogen). Après rinçage pendant 10 min sous agitation légère dans du tampon salin Tris (TBS), pH7,5, contenant 0,1% de tween-20 (TBST), la membrane est saturée 1h sous agitation à température ambiante dans du TBST contenant 5 % de lait écrémé (TBST/lait). La membrane est ensuite incubée la nuit à 4°C avec l'anticorps primaire à la dilution optimale dans le TBST/lait. La membrane est ensuite lavée trois fois sous agitation dans le TBST, puis incubée pendant 1h avec l'anticorps secondaire correspondant couplé à la peroxydase et dilué dans le TBST, à température ambiante. Après trois lavages avec le TBST, le complexe d'anticorps est révélé par chimioluminescence avec un kit de détection (ECL, Millipore). L'imageur

« fusion FX7 » (Vilbert-Lourmat, Marne-la-vallée, France) permet l'acquisition du signal de chimioluminescence pour une exposition optimale des membranes, et une capture par caméra CCD refroidie. L'exploitation numérique de l'image obtenue est réalisée à l'aide du logiciel « Bio1D » (Vilbert-Lourmat).

4 LES INHIBITEURS

Figure 13

Afin de comprendre et d'analyser les mécanismes cellulaires intervenant dans les processus de croissance du CCC humain, divers inhibiteurs agissant sur les voies impliquées ou potentiellement impliquées ont été utilisés.

➤ **Inhibiteur de la voie PI3K/Akt**

Le LY294002 (Sigma-Aldrich) est un inhibiteur compétitif et réversible du site de liaison de l'ATP. Il a une IC_{50} de 1,4 μ M. Dérivé des flavonoïdes, il est spécifique de la PI3K. (West *et al.*, 2002).

➤ **Inhibiteur de la voie NF- κ B**

Le BAY 11-7085 (Calbiochem), décrit depuis plus de 10 ans, inhibe la phosphorylation de I κ B α avec une IC_{50} d'environ 10 μ M, empêchant ainsi la dégradation de I κ B α , et donc l'activation de NF- κ B (Pierce *et al.*, 1997).

➤ **Inhibiteur de GSK3**

Le SB216763 (Sigma-Aldrich) est un inhibiteur compétitif et sélectif des isoformes α et β de GSK3. Son IC_{50} est de 3,6 μ M (Coghlan *et al.*, 2000).

➤ **Inhibiteur de la voie des MAPK**

U0126 (Calbiochem) est un composé organique synthétisé reconnu initialement comme antagoniste d'AP-1 (*Activator protein-1*), puis identifié comme inhibiteur hautement spécifique et efficace des cascades de MAPK en agissant sur leurs activateurs immédiats en amont : MEK1 et MEK2 avec une IC_{50} de 70 et 60 nM respectivement. U0126 inhibe les formes actives et inactives de ces kinases (Cirillo *et al.*, 2004).

➤ **Inhibiteur de la voie du sonic HH**

La cyclopamine (LC laboratories, Woburn, Etats-Unis) est le premier inhibiteur et le plus couramment utilisé pour agir sur la voie HH. Il s'agit d'un alcaloïde obtenu par héli-synthèse, issu d'une plante de l'ouest des Etats-Unis : le *Veratrum californicum*. Elle supprime l'activité de SMO qui est nécessaire pour l'activation de la voie HH (Chen

et al., 2007; Varjosalo and Taipale, 2007). De plus, la cycloamine bloque les effets oncogéniques des mutations de PTC et SMO et inhibe la croissance des cellules chez lesquelles le fonctionnement de ces deux protéines est perturbé (Taipale *et al.*, 2000). Elle est dissoute dans le DMSO (diméthyl sulfoxyde) qui a servi de contrôle pour les différentes expériences *in vitro*.

5 TRANSFERTS DE GÈNES

5.1 Extinction de gènes

Les lignées cellulaires sont dispersées dans des plaques 24 puits (20000 cellules/mL). Après 24h, les cellules sont transfectées transitoirement de 24 à 120h avec les différents siRNA (siSMO, siGLI1, siLhx1ex1, siLhx1ex2 et siCtl) selon les instructions fournies par le distributeur (Applied Biosystems, Ambion local distributeur, Courtaboeuf, France) avec la lipofectamine RNAiMax (Invitrogen). L'efficacité de transfection est déterminée par RT-PCR et Western blot à chaque temps.

5.2 Surexpression de gènes

5.2.1 Multiplication des plasmides d'intérêts

Les DNA codant pour les gènes d'intérêt à surexprimer dans les cellules (GLI1, SMO et Lhx1) ainsi que le DNA contrôle sont commandés chez Cliniscience (Origine local distributor, Montrouge, France). Brièvement, les plasmides d'intérêt sont incorporés aux bactéries *Escherichia coli* compétentes par choc thermique et la sélection des cellules transformées est réalisée par l'ajout d'ampicilline dans le milieu de culture. Après multiplication des cellules transformées, les plasmides sont purifiés avec le kit « HiSpeed® Plasmid Maxi kit » selon les instructions du fournisseur (QIAGEN S.A., Courtaboeuf, France), puis dosés comme décrit précédemment. Le rendement de la purification est également analysé en récoltant une fraction de l'éluat et de l'éluant à chaque étape de la purification, puis un dépôt sur gel d'agarose est effectué.

5.2.2 Transfection

Les lignées cellulaires sont dispersées dans des plaques 24 puits (20000 cellules/mL). Après 24h, les cellules sont transfectées transitoirement de 24 à 120h avec les plasmides d'intérêts (pCMV6-XL vecteur, pCMV6-XL-Gli1, pCMV6-CL-Lhx1 et pCMV6-XK-Smo) selon les instructions du fournisseur (Cliniscience). L'efficacité de transfection est déterminée par RT-PCR et Western blot à chaque temps.

6 ÉTUDES *IN VITRO* DE LA CROISSANCE CELLULAIRE

6.1 La densité cellulaire

Elle est mesurée en comptabilisant le nombre de cellules adhérentes d'une culture cellulaire. Les cellules sont dispersées dans des plaques de 24 puits (10 000 à 30 000 cellules/puits), puis traitées ou transfectées pendant 24 à 120 h en fonction des différentes expériences réalisées. Les cellules viables sont alors comptées à l'aide d'une lame de comptage quadrillée (« Fast Reader 102 », Dominique Dutscher). Pour éviter les effets toxiques non spécifiques des divers solvants utilisés sur la croissance cellulaire, leurs concentrations ont toujours été inférieures à 0,5 % dans les milieux de culture (Massfelder *et al.*, 2004).

6.2 La prolifération cellulaire

Les lignées cellulaires sont dispersées dans des plaques de 96 puits (3000 à 5000 cellules/puits). Après 24h, les cellules sont traitées ou transfectées pendant 24 à 120 h. Le principe du test réside dans l'incorporation du BrdU au niveau du nouvel ADN synthétisé dans les cellules prolifératives pendant les 24 dernières heures de culture. Le test est effectué suivant le protocole du fournisseur du kit (Calbiochem®, Merck KGaA, Darmstadt, Allemagne). Après fixation, les cellules sont mises en contact avec l'anticorps primaire anti-BrdU, puis avec l'anticorps secondaire couplé à une peroxydase qui catalyse la conversion du tetramethylbenzidine (TMB) incolore en une solution bleue dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de BrdU incorporée dans les cellules. Le produit de la réaction colorée est alors quantifié par une lecture au spectrophotomètre à 450 et 540 nm de longueur d'onde.

7 ÉTUDES *IN VITRO* DE LA MORT CELLULAIRE

7.1 *L'apoptose*

Lors de la mort cellulaire programmée (apoptose) naturelle ou induite par traitement pharmacologique, les cellules compactent leur matériel intracellulaire en formant des corps apoptotiques qui conservent l'intégrité de ce qu'ils contiennent. Une des caractéristiques moléculaires de ce type de mort est le passage d'un phospholipide membranaire de la surface interne de la cellule à sa surface externe, il s'agit du flip-flop phospholipidique réalisé par la phosphatidyl-sérine. Il est ainsi possible d'identifier ce type de mort cellulaire en ciblant ce phospholipide qui est désormais disponible à la surface cellulaire.

La cytométrie en flux est une méthode permettant de visualiser l'apoptose : elle est basée sur la détection de cellules marquées et en suspension grâce à des lasers. Elle permet également une quantification des cellules ayant subi différents marquages par rapport au nombre de cellules totales. Ces expériences ont été réalisées à l'Institut de Virologie de Strasbourg sur un FACScan (Becton Dickinson, New-York, Etats-Unis) avec l'aide du Dr. J. Barths. Un double marquage annexine V/iodure de propidium permet de distinguer l'apoptose de la nécrose et de quantifier ces deux phénomènes. L'annexine V marque la phosphatidylsérine qui se transloque sur le feuillet externe de la membrane lors de l'apoptose, et l'iodure de propidium est quant à lui un intercalant de l'ADN et permet de visualiser l'ADN des cellules nécrotiques dont les membranes plasmiques se sont rompues.

D'un point de vue méthodologique, les cellules sont mises en présence avec le traitement pharmacologique de 24 h à 120h. Après récupération du surnageant et trypsinisation des cellules adhérentes par plusieurs cycles de lavages au PBS et de centrifugations (2000 rpm, 3 min, 4°C), le culot (constitué des corps cellulaires du surnageant et des cellules adhérentes, non perméabilisés) est remis en suspension et incubé 10 min dans un tampon d'incubation (140 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, 10 mM HEPES) contenant 0,5% d'annexine V couplée à FITC (Roche, Bâle, Suisse) et 5 µg/ml d'iodure de propidium (Sigma-Aldrich), dans l'obscurité. Les cellules sont ensuite centrifugées et fixées avec du formol 1 % (réalisé à partir du tampon d'incubation) et peuvent alors être conservées une semaine à 4°C à l'abri de la lumière. Le jour de l'analyse par FACS, les tubes sont homogénéisés et filtrés pour ne pas boucher le capillaire du cytomètre qui prélève les

cellules en suspension. L'analyse est ensuite réalisée à l'aide du logiciel FCSExpress (De Novo Software, Los Angeles, CA, Etats-Unis).

7.2 La sénescence

La sénescence cellulaire est un type de mort cellulaire caractérisé par le raccourcissement des télomères. Morphologiquement, les cellules sénescents sont aplaties et vacuolisées, la quantité des lysosomes est augmentée, les noyaux possèdent des nucléoles très proéminents, les mitochondries sont moins denses en microscopie électronique et des vésicules de lipofuscine sont présentes (produits de la peroxydation lipidique). Une des caractéristiques biochimiques des cellules en phase de sénescence est l'augmentation de l'activité d'une enzyme, la β -galactosidase, une hydrolase cellulaire. Cette caractéristique est utilisée pour analyser la sénescence cellulaire *in vitro*.

Brièvement, les cellules sont dispersées dans des plaques 24 puits (20 000 cellules/mL). Après 24h de culture, les cellules sont transitoirement transfectées ou traitées avec les différents inhibiteurs de 24 h à 120 h. Le test est réalisé selon les instructions du fournisseur (« Senescence β -galactosidase staining kit », Cell Signaling). Le marquage à la β -galactosidase est visualisé sous microscope optique (grossissement x200). Le nombre de cellules totales et de cellules marquées dans huit champs de 0,25 cm² chacun est quantifié en aveugle pour déterminer le pourcentage de cellules en sénescence.

8 ÉTUDES IN VITRO DE LA MIGRATION ET DE L'INVASION CELLULAIRE

8.1 « Wound assay »

Les cellules sont dispersées dans des plaques de 24 puits (200 000 cellules/puits). Le lendemain, lorsque les cellules sont à 80 % de confluence, elles sont traitées ou transfectées pour un suivi de 24 h à 120 h en fonction des différentes expériences réalisées. Vingt quatre heures après cette étape, une cicatrice est réalisée au centre du puits à l'aide d'un grattoir en plastique stérile. Les débris cellulaires sont enlevés par deux rinçages successifs au PBS, et un milieu frais identique en composition à celui dans lequel les cellules étaient en culture précédemment est ajouté au puits. La capacité des cellules à coloniser la zone centrale est évaluée en prenant des clichés

photographiques sous microscope inversé au temps de remplacement du milieu (t0), puis à 12 h et 24h suite à la réalisation d'un marquage à l'élastine. Le pourcentage de couverture de la zone centrale est calculé en divisant la surface centrale occupée par les cellules à 12 h ou 24h par la surface initiale de la cicatrice au temps t0.

8.2 Les chambres de Boyden

L'étude de l'invasion cellulaire est basée sur l'utilisation d'inserts recouverts de matrice extracellulaire. Brièvement, la surface de la membrane de l'insert (taille des pores : 8 μm ; Millipore) posé dans un puits d'une plaque de 24, est recouverte d'une matrice extracellulaire ("ECL Matrix", Millipore). Les cellules transfectées ou traitées avec les différents inhibiteurs sont mises en suspension dans du milieu DMEM avec 10 % de SVF contenant les concentrations de réactifs optimales pour l'expérience. Puis, 100 000 cellules sont déposées dans la chambre supérieure de l'insert. La plaque est incubée de 24 h à 96 h et les cellules ayant migrées de la face supérieure du filtre à la face inférieure sont comptées. La capacité d'invasion des cellules tumorales est définie par le nombre total des cellules ayant migrées. La migration cellulaire est également évaluée avec cette méthode en utilisant des inserts non recouverts de matrice.

9 STATISTIQUES

Toutes les valeurs sont exprimées par leur moyenne \pm e.s.m. Elles sont comparées en utilisant une analyse multifactorielle de la variance, suivie d'un test de Student-Newman-Keul pour les comparaisons multiples. Les résultats sont considérés comme significatifs lorsque p est inférieur à 0,05 (* : $P < 0,05$; ** : $P < 0,01$).

IMPLICATION DES VOIES NEPHROGENIQUES

DANS LE CCC

**(présentation sous forme
de deux publications)**



CHAPITRE 3



1 ETUDE DE LA VOIE SHH

1.1 Publication

The sonic hedgehog signaling pathway is reactivated in human renal cell carcinoma and plays orchestral role in tumor growth.

(Dormoy *et al.*, 2009)

Mol Cancer 8: 123.

Research

Open Access

The sonic hedgehog signaling pathway is reactivated in human renal cell carcinoma and plays orchestral role in tumor growth

Valérian Dormoy¹, Sabrina Danilin¹, Véronique Lindner², Lionel Thomas¹, Sylvie Rothhut¹, Catherine Coquard¹, Jean-Jacques Helwig¹, Didier Jacqmin³, Hervé Lang³ and Thierry Massfelder*¹

Address: ¹INSERM U682, Section of Renal Cancer and Renal Physiopathology, University of Strasbourg, School of Medicine, Strasbourg, 67085 France, ²Hôpital de Mulhouse, Department of Pathology, Mulhouse, 68000 France and ³Nouvel Hôpital Civil de Strasbourg, Department of Urology, Strasbourg, 67091 France

Email: Valérian Dormoy - valerian.dormoy@medecine.u-strasbg.fr; Sabrina Danilin - sabrina.danilin@Vanderbilt.Edu; Véronique Lindner - lindnerv@ch-mulhouse.fr; Lionel Thomas - lionel.thomas@medecine.u-strasbg.fr; Sylvie Rothhut - sylvie.rothhut@pharmaco-ulp.u-strasbg.fr; Catherine Coquard - Catherine.coquard@medecine.u-strasbg.fr; Jean-Jacques Helwig - Jean-Jacques.Helwig@pharmaco-ulp.u-strasbg.fr; Didier Jacqmin - Didier.Jacqmin@chru-strasbourg.fr; Hervé Lang - Herve.Lang@chru-strasbourg.fr; Thierry Massfelder* - Thierry.massfelder@medecine.u-strasbg.fr

* Corresponding author

Published: 16 December 2009

Received: 8 July 2009

Molecular Cancer 2009, 8:123 doi:10.1186/1476-4598-8-123

Accepted: 16 December 2009

This article is available from: <http://www.molecular-cancer.com/content/8/1/123>

© 2009 Dormoy et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

Background: Human clear cell renal cell carcinoma (CRCC) remains resistant to therapies. Recent advances in Hypoxia Inducible Factors (HIF) molecular network led to targeted therapies, but unfortunately with only limited clinical significance. Elucidating the molecular processes involved in kidney tumorigenesis and resistance is central to the development of improved therapies, not only for kidney cancer but for many, if not all, cancer types. The oncogenic PI3K/Akt, NF- κ B and MAPK pathways are critical for tumorigenesis. The sonic hedgehog (SHH) signaling pathway is crucial to normal development.

Results: By quantitative RT-PCR and immunoblot, we report that the SHH signaling pathway is constitutively reactivated in tumors independently of the von Hippel-Lindau (VHL) tumor suppressor gene expression which is inactivated in the majority of CRCC. The inhibition of the SHH signaling pathway by the specific inhibitor cyclopamine abolished CRCC cell growth as assessed by cell counting, BrdU incorporation studies, fluorescence-activated cell sorting and β -galactosidase staining. Importantly, inhibition of the SHH pathway induced tumor regression in nude mice through inhibition of cell proliferation and neo-vascularization, and induction of apoptosis but not senescence assessed by *in vivo* studies, immunoblot and immunohistochemistry. Gli1, cyclin D1, Pax2, Lim1, VEGF, and TGF- β were exclusively expressed in tumors and were shown to be regulated by SHH, as evidenced by immunoblot after SHH inhibition. Using specific inhibitors and immunoblot, the activation of the oncogenic PI3K/Akt, NF- κ B and MAPK pathways was decreased by SHH inhibition.

Conclusions: These findings support targeting SHH for the treatment of CRCC and pave the way for innovative and additional investigations in a broad range of cancers.

Background

Renal cell carcinoma (RCC) is the most lethal urologic tumor and the sixth leading cause of cancer deaths in Western countries. Each year, around 200,000 patients are diagnosed with this malignancy resulting in approximately 100,000 deaths, and its incidence is increasing steadily [1,2]. RCC is represented by 80% by clear cell RCC (CRCC), originating from the renal proximal tubule. RCC is resistant to radio-, hormono-, and chemotherapy, and immunotherapy is effective in only 15% of selected patients [3]. The recent development of anti-angiogenic strategies based on small molecule tyrosine kinase receptor inhibitors lead to the approval of sunitinib or sorafenib as first-line therapy for RCC [2-5].

So far the best known oncogenic signal in human CRCC is constituted by the von Hippel-Lindau (VHL) tumor suppressor gene and hypoxia-induced factors (HIFs). Inherited and sporadic forms of CRCC are associated with inactivation of the VHL gene [6,7]. In hypoxic conditions, or when the VHL gene is defectuous as it is the case in 60% of CRCC, HIFs- α are stabilized allowing the expression of a large panel of target genes involved in growth, motility, metabolism and angiogenesis such as vascular endothelium growth factor (VEGF), tumor growth factors (TGFs), parathyroid hormone-related protein (PTHrP), glucose transporters and transferrin [1,7], all shown to contribute to CRCC tumorigenesis.

Additional oncogenic events are required for CRCC formation, and such concept has been clearly evidenced by molecular and genetic approaches [8]. We and others have shown that the proliferative and survival signaling pathways such as the PI3K/Akt, NF- κ B and MAPK pathways are constitutively activated and turned towards tumor growth in human CRCC [9-11]. The idea that tumors hijack for their own growth signaling pathways involved in normal development is emerging. In human CRCC, this is the case for at least the Pax2 and 8 transcription factors and Notch signalling [12,13].

The hedgehog pathway is critical for embryonic and post-natal organ and tissue development, including the kidney. The sonic hedgehog (SHH) signaling pathway has also been shown to be dysregulated in pancreatic and colorectal cancers and melanomas [14], resulting in the induction of the expression of numerous target genes that regulate cell proliferation, cell differentiation, cell death, extracellular matrix interactions, and angiogenesis [15]. The SHH pathway interacts with various oncogenic pathways including the PI3K/Akt, the NF- κ B, the MAPK pathways and the Notch pathway, another important developmental pathway. Interestingly, these pathways have been shown by us and others to be critical for human CRCC tumorigenesis [9-13]. To date and to our knowl-

edge no studies have been conducted to assess the importance of the SHH pathway in human CRCC tumorigenesis and that was the purpose of the present study.

We found that the SHH signalling pathway is reactivated in human CRCC and that it converges to various oncogenic pathways to orchestrate tumor growth. In addition, we identified various Gli1 targets some never previously described such as Smo and the transcription factor Lim1 that is also necessary for normal kidney development.

Results

SHH signaling pathway components are constitutively expressed in human CRCC cells independently of VHL expression

The SHH ligand expression was detected in untransfected 786-0 cells (wt) and in 786-0 cell either untransfected or transfected with the various VHL constructs, as well as in a panel of human CRCC cell lines expressing or not VHL (Figure 1A).

All the components of the SHH signaling pathway, i.e SHH ligand, Ptch1, Smo and the downstream transcription factors Glis were expressed in all cells (Figure 1B). In all cases, except A498 cells, Smo was the highest expressed component. There was no difference in expression depending on the VHL status (Figure 1B).

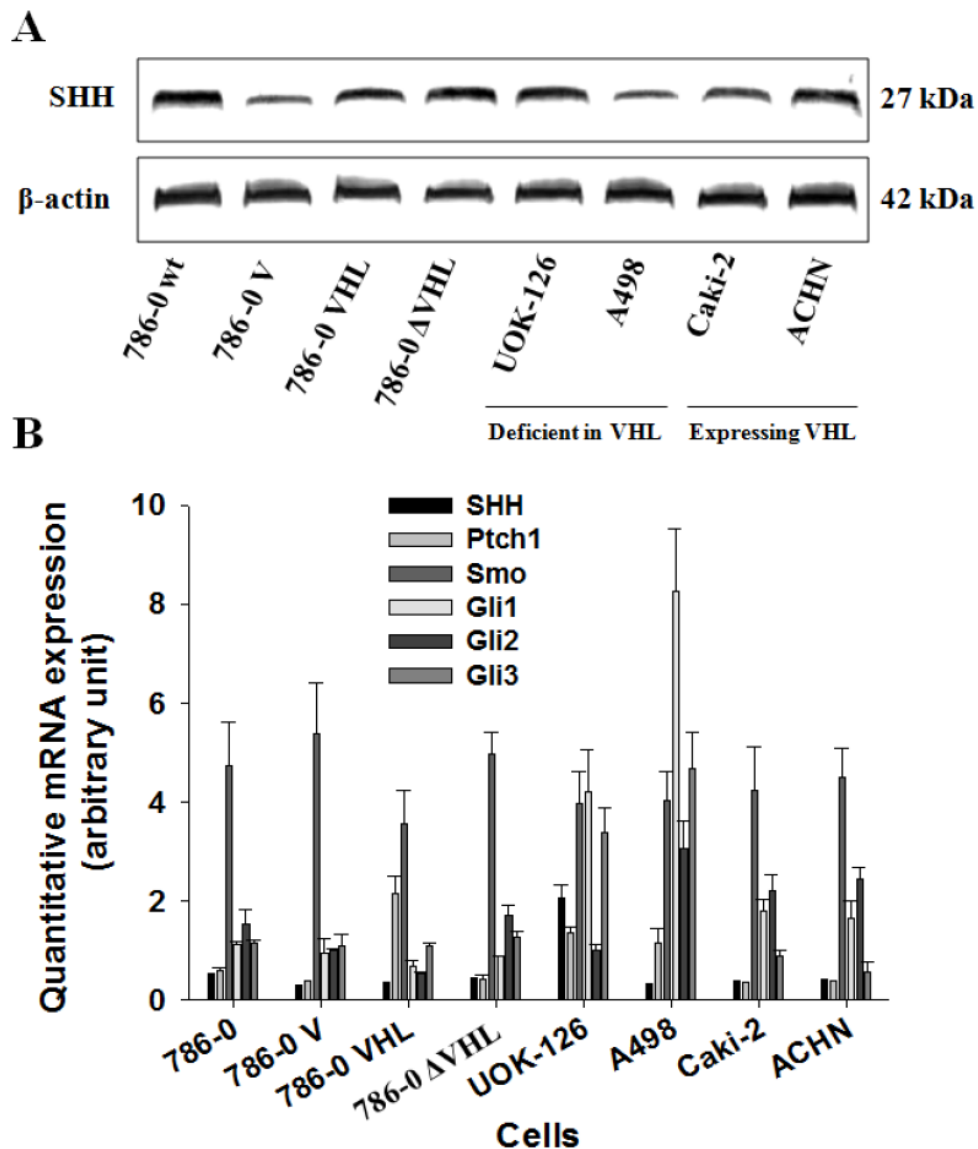
Thus, the SHH signaling pathway is constitutively expressed and activated in tumor cells and independently of VHL expression.

SHH signaling pathway components are constitutively reexpressed in human CRCC tumors

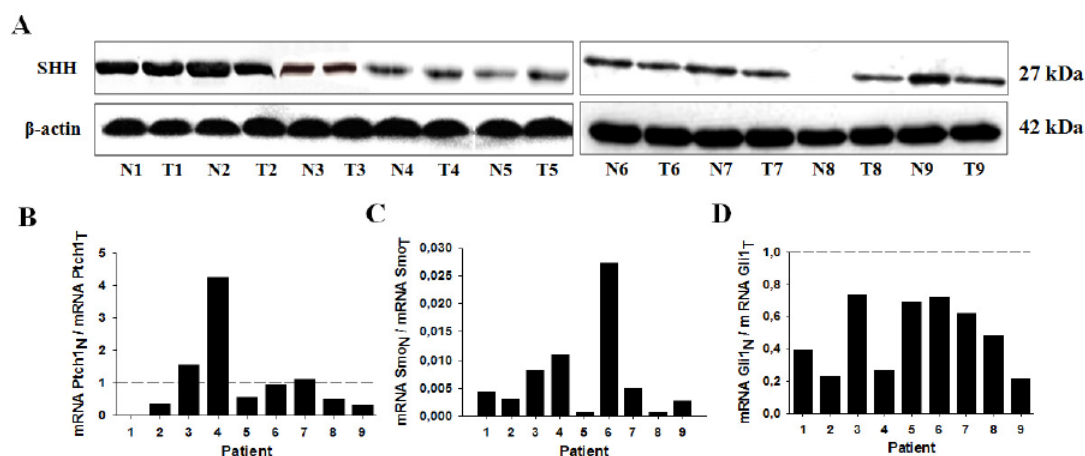
The SHH ligand was detected in all tumor samples as well as in normal corresponding tissues for all stages except for patient 8 (T8) where SHH was undetectable in normal tissue (N8) (Figure 2A).

The Ptch1 receptor ratio was very variable from one N/T sample pair to another being either less expressed in normal tissue, equally expressed in tumors and normal tissues or higher in normal tissue (Figure 2B). Interestingly, the expression of the Smo receptor was considerably higher (300 to 1,000 fold increase) in tumors compared to normal corresponding tissues for all N/T pairs tested (Figure 2C). The expression of the Gli1 transcription factor was also increase about two- to five- fold in tumors compared to normal corresponding tissues (Figure 2D).

Taken together these results show that the SHH signaling pathway is active in tumors compared to normals.

**Figure 1**

All the SHH signaling pathway components are expressed in human CRCC cells independently of VHL expression. (A) Western blot analysis of the SHH ligand in human CRCC cell lysates incubated with antibodies against human SHH ligand and corresponding β -actin. The expression of the ligand was assessed in 786-0 cells either untransfected (786-0 wt) or transfected with the vector alone (786-0 V), the full-length human VHL cDNA (786-0 VHL) or truncated inactive VHL cDNA sequence (786-0 Δ VHL), as well as in a panel of human CRCC cell lines either deficient in VHL expression (Deficient in VHL) or expressing VHL (Expressing VHL). The gels shown are representative for at least 3 independent experiments. (B) Quantitative gene expression of SHH ligand, of Ptch1 and Smo receptors, and of the Glis transcription factors (Gli1, Gli2 and Gli3) in the same panel of cells depicted in (A). Results are shown as mean \pm SEM, n = 4.

**Figure 2**

All the SHH signaling pathway components are expressed in human CRCC tumors. (A) Western blot analysis of the SHH ligand in 9 human tumors (T1 ...) and normal corresponding tissues (N1 ...) lysates incubated with antibodies against human SHH ligand and corresponding β -actin. The gels shown are representative for at least 3 independent experiments. (B) Quantitative gene expression of Ptch1 and Smo receptors, and of the Gli1 transcription factor in the same normal/tumoral tissue pairs shown in (A). Results are representative of 4 independent experiments.

SHH signaling pathway inhibition decreases human CRCC cell proliferation independently of VHL expression

Cyclopamine at 20 μ M decreased cell proliferation by up to 80% after 5 days of treatment (Figure 3A). The effect of the inhibitor was concentration-dependent with a maximal effect of 90% inhibition of cell proliferation at 40 μ M at day 5 (Figure 3B). For the rest of the experiments we choose to use cyclopamine at 20 μ M, a concentration near the IC₅₀ on cell growth.

The efficacy of the inhibitory effect of cyclopamine was not dependent on the VHL status and was identical also in our panel of human CRCC cell lines (Figure 3C).

The effect of cyclopamine on cell growth was due in a large part to inhibition of cell proliferation as assessed by BrdU incorporation studies in 786-0 wt cells, in 786-0 V, 786-0 VHL and 786-0 Δ VHL (Figure 3D), with a maximal inhibitory effect of 80-90%. Thus, this effect was not dependent on VHL status.

Since the possibility exists that cyclopamine may affect other pathways we used an alternate approach to inhibit the SHH pathway using siRNA targeting key components of this pathway, i.e the Smo receptor and the Gli1 transcription factor. In transient transfection assays, both siRNAs decreased cell growth in a time (Additional file 1A) and concentration-dependent (Additional file 1B) man-

ner by up to 80% at day 4. Such effects were observed in our panel of human CRCC cell lines (Additional file 1C) and again, this effect was mainly due to inhibition of cell proliferation, as assessed by BrdU incorporation (Additional file 1D).

Taken together, these data show that the inhibition of the SHH pathway decreases tumor cell growth essentially by affecting cell proliferation.

SHH signaling pathway inhibition increases human CRCC cell apoptosis but not senescence

Because the inhibition of cell proliferation by cyclopamine was not complete we also assessed whether the inhibitor was inducing apoptosis in human CRCC cells. Cyclopamine was inducing cell apoptosis in a time-dependent manner reaching a maximal induction of cell apoptosis of 12% (Figure 4A and 4B). As for cell proliferation assays, similar effects were observed in cells transiently transfected with siRNAs targeting Smo and Gli1 (Additional file 2). No effects of cyclopamine treatment were observed on tumor cell senescence (Additional file 3).

Thus, the growth inhibitory effects of SHH pathway inhibition is obtained mainly through a decrease of cell proliferation and in a lesser degree through induction of cell apoptosis in human CRCC.

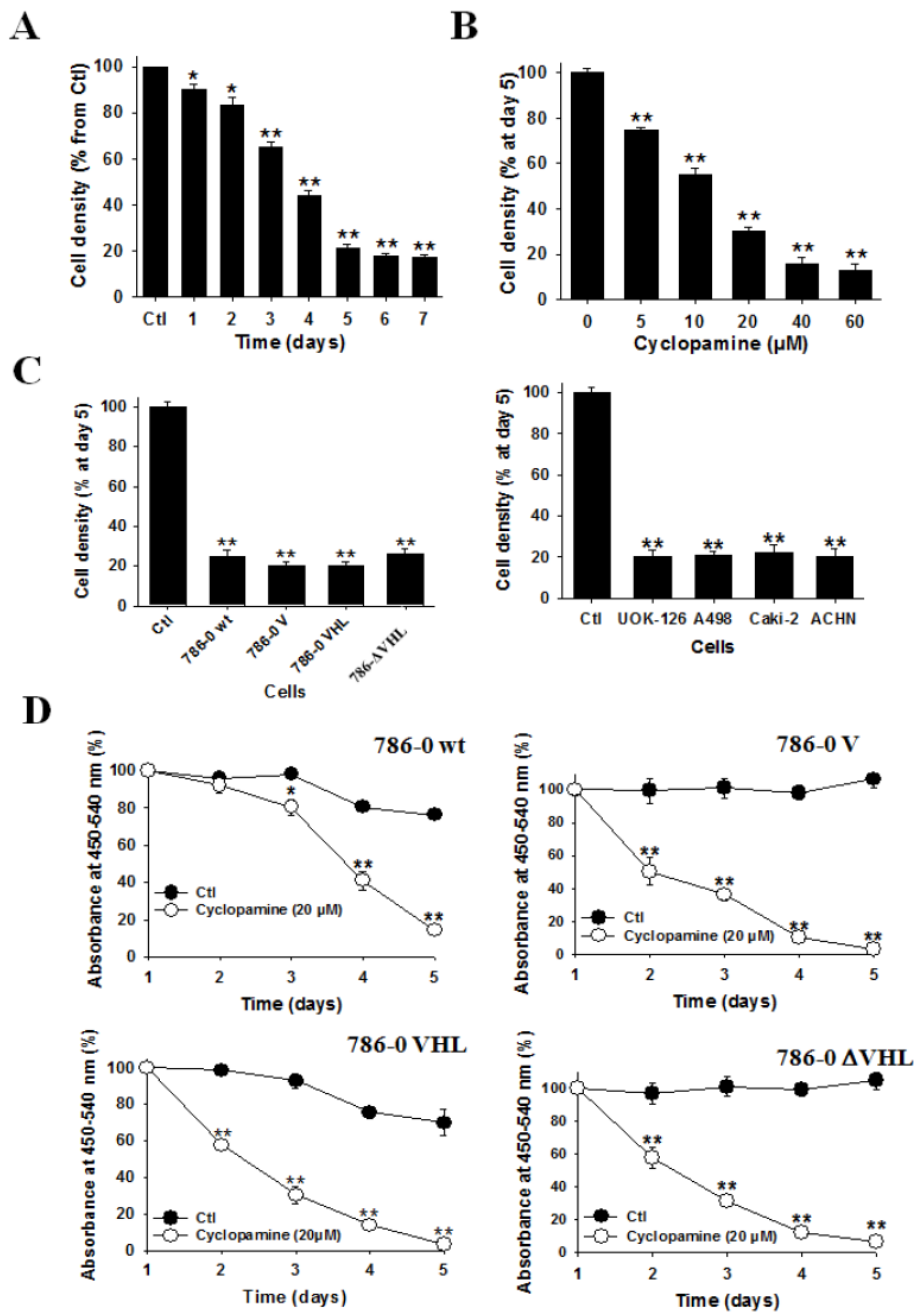


Figure 3 (see legend on next page)

Figure 3 (see previous page)

The inhibition of the SHH signaling pathway decreases human CRCC cell proliferation. (A) Human 786-0 cells were treated in control (Ctl) or with cyclopamine (Cyclopamine, 20 μ M) and cells were counted each day. Results are shown as mean \pm SEM, n = 6; *, P < 0.05; **, P < 0.01 from Ctl. (B) Human 786-0 cells were treated for 5 days in control (Ctl) or with cyclopamine (Cyclopamine) and adherent cells were counted. Results are shown as mean \pm SEM, n = 6; **, P < 0.01 from 0 (without cyclopamine). (C) Our panel of human CRCC cells either deficient or expressing VHL were treated for 5 days in control (Ctl) or with cyclopamine (Cyclopamine, 20 μ M) and adherent cells were counted. Results are shown as mean \pm SEM, n = 6; **, P < 0.01 from Ctl (without cyclopamine) that was set to 100%. (D) Human 786-0 wt, 786-0 V, 786-0 VHL and 786-0 π VHL cells were analyzed for BrdU incorporation after treatment in control (Ctl) or with cyclopamine (Cyclopamine, 20 μ M), for the indicated periods of time. Results are shown as mean \pm SEM, n = 6; *, P < 0.05; **, P < 0.01 from corresponding Ctl.

Transfection with Smo and Gli1 expression vectors alleviates the growth inhibitory effects of cyclopamine in human CRCC cells

To argue further the adequate targeting of cyclopamine against the SHH signaling pathway, we transiently transfected 786-0 cells for 0 to 5 days with Smo and Gli1 expression vectors (pCMV6-XL5-Smo and pCMV6-XL5-Gli1, respectively) or vector alone (pCMV6-XL5). We then assessed and compared the effects of cyclopamine on cell growth in cells transfected with these vectors and in untransfected cells. The overexpression of Smo and Gli1 was maximal 2 to 3 days post-transfection as assessed by western blot and quantitative RT-PCR (data not shown). The transfection with vector alone did not affect tumor cell proliferation at any time (Additional file 4). Interestingly, the transfection with Smo or Gli1 vector significantly increased cell proliferation 2 to 3 days post-transfection by up to 20-25% (Additional file 4). As expected from results presented on Figure 3, cyclopamine alone decreased cell proliferation by up to 80% at day 5 (Additional file 4). While the transfection with vector alone did not affect the inhibitory effect of cyclopamine on cell proliferation, the transfection with either Smo or Gli1 vectors alleviated significantly the growth inhibitory effect of cyclopamine at all times tested (Additional file 4).

These results show that overexpression of key components of the SHH signaling pathway not only has growth stimulatory effects on tumor cells but also alleviates the growth inhibitory effect of cyclopamine. These data clearly argue that the effect of cyclopamine is the consequence of SHH signaling pathway inhibition.

Specificity of cyclopamine towards the SHH signaling pathway in human CRCC cells

To check further the specificity of the inhibitor towards the SHH signaling pathway, we measured the expression of all the molecular components of the pathway by western blot or quantitative analysis of mRNAs expression in 786-0 cells. The expression of the SHH ligand was surprisingly, but interestingly, decreased as a function of time by

cyclopamine, suggesting that the SHH ligand may itself be a target of the SHH pathway (Figure 5A).

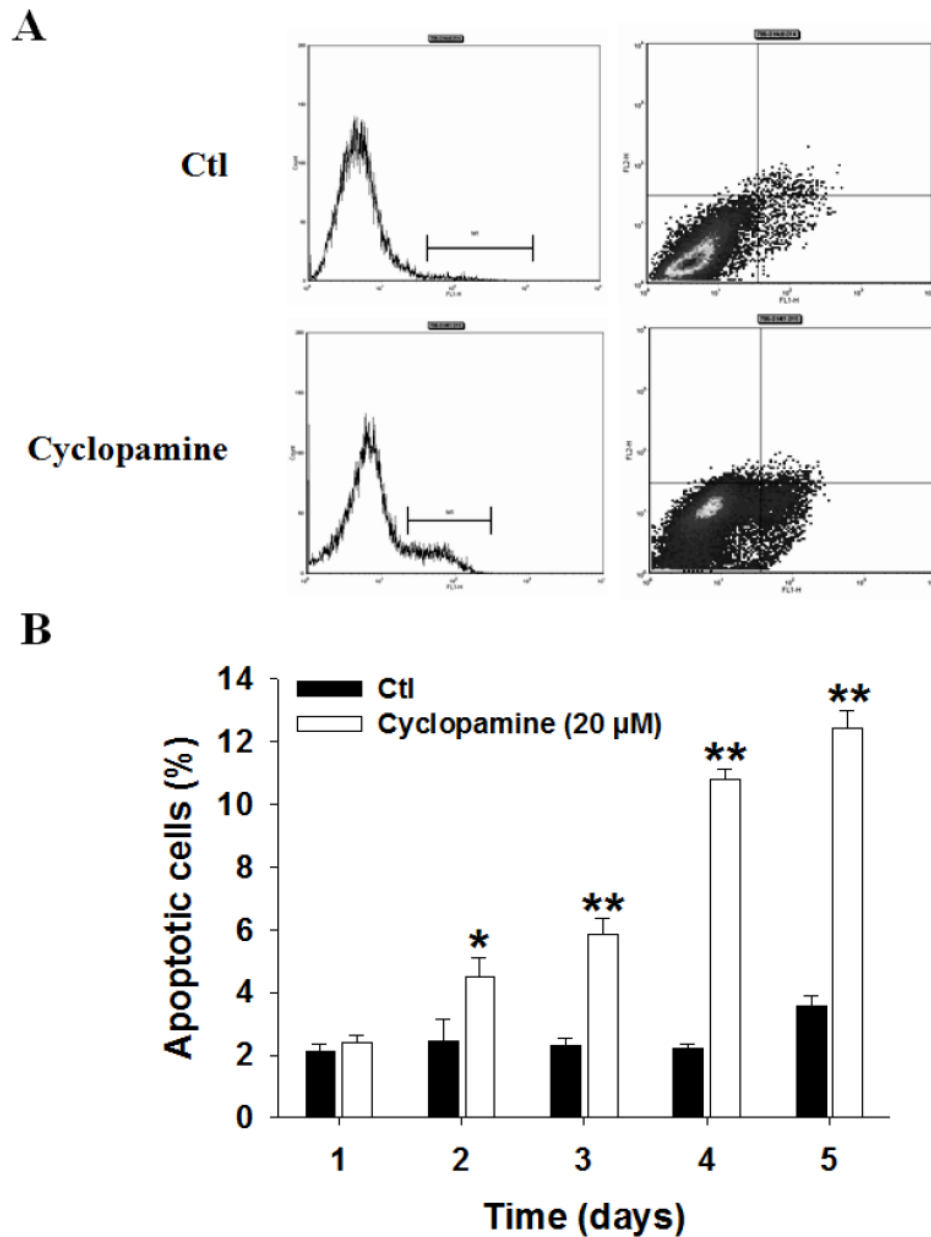
Cyclopamine also decreased the expression of Ptch1 and, interestingly, of Smo receptors (Figure 5B), suggesting further that Smo may also be a target of the SHH pathway. Cyclopamine treatment decreased the expression of the transcription factors Gli1 and Gli2 (Figure 5B). The expression of Gli3, the endogenous repressor of the SHH pathway, was increased by cyclopamine treatment (Figure 5B). The effect of the inhibitor on gene expression was observed with different velocities from one component to another.

Overall, these results argue further for the specificity of the Smo inhibitor towards the SHH signaling pathway, and put in evidence two additional targets of the pathway, Ptch1 and Smo receptors.

Cyclopamine injection induces tumor regression in nude mice bearing human CRCC tumors

We next analyzed the effect of cyclopamine *in vivo* in the tumor xenografted nude mice model. In the first protocol (injections every other day), tumor growth was completely abolished by cyclopamine treatment (Figure 6A and Additional file 5A). The expression of Gli1 was decreased by 80% in tumors harvested from cyclopamine-treated mice compared to tumors from control mice showing adequate targeting of the drug (Figure 6A, top gels).

The anti-tumor effect obtained following the first protocol prompted us to assess in a second protocol whether we could observe tumor regression with cyclopamine by increasing the overall dose of the SHH inhibitor in tumor-bearing mice. In the second protocol (daily injections), cyclopamine induced more than 50% tumor regression (Figure 6B and Additional file 5B). The expression of Gli1 was also substantially decreased in tumors harvested from cyclopamine-treated mice by more than 80% (data not shown).

**Figure 4**

The inhibition of the SHH signaling pathway induces human CRCC cells apoptosis. FACS analysis of 786-0 treated in control (Ctl) or with cyclopamine (Cyclopamine) at 20 μM. (A) Examples of FACS analysis (day 4). No evidence of necrosis was observed in any cases. (B) Quantitative analysis of apoptotic cells as a function of the time of treatments. Results are shown as mean ± SEM, n = 6 *, P < 0.05 and **, P < 0.01 from Ctl apoptosis. Bars, 5 μm.

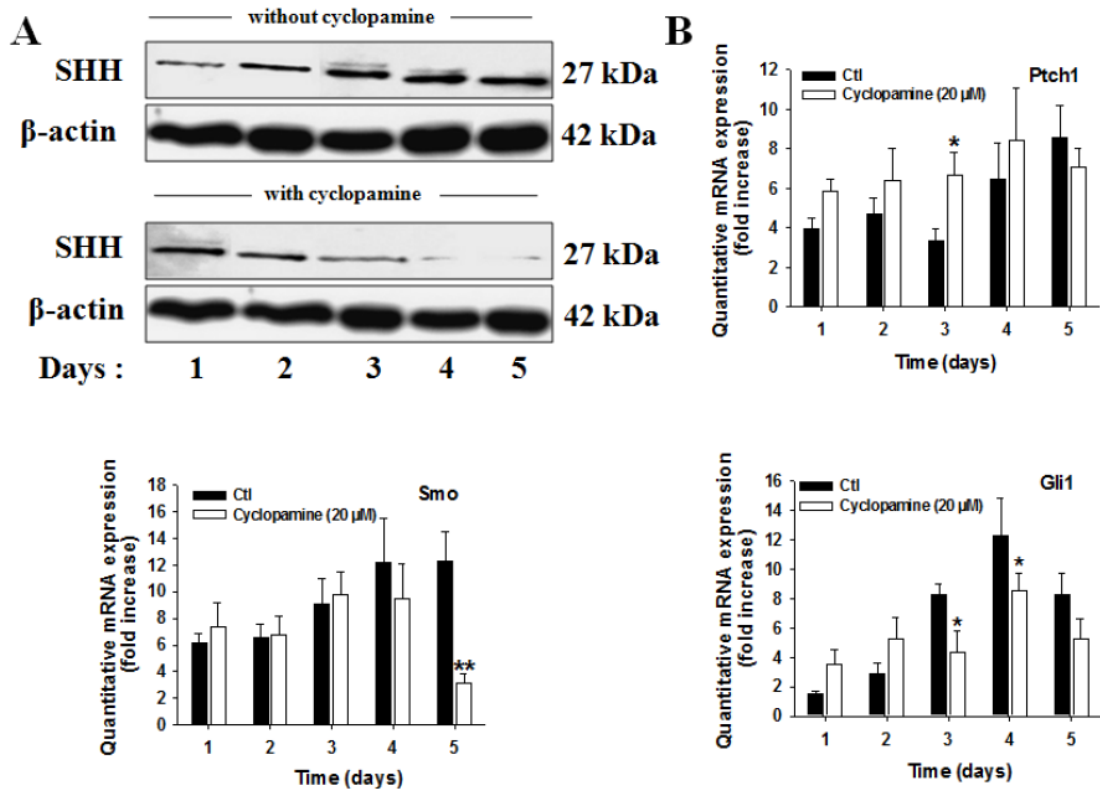


Figure 5

Cyclopamine treatment decreases the expression of the SHH ligand, Smo receptor, Gli1 factors, and increases the expression of the PtchI. (A) Human 786-0 CRCC cells were seeded and treated for the indicated periods of time in control (Ctl) or with cyclopamine (Cyclopamine, 20 μ M). Shown are western blot analysis of the SHH ligand in cell lysates from cells treated in each condition and incubated with antibodies against human SHH ligand and corresponding β -actin. The gels shown are representative for at least 3 independent experiments. (B) Human 786-0 CRCC cells were seeded and treated for the indicated periods of time in control (Ctl) or with cyclopamine (Cyclopamine, 20 μ M). Quantitative gene expression of PtchI, Smo receptors, Gli1, Gli2 and Gli3. Results are shown as mean \pm SEM, $n = 6$ *, $P < 0.05$ from cells treated in Ctl at the same time point.

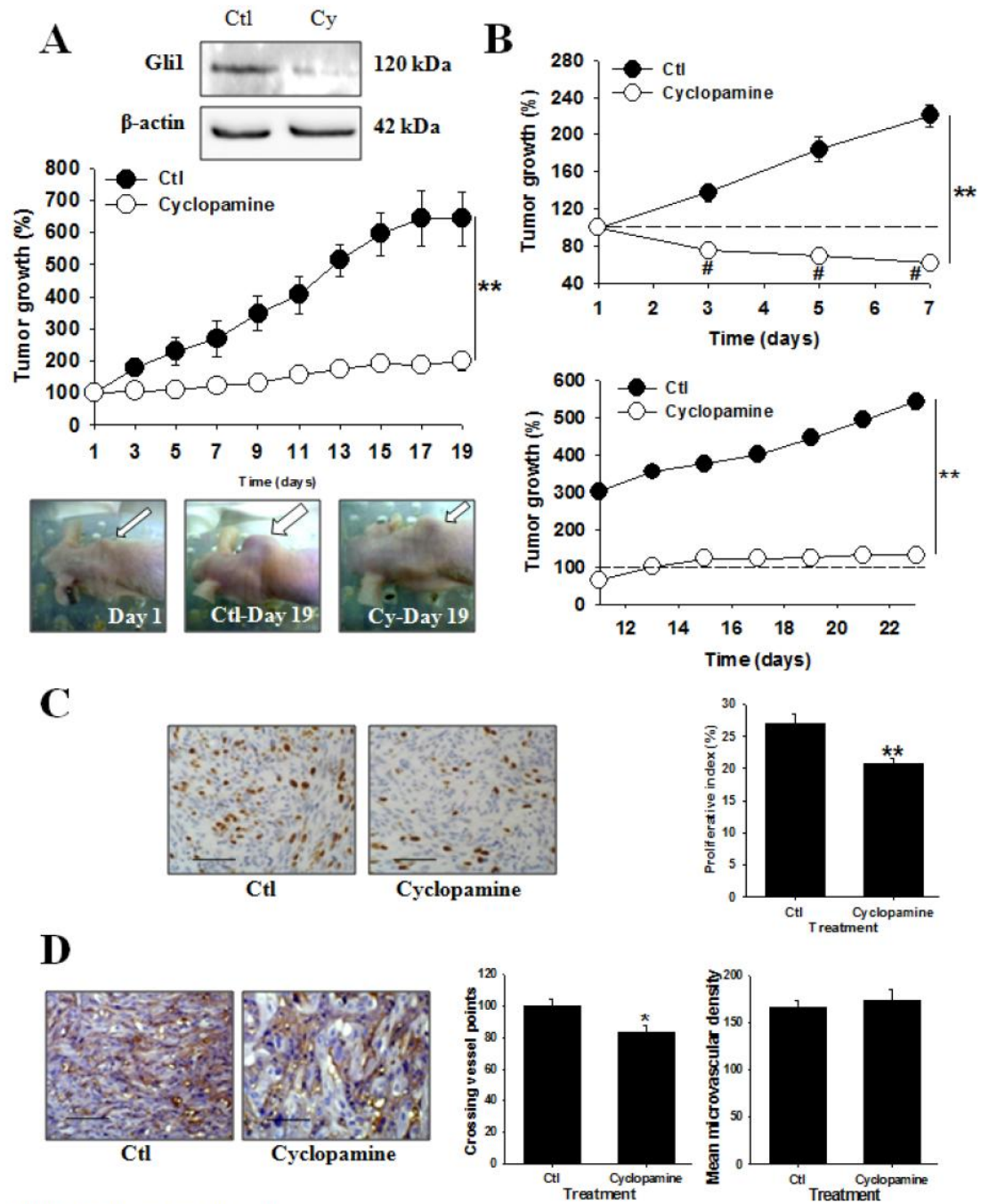


Figure 6 (see legend on next page)

Figure 6 (see previous page)

Inhibition of the SHH signaling pathway induces tumor regression in nude mice. (A) Tumor growth in mice treated according to the first experimental protocol. Results are shown as mean \pm SEM, n = 7 for both groups; **, P < 0.01 cyclopamine-treated mice vs Ctl-treated mice. Immunoblotting experiments to measure expression of Gli1 in tumors lysates. The gels shown are representative for at least 3 independent experiments. Photographs show the implanted tumors in representative mice at day 1 of drug injection, at day 19 in Ctl-treated group or cyclopamine-treated group. (B) Tumor growth in mice treated according to the second protocol. Results are shown as mean \pm SEM, n = 7 for both groups; **, P < 0.01 cyclopamine-treated mice vs Ctl-treated mice. (C) Left, tumor sections of control- (Ctl) or cyclopamine (Cyclopamine)-treated mice immunostained with an antibody against Ki67 (magnification \times 400). Right, proliferative index. Results are shown as mean \pm SEM, n = 7. **, P < 0.01 from Ctl-treated mice. (D) Left, tumor sections of control- (Ctl) or cyclopamine (Cyclopamine)-treated mice immunostained for CD31 (magnification \times 400). Right, quantification of neovascularization. Results are shown as mean \pm SEM, n = 7. *, P < 0.05 from Ctl-treated mice.

To assess whether the inhibitory effect on tumor growth of cyclopamine was long-lasting, in the mice treated using the second protocol, the control and cyclopamine treatments were stopped at day 10 and tumors were left growing for an additional 14 days period. In mice treated with cyclopamine, tumors did not grow further while in control mice the tumors' volume doubled (Figure 6B).

We used tumors harvested from mice treated according to the first protocol to assess the effect of cyclopamine on cell proliferation, death and on angiogenesis. Indeed for the second protocol mice were left untreated for several days and this not allow us to determine the effect of the drug on such tumor parameters. The proliferative index was significantly decreased by about 25% in mice treated with cyclopamine compared to mice treated in control (Figure 6C). Curiously, cyclopamine treatment did not influence tumor cell apoptosis (Additional file 5C). However such an effect may be due to the time between the last injection of cyclopamine and analysis, i.e 3 days. Very interestingly, tumor neovascularization was decreased significantly by cyclopamine treatment (Figure 6D).

These results suggest that the SHH signaling pathway plays a critical role in tumor growth *in vivo* mainly by affecting cell proliferation and vessel generations in human CRCC tumors.

The SHH signaling pathway plays orchestral roles in oncogenic pathways stimulation in human CRCC

We next investigated the connection between the SHH signaling and known oncogenic pathways, i.e the PI3K/Akt (and GSK3), NF- κ B and MAPK pathways. For that, we used cyclopamine or cells transiently transfected with siSmo or siGli1 targeting siRNAs alone or in combination with inhibitors of oncogenic pathways in 786-0 cells. The inhibitory effect of cyclopamine on cell growth was not additive with the effects of inhibitors of each pathway, suggesting strongly that the SHH signaling is linked to the activity of GSK-3 and to the oncogenic PI3K/Akt, NF- κ B and MAPK pathways (Additional file 6). The effects of the

GSK-3 and NF- κ B inhibitors alone was observable only at day 1 and day 2 of treatments, while the effect of the PI3K/Akt and MAPK inhibitors lasted during the 5 days of the experiments (Additional file 6), suggesting a sequential activation of these pathways. Similar results were obtained after Smo or Gli1 silencing (Additional file 7).

We next evaluated the effect of cyclopamine and of Smo and Gli1 silencing through transient transfection on GSK-3 activation and of all of the above-mentioned signaling pathways by western blot in 786-0 cells. The non-phosphorylated states of GSK-3, Akt, NF- κ B and Erk1/2 remain unchanged after cyclopamine treatments (Figure 7A). However, cyclopamine treatments induced a decrease in the phosphorylation state of Akt, NF- κ B and Erk1/2, and an increase in the phosphorylated state of GSK-3 (Figure 7A), thus inhibiting their biological activities. Again, similar results were obtained after Smo or Gli1 silencing (Additional file 8).

These results argue for an orchestral role for SHH signaling in the constitutive activation of oncogenic pathways in this pathology.

We tested a panel of genes known for some of them to be Gli's targets in other cell lines or tissue types and shown to be important in human CRCC tumorigenesis, i.e Gli1 itself, cyclin D1, Pax2, Lim1, VEGF and TGF- β . By treating 786-0 cells with cyclopamine for 1 or 2 days, we showed that all of the tested targets were under the transcriptional activity of the SHH signaling pathways except cyclin D1, and that Pax2 expression was only inhibited at day 1 of cyclopamine treatment (Figure 7B).

In all patients tested, Gli1, cyclin D1, Pax2 and Lim1 were expressed exclusively in tumors at all stages (Figure 7C). The expression of VEGF and TGF- β were not assessed in these patients because these factors are known to be expressed in tumors and in a lesser degree in normal counterparts in human CRCC [2].

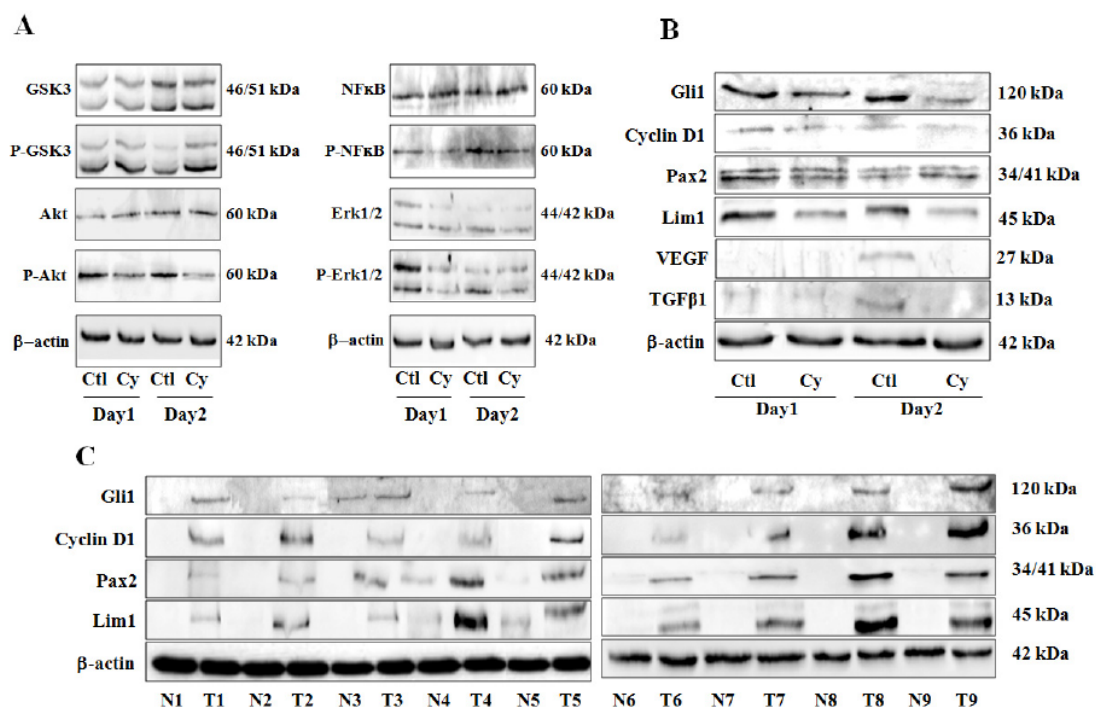


Figure 7
The SHH signaling pathway plays a pivotal and orchestral role in the constitutive activation of oncogenic pathways in human CRCC. (A) Western blots analysis of human CRCC 786-0 cell lysates treated for 2 days in control (Ctl) or with cyclopamine (Cy) at 20 μ M and incubated with the antibodies against non-phosphorylated GSK-3 (GSK-3), phospho-GSK-3 (P-GSK3), non-phosphorylated Akt (Akt), phospho-Akt (P-Akt), non-phosphorylated NF- κ B (NF- κ B), phospho-NF- κ B (P-NF- κ B), non-phosphorylated Erk1/2 (Erk1/2), phospho-Erk1/2 (P-Erk1/2) and corresponding β -actin. The gels shown are representative for at least 3 independent experiments. (B) Western blots analysis of human CRCC 786-0 cells lysates treated for 2 days in control (Ctl) or with cyclopamine (Cy) at 20 μ M and incubated with the antibodies against Gli1, cyclin D1, Pax2, Lim1, VEGF, TGF- β 1 and corresponding β -actin. The gels shown are representative for at least 3 independent experiments. (C) Western blot analysis in 9 human tumors (T1 ...) and normal corresponding tissues (N1 ...) lysates incubated with antibodies against Gli1, cyclin D1, Pax2, Lim1, and corresponding β -actin. The gels shown are representative for at least 3 independent experiments.

In conclusion, various Gli target genes have found to be specifically expressed in tumors, clearly arguing the pivotal role played by the SHH signaling pathway in human CRCC.

Discussion

The SHH signaling pathway plays crucial roles in metazoan embryo patterning [16]. During nephrogenesis, the biological effects of the SHH signaling pathway concern cell differentiation, migration and growth as well as angiogenesis [17]. Inherited or acquired modifications or aberrations in components of the SHH cascade result in various phenotypes such as congenital anomalies (Pallister-Hall syndrome and holoprosencephaly) and various

cancers including basal cell carcinoma and gastrointestinal cancers [18,19].

We show that this pathway is constitutively expressed and activated in human CRCC both *in vitro* and *in vivo* in freshly harvested tumors and in tumors grown in nude mice. The SHH ligand was expressed in cells and tumors but there was no consensus as for a preferential expression in tumors vs. normal corresponding tissues. This may be explained in part by diffusion of the SHH ligand secreted by the tumor to the adjacent normal tissues. Alternatively, some cells, such as resident stem cells, may expressed SHH ligand as suggested by other studies, arguing for a role for SHH pathway in the maintenance of the stem cell com-

partment [20,21]. Our results clearly show that the SHH signaling pathway is active in tumors but not in normal kidney tissues, as evidenced by the elevated expression of Smo and Gli transcription factors in tumors vs. corresponding normal tissues. As no data has been reported about the involvement of the SHH signaling pathway in human CRCC, it remains unknown whether there are activating mutations of this pathway. Our data suggest that the erroneous activation of this pathway in human CRCC may result from the expression of the Ptch1 receptor and the signaling components Smo and Gli.

The SHH ligand was present in all cell lines tested whether or not they are expressing VHL and the level of expression of SHH, Smo, Gli1, Gli2 and Gli3 were identical in 786-0 cells untransfected or VHL constructs-transfected cells. Although some studies have reported crosstalk between SHH and HIF pathways in other systems [22], our data suggest that the activation state of the SHH signaling is not associated with the VHL/HIF system in human CRCC.

Our results show that the SHH signaling pathway promotes tumor cell growth in human CRCC, regardless of the VHL status. The specificity of the Smo inhibitor cyclopamine against the SHH signaling pathway was clearly demonstrated herein by showing that overexpression of Smo and Gli1 alleviates the growth inhibitory effect of cyclopamine and by the negative effect of the Smo inhibitor on the expression not only of the SHH ligand but also of Gli1 and Gli2. Surprisingly, the expression of Ptch1 was increased by cyclopamine treatment, suggesting that Ptch1 expression might be repressed by the transcriptional activity of the SHH signaling pathway in human CRCC; this contrasts with what has been observed in other systems [15]. The expression of Smo was also decreased by the Smo inhibitor but at later time points suggesting that Smo may be transcriptionally regulated by Gli transcription factors. In human CRCC, we show, using various experimental approaches, i.e. cyclopamine, Smo and Gli1 targeting siRNAs and Smo and Gli1 overexpression, that the SHH signaling pathway stimulates essentially cell proliferation and in a lesser degree inhibits cell death, and no effects were observed on tumor cell senescence.

Interestingly, SHH signaling inhibition induced substantial tumor regression in nude mice, and the inhibitory effect on tumor growth was long-lasting after treatment arrest. Such spectacular effects of SHH signaling inhibition on tumor growth were also observed in other cancers such as human cholangiocarcinoma and melanomas [23]. Herein, we also showed that the treatment of human CRCC tumor-bearing nude mice with cyclopamine decreases tumor vascularization, indicating that the SHH pathway stimulates neoangiogenesis in human CRCC.

Moreover, we showed that the expression of the angiogenic and growth factors VEGF and TGF- β are under the transcriptional control of the SHH signaling pathway, and thus that they are probably part of the targets mediating this effect in human CRCC. However, reports of the prognostic value of vascularization in human CRCC have shown either no effect on patient survival, better survival or worse prognosis [24-26]; these discrepancies may be the consequence of vessel size and/or the co-existence of different vessels depending on the expressed markers CD31 and CD34 [27].

The PI3K/Akt, NF- κ B, MAPK, Jun kinase, Notch and SHH signaling pathways have been shown to be the main signaling events involved in nephrogenesis [28,29]. Interestingly, these pathways are activated constitutively in human CRCC. Our results demonstrate clear interactions between the PI3K/Akt, NF- κ B, MAPK, and SHH signaling pathways in human CRCC. As GSK-3 has been shown to inhibit Gli functions [30], it was surprising to observe that GSK-3 phosphorylation was increased in response to SHH inhibition using cyclopamine and Smo and Gli1 targeting siRNAs. However, the Akt-independent phosphorylation of GSK-3 may have opposite effect on GSK-3 activity. Finally, NF- κ B has been shown to contribute to SHH signaling activation through SHH ligand induction in pancreatic cells [31]. The inhibitory effect of cyclopamine and of Smo and Gli1 silencing on NF- κ B activation observed here thus suggests that the SHH signaling stimulates NF- κ B, which itself stimulates SHH signaling. Therefore, our results provide evidence for a pivotal and orchestral role for SHH signaling pathway in the constitutive activation of oncogenic pathways leading to sustained tumor growth.

As stated above, various Gli targets have been evidenced [15]. We identified various genes being under the transcriptional activity of Gli. There are some reports in the literature describing the involvement of cyclin D1 and Pax2 in human CRCC tumorigenesis [32,33] and for Pax2 in responses to therapies, but not for the SHH ligand, Gli1 and Lim1. Interestingly, the SHH ligand itself was shown to be a transcriptional target of the SHH signaling. Thus, the system boosts itself by also increasing the expression of the ligand.

Conclusions

Until the recent development of targeted therapies with multi-tyrosine kinase receptors inhibitors such as sunitinib and sorafenib, and although their effects are not long-lasting due to therapy-induced resistance, there was no efficient treatment for advanced human CRCC. Our results indicate that inhibition of SHH signaling might represent a new and complementary therapeutic approach against human CRCC. As SHH signaling path-

way has emerged as a crucial pathway in the pathogenesis of various tumor types, SHH inhibitors are currently being evaluated as potential anticancer drugs. Here, we showed that cyclopamine was safe and well tolerated by the mice, providing the proof of concept for the use of this family of drugs *in vivo*.

Overall, we showed that the SHH pathway is specifically reactivated in human CRCC and that targeting this pathway might be particularly efficient against this disease, not only through inhibition of tumor growth but also by impeding tumor vascularization. Because CRCC is resistant to therapies, describing and understanding all the molecular mechanisms leading to carcinogenesis is critical to develop treatment for this cancer type. Thus, our study identifies the SHH pathway as an important signaling pathway implicated in kidney tumorigenesis.

Methods

Cell culture and reagents

Human CRCC cell lines either deficient in VHL (786-0, UOK-126, A498) or expressing VHL (ACHN, Caki-2) as described [9]. Clones of 786-0 cells transfected either with human VHL gene (786-0 VHL), inactive truncated human VHL gene (786-0 ΔVHL), or the vector alone only pCR3-Uni (786-0 V) were also used.

Human tumor biopsies

The tumor and normal corresponding tissue of 9 patients were obtained in collaboration with the Department of Urology (Pr. D. Jaqmin and Pr. H. Lang) of the "Nouvel Hôpital Civil" (NHC), Strasbourg, France. Informed consent was obtained from all patients. The tumors were staged according to the tumor node metastasis (TNM) classification [34]: 2 pT1aNx, 1 pT1bNx, 1 pT2N0, 1 pT2Nx, 1 pT3aNx, 2 pT3bN0 and 1 pT3bN1 (T1 to T9). Immediately after surgical resection, tissues were fresh frozen and kept in liquid nitrogen until RNA and protein expression analysis.

Western Blot Analysis

Protein extractions and membrane preparations were performed as described [35]. Membranes were incubated overnight at 4°C with the appropriate dilution of the following primary antibodies: anti-Akt antibody (1:250; Millipore), anti-phospho-Akt antibody (1:150; Ozyme, Cell signaling local distributor, Saint-Quentin-en-Yvelines, France), anti-GSK3 α/β antibody (1:1000; Millipore 05-903), anti-phospho-GSK3 α/β (Ser21/9) antibody (1:250; Ozyme), anti-NF- κ B (1:2000; Millipore AB1604), anti-phospho-NF- κ B (S468) (1:250; Ozyme); anti-Erk1/2 (1:1000; Ozyme), anti-phospho-Erk1/2 (1:1000; Millipore 05-481), anti-SHH (1:500; Ozyme), anti-cyclinD1 (1:750; Ozyme), anti-Gli1 (1:2000; Millipore AB3444), anti-Pax2 (1:1000; Ozyme), anti-Lim1 (1:3000; Millipore

AB3200), anti-VEGF (1:250; Millipore MAB3734) and anti-TGF β 1 (1:200; Ozyme). For visualization of protein gel loading, an anti β -actin antibody was used (1:5000; Sigma-aldrich, St Quentin Fallavier, France). The appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary was used. Immunoreactivity was visualized as detailed [35].

Real-time quantitative RT-PCR analysis

Total RNAs were extracted from CRCC cells and tissues using the Trizol method according to the manufacturer's protocol (Invitrogen). Five μ g of total RNA were reverse transcribed in a reaction buffer (Invitrogen) and non-specific primer p(dT)₁₅ (Roche Diagnostics, Meylan, France), at 37°C for 1 h. cDNAs specific for each Ptch1, Smo, Gli1, Gli2, Gli3 and SHH mRNAs were amplified using the "LightCycler-FastStart DNA Master SYBR (syber) Green" kit (Roche Diagnostics). Sense and antisense primers used are depicted in Additional file 9. Each sample was analyzed 3 times and quantified with the analysis software for LightCycler (Roche Diagnostics).

Cell density

CRCC cell proliferation was assessed by counting adherent cells, as described [35]. RCC cells were seeded in 24-well plates (20,000 cells/ml), grown for 24 h, and then treated for 1-5 days with various concentrations of cyclopamine (LC Laboratories, Woburn, USA), SB216763 (GSK3 inhibitor, Sigma-Aldrich), LY294002 (PI3K inhibitor, Sigma-Aldrich), BAY 11-7085 (NF- κ B inhibitor, Calbiochem, Fontenay-sous-Bois, France), or U0126 (MAPK inhibitor, Calbiochem), alone or in combination, as indicated in the appropriate Figures or Figure legends, or the diluent only (DMSO). In some experiments, we also used Smo and Gli1 targeting siRNAs and Smo and Gli1 expressing vector and assessed cell density, either alone or in combination with cyclopamine or the above-mentioned oncogenic pathways inhibitors, as indicated in the appropriate Figures or Figure legends.

Bromodeoxyuridine (BrdU) incorporation

CRCC cells were seeded in 96-well plate (20,000 cells/ml), grown for 24 h and FBS was replaced by 0,1% of BSA during an additional 24 h to render cells quiescent. Cells were treated for 1-5 days with 20 μ M cyclopamine or the corresponding volume of DMSO. In some experiments, we also used Smo and Gli1 targeting siRNAs and performed BrdU incorporation studies, as indicated in the appropriate Figures or Figure legends. Test was then realized according to the protocol of the manufacturer (Calbiochem®, Merck KGaA, Darmstadt, Germany).

Fluorescence-Activated Cell Sorting Analysis

CRCC cells were seeded in 6-well plates (20000 cells/ml) and treated with 20 μ M cyclopamine or DMSO. In some experiments, we also used Smo and Gli1 targeting siRNAs

and performed fluorescence-activated cell sorting (FACS), as indicated in the appropriate Figures or Figure legends. Floating and adherent cells were harvested and resuspended in incubation buffer (100 μ L/500 000 cells: 140 mmol/L NaCl, 5 mmol/L CaCl₂, and 10 mmol/L HEPES buffer) containing Annexin V-FITC and propidium iodide (1 μ g/mL) and incubated in a dark chamber at 4°C for 10 minutes. After centrifugation, the supernatant was withdrawn and cells fixed in a dark chamber in 200 μ L of formalin 1% at 4°C for 10 min. After centrifugation, cells were resuspended in 200 μ L incubation buffer and subjected to FACS analysis. Fluorescence analysis were performed using FACSsort flow cytometer (BD) and the fraction of viable cells, and apoptosis cells was determined using FCS express software (DeNovo Software, Los Angeles, CA).

Xenograft Tumor Model

All animal studies were in compliance with the French animal use regulations. Four million 786-0 cells were injected s.c. under the skin of 4 week-old athymic male mice (SWISS nu-/nu-; Charles River Laboratories, l'Arbresle, France). Tumor volumes were measured as previously described [35]. We begun drug injections when 786-0 tumors had grown to an overall volume of 100 mm³. We followed two protocols: the first protocol was injection of cyclopamine i.p at 0.5 mg/mouse at 2 days interval for 19 days and the second protocol was injection of cyclopamine i.p at 0.4 mg/mouse every day for 7 days, the control groups receiving the vehicle alone (DMSO/oil, v/v) at the same time period. Mice were thus divided in 4 groups, two groups treated with cyclopamine and 2 groups treated in control, according to the 2 protocols. For the second protocol, the treatment was then followed for 4 days (day 7 to day 11) and mice were then left untreated for additional 12 days (day 11 to day 23), and tumors growth was measured. At the end of the treatments, animals were sacrificed and the tumors were harvested, paraffin embedded, and cut in 4- μ m-thick sections for subsequent immunohistochemical analysis as described before for the proliferative index, the apoptotic index and the neovascularization and snap-frozen for PCR or Western blot analysis.

Statistical analysis

All values are expressed as mean \pm s.e.m. Values were compared using multifactorial analysis of variance followed by the Student-Newman-Keul's test for multiple comparisons. A $P < 0.05$ was considered significant.

Abbreviations

CRCC: clear cell renal cell carcinoma; Ptch: patched1 receptor; Smo: smoothened receptor; VHL: von Hippel-Lindau.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

VD, TM designed research. VD, SD, LT, SR performed research. JJH, DJ, HL contributed clinical material. VD, CC, VL, TM analyzed data. TM wrote the paper. All authors read and approved the manuscript.

Additional material

Additional file 1

*The silencing of the SHH signaling pathway decreases human CRCC cell proliferation. Tumor cells were seeded in 24-well plates (20,000 cells/ml), grown for 24 h and were then transiently transfected for 24 to 96 h with Smo-targeting siRNA (siSmo), Gli1-targeting siRNA (siGli1) or control siRNA (siCtl), according to the manufacturer's instructions (Applied Biosystems, Ambion local distributor, Courtaboeuf, France). (A) Human 786-0 cells were transiently transfected with siRNA (siCtl, siSmo and siGli1, as indicated) at 100 nM or not transfected (Ctl) and cells were counted each day. Results are shown as mean \pm SEM, n = 6; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ from Ctl. (B) Human 786-0 cells were transiently transfected for 4 days with siRNA (siCtl, siSmo, and siGli1, as indicated) or not transfected (Ctl) at the concentrations indicated in the figure and adherent cells were counted. Results are shown as mean \pm SEM, n = 6; **, $P < 0.01$ from Ctl. (C) Our panel of human CRCC cells either deficient or expressing the VHL gene were transiently transfected for 4 days with siRNA (siCtl, siSmo, and siGli1, as indicated) at 100 nM or not transfected (Ctl) and adherent cells were counted. Results are shown as mean \pm SEM, n = 6; **, $P < 0.01$ from Ctl that was set to 100%. (D) Our panel of human CRCC cells either deficient or expressing VHL were analyzed for BrdU incorporation after transient transfection with siRNA (siCtl, siSmo, and siGli1, as indicated) at 100 nM or not transfected (Ctl) for the indicated periods of time. For clarity, only the results concerning 786-0 cell line are presented since similar results were obtained with the other cell lines (dat not shown). Results are shown as mean \pm SEM, n = 6; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ from corresponding Ctl. Click here for file [http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1476-4598-8-123-S1.TIFF]*

Additional file 2

*The silencing of the SHH signaling pathway induces tumor cells apoptosis. FACS analysis of 786-0 cells transiently transfected with siRNA (siCtl, siSmo and siGli1, as indicated) at 100 nM or not transfected (Ctl). No evidence of necrosis was observed in any cases. The percent of apoptotic cells was quantified as a function of treatment times. Results are shown as mean \pm SD, n = 6; *, $P < 0.05$ and **, $P < 0.01$ from Ctl apoptosis. Click here for file [http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1476-4598-8-123-S2.TIFF]*

Additional file 3

The inhibition of the SHH signalling pathway does not induce CRCC cells senescence. RCC cells were seeded in 24-well plates (20,000 cells/ml), grown for 24 h, and then treated for 1 day to 5 days with 20 μ M cyclopamine or the corresponding volume of DMSO. The test was then realized according to the protocol of the manufacturer ("Senescence β -Galactosidase Staining Kit", Cell Signaling). β -galactosidase staining was analysed under a microscope (magnification \times 200) (A) Examples of microscope analysis (day 4). (B) Quantitative analysis of senescent cells as function of the time of treatments, the number of total and stained cells in 8 fields (0,25 cm² each) were quantified in a blinded manner to determine the percentage of senescent cells. Results are shown as mean \pm SEM, n = 6 from Ctl senescence. Bars, 5 μ m.

Click here for file

[<http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1476-4598-8-123-S3.TIFF>]

Additional file 4

The overexpression of Smo and Gli1 alleviate the growth inhibitory effect of cyclopamine in human tumor cells. Human 786-O cells were seeded in 24-well plates (20,000 cells/ml), grown for 24 h and were then treated with cyclopamine (20 μ M) or transiently transfected for 1 to 5 days with cDNA overexpression plasmids (pCMV6-XL5 vector, pCMV6-XL5-Smo and pCMV6-XL5-Gli1) according to the manufacturer's instructions (Clinisciences, Origene local distributor, Montrouge, France), either alone or in combination with cyclopamine, as indicated in the figure, and adherent cells were counted each day. Results are shown as mean \pm SEM, n = 6; **, P < 0.01 from Ctl; #, P < 0.01 from cyclopamine alone or in cells transfected with vector alone at 72 h, 96 h and 120 h.

Click here for file

[<http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1476-4598-8-123-S4.TIFF>]

Additional file 5

Inhibition of the SHH signaling pathway induces tumor regression in nude mice. (A) Tumor weight in mice treated according to the first experimental protocol. Results are shown as mean \pm SEM, n = 7 for both groups; **, P < 0.01 cyclopamine-treated mice vs Ctl-treated mice. (B) Tumor weight in mice treated according to the second experimental protocol. Results are shown as mean \pm SEM, n = 7 for both groups; **, P < 0.01 cyclopamine-treated mice vs Ctl-treated mice. (C) Left, tumor sections of control- (Ctl) or cyclopamine (Cyclopamine)-treated mice immunostained for DNA fragmentation (magnification \times 400). Right, apoptotic index. Results are shown as mean \pm SEM, n = 7; NS.

Click here for file

[<http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1476-4598-8-123-S5.TIFF>]

Additional file 6

The SHH signaling pathway plays a pivotal and orchestral role in the constitutive activation of oncogenic pathways in human CRCC. Human CRCC 786-0 cells were seeded and treated for the indicated period of times in control (Ctl) or with cyclopamine (Cyclopamine) at 20 μ M, the GSK-3 inhibitor SB216763 at 20 μ M, the PI3K/Akt inhibitor LY294002 at 10 μ M, the NF- κ B inhibitor BAY 11-7085 at 2,5 μ M or the MAPK inhibitor U0126 at 30 μ M, either alone or in combination, as indicated in the figure, and adherent cells were counted each day. Results are shown as mean \pm SEM, n = 6; **, P < 0.01 from Ctl.

Click here for file

[<http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1476-4598-8-123-S6.TIFF>]

Additional file 7

The silencing of the SHH signaling pathway further arguments the orchestral role of this pathway in oncogenic pathways activation in human CRCC. Human CRCC 786-0 cells were seeded and transiently transfected with siRNA (siCtl, siSmo and siGli1) at 100 nM or not transfected (Ctl) and treated, for the indicated period of times, with the GSK-3 inhibitor SB216763 (SB) at 20 μ M, the PI3K/Akt inhibitor LY294002 at 10 μ M (LY), the NF- κ B inhibitor BAY 11-7085 (BAY) at 2.5 μ M or the MAPK inhibitor U0126 (U0) at 30 μ M, either alone or in combination, as indicated in the figure, and adherent cells were counted each day. Results are shown as mean \pm SEM, n = 6; **, P < 0.01 from Ctl.

Click here for file

[<http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1476-4598-8-123-S7.TIFF>]

Additional file 8

The SHH signaling pathway plays an orchestral role in the constitutive activation of oncogenic pathways in human CRCC as evaluated after Smo and Gli1 silencing. Western blots analysis of human 786-0 cell lysates that were transiently transfected for 2 days with siRNA (siCtl, siSmo and siGli1, as indicated) at 100 nM and incubated with the antibodies against non-phosphorylated GSK-3 (GSK-3), phospho-GSK-3 (P-GSK3), non-phosphorylated Akt (Akt), phospho-Akt (P-Akt), non-phosphorylated NF- κ B (NF- κ B), phospho-NF- κ B (P-NF- κ B), non-phosphorylated Erk1/2 (Erk1/2), phospho-Erk1/2 (P-Erk1/2) and corresponding β -actin, as indicated. The gels shown are representative of at least 3 independent experiments.

Click here for file

[<http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1476-4598-8-123-S8.TIFF>]

Additional file 9

Primer pairs for the quantitative measurements of gene expression. Table showing primer pairs for the quantitative measurements of gene expression.

Click here for file

[<http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1476-4598-8-123-S9.DOC>]

Acknowledgements

This study was sponsored by INSERM, University of Strasbourg and the French Ligue Contre le Cancer (Comités du Bas-Rhin et du Haut-Rhin et Comité National, recipient TM). We thank Dr A. Donai (INSERM U316, Tour Hospital, France) for helpful suggestions and Dr. Barths Jochen (INSERM U748, Strasbourg Hospital, France) for allowing us to perform FACS analysis.

References

1. Sourbier C, Massfelder T: **Parathyroid hormone-related protein in human renal cell carcinoma.** *Cancer Lett* 2006, **240**:170-182.
2. Clark PE: **Recent advances in targeted therapy for renal cell carcinoma.** *Curr Opin Urol* 2007, **17**:331-336.
3. Motzer RJ, Russo P: **Systemic therapy for renal cell carcinoma.** *J Urol* 2000, **163**:408-417.
4. Motzer RJ, Hutson TE, Tomczak P, Michaelson MD, Bukowski RM, Rixe O, Oudard S, Negrier S, Szczylik C, Kim ST, Chen I, Bycott PW, Baum CM, Figlin RA: **Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma.** *New Engl J Med* 2007, **356**:115-124.
5. Escudier B, Eisen T, Stadler WM, Szczylik C, Oudard S, Siebels M, Negrier S, Chevreau C, Solska E, Desai AA, Rolland F, Demkow T, Hutson TE, Gore M, Freeman S, Schwartz B, Shan M, Simantov R,

- Bukowski RM: Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma. *New Engl J Med* 2007, **356**:125-134.
6. Friedrich CA: Von Hippel-Lindau syndrome. A pleomorphic condition. *Cancer* 1999, **86**:2478-2485.
 7. Kaelin WG Jr: The von hippel-lindau tumor suppressor protein and clear cell renal carcinoma. *Clin Cancer Res* 2007, **13**:680-684.
 8. Seagroves T, Johnson RS: Two HIFs may be better than one. *Cancer Cell* 2002, **1**:211-213.
 9. Sourbier C, Lindner V, Lang H, Agouni A, Schordan E, Danilin S, Rothhut S, Jacqmin D, Helwig JJ, Massfelder T: The Phosphoinositide 3-Kinase/Akt Pathway: A New Target in Human Renal Cell Carcinoma Therapy. *Cancer Res* 2006, **66**:5130-5142.
 10. Sourbier C, Danilin S, Lindner V, Steger J, Rothhut S, Meyer N, Jacqmin D, Helwig JJ, Lang H, Massfelder T: Targeting the NF-kappa B rescue pathway has promising future in human renal cell carcinoma therapy. *Cancer Res* 2007, **67**:11668-1176.
 11. Huang D, Ding Y, Luo WM, Bender S, Qian CN, Kort E, Zhang ZF, VandenBeldt K, Duesbery NS, Resau JH, Teh BT: Inhibition of MAPK kinase signaling pathways suppressed renal cell carcinoma growth and angiogenesis in vivo. *Cancer Res* 2008, **68**:81-88.
 12. Hueber PA, Iglesias D, Chu LL, Eccles M, Goodyer P: In vivo validation of PAX2 as a target for renal cancer therapy. *Cancer Lett* 2008, **265**:148-155.
 13. Sjölund J, Johansson M, Manna S, Norin C, Pietras A, Beckman S, Nilsson E, Ljungberg B, Axelson H: Suppression of renal cell carcinoma growth by inhibition of Notch signaling in vitro and in vivo. *J Clin Invest* 2008, **118**:217-228.
 14. Chari NS, McDonnell TJ: The sonic hedgehog signaling network in development and neoplasia. *Adv Anat Pathol* 2007, **14**:344-352.
 15. Louro ID, Bailey EC, Li X, South LS, McKie-Bell PR, Yoder BK, Huang CC, Johnson MR, Hill AE, Johnson RL, Ruppert JM: Comparative gene expression profile analysis of GLI and c-MYC in an epithelial model of malignant transformation. *Cancer Res* 2002, **62**:5867-5873.
 16. Hedberg Y, Ljungberg B, Roos G, Landberg G: Expression of cyclin D1, D3, E, and p27 in human renal cell carcinoma analysed by tissue microarray. *Br J Cancer* 2003, **88**:1417-1423.
 17. Mazal PR, Stichenwirth M, Koller A, Blach S, Haitel A, Susani M: Expression of aquaporins and PAX-2 compared to CD10 and cytokeratin 7 in renal neoplasms: a tissue microarray study. *Mod Pathol* 2005, **18**:535-540.
 18. Varjosalo M, Taipale J: Hedgehog: functions and mechanisms. *Genes & Development* 2008, **22**:2454-2472.
 19. Gill PS, Rosenblum ND: Control of murine kidney development by sonic hedgehog and its gli effectors. *Cell Cycle* 2006, **13**:1426-1430.
 20. Dahmane N, Lee J, Robins P, Heller P, Ruiz i Altaba A: Activation of the transcription factor Gli1 and the Sonic hedgehog signaling pathway in skin tumours. *Nature* 1997, **389**:876-881.
 21. Berman DM, Karhadkar SS, Maitra A, Montes De Oca R, Gerstenblith MR, Briggs K, Parker AR, Shimada Y, Eshleman JR, Watkins DN, Beachy PA: Widespread requirement for Hedgehog ligand stimulation in growth of digestive tract tumours. *Nature* 2003, **425**:846-851.
 22. Bar EE, Chaudhry A, Lin A, Fan X, Schreck K, Matsui W, Piccirillo S, Vescevi AL, DiMeco F, Olivi A, Eberhart CG: Cyclopamine-mediated hedgehog pathway inhibition depletes stem-like cancer cells in glioblastoma. *Stem cells* 2007, **25**:2524-2533.
 23. Clement V, Sanchez P, de Tribolet N, Radovanovic I, Ruiz i Altaba A: Hedgehog-Gli1 signaling regulates human glioma growth, cancer stem cell self-renewal, and tumorigenicity. *Current Biology* 2007, **17**:165-172.
 24. Hwang JM, Weng YJ, Lin JA, Bau DT, Ko FY, Tsai FJ, Tsai CH, Wu CH, Lin PC, Huang CY, Kuo WW: Hypoxia-induced compensatory effect as related to Shh and HIF-1alpha in ischemia embryo rat heart. *Mol Cell Biochem* 2008, **311**:179-187.
 25. Stecca B, Mas C, Clement V, Zbinden M, Correa R, Piguet V, Beer-mann F, Ruiz I, Altaba A: Melanomas require hedgehog-Gli signalling regulated by interactions between Gli1 and the ras- MEK/Akt pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007, **104**:5895-5900.
 26. MacLennan GT, Bostwick DG: Microvessel density in renal cell carcinoma: lack of prognostic significance. *Urology* 1995, **46**:27-30.
 27. Nativ O, Sabo E, Reiss A, Wald M, Madjar S, Moskovitz B: Clinical significance of tumor angiogenesis in patients with localized renal cell carcinoma. *Urology* 1998, **51**:693-696.
 28. Imao T, Egawa M, Takashima H, Koshida K, Namiki M: Inverse correlation of microvessel density with metastasis and prognosis in renal cell carcinoma. *Int J Urol* 2004, **11**:948-953.
 29. Yao Y, Pan Y, Chen J, Sun X, Qiu Y, Ding Y: Endoglin (CD105) expression in angiogenesis of primary hepatocellular carcinomas: analysis using tissue microarrays and comparisons with CD34 and VEGF. *Ann Clin Lab Sci* 2007, **37**:39-48.
 30. Tang X, Batty IH, Downes CP: Muscarinic receptors mediate phospholipase C-dependent activation of protein kinase B via Ca2+, ErbB3, and phosphoinositide 3-kinase in I321NI astrocytoma cells. *J Biol Chem* 2002, **277**:338-344.
 31. Dressler GR: The cellular basis of kidney development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2006, **22**:509-529.
 32. Jiang J: Regulation of Hh/Gli signaling by dual ubiquitin pathways. *Cell Cycle* 2006, **5**:2457-2463.
 33. Nakashima H, Nakamura M, Yamaguchi H, Yamanaka N, Akiyoshi T, Koga K, Yamaguchi K, Tsuneyoshi M, Tanaka M, Katano M: Nuclear factor-κB contributes to hedgehog signalling pathway activation through sonic hedgehog induction in pancreatic cancer. *Cancer Res* 2006, **66**:7041-7049.
 34. Sagalowsky AI: The 1997 TNM classification of renal cell carcinoma revisited: the pendulum swings back. *Curr Opin Urol* 2002, **12**:371-373.
 35. Massfelder T, Lang H, Schordan E, Lindner V, Rothhut S, Welsch S, Simon-Assmann P, Barthelmebs M, Jacqmin D, Helwig JJ: Parathyroid hormone-related protein is an essential growth factor for human clear cell renal carcinoma and a target for the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene. *Cancer Res* 2004, **64**:180-188.

Publish with **BioMed Central** and every scientist can read your work free of charge

"BioMed Central will be the most significant development for disseminating the results of biomedical research in our lifetime."

Sir Paul Nurse, Cancer Research UK

Your research papers will be:

- available free of charge to the entire biomedical community
- peer reviewed and published immediately upon acceptance
- cited in PubMed and archived on PubMed Central
- yours — you keep the copyright

Submit your manuscript here:
http://www.biomedcentral.com/info/publishing_adv.asp



1.2 Résumé

Le CCR est caractérisé par une résistance très importante aux thérapies. Les dernières avancées concernant les facteurs inductibles par l'hypoxie ont abouti à l'élaboration de thérapies ciblées basées sur l'inhibition de l'angiogénèse mais les résultats cliniques demeurent limités. Elucider les processus moléculaires impliqués dans la tumorigénèse et la résistance devient essentiel pour le développement de nouvelles thérapies contre ce cancer. Les voies oncogéniques PI3K/Akt, NF- κ B ou encore des MAPK ont été montrées comme jouant un rôle dans le cancer du rein mais ne suffisent toujours pas à expliquer la cancérogénicité associée aux CCR. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés aux voies développementales qui agissent sur la différenciation et la prolifération cellulaires au cours de l'embryogenèse et qui pouvaient donc influencer ces mêmes processus au sein des cellules cancéreuses si elles se trouvaient (ré)activées dans cette situation pathologique. La voie HH, cruciale pour le développement normal, semblait être un candidat idéal pour étayer cette hypothèse concernant le CCR.

Nous avons montré par PCR en temps réel et Western blot, que la voie HH est constitutivement réactivée dans les tumeurs humaines de CCR et dans les lignées cellulaires, indépendamment du statut en VHL. Des études d'incorporation de BrdU, et de cytométrie en flux ont montré que le blocage de cette voie inhibe la croissance cellulaire. Sur le modèle de souris nude xénotreffées, des régressions tumorales ont été observées en bloquant la voie HH. Gli1, cycline D1, Pax2, Lim1, VEGF, et TGF- β sont exclusivement exprimés dans les tumeurs et sont régulés par SHH comme le montrent les Western blot après inhibition de la voie HH. De plus, l'activation des voies oncogéniques est réduite lorsque la voie HH est inhibée.

Nos travaux indiquent que les voies impliquées lors du développement rénal peuvent être réactivées par les cellules cancéreuses pour participer aux phénomènes de prolifération, d'angiogénèse et d'apoptose afin de permettre à la tumeur de croître, et potentiellement de devenir métastatique. Ces résultats décrivent la voie HH comme une cible pour le traitement du CCR et ouvrent la voie à des investigations innovantes dans ce cancer.

1.3 Discussion

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à la voie HH et sa potentielle implication dans le CCC. Le contexte scientifique à l'initiation du projet au sein du laboratoire, était favorable à un rôle de cette voie au sein des cellules cancéreuses rénales. En effet, d'une part la voie HH est nécessaire au développement, notamment au niveau du rein (Gill and Rosenblum, 2006), et d'autre part une activation dans de nombreux cancers venait d'être démontrée (Katano, 2005; Nakashima *et al.*, 2006; Thayer *et al.*, 2003). Mais aucune étude n'avait été menée concernant le cancer du rein. Il nous paraissait ainsi intéressant de sonder cette voie avec les outils biologiques à disposition du laboratoire dans le but de décrire les mécanismes de tumorigenèse associés au CCR, et de découvrir des voies d'innovation thérapeutique pour cette pathologie réfractaire aux traitements actuels.

Concernant la voie HH, il était connu que son inhibition *in vitro* entraînait une diminution de la prolifération cellulaire et une augmentation de l'apoptose. Dans des modèles de souris xénogreffées, l'injection d'inhibiteurs de la voie ralentissait la croissance tumorale et permettait d'obtenir des régressions tumorales (Berman *et al.*, 2003). La protéine reconnue comme marqueur de la voie HH était le facteur de transcription Gli1, et l'inhibiteur le mieux décrit et le plus utilisé dans les études était la cyclopamine, qui agit en bloquant l'activité du récepteur Smo (Incardona *et al.*, 1998).

L'initiation des travaux de recherche a consistée en l'étude de l'expression de la voie HH au sein des lignées cellulaires issues de CCC et dans les échantillons de tissus humains tumoraux et sains obtenus en collaboration avec le service de chirurgie urologique (Pr. D. Jacqmin et Pr. H. Lang) du Nouvel Hôpital Civil de Strasbourg. Sur des extraits ARN et protéiques utilisés en RT-PCR et en Western blot, respectivement, nous avons montré la réactivation de la voie HH dans le CCR, en analysant les acteurs principaux de la voie : les 2 récepteurs (Smo et Ptc), les facteurs de transcription associés à la voie (Gli1, Gli2 et Gli3) ainsi que le ligand SHH. De plus, par l'utilisation de l'ensemble des lignées disponibles au laboratoire, c'est-à-dire, des lignées exprimant le gène suppresseur de tumeur VHL ou non, nous avons pu montrer que l'expression de la voie n'est pas dépendante du statut VHL. Il est à noter que jusque là, l'activation de la voie HH avait été principalement montrée par des techniques d'immunohistochimie et non par Western blot, de plus nous avons pu comparer l'expression des différentes

protéines avec le tissu sain correspondant à la tumeur, ce qui n'avait pas été fait jusque là. Tout comme pour les autres types de cancer qui avaient été étudiés dans la littérature, nous pouvions affirmer que la voie HH était également active dans le CCR.

L'étude de l'effet de l'inhibition de la voie HH sur la croissance tumorale *in vitro* et *in vivo* devenait l'étape suivante. En utilisant la cyclopamine ainsi qu'une approche par transfection transitoire (RNA interférants et surexpression de gènes), nous avons montré que l'inhibition de la voie HH induit une diminution de plus de 70% de la prolifération cellulaire et augmente l'apoptose cellulaire sans modifier la sénescence des cellules cancéreuses. Ces résultats étaient identiques quelle que soit la lignée cellulaire utilisée. L'effet de l'inhibition de la voie HH était donc indépendant du statut en VHL. Les effets de l'inhibition de cette voie développementale dans les cellules issues de CCR se rapprochaient donc des effets caractérisés pour les autres cancers étudiés. Finalement, en traitant des souris nude xénotreffées par la cyclopamine, nous avons obtenu une diminution de la croissance tumorale de plus de 80% ainsi que des régressions dans le cas d'une dose plus élevée en agent pharmacologique sans que cela ne soit toxique pour la souris. Après sacrifice des souris et résection des tumeurs, des analyses immunohistochimiques ont révélé une diminution de la prolifération cellulaire tumorale chez les souris traitées avec la cyclopamine.

La dernière étape de notre étude consistait en la recherche de cibles et du mécanisme d'action de la voie HH au sein des cellules cancéreuses rénales. Pour cela, nous avons utilisé différents inhibiteurs pharmacologiques des principales voies oncogéniques impliquées dans la croissance du CCR, avec la cyclopamine ou des siRNA ciblant Gli1 et Smo. Nous avons pu mettre en évidence un rôle de chef d'orchestre de la voie HH dans les mécanismes gérant la prolifération et la mort cellulaires des cellules cancéreuses tout comme cela avait déjà été montré dans le cas du développement (Varjosalo and Taipale, 2008). L'analyse en Western blot de divers acteurs moléculaires impliqués dans les processus prolifératifs, apoptotiques, angiogéniques et migratoires, nous ont permis de mettre notamment en évidence l'interaction de la voie HH avec Pax2 ou Lim1.

A travers cette étude nous avons démontré que la voie HH est activée dans le CCR humain et semble jouer un rôle régulateur d'autres voies impliquées dans la croissance de ce type de cancer. Il devient donc intéressant de considérer le ciblage de cette voie dans une optique thérapeutique. Comme nous l'avons énoncé en introduction, un

inhibiteur de la voie HH est à présent testé dans des études cliniques de phase 1 et 2 ce qui n'était pas le cas lorsque nous avons commencé notre étude. Il est à noter que les connaissances du fonctionnement et des modalités d'activation de la voie HH dans différentes conditions pathologiques n'en sont qu'à leur début. Ainsi, il sera intéressant, dans des études ultérieures d'analyser les relations de la voies HH avec d'autres acteurs impliqués dans le CCR. De même, l'utilisation d'une puce à tissus afin d'étudier les nombreux acteurs de la voie HH sur un échantillon important de tumeurs de CCR humain et tissus sains correspondants, permettra d'augmenter la pertinence de l'implication de la voie HH dans le CCR. Ceci permettra également d'analyser s'il existe une corrélation dans son expression avec le grade de la tumeur. Etant donné les résultats que nous avons obtenus lors de la recherche de cibles de la voie HH par Western blot, nous avons décidé de nous attacher à l'étude du facteur de transcription Lim1, qui n'avait encore jamais été décrit comme interagissant avec la voie HH dans une pathologie, tandis que les études sur Pax2 étaient déjà nombreuses (Beland and Bouchard, 2006; Hueber *et al.*, 2008).

2 ETUDE DU FACTEUR DE TRANSCRIPTION Lim1

2.1 Publication

LIM-class homeobox gene Lim1, a novel oncogene in human renal cell carcinoma.

(Dormoy et al., 2010)

Manuscrit en révision dans Oncogene

LIM-class homeobox gene *Lim1*, a novel oncogene in human renal cell carcinoma.

Valérien Dormoy,¹ Claire Béraud,¹ Véronique Lindner,² Lionel Thomas,¹ Catherine Coquard,¹ Mariette Barthelmebs,¹ Didier Jacqmin,³ Hervé Lang,³ and Thierry Massfelder¹

¹INSERM U682, Section of Renal Cancer and Renal Physiopathology, University of Strasbourg, School of Medicine, Strasbourg, 67085 France

²Hôpital de Mulhouse, Department of Pathology, Mulhouse, 68000 France

³Nouvel Hôpital Civil de Strasbourg, Department of Urology, Strasbourg, 67091 France

Correspondence: Dr Thierry Massfelder, INSERM U682, E-mail, thierry.massfelder@medecine.u-strasbg.fr, Phone, 333-68-85-34-56; Fax, 333-68-85-34-59.

Key words: renal cell carcinoma; developmental LIM class homeobox gene *Lim1*; growth; migration; VHL tumor suppressor; oncogene

Running title: *Lim1* in renal cell carcinoma

Abbreviations: CCC, clear cell renal cell carcinoma; *Lhx1*, LIM-class homeobox gene 1; SHH, sonic hedgehog; VHL, von Hippel-Lindau

Abstract

Human clear cell renal cell carcinoma (CCC) remains resistant to therapies. The transcription factor LIM-class homeobox gene *Lim1* is required for normal organogenesis, including nephrogenesis, by regulating cell movements, differentiation and growth. Its expression is controlled partly by the sonic hedgehog (SHH)-Gli signaling pathway, which we have recently shown to be reactivated in human CCC. So far, no study has assessed whether *Lim1* may be associated with tumorigenesis. Using a panel of human CCC cell lines expressing or not the von Hippel-Lindau (VHL) tumor suppressor gene and 44 tumor/normal tissues pairs, we found that *Lim1* is constitutively and exclusively reexpressed in tumors. Through *Lim1* silencing or overexpressing, we show that *Lim1* is a growth and survival factor in human CCC, at least through the activation of oncogenic pathways including the PI3K/Akt and NF- κ B pathways. More importantly, in nude mice bearing human CCC tumors, *Lim1* silencing abolished tumor growth through the same mechanism as *in vitro*. In *Lim1*-depleted cells and tumors, cell movements were substantially impaired due to the inhibition of expression of various proteins involved in metastatic spread, such as paxillin or tenascin-C. These findings establish that, the developmental marker *Lim1* acts as an oncogene in cancer cells and targeting *Lim1* may constitute an innovative therapeutic intervention in human CCC.

Introduction

Renal cell carcinoma (RCC) is the sixth leading cause of cancer deaths in Western countries and is the most lethal urologic tumor (Clark, 2007). RCC is represented in 80% of the cases by clear cell RCC (CCC), originating from the renal proximal tubule. RCC is characterized by a high degree of resistance to conventional therapies. Recent studies yielded better knowledge of the molecular mechanisms of kidney tumorigenesis, and led to the latest development of targeted anti-angiogenic strategies now used as first-line therapy for RCC (Escudier *et al.*, 2008; Escudier *et al.*, 2009; Motzer *et al.*, 2009).

The majority of CCC cases is characterized by inactivation of the von Hippel-Lindau (VHL) tumor suppressor gene leading to the loss of VHL proteins (pVHL) (Baldewijns *et al.*; Carroll and Ashcroft, 2006; Friedrich, 1999; Kaelin, 2007). It should be stressed that the best known oncogenic signal in human CCC so far is constituted by the VHL/HIF system. However, genetic and molecular studies clearly show that additional events are required for kidney tumorigenesis. In that context, the idea that tumors hijack signaling pathways and molecular factors/markers involved in normal development for their own growth has recently taken hold of investigators. Consequently, Sjölund *et al.* (Sjölund *et al.*, 2008) and Hueber *et al.* (Hueber *et al.*, 2008; Hueber *et al.*, 2006) have shown that the developmental Notch signaling cascade and Pax2, critical for nephrogenesis, are constitutively active in human CCC cell lines; and that it has growth-promoting effect. More recently, we have reached similar conclusions concerning the involvement of the developmental sonic hedgehog (SHH) signaling pathway in human CCC progression, and we showed further that the SHH signaling pathway plays orchestral roles in the activation of oncogenic pathways in this disease, including the PI3K/Akt, the NF- κ B and MAPK signaling pathways (Dormoy *et al.*, 2009). This is particularly important since all these pathways, critical during kidney development

(Reidy and Rosenblum, 2009), are constitutively reactivated in CCC tumors (Huang *et al.*, 2008; Schedl, 2007; Sourbier *et al.*, 2007; Sourbier *et al.*, 2006).

Another very important genetic marker of nephrogenesis is the transcription factor LIM-class homeobox gene *Lim1*. *Lim1* is specific to the vertebrate gastrula organizer and is required for proper cell movements during gastrulation (Venegas-Ferrin *et al.*, 2010). *Lim1* has particular biological functions in brain and kidney (Kobayashi *et al.*, 2005). Invalidation of the *Lim1* gene in mice led to kidney agenesis due to nephric duct formation failure (Shawlot and Behringer, 1995). *Lim1* is a downstream target of *Pax2*, and the tissue-specific deletion of the *Lim1* gene in the metanephric mesenchyme halts development at the renal vesicle stage (Kobayashi *et al.*, 2005; Reidy and Rosenblum, 2009).

To date and to our knowledge, no studies have been conducted to assess the role of *Lim1* in human CCC tumorigenesis. In our recent studies dealing with the involvement of the sonic hedgehog (SHH) pathway in human CCC progression (Dormoy *et al.*, 2009), we observed that *Lim1* expression was under the regulation of the SHH pathway through the activity of the *Glis* transcription factors and that importantly it appears to be exclusively expressed in tumors compared to normal corresponding tissues in a 9 tumor/normal tissues pairs sampling. These data, added to the importance of *Lim1* in fundamental steps of kidney development, including Notch pathways regulation, prompted us to study whether this transcription factor is part of the molecular mechanisms involved in human kidney progression; and consequently, whether targeting *Lim1* may have therapeutic potential against this therapy-refractory disease.

Results

Lim1 transcription factor is constitutively expressed in human CCC cells independently of VHL expression.

In contrast to normal human kidney, Lim1 expression was detected in a panel of human CCC cell lines expressing or not VHL either endogenously, or by gene transfer at both mRNA (Figure 1a) and protein (Figure 1b) levels, and there was no difference in expression depending on the VHL status.

Lim1 is exclusively reexpressed in human CCC tumors.

We have shown, very recently, by Western blot analysis on 9 normal/tumoral tissues pairs that Lim1 is almost exclusively reexpressed in tumors (Dormoy *et al.*, 2009). Here, we have considerably extended this analysis. Indeed, on 44 normal/tumoral CCC pairs at all stages (Supplementary Table 1), Lim1 expression was largely expressed in tumors, while normal corresponding tissues showed low or no signal at both mRNA (Figure 2a) and protein (Figure 2b; Supplementary Table 1) levels. The difference in Lim1 expression in tumors vs normal tissues was highly significant and there was no difference in Lim1 expression depending on the tumoral stage and grade (Figure 2b; Supplementary Table 1).

Lim1 silencing decreases human CCC cell proliferation independently of VHL expression.

Since there are no chemical inhibitors of Lim1, we silenced Lim1 expression in human CCC cells using specific Lim1-targeting siRNAs (siLhx1) targeting Lim1 exon-1 (siLhx1ex1), 2 (siLhx1ex2) or 3 (siLhx1ex3). The transient transfection of 786-0 cells with siLhx1ex1 (100nM) for 0 to 96h significantly decreased Lim1 expression up to 90-95% up to 96h post-transfection, as assessed by quantitative RT-PCR (Figure 3a) and Western blot (Figure 3b),

showing the high efficiency of Lim1 targeting. Similar results were obtained with siLhx1ex2 and siLhx1ex3 (data not shown).

In transient transfection assays, siLhx1ex1 decreased 786-0 cell growth in a time and concentration-dependent manner by up to 60% at all time points (Figure 3c). Similar effects were obtained on 786-0 cell growth with the maximal concentration of all three Lim1-targeting siRNAs at all time points (Figure 3d). Such effects were also observed in our panel of human CCC cell lines expressing or not the VHL gene (Supplementary Figure 1).

To confirm the effects of Lim1 silencing on cell growth, we transiently transfected human 786-0 cells with human Lim1 expression vector (pCMV6-XL5-LHX1) or vector alone (pCMV6-XL5). The overexpression of Lim1 was maximal 2 to 3 days post-transfection as assessed by western blot (data not shown). The transfection with vector alone did not affect tumor cell growth at any time (Supplementary Figure 2). Interestingly, the transfection with Lim1 vector significantly increased cell growth at 48h, 72h and 96h post-transfection by up to 20-25% and substantially decreased the inhibitory effect of Lim1 silencing on cell growth (Supplementary Figure 2).

The effect of Lim1 silencing on cell growth was due in a large part to the inhibition of cell proliferation as assessed by BrdU incorporation studies in our panel of human CCC cells, with a maximal inhibitory effect of 60-70%, again independently of VHL expression (Supplementary Figure 3).

Lim1 silencing increases human CCC cell apoptosis but not senescence.

Since the effect of Lim1 silencing on cell proliferation was not complete, we also checked whether the inhibitor was inducing apoptosis in human CCC cells. The transient transfection of 786-0 and Caki-1 cells with siLhx1ex1 was inducing cell apoptosis in a time-dependent manner reaching a maximal induction of cell apoptosis at 72h of 10,1% ($\pm 2,8$) in 786-0 cells

(Figure 4a) and 12,1% ($\pm 3,8$) in Caki-1 cells (Figure 4b). No effects of siLhx1 treatment were observed on tumor cell senescence (Supplementary Figure 4).

Thus, the effect of Lim1 silencing on cell growth is obtained mainly through the inhibition of cell proliferation and, to a lesser but significant degree, through induction of cell apoptosis in human CCC.

Lim1 plays a central role in the constitutive activation of oncogenic pathways in human CCC.

Here, we assessed whether Lim1 plays a role in the constitutive activation of oncogenic pathways in human CCC. For that, we used 786-0 cells transiently transfected with siLhx1ex1 alone or in combination with inhibitors of oncogenic pathways. All inhibitors decreased cell growth similarly to siLhx1ex1 including the SHH inhibitor cyclopamine at both post-transfection times (Figure 5a). The effect of siLhx1ex1 on cell growth was not additive with the effect of cyclopamine or U0126. Interestingly, the growth inhibitory effect of siLhx1ex1 was higher when combined with GSK-3, NF- κ B or MAPK inhibitors than alone, although non additive. These results suggest that Lim1 is linked to the activity of GSK-3 and to the oncogenic PI3K/Akt and NF- κ B pathways, but not to the MAPK pathways.

We next evaluated the effect of siLhx1ex1 on GSK-3 activation and on all of the above-mentioned signaling pathways by Western blot in 786-0 cells. The non-phosphorylated states of GSK-3, Akt, NF- κ B and Erk1/2 remained unchanged after Lim1 silencing (Figure 5b). As expected from cell growth data above, the phosphorylation state of Akt and NF- κ B, but not of Erk1/2, decreased as a consequence of Lim1 depletion. However, unexpectedly, GSK-3 phosphorylation was not affected by siLhx1ex1 (Figure 5b).

These results strongly suggest that Lim1 plays a critical role in oncogenic pathways activation in human CCC, and that at least part of the effect of the SHH signaling on these pathways is obtained through Lim1 activity.

Lim1 silencing decreases human CCC cell motility, migration and invasion. Since Lim1 is critically involved in cell movements during nephrogenesis, we investigated whether Lim1 affects human CCC cell motility, migration and invasion. Cell motility was assessed by wound healing assay on both 786-0 (VHL deficient) and Caki-1 (expressing VHL) cells. The transient transfection of siLhx1ex1 concentration- and time-dependently decreased 786-0 cell motility by up to 70% at 12 and 24h post-transfection (Figure 6a and b). Similar results were obtained in Caki-1 cells (data not shown).

Cell migration and invasion were analyzed using Matrigel migration and invasion assays in both 786-0 and Caki-1 cells, respectively. As for motility assay, Lim1 silencing decreased 786-0 cell migration (Figure 6c) and invasion (Figure 6d) concentration- and time-dependently by up to 50% at 24h post-transfection. Similar results were obtained in Caki-1 cells (data not shown).

We went deeper into these investigations by analyzing the expression of markers involved in cell adhesion and movement, including MMP9, tenascin-C, fibronectin, paxillin, actin and tubulin, that have all shown to be involved in CCC invasiveness. In 786-0 cells transiently transfected with siLhx1ex1, the expression of all of these proteins was substantially decreased in a dose- and time-dependent manner (Figure 6e).

Taken together, these results show that Lim1 is part of the machinery orchestrated by human CCC tumor cells to migrate and thus potentially to invade extrarenal sites.

Lim1 depletion blocks tumor progression in human CCC tumors-bearing nude mice.

We next analyzed the effect of Lim1 silencing using siLhx1ex1 and siLhx1ex2 *in vivo* in the tumor xenografted nude mice model.

The expression of Lim1 was substantially decreased in tumors harvested from siLhx1ex1- or siLhx1ex2-treated mice by around 80% compared to tumors from control-treated mice, showing adequate targeting of the drug (Figure 7a). Tumor growth was almost completely abolished in the group treated with either Lim1-targeting siRNA compared to the control groups receiving the diluent alone or receiving control siRNA, which grown to approximately 600-700% of the initial volume (Figure 7a and b). In mice treated with either Lim1-targeting siRNA, the proliferative (Figure 7c; Supplementary Figure 5a) and apoptotic (Figure 7d; Supplementary Figure 5b) indexes were respectively significantly decreased by about 15% and significantly increased by 200%. Tumor neovascularisation as well as tumor senescence were not affected by the treatments (Figure 7e and f; Supplementary Figure 5c). In tumors grown in nude mice and treated with either siLhx1ex1 or siLhx1ex2, the activation of the oncogenic pathways PI3K/Akt and NF- κ B was substantially decreased but not the activation of GSK-3 and of MAPK (Supplementary Figure 5d), as observed in cultured cells. Similarly, the expression of the cell movement markers was also impaired in Lim1 depleted tumors (Supplementary Figure 5e).

These results show that Lim1 plays a critical role in human CCC tumors growth, and that it is mainly turned towards cell proliferation, inhibition of cell death, activation of oncogenic pathways and stimulation of cell movements' markers in the *in vivo* environment.

Discussion

Lim1 has essential functions during several stages of kidney development from the early mesenchyme-to-epithelium transition to nephron patterning. We have recently shown that the developmental SHH-Gli signaling is reactivated in human CCC and that Lim1 is a SHH-Gli signaling target (Dormoy *et al.*, 2009). Here, we show that Lim1 is expressed in our panel of human CCC cells and that Lim1 is exclusively reexpressed in human tumors compared to normal corresponding tissues, thus extending substantially the results of our previous studies on Lim1 expression in CCC tumors (Dormoy *et al.*, 2009). There was no difference in Lim1 expression depending on the tumoral stage and grade suggesting that Lim1 expression levels are maintained throughout CCC growth. It is noteworthy; however, that Lim1 was characteristic of human CCC, and such finding may pave the way to identify diagnostic tools for this disease, in which no molecular diagnostic markers have yet been validated (Arsanious *et al.*, 2009; Nogueira and Kim, 2008).

Our group and other investigators have reported the critical role played by the oncogenic PI3K/Akt, NF- κ B and MAPK signaling pathways as well as by the developmental Notch and SHH-Gli signaling in human CCC tumorigenesis (Dormoy *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2008; Sjolund *et al.*, 2008; Sourbier *et al.*, 2007; Sourbier *et al.*, 2006). In all cases, these pathways were shown to be constitutively activated and turned towards tumor growth regardless of VHL status. In accordance with these observations, we observed herein that Lim1 expression is not dependent on VHL status suggesting that Lim1 expression is not associated with the VHL/HIF system in human CCC; although some studies have reported crosstalk between SHH-Gli pathway, that is at least partly responsible for Lim1 expression in this disease, and HIF pathways in other systems (Bar *et al.*, 2007). To our best knowledge, the Lhx1 gene has not been shown to be mutated in cancer. Lim1 is a downstream effector of SHH-Gli signaling functions (Dormoy *et al.*, 2009) and its expression is for example regulated by Pax2, FGFs

and Wnts factors, that have been shown to be involved in human CCC tumorigenesis (Hueber *et al.*, 2008; Kawakami *et al.*, 2009; Strutz *et al.*, 2002). Since the list of developmental markers shown to be involved in human CCC growth is increasing progressively, it would be interesting to go further into this mechanism to help to dissect the molecular puzzle accounting for kidney tumorigenesis.

The role of Lim1 has never been assessed in human CCC, and in fact in any cancer type. Here we show that Lim1 is constitutively expressed and activated in human CCC both *in vitro* in cultured cells and *in vivo* in freshly harvested tumors, and in tumors grown in nude mice. Our results showed that Lim1 is turned towards tumor cell growth in human CCC. The inhibition of Lim1 was equally active in decreasing growth whether cells are expressing or not VHL. In human CCC, we show both in cultured cells and in tumor-bearing nude mice that Lim1 stimulates essentially cell proliferation and in a lesser degree inhibits cell death; and Lim1 silencing did not induce senescence.

Very importantly, we observed that Lim1 silencing blocks tumor progression, an effect that was related to the decrease in Lim1 expression. An interesting observation is that Lim1 silencing in tumors of human CCC-bearing nude mice did not affect tumor vascularisation. It should be noted, however, that reports dealing with the prognostic value of vascularisation in human CCC have shown either no effect on patient survival, better survival, or worse prognosis (Imao *et al.*, 2004; MacLennan and Bostwick, 1995; Nativ *et al.*, 1998; Yao *et al.*, 2007).

The spread of cancer cells from the primary tumor to a distant site involves many of the invasive processes, normally required for wound healing, including migration through the local connective tissue, invasion of the vasculature and the connective tissue at a distant site, or angiogenesis. We have tested some of the markers responsible for the acquisition of

metastatic properties including fibronectin (Meng *et al.*, 2009), the matrix metalloproteinase MMP9 (Ryschich *et al.*, 2009), the focal adhesion plaque associated cytoskeleton protein paxillin (Tang *et al.*, 2008), tenascin-C (Chen *et al.*, 2009) as well as tubulin and actin (Hall, 2009). The expression of all of these markers was substantially decreased by Lim1 silencing both *in vitro* in cultured cells and *in vivo* in human CCC-bearing nude mice. Our results strongly suggest that Lim1 is part of the molecular network involved in tumor spread and invasion in human CCC. In accordance with that hypothesis, tenascin-C expression was shown to be a significant predictor of metastasis in human CCC (Ohno *et al.*, 2008). It will be thus interesting in the near future to define more precisely the role of Lim1 in tumor invasion, and this should lead to a better comprehension of the molecular mechanism involved in metastatic spread of human CCC.

The PI3K/Akt, NF- κ B, MAPK, Notch and SHH signaling pathways are activated constitutively in human CCC (Dormoy *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2008; Sjolund *et al.*, 2008; Sourbier *et al.*, 2007; Sourbier *et al.*, 2006) strongly suggesting that tumor cells reactivate developmental pathways for their growth, invasion and immune escape. Here we show that Lim1 regulates the activation of the oncogenic pathways PI3K/Akt and NF- κ B. Knowing the exclusive expression of Lim1 in tumors vs. normal tissues, these results strongly suggest that Lim1 is a factor involved in the activation of such pathways, stimulating tumor cell growth and inhibiting cell death.

Our results indicate that Lim1 acts as an oncogene concerning RCC and its blockade may represent a new, efficient and safe therapeutic option for this refractory disease either alone or in combination. The identification of Lim1 as a new prognostic factor may also emerge from these results.

Materials and methods

Cell culture and reagents

Human CCC cell lines either deficient in VHL (786-0, A498) or expressing VHL (ACHN, Caki-1, Caki-2) were obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA). The cells were maintained in DMEM (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% antibiotics (penicillin/streptomycin, Gibco) in a 10% CO₂ atmosphere. Clones of 786-0 cells transfected either with human VHL gene (786-0-VHL), inactive truncated human VHL gene (786-0-ΔVHL), or the vector alone only pCR3-Uni (786-0-V) were also used and maintained in the same medium supplemented with gentamycin (500µg/ml, Invitrogen).

Human tumor biopsies

The tumor and normal corresponding tissue of 44 patients were obtained in collaboration with the Department of Urology (Pr. D. Jaqmin and Pr. H. Lang) of the “Nouvel Hôpital Civil” (NHC), Strasbourg, France. Informed consent was obtained from all patients. The tumors were staged according to the tumor node metastasis (TNM) classification (Sagalowsky, 2002): 9 pT1a, 7 pT1b, 7pT2, 3 pT3a, 15 pT3b, 3 pT4. Immediately after surgical resection, tissues were fresh frozen and kept in liquid nitrogen until RNA and protein expression analysis.

Western Blot Analysis

Protein extractions and membrane preparations were performed as described (Massfelder *et al.*, 2004). Membranes were incubated overnight at 4°C with the appropriate dilution of the following primary antibodies: anti-Akt (1:250; Millipore, Molsheim, France), anti-phospho-Akt (1:150; Ozyme, Cell Signaling local distributor, Saint-Quentin-en-Yvelines, France), anti-NF-κB (1:2000; Millipore), anti-phospho-NF-κB (1:250; Ozyme), anti-GSK3α/β (1:1000; Millipore), anti-phospho-GSK3α/β (Ser21/9 ; 1:500; Millipore) anti-Erk1/2 (1:1000; Ozyme),

anti-phospho-Erk1/2 (1:1000; Millipore), anti-glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase (GAPDH) (1:500; Millipore), anti- α -tubulin (1:500; Abcam, Paris, France), anti- β -actin (1:500; Millipore), anti-paxillin (1:500; Invitrogen), anti-fibronectin (1:500; Ozyme), anti-tenascin-C (1:500; Ozyme), anti-MMP-9 (1:500; Millipore), and anti-Lim1 (1:500, Millipore). For visualization of protein gel loading, an anti- β -actin (1:5000; Sigma-aldrich, St Quentin Fallavier, France) or anti-GAPDH (1:500, Millipore) antibody was used. The appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody was used. Immunoreactivity was visualized with the enhanced chemiluminescence immunoblotting detection kit (Millipore).

Real-time quantitative RT-PCR analysis

Total RNAs were extracted from CCC cells using the Trizol method according to the manufacturer's protocol (Invitrogen). Five μ g of total RNA were reverse transcribed in a reaction buffer (Invitrogen) and non-specific primer p(dT)₁₅ (Roche Diagnostics, Meylan, France), at 37°C for 1h. cDNAs specific for Lhx1 mRNA were amplified using the "LightCycler-FastStart DNA Master SYBR (syber) Green" kit (Roche Diagnostics). Sense and antisens primers used are the following: GAPDH (forward primer: GCAGTGATGGCATGGACTG; reverse primer: GGAAGGTGAAGGTCGGAGTC), Lhx1 (forward primer: CTTCTTCCGGTGTTCGGTA; reverse primer: TCATGCAGGTGAAGCAGTTC), pCMV6-XL5 (forward primer: GTGAAACCCCGTCTCTACCA; reverse primer: CTATTGGGAACCAAGCTGGA). Each sample was analyzed 3 times and quantified with the analysis software for LightCycler (Roche Diagnostics).

RNA interference

Tumor cells were seeded in 24-well plates (20,000 cells/ml), grown for 24 h and were then transiently transfected for 24 to 96h with Lhx1-targeting siRNA (siLhx1, Applied Biosystems,

Ambion local distributor, Courtaboeuf, France), or control siRNA (siCtl, Applied Biosystems), according to the manufacturer's instructions (Applied Biosystems).

cDNA overexpression

Human 786-O cells were seeded in 24-well plates (20,000 cells/ml), grown for 24 h and were then transiently transfected for 24h to 96h with cDNA overexpression plasmids (pCMV6-XL vector, and pCMV6-XL-Lhx1, Clinisciences, Origene local distributor, Montrouge, France) according to the manufacturer's instructions (Clinisciences).

Cell density

CCC cell proliferation was assessed by counting adherent cells, as described (Massfelder *et al.*, 2004). RCC cells were seeded in 24-well plates (20,000 cells/ml), grown for 24 h, and then transiently transfected for 24h to 96h with various concentrations of Lhx1 targeting siRNAs or Lhx1 expressing vector. Cell density were assessed either alone or in combination with cyclopamine (LC Laboratories, Woburn, USA), SB216763 (GSK3 inhibitor, Sigma-Aldrich), LY294002 (PI3K inhibitor, Sigma-Aldrich), BAY 11-7085 (NF- κ B inhibitor, Calbiochem, Fontenay-sous-Bois, France), or U0126 (MAPK inhibitor, Calbiochem).

Bromodeoxyuridine (BrdU) incorporation

CCC cells were seeded in 96-well plate (20,000 cells/ml) and grown for 24h. Cells were transiently transfected for 24h to 96h with siLhx1, siCtl or vehicle (Ctl). Tests were then realized according to the protocol of the manufacturer (Calbiochem[®], Merck KGaA, Darmstadt, Germany).

Fluorescence-Activated Cell Sorting Analysis

CCC cells were seeded in 6-well plates (20,000 cells/ml) and grown for 24h. Then cells were transiently transfected for 24h to 96h with siLhx1, or the corresponding volume of vehicle (Ctl). Floating and adherent cells were harvested and resuspended in incubation buffer (100

$\mu\text{L}/500,000$ cells: 140 mmol/L NaCl, 5 mmol/L CaCl_2 , and 10 mmol/L HEPES buffer) containing Annexin V-FITC and propidium iodide (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and incubated in a dark chamber at 4°C for 10 minutes. After centrifugation, the supernatant was withdrawn and cells fixed in a dark chamber in 200 μL of formol 1% at 4°C for 10 min. After centrifugation, cells were resuspended in 200 μL incubation buffer and subjected to fluorescence-activated cell sorter (FACS). Fluorescence analysis was performed using FACSort flow cytometer (BD) and the fraction of viable cells, and apoptosis cells was determined using FCS express software (DeNovo Software, Los Angeles, CA).

Scratch (Wound) Assay

786-O and Caki-1 cells were grown in 24-well plates to confluence and formed a monolayer covering the surface of the entire plate. Cells were transiently transfected with siLhx1 or siCtl. After 24 h of treatment, the wound was created in the center of the cell monolayer by the gentle removal of the attached cells with a sterile plastic scratcher. Debris was removed by PBS wash, and the cells received fresh media with the same conditions as before. The ability of the cells to migrate into the wound area was assessed after 24 h by comparing the 0- 12- and 24-h micrographs of several marked points along the wounded area at each plate. The percentage of recovered wound area was calculated by dividing the recovered area after 12h or 24h by the initial wound area at zero time.

Migration and invasion assays

The invasiveness of renal cancer cells was assessed based on the invasion of cells through Matrigel-coated transwell inserts. In brief, the upper surface of a filter (pore size, 8.0 μm ; Millipore) was coated with basement membrane Matrigel (ECL Matrix, Millipore). Cells transiently transfected with siLhx1 or not were suspended in DMEM with 10% fetal bovine serum containing the desired dose of reagents. Then 100,000 cells were added to the upper chamber and incubated for 24h to 96h. After incubation, cells that had migrated from the

upper to the lower side of the filter were counted. Tumor cell invasiveness was defined as the total number of invaded cells. Each experiment was carried out in triplicate wells. The migration ability of renal cancer cells was assessed in the same way as described above, but non-Matrigel-coated transwell inserts were used.

Xenograft Tumor Model

All animal studies were in compliance with the French animal use regulations. Ten million 786-0 cells were injected s.c. into the skin of 4 week-old athymic male mice (SWISS nu-/nu-; Charles River Laboratories, l'Arbresle, France). Tumor volumes were measured as previously described (Massfelder *et al.*, 2004). We begun drug injections in the two groups when 786-0 tumors had grown to an overall volume of 100 mm³. The protocol was injection of siLhx1 ("siRNA in vivo ready" Lhx1 s8165 (exon 2) or s8166 (exon1) targeting the Lhx1 RNA) intratumoral (iTU) at 1 nmol/mouse 3 times a week, the control groups receiving the siCtl negative or the vehicle alone (PBS) at the same time period. The treatment was followed for 4 weeks and tumors growth was measured 3 times a week. At the end of the treatment, animals were sacrificed and the tumors were harvested, paraffin embedded, and cut in 4- μ m-thick sections for subsequent immunohistochemical analysis as described before, for the proliferative index, the apoptotic index and the neovascularisation (Soubrier *et al.*, 2007), and snap-frozen for PCR or Western blot analysis.

Statistical analysis

All values are expressed as mean \pm s.e.m. Values were compared using multifactorial analysis of variance followed by the Student-Newman-Keul's test for multiple comparisons. A $P < 0.05$ was considered significant.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments

This study was sponsored by INSERM (Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale), University of Strasbourg and the French Ligue Contre le Cancer (Comités du Bas-Rhin et du Haut-Rhin et Comité National, recipient TM). We thank Dr A. Donai for helpful suggestions, Dr. J. Barths for allowing us to perform FACS analysis and R.A. Hanna for text correction.

References

- Arsanious A, Bjarnason GA, Yousef GM (2009). From bench to bedside: current and future applications of molecular profiling in renal cell carcinoma. *Mol Cancer* **8**: 20.
- Baldewijns MM, van Vlodrop IJ, Vermeulen PB, Soetekouw PM, van Engeland M, de Bruine AP VHL and HIF signalling in renal cell carcinogenesis. *J Pathol*.
- Bar EE, Chaudhry A, Lin A, Fan X, Schreck K, Matsui W *et al* (2007). Cyclopamine-mediated hedgehog pathway inhibition depletes stem-like cancer cells in glioblastoma. *Stem Cells* **25**: 2524-33.
- Carroll VA, Ashcroft M (2006). Role of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha versus HIF-2alpha in the regulation of HIF target genes in response to hypoxia, insulin-like growth factor-I, or loss of von Hippel-Lindau function: implications for targeting the HIF pathway. *Cancer Res* **66**: 6264-70.
- Chen J, Chen Z, Chen M, Li D, Li Z, Xiong Y *et al* (2009). Role of fibrillar Tenascin-C in metastatic pancreatic cancer. *Int J Oncol* **34**: 1029-36.
- Clark PE (2007). Recent advances in targeted therapy for renal cell carcinoma. *Curr Opin Urol* **17**: 331-6.
- Dormoy V, Danilin S, Lindner V, Thomas L, Rothhut S, Coquard C *et al* (2009). The sonic hedgehog signaling pathway is reactivated in human renal cell carcinoma and plays orchestral role in tumor growth. *Mol Cancer* **8**: 123.
- Escudier B, Cosaert J, Jethwa S (2008). Targeted therapies in the management of renal cell carcinoma: role of bevacizumab. *Biologics* **2**: 517-30.

Escudier B, Eisen T, Stadler WM, Szczylik C, Oudard S, Staehler M *et al* (2009). Sorafenib for treatment of renal cell carcinoma: Final efficacy and safety results of the phase III treatment approaches in renal cancer global evaluation trial. *J Clin Oncol* **27**: 3312-8.

Friedrich CA (1999). Von Hippel-Lindau syndrome. A pleomorphic condition. *Cancer* **86**: 2478-82.

Hall A (2009). The cytoskeleton and cancer. *Cancer Metastasis Rev* **28**: 5-14.

Huang D, Ding Y, Luo WM, Bender S, Qian CN, Kort E *et al* (2008). Inhibition of MAPK kinase signaling pathways suppressed renal cell carcinoma growth and angiogenesis in vivo. *Cancer Res* **68**: 81-8.

Hueber PA, Iglesias D, Chu LL, Eccles M, Goodyer P (2008). In vivo validation of PAX2 as a target for renal cancer therapy. *Cancer Lett* **265**: 148-55.

Hueber PA, Waters P, Clark P, Eccles M, Goodyer P (2006). PAX2 inactivation enhances cisplatin-induced apoptosis in renal carcinoma cells. *Kidney Int* **69**: 1139-45.

Imao T, Egawa M, Takashima H, Koshida K, Namiki M (2004). Inverse correlation of microvessel density with metastasis and prognosis in renal cell carcinoma. *Int J Urol* **11**: 948-53.

Kaelin WG, Jr. (2007). The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein and clear cell renal carcinoma. *Clin Cancer Res* **13**: 680s-684s.

Kawakami K, Hirata H, Yamamura S, Kikuno N, Saini S, Majid S *et al* (2009). Functional significance of Wnt inhibitory factor-1 gene in kidney cancer. *Cancer Res* **69**: 8603-10.

Kobayashi A, Kwan KM, Carroll TJ, McMahon AP, Mendelsohn CL, Behringer RR (2005). Distinct and sequential tissue-specific activities of the LIM-class homeobox gene *Lim1* for tubular morphogenesis during kidney development. *Development* **132**: 2809-23.

MacLennan GT, Bostwick DG (1995). Microvessel density in renal cell carcinoma: lack of prognostic significance. *Urology* **46**: 27-30.

Massfelder T, Lang H, Schordan E, Lindner V, Rothhut S, Welsch S *et al* (2004). Parathyroid hormone-related protein is an essential growth factor for human clear cell renal carcinoma and a target for the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene. *Cancer Res* **64**: 180-8.

Meng XN, Jin Y, Yu Y, Bai J, Liu GY, Zhu J *et al* (2009). Characterisation of fibronectin-mediated FAK signalling pathways in lung cancer cell migration and invasion. *Br J Cancer* **101**: 327-34.

Motzer RJ, Hutson TE, Tomczak P, Michaelson MD, Bukowski RM, Oudard S *et al* (2009). Overall survival and updated results for sunitinib compared with interferon alfa in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* **27**: 3584-90.

Nativ O, Sabo E, Reiss A, Wald M, Madjar S, Moskovitz B (1998). Clinical significance of tumor angiogenesis in patients with localized renal cell carcinoma. *Urology* **51**: 693-6.

Nogueira M, Kim HL (2008). Molecular markers for predicting prognosis of renal cell carcinoma. *Urol Oncol* **26**: 113-24.

Ohno Y, Izumi M, Yoshioka K, Ohori M, Yonou H, Tachibana M (2008). Prognostic significance of tenascin-C expression in clear cell renal cell carcinoma. *Oncol Rep* **20**: 511-6.

Reidy KJ, Rosenblum ND (2009). Cell and molecular biology of kidney development. *Semin Nephrol* **29**: 321-37.

Ryschich E, Khamidjanov A, Kerkadze V, Buchler MW, Zoller M, Schmidt J (2009). Promotion of tumor cell migration by extracellular matrix proteins in human pancreatic cancer. *Pancreas* **38**: 804-10.

Sagalowsky AI (2002). The 1997 TNM classification of renal cell carcinoma revisited: the pendulum swings back. *Curr Opin Urol* **12**: 371-3.

Schedl A (2007). Renal abnormalities and their developmental origin. *Nat Rev Genet* **8**: 791-802.

Shawlot W, Behringer RR (1995). Requirement for Lim1 in head-organizer function. *Nature* **374**: 425-30.

Sjolund J, Johansson M, Manna S, Norin C, Pietras A, Beckman S *et al* (2008). Suppression of renal cell carcinoma growth by inhibition of Notch signaling in vitro and in vivo. *J Clin Invest* **118**: 217-28.

Soubrier C, Danilin S, Lindner V, Steger J, Rothhut S, Meyer N *et al* (2007). Targeting the nuclear factor-kappaB rescue pathway has promising future in human renal cell carcinoma therapy. *Cancer Res* **67**: 11668-76.

Soubrier C, Lindner V, Lang H, Agouni A, Schordan E, Danilin S *et al* (2006). The phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway: a new target in human renal cell carcinoma therapy. *Cancer Res* **66**: 5130-42.

Strutz F, Zeisberg M, Ziyadeh FN, Yang CQ, Kalluri R, Muller GA *et al* (2002). Role of basic fibroblast growth factor-2 in epithelial-mesenchymal transformation. *Kidney Int* **61**: 1714-28.

Tang J, Wu YM, Zhao P, Yang XM, Jiang JL, Chen ZN (2008). Overexpression of HAb18G/CD147 promotes invasion and metastasis via alpha3beta1 integrin mediated FAK-paxillin and FAK-PI3K-Ca²⁺ pathways. *Cell Mol Life Sci* **65**: 2933-42.

Venegas-Ferrin M, Sudou N, Taira M, del Pino EM Comparison of Lim1 expression in embryos of frogs with different modes of reproduction. *Int J Dev Biol* **54**: 195-202.

Yao Y, Pan Y, Chen J, Sun X, Qiu Y, Ding Y (2007). Endoglin (CD105) expression in angiogenesis of primary hepatocellular carcinomas: analysis using tissue microarrays and comparisons with CD34 and VEGF. *Ann Clin Lab Sci* **37**: 39-48.

Supplementary Information accompanies the paper on the Oncogene website (<http://www.nature.com/onc>)

Figures

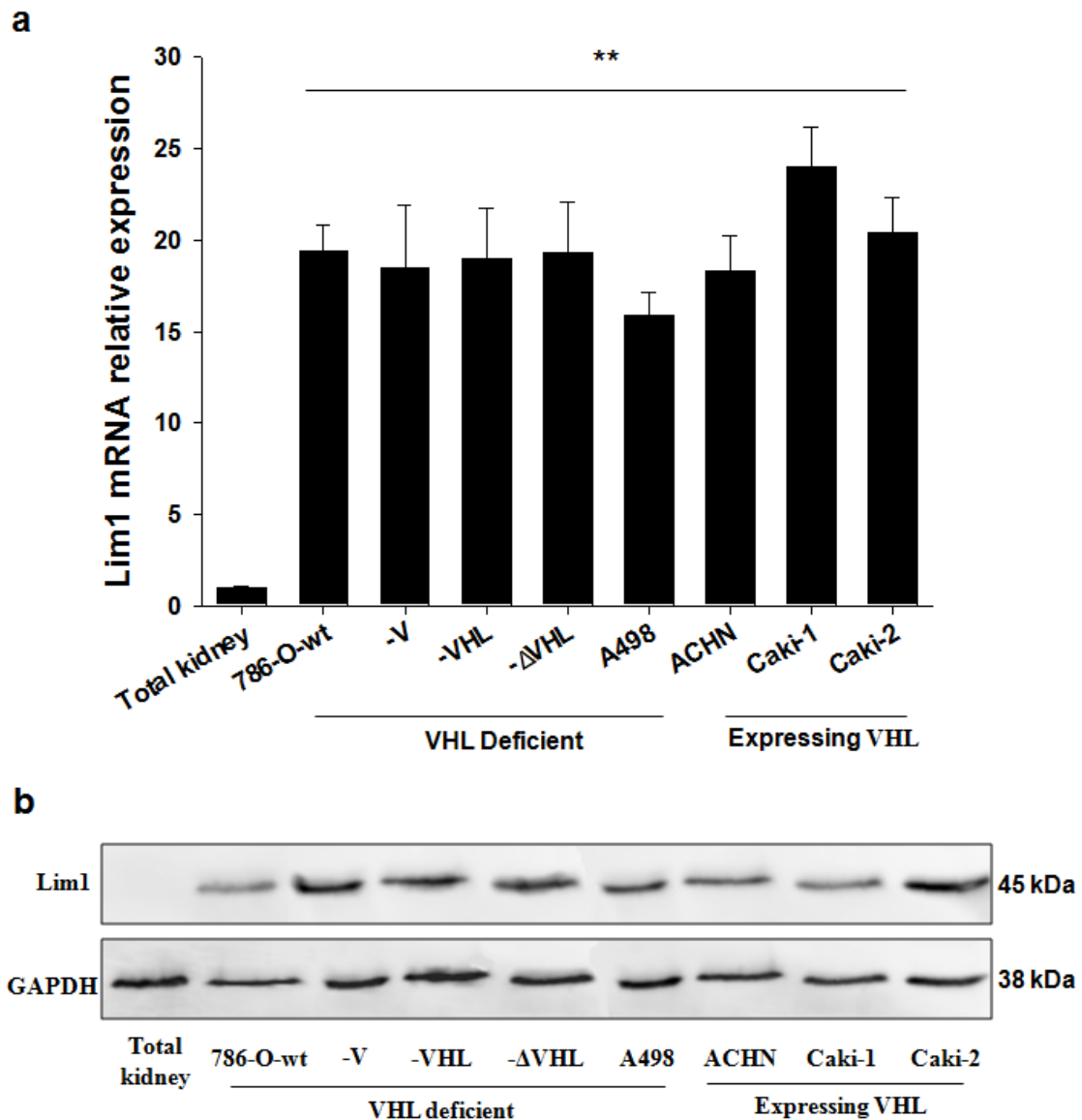


Figure 1

Lim1 transcription factor is constitutively expressed in human CCC cells independently of VHL expression. **(a)** Lim1 mRNA relative expression was measured by real-time quantitative RT-PCR on total RNA from 786-0 cells either untransfected (786-0-wt) or transfected with the vector alone (786-0-V), the full-length human VHL cDNA (786-0-VHL) or truncated inactive VHL cDNA sequence (786-0-ΔVHL), as well as in a panel of human CCC cell lines either deficient in VHL (VHL deficient) or expressing VHL (Expressing VHL). Results are shown as mean ± SEM, n = 4; **, $P < 0.01$ from Total kidney (pooled normal tissues). **(b)** Lim1 expression was evaluated by western blot on cell extracts from human CCC cells and clones as in **(a)**.

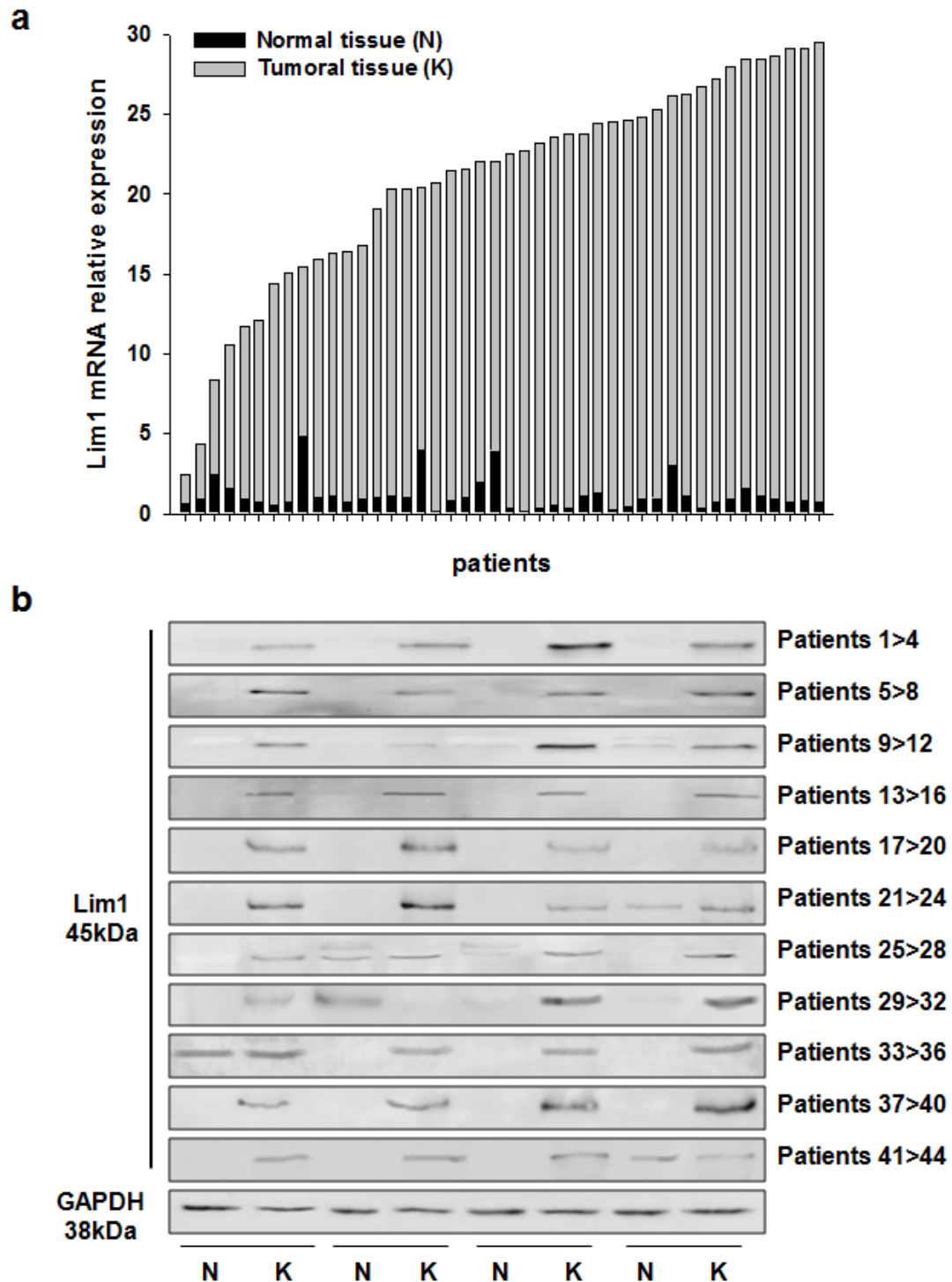


Figure 2

Lim1 transcription factor is constitutively expressed in human CCC tumors. **(a)** Lim1 expression analyzed by real-time quantitative RT-PCR on total RNA from 44 normal/tumor tissues pairs. Each pair corresponds to the normal tissue (N) and the tumoral tissue (K) of one patient. Data are ranged beginning by the normal/tumor tissues pair showing the lowest expression level of Lim1 mRNA in tumor tissue and finishing by the normal/tumor tissues pair showing the highest level in tumor tissue. **(b)** Lim1 expression was evaluated by western blot on total proteins from the 44 normal/tumor tissues pairs. N: normal tissue; K: tumor tissue for each tissues pair (i.e for each patient).

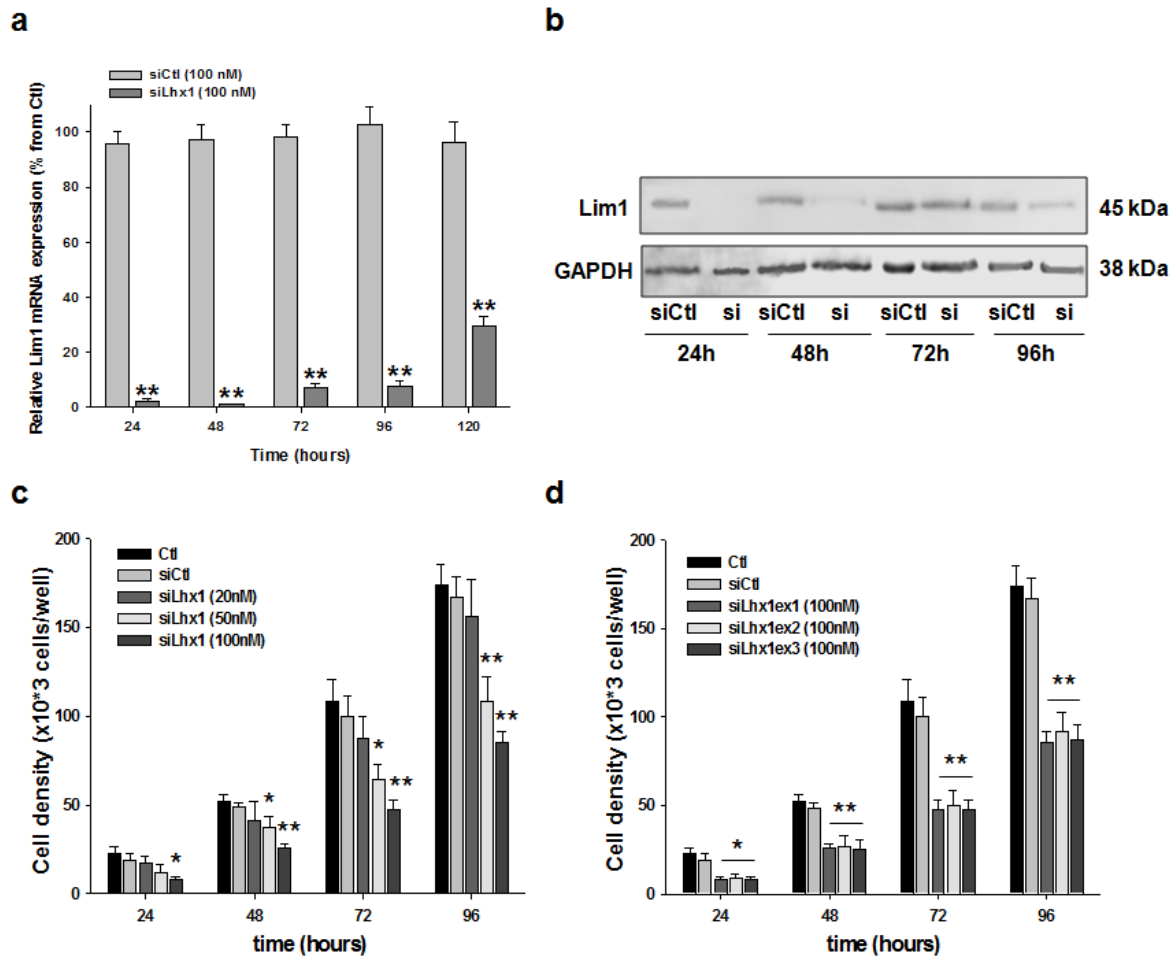


Figure 3

Lim1 silencing decreases human CCC cell proliferation. Human 786-0 cells were transiently transfected for 24h to 120h with siLhx1 (targeting the first exon if no additional information), or with siCtl both at 100 nM. Efficiency of Lim1 silencing was analyzed by real-time quantitative RT-PCR on total RNA from human CCC cells (**a**) and by western blot on total human CCC cells extracts (**b**). Results are shown as mean \pm SEM, $n = 4$; **, $P < 0.01$ from siCtl. (**c**, **d**) Effect of siLhx1 transfection on 786-0 cell density. Concentration-effect of siLhx1 silencing on cell density (**c**) and effect of the 3 different sets of siRNA targeting Lhx1 at 100 nM on cell density (**d**). Results are shown as mean \pm SEM, $n = 6$; *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$ from Ctl.

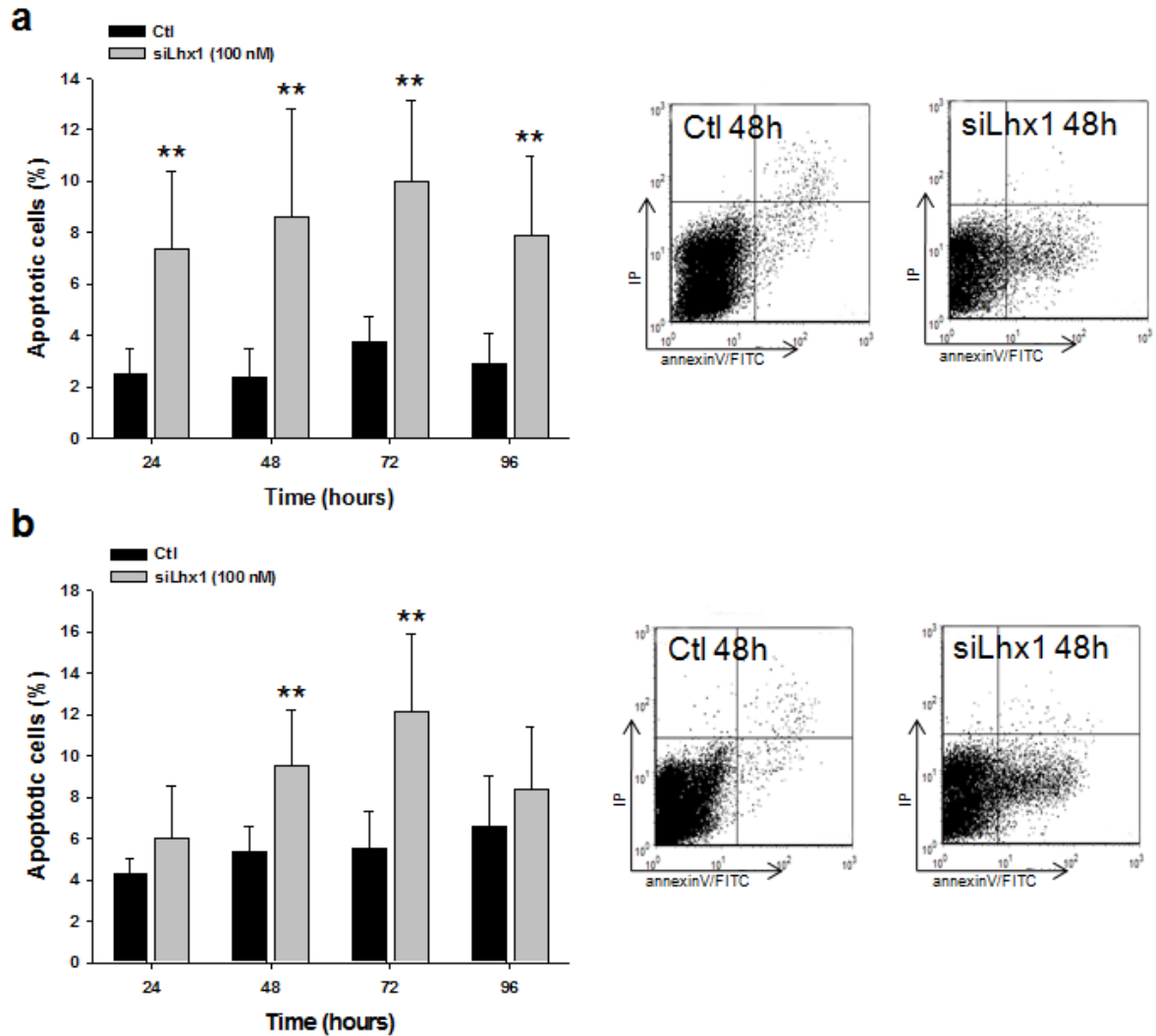


Figure 4

Lim1 silencing increases human CCC cell apoptosis. **(a)** Quantitative analysis of apoptotic cells in siLhx1lex1 (siLhx1)-transfected cells as a function of the time post-transfection in 786-0 cells (left) and representative analysis of FACS analysis (right). **(b)** Same analysis in Caki-1 cells (left) and representative analysis of FACS analysis (right). **(a, b)** Results are shown as mean \pm SEM, $n = 6$; **, $P < 0.01$ from Ctl.

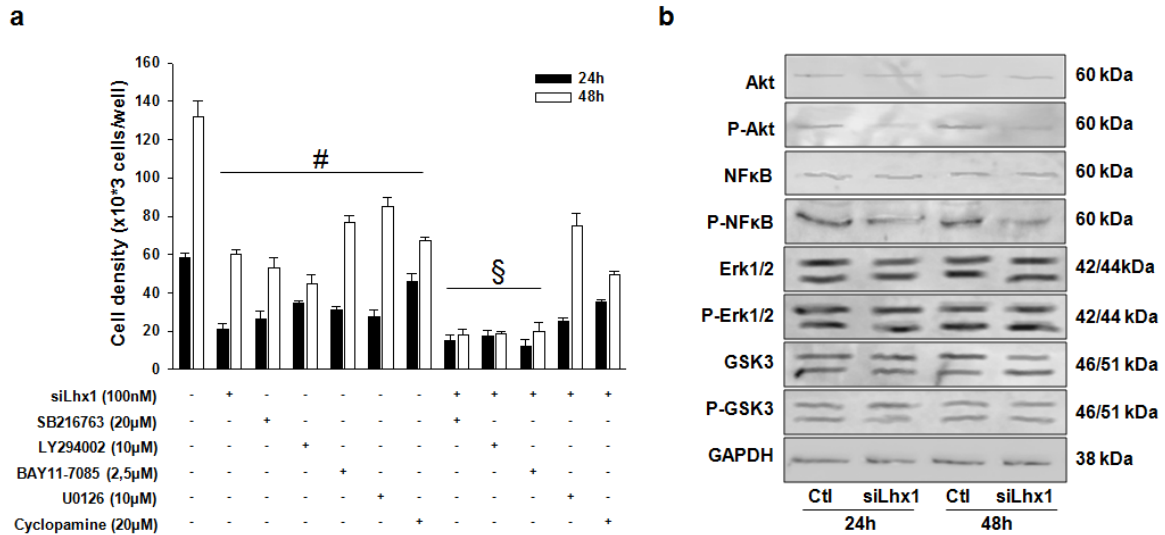


Figure 5

Lim1 plays a central role in the constitutive activation of oncogenic pathways in human CCC. **(a)** Human 786-0 cells were seeded and either transiently transfected with siLhx1ex1 (siLhx1, 100 nM), or treated with the inhibitors depicted or transfected in combination with those inhibitors for the indicated period of times. Results are shown as mean \pm SEM, $n = 6$; #, $P < 0.01$ from non-treated cells, §, $P < 0.01$ from cells either transiently transfected alone or cells treated with inhibitors alone. **(b)** The effects of Lim1 silencing on the activation of oncogenic signaling pathways were analyzed by western blot 24 to 48h post-transfection.

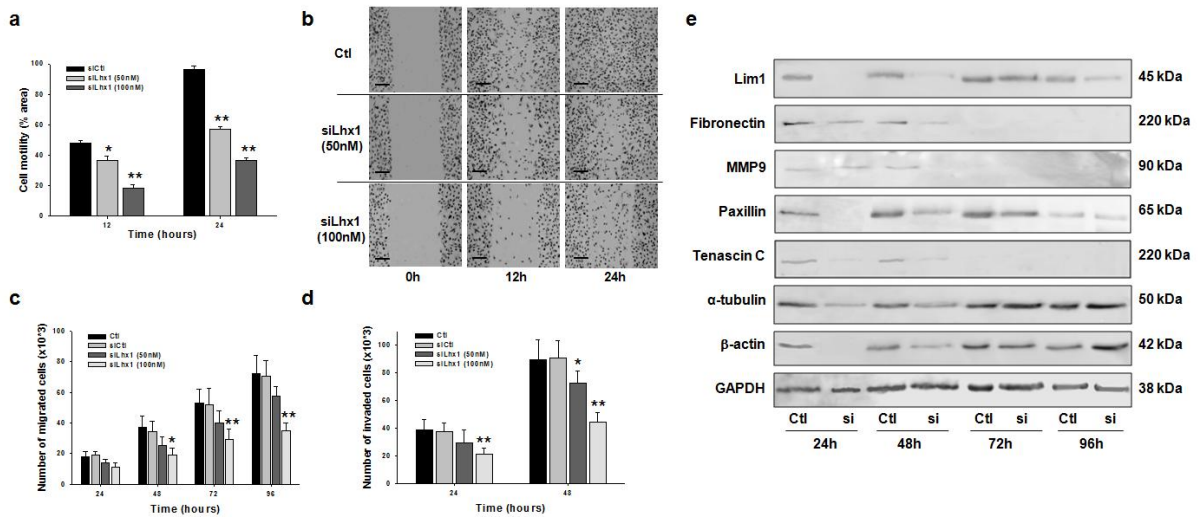


Figure 6

Lim1 silencing decreases human CCC cell motility, migration and invasion. 786-0 cells were transiently transfected with siLhx1ex1 (siLhx1) at 50 nM or 100 nM or in control (siCtl, 100nM). **(a)** Cell motility was then quantitatively analyzed and expressed in percentage of the cell surface in the wound area as a function of the time after the scratch, i.e 12 and 24h. Results are shown as mean \pm SEM, $n = 4$; *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$ from siCtl **(b)** Representative pictures of the wound area at 0, 12 and 24h after the scratch. Scale bars: 40 μ m. **(c)** Cell invasion was then analyzed using Matrigel-coated transwell inserts as detailed in Materials and methods. **(d)** Cell migration was then assessed using transwell inserts. **(c, d)** Results are shown as mean \pm SEM, $n = 4$; *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$ from Ctl. **(e)** The effects of Lim1 silencing on cell movements markers were then analyzed by western blot on 786-0 cell extracts by western blot after transfection for 24 to 96h.

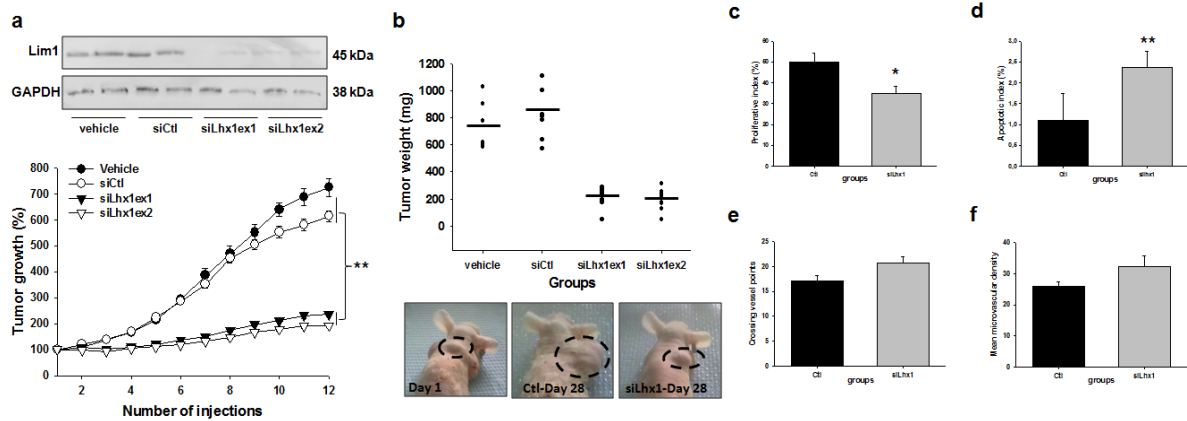


Figure 7

Lim1 depletion blocks tumor progression in human CCC tumors-bearing nude mice. The volume of 786-0 grafted tumors was measured during treatment with either siLhx1ex1, siLhx1ex2, siCtl or the vehicle only. **(a)** The expression of Lim1 was analyzed in pooled tumor extracts from all groups and shown is representative immunoblots of three independent experiments (top gels). Tumor growth in percent from J0 for all groups (bottom). Results are shown as mean \pm SEM, $n = 8$ for all groups; **, $P < 0.01$ siLhx1-treated mice vs Ctl-treated mice. **(b)** Tumors of each group were harvested and weighted at the end of the experimental period (top). Bars show the mean values of the mean weight for all groups of tumors. Photographs show the implanted tumors in representative mice at day 1 of drug injection, at day 28 in Ctl group or siLhx1ex1-treated group (below). **(c)** Quantitative analysis of the proliferative index on tumor sections immunostained with an antibody against Ki67. **(d)** Quantitative analysis of the apoptotic index on tumor sections by the TUNEL method. **(e, f)** Quantitative analysis of the vascularisation on tumors sections immunostained with an antibody against factor VIII. **(c-f)** Results of siLhx1ex1 and siLhxex2 were similar and were pooled in the data shown. Results are shown as mean \pm SEM, $n = 8$; *, $P < 0.05$ **, $P < 0.01$ from Ctl-treated mice.

2.2 Résumé

Le facteur de transcription Lim1 est crucial pour l'organogenèse, notamment la néphrogenèse, par la régulation qu'il exerce sur les mouvements cellulaires, la différenciation et la croissance cellulaires. Son expression peut être sous le contrôle de la voie HH dont nous avons montré l'implication dans le CCR lors de nos derniers travaux. Jusqu'à présent, aucune étude n'a évalué l'association de Lim1 avec la tumorigénèse ; seuls des marquages en immunocytochimie ont permis de mettre en évidence sa présence dans certaines situations pathologiques.

En utilisant le panel de lignées cellulaires à notre disposition ainsi que de nombreuses paires de tissus tumoraux et tissus sains correspondant obtenues en collaboration avec le service de chirurgie urologique du Nouvel Hôpital Civil de Strasbourg, nous avons montré que Lim1 est constitutivement et quasi exclusivement réexprimé dans les tumeurs. Par l'utilisation de stratégie d'extinction de gène, nous avons montré que Lim1 est un facteur de croissance et de survie dans le CCR, au moins en partie via l'activation des voies oncogéniques PI3K/Akt et NF- κ B. Sur le modèle de souris nude xéno greffées, l'extinction de Lim1 inhibe la croissance tumorale à travers les mêmes mécanismes qu'*in vitro*. De plus, dans les cellules et les tumeurs où l'expression de Lim1 a été éteinte, la migration cellulaire est associée à l'inhibition de l'expression de nombreuses protéines impliquées dans la dissémination métastatique comme la paxilline ou la tenascine-C.

Après avoir montré que la voie HH pouvait constituer une cible intéressante pour le traitement du CCR, cette nouvelle étude décrit également le facteur de transcription Lim1 comme un candidat potentiel. Le ciblage de Lim1 reproduit la majorité des effets observés lors de l'inhibition de la voie HH. De plus, Lim1 pourrait constituer un marqueur pronostique du CCR, étant donné son expression tissulaire.

2.3 Discussion

Dans cette seconde étude, nous nous sommes intéressés au facteur de transcription Lim1. Non pas que la littérature permettait de penser que celui-ci ait un rôle dans la cancerogenité associée au CCR, mais nos travaux antérieurs suggéraient son interaction avec une voie que nous venions de décrire comme activée dans le CCR, et laissaient entrevoir son expression uniquement dans les tissus cancéreux provenant de patients atteints de CCR et pas dans les tissus sains correspondants. Tout comme la voie HH, ce facteur de transcription joue un rôle indispensable dans l'embryogenèse et notamment dans le développement du rein (Kobayashi *et al.*, 2004). En revanche, même si son implication dans certaines anomalies du système urinaire avait été observée, aucune étude n'avait été menée pour explorer son rôle dans des pathologies cancéreuses. Il nous a ainsi paru important d'analyser ce facteur de transcription dans le CCR, à la lumière des résultats préliminaires que nous avons obtenus lors de notre étude concernant la voie HH. D'une part, pour poursuivre la compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires mis en place par les cellules cancéreuses pour se développer dans le CCR, et, d'autre part, dans le but de décrire une voie thérapeutique potentielle pour cette pathologie. L'identification de marqueurs pronostiques et/ou diagnostiques pouvant également découler de ces études.

Les données de la littérature présentait Lim1 comme un facteur critique lors du développement et en particulier rénal. En effet, présent dès les étapes précoces de l'embryogenèse, son expression et sa régulation contrôlent notamment en partie la formation de la tête et du système urinaire. Ainsi, les souris invalidées pour ce gène sont acéphales et n'ont pas de reins (Kobayashi *et al.*, 2004; Shawlot and Behringer, 1995). Jusqu'à présent, les données expérimentales permettant d'étudier Lim1 se focalisaient principalement sur des analyses immunohistochimiques. La possibilité d'obtenir une détection de la protéine Lim1 en Western blot et son expression à priori restreinte au tissu tumoral d'après nos études préliminaire nous ont poussés à analyser l'expression et le rôle potentiel de ce facteur de transcription dans le CCR humain.

L'initiation des travaux de recherche a consisté en l'étude de l'expression de Lim1 dans les lignées cellulaires issues de CCC et dans les échantillons de tissus humains tumoraux et sains obtenus en collaboration avec le service de chirurgie urologique du

Nouvel Hôpital Civil de Strasbourg. Sur des extraits ARN et protéiques, utilisés en RT-PCR et Western blot, nous avons montré la présence de Lim1 dans le CCR et ceci indépendamment du statut en VHL. De même que pour l'étude concernant la voie HH, nous avons pu comparer l'expression du facteur de transcription avec le tissu sain correspondant à la tumeur, ce qui n'avait pas été fait jusque là. Sur 44 paires de tissus tumoraux de différents grades et tissus sains correspondant, nous avons pu montrer une expression quasi exclusive de Lim1 dans les tissus tumoraux (> 95%) alors qu'il n'est présent qu'à hauteur de 18% dans les tissus sains.

L'étape suivante de notre étude a consisté en l'étude du rôle du facteur de transcription Lim1 dans le CCR. Les modalités d'activation de Lim1 n'étant pas connues, nous avons opté pour une stratégie mettant en œuvre des transfections transitoires ciblant ce facteur : ARN interférants et surexpression de gène. Nous avons ainsi montré qu'une extinction du gène Lim1 induit une diminution de la prolifération cellulaire de plus de 70%, une légère augmentation de l'apoptose et surtout une diminution des capacités migratoires et invasives des cellules cancéreuses supérieure à 50%, et ceci indépendamment du statut en VHL. Finalement, des injections intra tumorales de RNA interférants chez des souris nude xénogreffées ont permis de diminuer de plus de 70% la croissance tumorale en agissant sur la prolifération cellulaire et l'apoptose comme cela a pu être observé à partir des analyses immunohistochimiques.

La dernière étape de notre étude visait la compréhension des mécanismes par lesquels Lim1 induisait ces effets. Pour cela nous nous sommes intéressés aux voies oncogéniques démontrées comme jouant un rôle dans le CCR ainsi qu'à quelques protéines contenant un domaine LIM. Nous avons ainsi montré par Western blot que l'extinction de Lim1 *in vitro* diminue la phosphorylation d'Akt, de NF- κ B, et diminue l'expression de diverses protéines intervenants dans les mouvements cellulaires incluant l'actine, la tubuline, la tenascine C et la paxiline. Il semblerait ainsi que Lim1 intervient dans la régulation des voies oncogéniques tout comme la voie HH, et influence les capacités prolifératives et migratoires des cellules cancéreuses en agissant sur les protéines d'architecture et d'adhésion cellulaire.

A travers cette étude, nous avons montré que le facteur de transcription Lim1 est exprimé dans le CCR humain, indépendamment du statut en VHL, et surexprimé dans le tissu cancéreux, à défaut d'être quasiment restreint à celui-ci comparé au tissu normal. L'extinction de ce gène dans les cellules cancéreuses diminue la prolifération, la

migration, l'invasion cellulaire et augmente légèrement l'apoptose. La croissance tumorale des souris xéno greffées est réduite de plus de 70% dans les groupes recevant des RNA interférants ciblant Lim1. Finalement, une étude préliminaire des cibles du facteur de transcription a permis de mettre en évidence une implication des voies oncogéniques PI3K/Akt, NF- κ B ainsi que de divers acteurs responsables de la plasticité cellulaire. Il devient donc intéressant de considérer ce facteur comme une voie de ciblage potentielle pour l'innovation thérapeutique associée au CCR. De plus, une analyse plus approfondie de l'expression de ce facteur, notamment à travers des analyses de localisation sub-tissulaire, voire sub-cellulaire permettrait de le proposer comme candidat en tant que marqueur diagnostique du CCR.

Des études complémentaires sont en cours au laboratoire pour comprendre les mécanismes par lesquels l'expression de Lim1 affecte la viabilité/survie des cellules cancéreuses. Dans cette optique nous utilisons notamment des puces protéomiques afin de caractériser les cibles du facteur de transcription pouvant être responsables des effets observés *in vitro* et *in vivo*. Il sera également intéressant d'avoir recours à des techniques d'immunoprécipitation pour comprendre la régulation de ce facteur de transcription et ainsi décrire des alternatives à l'inhibition de Lim1 en ciblant d'autres protéines.

CONCLUSIONS ET

PERSPECTIVES



CHAPITRE 4



Les travaux présentés dans ce mémoire avaient pour objectif commun l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques pour le CCC humain à travers l'étude de voies néphrogéniques. L'approche expérimentale basée sur des outils *in vitro* et *in vivo*, comprenait trois étapes principales : analyse de l'expression de la voie ou de la protéine considérée dans le CCR, puis, étude de son inhibition sur la croissance cellulaire, et finalement, analyse du mécanisme d'action et des cibles du système étudié. De part le contexte bibliographique présenté en introduction, nous avons initié nos travaux par la description de la voie SHH.

Exploitant les nombreuses lignées cellulaires provenant de CCC humains et les tumeurs obtenues en collaboration avec le service de chirurgie urologique du Nouvel Hôpital Civil de Strasbourg, nous avons mis en évidence par l'expérimentation *in vitro* que les composants de la voie SHH (notamment les récepteurs Smoothed et Patched, ainsi que les facteurs de transcription Gli) sont spécifiquement réactivés dans le CCC et ceci indépendamment du gène suppresseur de tumeur VHL. Ceci a été étudié par l'expression de l'ARNm des différents acteurs de la voie SHH par RT-PCR quantitative en temps réel mais également par Western blot sur des extraits protéiques cellulaires et tissulaires d'échantillons tumoraux et sains correspondants. L'étape suivante a été l'étude de l'inhibition de la voie SHH sur l'activité cellulaire et la croissance tumorale. L'utilisation de la cyclopamine, un inhibiteur du récepteur des ligands de la voie SHH, induit une diminution jusqu'à 80% de la croissance cellulaire *in vitro*. Des études en cytométrie de flux ont révélé une induction faible mais notable de l'apoptose pour les cellules cancéreuses traitées avec la cyclopamine par rapport aux cellules non traitées. Les marquages à la β -galactosidase n'ont montré aucune modification de la sénescence cellulaire. L'ensemble de ces résultats a été conforté par l'utilisation de siARNs spécifiques de Gli1 et de Smo. Parallèlement à l'expérimentation *in vitro*, nous avons conduit des expériences *in vivo* sur des souris immunodéficientes xénotreffées. Un traitement à la cyclopamine injectée en intra péritonéal induit une régression tumorale via l'inhibition de la prolifération cellulaire, de la néo-vascularisation, et une induction de l'apoptose comme le révèlent les résultats d'immunohistochimie après sacrifice des souris des groupes contrôles et traités avec la cyclopamine. Finalement, nous avons montré que différents acteurs de voies oncogéniques tels que la cycline D1, Pax2, Lim1, le VEGF ou encore le TGF- β sont exclusivement exprimés dans les tumeurs de CCR et qu'ils sont régulés par la voie SHH comme l'indiquent les résultats de Western blot après

inhibition de la voie SHH. De plus, l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de différentes voies oncogéniques dont les voies PI3K/Akt, NF- κ B et MAPK, combinée à l'inhibition de la voie HH, nous a permis de mettre en évidence par étude de la croissance cellulaire *in vitro* et Western blot une diminution de l'activation de ces voies par la cyclopamine. Ces résultats ont également été confortés par une approche utilisant des siRNAs.

Comme écrit précédemment, l'étude de la voie SHH nous a permis de mettre en évidence l'expression spécifique de Lim1 dans les CCC et pas dans les tissus sains correspondants de patients. Ainsi il semblait intéressant d'approfondir cette observation dans la poursuite de ma thèse car aucune étude à ce jour n'a été conduite pour étudier le rôle de lim1 dans les cancers du rein, alors qu'il est un facteur important au cours de la néphrogénèse. Sur un échantillon de 44 patients atteints de CCC, une analyse en RT-PCR quantitative et Western blot a mis en évidence une expression quasi-exclusive de Lim1 dans le tissu cancéreux par rapport au tissu normal correspondant. Pour étudier son rôle, une approche mettant en œuvre des techniques de transfections transitoires (siRNA/cDNA) a été utilisée. Les résultats *in vitro* sur les lignées cellulaires montrent qu'une inhibition de Lim1 par transfection transitoire avec des siRNA (efficacité testée par Western blot et RT-PCR >95% de 24h à 72h de culture) diminue la densité et la prolifération cellulaire de 50% et ceci de manière concentration-dépendante. De plus, des études sur l'invasion et la migration ont montré que la transfection transitoire avec des siRNA Lim1 diminue ces 2 caractéristiques cellulaires de plus de 50%. *In vivo*, un traitement par des siRNA Lim1 induit une très forte diminution de la croissance tumorale. Enfin, il semble qu'il y ait des interactions avec la voie SHH et la voie des MAPK notamment, comme l'indiquent des études d'inhibitions croisées avec différents inhibiteurs de ces voies sur des cellules transfectées. Quelques cibles potentielles de ce facteur de transcription ont été décrites au cours des expériences.

En ce qui concerne la suite des travaux, il sera nécessaire d'une part de décrire précisément les modalités d'activation du facteur de transcription Lim1, et d'identifier ses cibles afin de comprendre ses effets dans le CCC. D'autre part, l'interaction de Lim1 avec la voie SHH reste à analyser en détail : en effet, de part leurs effets similaires sur la croissance cellulaire des cellules cancéreuses aussi bien *in vitro* que *in vivo*, ainsi que par leur profil d'expression au cours de la néphrogénèse, il est à supposer que les effecteurs de la voie SHH régulent Lim1 et que Lim1 peut également moduler l'activité de la voie SHH dans certaines conditions. L'étude du profil protéomique des lignées cellulaires où

l'expression de Lim1 a été modifiée est en cours au laboratoire et permettra de décrire des cibles de ce facteur de transcription afin de comprendre les effets cellulaires qu'il induit.

En conclusion, nous avons montré l'implication d'une voie signalétique et d'un marqueur néphrogénique primordial dans la croissance du CCC humain, ainsi que leur interaction avec des voies oncogéniques cruciales pour la croissance tumorale. La régulation des différents acteurs ainsi que les mécanismes d'action complexes restent à caractériser précisément. Des expériences complémentaires permettront la réalisation d'un schéma synthétique inscrivant les différentes molécules intervenant dans les processus de prolifération, d'apoptose et de migration/invasion. Il sera également intéressant de se focaliser sur d'autres voies développementales qui pourraient être impliquées dans la croissance du CCC, ou qui pourraient réguler d'autres voies responsables de sa croissance. En ciblant différemment les voies qui constituent l'objet de ce manuscrit sur des modèles de souris, il sera intéressant d'optimiser la réponse antitumorale obtenue *in vivo*. De même, une combinaison de traitements permettrait de constituer une approche thérapeutique multicibles basée sur le ciblage de voies développementales réexprimées par les cellules cancéreuses. Il s'agira par exemple d'utiliser un inhibiteur de la voie SHH différent de la cyclopamine, avec un inhibiteur potentiel de Lim1 qui ne soit pas un ARN interférent.

Les résultats obtenus lors de ma thèse décrivent d'une part de nouvelles cibles pour le traitement du CCC humain, et d'autre part suggèrent la candidature de Lim1 en tant que marqueur pronostique/diagnostique pour cette pathologie.

REFERENCES



BIBLIOGRAPHIQUES



CHAPITRE 5



A

Abdelhak S, Kalatzis V, Heilig R, Compain S, Samson D, Vincent C *et al* (1997). A human homologue of the Drosophila eyes absent gene underlies branchio-oto-renal (BOR) syndrome and identifies a novel gene family. *Nat Genet* **15**: 157-64.

Agarwala SS, Case S Everolimus (RAD001) in the treatment of advanced renal cell carcinoma: a review. *Oncologist* **15**: 236-45.

Agrawal R, Tran U, Wessely O (2009). The miR-30 miRNA family regulates Xenopus pronephros development and targets the transcription factor Xlim1/Lhx1. *Development* **136**: 3927-36.

Al-Aynati M, Chen V, Salama S, Shuhaibar H, Treleaven D, Vincic L (2003). Interobserver and intraobserver variability using the Fuhrman grading system for renal cell carcinoma. *Arch Pathol Lab Med* **127**: 593-6.

Amin MB, Paner GP, Alvarado-Cabrero I, Young AN, Stricker HJ, Lyles RH *et al* (2008). Chromophobe renal cell carcinoma: histomorphologic characteristics and evaluation of conventional pathologic prognostic parameters in 145 cases. *Am J Surg Pathol* **32**: 1822-34.

Atkins M, Regan M, McDermott D, Mier J, Stanbridge E, Youmans A *et al* (2005). Carbonic anhydrase IX expression predicts outcome of interleukin 2 therapy for renal cancer. *Clin Cancer Res* **11**: 3714-21.

B

Bailey JM, Singh PK, Hollingsworth MA (2007). Cancer metastasis facilitated by developmental pathways: Sonic hedgehog, Notch, and bone morphogenic proteins. *J Cell Biochem* **102**: 829-39.

Baldewijns MM, van Vlodrop IJ, Vermeulen PB, Soetekouw PM, van Engeland M, de Bruine AP VHL and HIF signalling in renal cell carcinogenesis. *J Pathol*.

Banks RE, Tirukonda P, Taylor C, Hornigold N, Astuti D, Cohen D *et al* (2006). Genetic and epigenetic analysis of von Hippel-Lindau (VHL) gene alterations and relationship with clinical variables in sporadic renal cancer. *Cancer Res* **66**: 2000-11.

Barnes JD, Crosby JL, Jones CM, Wright CV, Hogan BL (1994). Embryonic expression of Lim-1, the mouse homolog of Xenopus Xlim-1, suggests a role in lateral mesoderm differentiation and neurogenesis. *Dev Biol* **161**: 168-78.

Beland M, Bouchard M (2006). [PAX gene function during kidney tumorigenesis: a comparative approach]. *Bull Cancer* **93**: 875-82.

Belot A, Grosclaude P, Bossard N, Jouglu E, Benhamou E, Delafosse P *et al* (2008). Cancer incidence and mortality in France over the period 1980-2005. *Rev Epidemiol Sante Publique* **56**: 159-75.

Berman DM, Karhadkar SS, Hallahan AR, Pritchard JI, Eberhart CG, Watkins DN *et al* (2002). Medulloblastoma growth inhibition by hedgehog pathway blockade. *Science* **297**: 1559-61.

Berman DM, Karhadkar SS, Maitra A, Montes De Oca R, Gerstenblith MR, Briggs K *et al* (2003). Widespread requirement for Hedgehog ligand stimulation in growth of digestive tract tumours. *Nature* **425**: 846-51.

Bozzi F, Bertuzzi S, Strina D, Giannetto C, Vezzoni P, Villa A (1996). The exon-intron structure of human LHX1 gene. *Biochem Biophys Res Commun* **229**: 494-7.

Briscoe J (2006). Agonizing hedgehog. *Nat Chem Biol* **2**: 10-1.

Brock KE, Gridley G, Chiu BC, Ershow AG, Lynch CF, Cantor KP (2009). Dietary fat and risk of renal cell carcinoma in the USA: a case-control study. *Br J Nutr* **101**: 1228-38.

Buglino JA, Resh MD (2008). Hhat is a palmitoyltransferase with specificity for N-palmitoylation of Sonic Hedgehog. *J Biol Chem* **283**: 22076-88.

Bui MH, Seligson D, Han KR, Pantuck AJ, Dorey FJ, Huang Y *et al* (2003). Carbonic anhydrase IX is an independent predictor of survival in advanced renal clear cell carcinoma: implications for prognosis and therapy. *Clin Cancer Res* **9**: 802-11.

Burgess NA, Koo BC, Calvert RC, Hindmarsh A, Donaldson PJ, Rhodes M (2007). Randomized trial of laparoscopic v open nephrectomy. *J Endourol* **21**: 610-3.

C

Chen Y, Li X, Tian L, Lui VC, Dallman MJ, Lamb JR *et al* (2007). Inhibition of sonic hedgehog signaling reduces chronic rejection and prolongs allograft survival in a rat orthotopic small bowel transplantation model. *Transplantation* **83**: 1351-7.

Chi N, Epstein JA (2002). Getting your Pax straight: Pax proteins in development and disease. *Trends Genet* **18**: 41-7.

Chiu BC, Gapstur SM, Chow WH, Kirby KA, Lynch CF, Cantor KP (2006). Body mass index, physical activity, and risk of renal cell carcinoma. *Int J Obes (Lond)* **30**: 940-7.

Chow LQ, Eckhardt SG (2007). Sunitinib: from rational design to clinical efficacy. *J Clin Oncol* **25**: 884-96.

Cirillo P, Cali G, Golino P, Calabro P, Forte L, De Rosa S *et al* (2004). Tissue factor binding of activated factor VII triggers smooth muscle cell proliferation via extracellular signal-regulated kinase activation. *Circulation* **109**: 2911-6.

Clark PE (2007). Recent advances in targeted therapy for renal cell carcinoma. *Curr Opin Urol* **17**: 331-6.

Clark PE (2009). The role of VHL in clear-cell renal cell carcinoma and its relation to targeted therapy. *Kidney Int* **76**: 939-45.

Coghlan MP, Culbert AA, Cross DA, Corcoran SL, Yates JW, Pearce NJ *et al* (2000). Selective small molecule inhibitors of glycogen synthase kinase-3 modulate glycogen metabolism and gene transcription. *Chem Biol* **7**: 793-803.

Cohen D, Zhou M (2005). Molecular genetics of familial renal cell carcinoma syndromes. *Clin Lab Med* **25**: 259-77.

D

Dahmane N, Lee J, Robins P, Heller P, Ruiz i Altaba A (1997). Activation of the transcription factor Gli1 and the Sonic hedgehog signalling pathway in skin tumours. *Nature* **389**: 876-81.

Danilin S, Sourbier C, Thomas L, Lindner V, Rothhut S, Dormoy V *et al* Role of the RNA-binding protein HuR in human renal cell carcinoma. *Carcinogenesis*.

Davol PE, Fulmer BR, Rukstalis DB (2006). Long-term results of cryoablation for renal cancer and complex renal masses. *Urology* **68**: 2-6.

Dhote R, Thiounn N, Debre B, Vidal-Trecan G (2004). Risk factors for adult renal cell carcinoma. *Urol Clin North Am* **31**: 237-47.

Doggrell SA The hedgehog pathway inhibitor GDC-0449 shows potential in skin and other cancers. *Expert Opin Investig Drugs* **19**: 451-4.

Dong WF, Heng HH, Lowsky R, Xu Y, DeCoteau JF, Shi XM *et al* (1997). Cloning, expression, and chromosomal localization to 11p12-13 of a human LIM/HOMEBOX gene, hLim-1. *DNA Cell Biol* **16**: 671-8.

Dormoy V, Danilin S, Lindner V, Thomas L, Rothhut S, Coquard C *et al* (2009). The sonic hedgehog signaling pathway is reactivated in human renal cell carcinoma and plays orchestral role in tumor growth. *Mol Cancer* **8**: 123.

Downs TM, Schultzel M, Shi H, Sanders C, Tahir Z, Sadler GR (2009). Renal cell carcinoma: risk assessment and prognostic factors for newly diagnosed patients. *Crit Rev Oncol Hematol* **70**: 59-70.

Drucker BJ (2005). Renal cell carcinoma: current status and future prospects. *Cancer Treat Rev* **31**: 536-45.

Duman-Scheel M, Weng L, Xin S, Du W (2002). Hedgehog regulates cell growth and proliferation by inducing Cyclin D and Cyclin E. *Nature* **417**: 299-304.

E

Eccles MR, He S, Legge M, Kumar R, Fox J, Zhou C *et al* (2002). PAX genes in development and disease: the role of PAX2 in urogenital tract development. *Int J Dev Biol* **46**: 535-44.

Echelard Y, Epstein DJ, St-Jacques B, Shen L, Mohler J, McMahon JA *et al* (1993). Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell* **75**: 1417-30.

Escudier B, Eisen T, Stadler WM, Szczylik C, Oudard S, Siebels M *et al* (2007a). Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* **356**: 125-34.

Escudier B, Eisen T, Stadler WM, Szczylik C, Oudard S, Staehler M *et al* (2009). Sorafenib for treatment of renal cell carcinoma: Final efficacy and safety results of the phase III treatment approaches in renal cancer global evaluation trial. *J Clin Oncol* **27**: 3312-8.

Escudier B, Pluzanska A, Koralewski P, Ravaud A, Bracarda S, Szczylik C *et al* (2007b). Bevacizumab plus interferon alfa-2a for treatment of metastatic renal cell carcinoma: a randomised, double-blind phase III trial. *Lancet* **370**: 2103-11.

Evangelista M, Tian H, de Sauvage FJ (2006). The hedgehog signaling pathway in cancer. *Clin Cancer Res* **12**: 5924-8.

F

Facchini G, Perri F, Caraglia M, Pisano C, Striano S, Marra L *et al* (2009). New treatment approaches in renal cell carcinoma. *Anticancer Drugs* **20**: 893-900.

Ficarra V, Galfano A, Guille F, Schips L, Tostain J, Mejean A *et al* (2007). A new staging system for locally advanced (pT3-4) renal cell carcinoma: a multicenter European study including 2,000 patients. *J Urol* **178**: 418-24; discussion 423-4.

Ficarra V, Martignoni G, Maffei N, Brunelli M, Novara G, Zanolla L *et al* (2005). Original and reviewed nuclear grading according to the Fuhrman system: a multivariate analysis of 388 patients with conventional renal cell carcinoma. *Cancer* **103**: 68-75.

Flaherty KT, Fuchs CS, Colditz GA, Stampfer MJ, Speizer FE, Willett WC *et al* (2005). A prospective study of body mass index, hypertension, and smoking and the risk of renal cell carcinoma (United States). *Cancer Causes Control* **16**: 1099-106.

Freyd G, Kim SK, Horvitz HR (1990). Novel cysteine-rich motif and homeodomain in the product of the *Caenorhabditis elegans* cell lineage gene *lin-11*. *Nature* **344**: 876-9.

Friedrich CA (1999). Von Hippel-Lindau syndrome. A pleomorphic condition. *Cancer* **86**: 2478-82.

Fuhrman SA, Lasky LC, Limas C (1982). Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol* **6**: 655-63.

Fujii T, Pichel JG, Taira M, Toyama R, Dawid IB, Westphal H (1994). Expression patterns of the murine LIM class homeobox gene *lim1* in the developing brain and excretory system. *Dev Dyn* **199**: 73-83.

G

Gill PS, Rosenblum ND (2006). Control of murine kidney development by sonic hedgehog and its GLI effectors. *Cell Cycle* **5**: 1426-30.

H

Haase VH (2006). The VHL/HIF oxygen-sensing pathway and its relevance to kidney disease. *Kidney Int* **69**: 1302-7.

Heldwein FL, McCullough TC, Souto CA, Galiano M, Barret E (2008). Localized renal cell carcinoma management: an update. *Int Braz J Urol* **34**: 676-89; discussion 689-90.

Hickey MM, Simon MC (2006). Regulation of angiogenesis by hypoxia and hypoxia-inducible factors. *Curr Top Dev Biol* **76**: 217-57.

Holland PW, Booth HA, Bruford EA (2007). Classification and nomenclature of all human homeobox genes. *BMC Biol* **5**: 47.

Hoskins BE, Cramer CH, Silvius D, Zou D, Raymond RM, Orten DJ *et al* (2007). Transcription factor SIX5 is mutated in patients with branchio-oto-renal syndrome. *Am J Hum Genet* **80**: 800-4.

Hu J, La Vecchia C, DesMeules M, Negri E, Mery L (2008). Nutrient and fiber intake and risk of renal cell carcinoma. *Nutr Cancer* **60**: 720-8.

Huang D, Ding Y, Luo WM, Bender S, Qian CN, Kort E *et al* (2008). Inhibition of MAPK kinase signaling pathways suppressed renal cell carcinoma growth and angiogenesis in vivo. *Cancer Res* **68**: 81-8.

Hudes GR (2007). mTOR as a target for therapy of renal cancer. *Clin Adv Hematol Oncol* **5**: 772-4.

Hueber PA, Iglesias D, Chu LL, Eccles M, Goodyer P (2008). In vivo validation of PAX2 as a target for renal cancer therapy. *Cancer Lett* **265**: 148-55.

Hueber PA, Waters P, Clark P, Eccles M, Goodyer P (2006). PAX2 inactivation enhances cisplatin-induced apoptosis in renal carcinoma cells. *Kidney Int* **69**: 1139-45.

Hunter CS, Rhodes SJ (2005). LIM-homeodomain genes in mammalian development and human disease. *Mol Biol Rep* **32**: 67-77.

I

Iliopoulos O, Kibel A, Gray S, Kaelin WG, Jr. (1995). Tumour suppression by the human von Hippel-Lindau gene product. *Nat Med* **1**: 822-6.

Incardona JP, Gaffield W, Kapur RP, Roelink H (1998). The teratogenic Veratrum alkaloid cyclopamine inhibits sonic hedgehog signal transduction. *Development* **125**: 3553-62.

J

Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ (2009). Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin* **59**: 225-49.

Jemtland R, Divieti P, Lee K, Segre GV (2003). Hedgehog promotes primary osteoblast differentiation and increases PTHrP mRNA expression and iPTHrP secretion. *Bone* **32**: 611-20.

K

Kaelin WG, Jr. (2007). The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein and clear cell renal carcinoma. *Clin Cancer Res* **13**: 680s-684s.

Kania A, Johnson RL, Jessell TM (2000). Coordinate roles for LIM homeobox genes in directing the dorsoventral trajectory of motor axons in the vertebrate limb. *Cell* **102**: 161-73.

Kapitsinou PP, Haase VH (2008). The VHL tumor suppressor and HIF: insights from genetic studies in mice. *Cell Death Differ* **15**: 650-9.

Karakiewicz PI, Briganti A, Chun FK, Trinh QD, Perrotte P, Ficarra V *et al* (2007). Multi-institutional validation of a new renal cancer-specific survival nomogram. *J Clin Oncol* **25**: 1316-22.

Karavanov AA, Karavanova I, Perantoni A, Dawid IB (1998). Expression pattern of the rat Lim-1 homeobox gene suggests a dual role during kidney development. *Int J Dev Biol* **42**: 61-6.

Karhadkar SS, Bova GS, Abdallah N, Dhara S, Gardner D, Maitra A *et al* (2004). Hedgehog signalling in prostate regeneration, neoplasia and metastasis. *Nature* **431**: 707-12.

Karlsson O, Thor S, Norberg T, Ohlsson H, Edlund T (1990). Insulin gene enhancer binding protein Isl-1 is a member of a novel class of proteins containing both a homeo- and a Cys-His domain. *Nature* **344**: 879-82.

Kasper M, Regl G, Frischauf AM, Aberger F (2006). GLI transcription factors: mediators of oncogenic Hedgehog signalling. *Eur J Cancer* **42**: 437-45.

Katano M (2005). Hedgehog signaling pathway as a therapeutic target in breast cancer. *Cancer Lett* **227**: 99-104.

Katoh Y, Katoh M (2008). Hedgehog signaling, epithelial-to-mesenchymal transition and miRNA (review). *Int J Mol Med* **22**: 271-5.

Kobayashi A, Kwan KM, Carroll TJ, McMahon AP, Mendelsohn CL, Behringer RR (2005). Distinct and sequential tissue-specific activities of the LIM-class homeobox gene *Lim1* for tubular morphogenesis during kidney development. *Development* **132**: 2809-23.

Kobayashi A, Shawlot W, Kania A, Behringer RR (2004). Requirement of *Lim1* for female reproductive tract development. *Development* **131**: 539-49.

Kosaka T, Mikami S, Miyajima A, Kikuchi E, Nakagawa K, Ohigashi T *et al* (2008). Papillary renal cell carcinoma: clinicopathological characteristics in 40 patients. *Clin Exp Nephrol* **12**: 195-9.

Kovacs G, Akhtar M, Beckwith BJ, Bugert P, Cooper CS, Delahunt B *et al* (1997). The Heidelberg classification of renal cell tumours. *J Pathol* **183**: 131-3.

Kume T, Deng K, Hogan BL (2000). Murine forkhead/winged helix genes *Foxc1* (*Mf1*) and *Foxc2* (*Mfh1*) are required for the early organogenesis of the kidney and urinary tract. *Development* **127**: 1387-95.

L

Lam JS, Shvarts O, Leppert JT, Figlin RA, Belldegrun AS (2005). Renal cell carcinoma 2005: new frontiers in staging, prognostication and targeted molecular therapy. *J Urol* **173**: 1853-62.

Lang H, Lindner V, de Fromont M, Molinie V, Letourneux H, Meyer N *et al* (2005). Multicenter determination of optimal interobserver agreement using the Fuhrman grading system for renal cell carcinoma: Assessment of 241 patients with > 15-year follow-up. *Cancer* **103**: 625-9.

Leppert JT, Pantuck AJ, Figlin RA, Belldegrun AS (2007). The role of molecular markers in the staging of renal cell carcinoma. *BJU Int* **99**: 1208-11.

Letourneux H, Lindner V, Lang H, Massfelder T, Meyer N, Saussine C *et al* (2006). [Reproducibility of Fuhrman nuclear grade: advantages of a two-grade system]. *Prog Urol* **16**: 281-5.

Levi F, Ferlay J, Galeone C, Lucchini F, Negri E, Boyle P *et al* (2008). The changing pattern of kidney cancer incidence and mortality in Europe. *BJU Int* **101**: 949-58.

Lipworth L, Tarone RE, McLaughlin JK (2006). The epidemiology of renal cell carcinoma. *J Urol* **176**: 2353-8.

Lonser RR, Glenn GM, Walther M, Chew EY, Libutti SK, Linehan WM *et al* (2003). von Hippel-Lindau disease. *Lancet* **361**: 2059-67.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**: 265-75.

Lubensky IA, Schmidt L, Zhuang Z, Weirich G, Pack S, Zambrano N *et al* (1999). Hereditary and sporadic papillary renal carcinomas with c-met mutations share a distinct morphological phenotype. *Am J Pathol* **155**: 517-26.

M

Ma Y, Erkner A, Gong R, Yao S, Taipale J, Basler K *et al* (2002). Hedgehog-mediated patterning of the mammalian embryo requires transporter-like function of dispatched. *Cell* **111**: 63-75.

Mak BC, Yeung RS (2004). The tuberous sclerosis complex genes in tumor development. *Cancer Invest* **22**: 588-603.

Mancini V, Battaglia M, Ditunno P, Palazzo S, Lastilla G, Montironi R *et al* (2008). Current insights in renal cell cancer pathology. *Urol Oncol* **26**: 225-38.

Massfelder T, Lang H, Schordan E, Lindner V, Rothhut S, Welsch S *et al* (2004). Parathyroid hormone-related protein is an essential growth factor for human clear cell renal carcinoma and a target for the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene. *Cancer Res* **64**: 180-8.

Maynard MA, Evans AJ, Shi W, Kim WY, Liu FF, Ohh M (2007). Dominant-negative HIF-3 alpha 4 suppresses VHL-null renal cell carcinoma progression. *Cell Cycle* **6**: 2810-6.

McCright B (2003). Notch signaling in kidney development. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **12**: 5-10.

McDermott DF (2009). Immunotherapy of metastatic renal cell carcinoma. *Cancer* **115**: 2298-305.

Mekhail TM, Abou-Jawde RM, Boumerhi G, Malhi S, Wood L, Elson P *et al* (2005). Validation and extension of the Memorial Sloan-Kettering prognostic factors model for survival in patients with previously untreated metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* **23**: 832-41.

Meraney AM, Gill IS (2002). Financial analysis of open versus laparoscopic radical nephrectomy and nephroureterectomy. *J Urol* **167**: 1757-62.

Michos O, Goncalves A, Lopez-Rios J, Tiecke E, Naillat F, Beier K *et al* (2007). Reduction of BMP4 activity by gremlin 1 enables ureteric bud outgrowth and GDNF/WNT11 feedback signalling during kidney branching morphogenesis. *Development* **134**: 2397-405.

Miller DC, Hollingsworth JM, Hafez KS, Daignault S, Hollenbeck BK (2006). Partial nephrectomy for small renal masses: an emerging quality of care concern? *J Urol* **175**: 853-7; discussion 858.

Molckovsky A, Siu LL (2008). First-in-class, first-in-human phase I results of targeted agents: highlights of the 2008 American society of clinical oncology meeting. *J Hematol Oncol* **1**: 20.

Motzer RJ, Hutson TE, Tomczak P, Michaelson MD, Bukowski RM, Oudard S *et al* (2009). Overall survival and updated results for sunitinib compared with interferon alfa in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* **27**: 3584-90.

Motzer RJ, Hutson TE, Tomczak P, Michaelson MD, Bukowski RM, Rixe O *et al* (2007a). Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* **356**: 115-24.

Motzer RJ, Mazumdar M, Bacik J, Berg W, Amsterdam A, Ferrara J (1999). Survival and prognostic stratification of 670 patients with advanced renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* **17**: 2530-40.

Motzer RJ, Michaelson MD, Rosenberg J, Bukowski RM, Curti BD, George DJ *et al* (2007b). Sunitinib efficacy against advanced renal cell carcinoma. *J Urol* **178**: 1883-7.

Motzer RJ, Rini BI, Bukowski RM, Curti BD, George DJ, Hudes GR *et al* (2006). Sunitinib in patients with metastatic renal cell carcinoma. *JAMA* **295**: 2516-24.

Motzer RJ, Russo P (2000). Systemic therapy for renal cell carcinoma. *J Urol* **163**: 408-17.

N

Nakashima H, Nakamura M, Yamaguchi H, Yamanaka N, Akiyoshi T, Koga K *et al* (2006). Nuclear factor-kappaB contributes to hedgehog signaling pathway activation through sonic hedgehog induction in pancreatic cancer. *Cancer Res* **66**: 7041-9.

Narlis M, Grote D, Gaitan Y, Boualia SK, Bouchard M (2007). Pax2 and pax8 regulate branching morphogenesis and nephron differentiation in the developing kidney. *J Am Soc Nephrol* **18**: 1121-9.

Nogueira M, Kim HL (2008). Molecular markers for predicting prognosis of renal cell carcinoma. *Urol Oncol* **26**: 113-24.

O

Ozcan A, Zhai J, Hamilton C, Shen SS, Ro JY, Krishnan B *et al* (2009). PAX-2 in the diagnosis of primary renal tumors: immunohistochemical comparison with renal cell carcinoma marker antigen and kidney-specific cadherin. *Am J Clin Pathol* **131**: 393-404.

P

Pan SY, DesMeules M (2009). Energy intake, physical activity, energy balance, and cancer: epidemiologic evidence. *Methods Mol Biol* **472**: 191-215.

Pantuck AJ, Zisman A, Belldegrun A (2001). Biology of renal cell carcinoma: changing concepts in classification and staging. *Semin Urol Oncol* **19**: 72-9.

Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P (2005). Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* **55**: 74-108.

Patard JJ, Kim HL, Lam JS, Dorey FJ, Pantuck AJ, Zisman A *et al* (2004). Use of the University of California Los Angeles integrated staging system to predict survival in renal cell carcinoma: an international multicenter study. *J Clin Oncol* **22**: 3316-22.

Pierce JW, Schoenleber R, Jesmok G, Best J, Moore SA, Collins T *et al* (1997). Novel inhibitors of cytokine-induced I κ B α phosphorylation and endothelial cell adhesion molecule expression show anti-inflammatory effects in vivo. *J Biol Chem* **272**: 21096-103.

Pignot G, Elie C, Conquy S, Vieillefond A, Flam T, Zerbib M *et al* (2007). Survival analysis of 130 patients with papillary renal cell carcinoma: prognostic utility of type 1 and type 2 subclassification. *Urology* **69**: 230-5.

Pola R, Ling LE, Silver M, Corbley MJ, Kearney M, Blake Pepinsky R *et al* (2001). The morphogen Sonic hedgehog is an indirect angiogenic agent upregulating two families of angiogenic growth factors. *Nat Med* **7**: 706-11.

Pulkkinen K, Murugan S, Vainio S (2008). Wnt signaling in kidney development and disease. *Organogenesis* **4**: 55-9.

Q

Qualtrough D, Buda A, Gaffield W, Williams AC, Paraskeva C (2004). Hedgehog signalling in colorectal tumour cells: induction of apoptosis with cyclopamine treatment. *Int J Cancer* **110**: 831-7.

R

Ratcliffe PJ (2007). Fumarate hydratase deficiency and cancer: activation of hypoxia signaling? *Cancer Cell* **11**: 303-5.

Reidy KJ, Rosenblum ND (2009). Cell and molecular biology of kidney development. *Semin Nephrol* **29**: 321-37.

Retaux S, Bachy I (2002). A short history of LIM domains (1993-2002): from protein interaction to degradation. *Mol Neurobiol* **26**: 269-81.

Richard S, Graff J, Lindau J, Resche F (2004). Von Hippel-Lindau disease. *Lancet* **363**: 1231-4.

Rini BI (2009). Vascular endothelial growth factor-targeted therapy in metastatic renal cell carcinoma. *Cancer* **115**: 2306-12.

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

Ruf RG, Xu PX, Silvius D, Otto EA, Beekmann F, Muerb UT *et al* (2004). SIX1 mutations cause branchio-oto-renal syndrome by disruption of EYA1-SIX1-DNA complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 8090-5.

Ruiz i Altaba A, Sanchez P, Dahmane N (2002). Gli and hedgehog in cancer: tumours, embryos and stem cells. *Nat Rev Cancer* **2**: 361-72.

Russo P, Synder M, Vickers A, Kondagunta V, Motzer R (2007). Cytoreductive nephrectomy and nephrectomy/complete metastasectomy for metastatic renal cancer. *ScientificWorldJournal* **7**: 768-78.

S

Sagalowsky AI (2002). The 1997 TNM classification of renal cell carcinoma revisited: the pendulum swings back. *Curr Opin Urol* **12**: 371-3.

Sanchez-Garcia I, Osada H, Forster A, Rabbitts TH (1993). The cysteine-rich LIM domains inhibit DNA binding by the associated homeodomain in Isl-1. *EMBO J* **12**: 4243-50.

Sariola H (2002). Nephron induction. *Nephrol Dial Transplant* **17 Suppl 9**: 88-90.

Sato N, Fukushima N, Hruban RH, Goggins M (2008). CpG island methylation profile of pancreatic intraepithelial neoplasia. *Mod Pathol* **21**: 238-44.

Sato N, Fukushima N, Maitra A, Matsubayashi H, Yeo CJ, Cameron JL *et al* (2003). Discovery of novel targets for aberrant methylation in pancreatic carcinoma using high-throughput microarrays. *Cancer Res* **63**: 3735-42.

Saxen L, Sariola H (1987). Early organogenesis of the kidney. *Pediatr Nephrol* **1**: 385-92.

Scales SJ, de Sauvage FJ (2009). Mechanisms of Hedgehog pathway activation in cancer and implications for therapy. *Trends Pharmacol Sci* **30**: 303-12.

Schedl A (2007). Renal abnormalities and their developmental origin. *Nat Rev Genet* **8**: 791-802.

Shawlot W, Behringer RR (1995). Requirement for Lim1 in head-organizer function. *Nature* **374**: 425-30.

Shih T, Lindley C (2006). Bevacizumab: an angiogenesis inhibitor for the treatment of solid malignancies. *Clin Ther* **28**: 1779-802.

Shuch B, La Rochelle JC, Pantuck AJ, Belldegrun AS (2008). The staging of renal cell carcinoma. *Curr Opin Urol* **18**: 455-61.

Siemer S, Lehmann J, Loch A, Becker F, Stein U, Schneider G *et al* (2005). Current TNM classification of renal cell carcinoma evaluated: revising stage T3a. *J Urol* **173**: 33-7.

Sjolund J, Johansson M, Manna S, Norin C, Pietras A, Beckman S *et al* (2008). Suppression of renal cell carcinoma growth by inhibition of Notch signaling in vitro and in vivo. *J Clin Invest* **118**: 217-28.

Soubrier C, Danilin S, Lindner V, Steger J, Rothhut S, Meyer N *et al* (2007). Targeting the nuclear factor-kappaB rescue pathway has promising future in human renal cell carcinoma therapy. *Cancer Res* **67**: 11668-76.

Soubrier C, Lindner V, Lang H, Agouni A, Schordan E, Danilin S *et al* (2006). The phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway: a new target in human renal cell carcinoma therapy. *Cancer Res* **66**: 5130-42.

Soubrier C, Massfelder T (2006). Parathyroid hormone-related protein in human renal cell carcinoma. *Cancer Lett* **240**: 170-82.

Stein MN, Flaherty KT (2007). CCR drug updates: sorafenib and sunitinib in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* **13**: 3765-70.

T

Taipale J, Chen JK, Cooper MK, Wang B, Mann RK, Milenkovic L *et al* (2000). Effects of oncogenic mutations in Smoothed and Patched can be reversed by cyclopamine. *Nature* **406**: 1005-9.

Takahashi M, Rhodes DR, Furge KA, Kanayama H, Kagawa S, Haab BB *et al* (2001). Gene expression profiling of clear cell renal cell carcinoma: gene identification and prognostic classification. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 9754-9.

Talon I, Lindner V, Soubrier C, Schordan E, Rothhut S, Barthelmebs M *et al* (2006). Antitumor effect of parathyroid hormone-related protein neutralizing antibody in human renal cell carcinoma in vitro and in vivo. *Carcinogenesis* **27**: 73-83.

Tashiro S, Michiue T, Higashijima S, Zenno S, Ishimaru S, Takahashi F *et al* (1993). Structure and expression of hedgehog, a Drosophila segment-polarity gene required for cell-cell communication. *Gene* **124**: 183-9.

Thayer SP, di Magliano MP, Heiser PW, Nielsen CM, Roberts DJ, Lauwers GY *et al* (2003). Hedgehog is an early and late mediator of pancreatic cancer tumorigenesis. *Nature* **425**: 851-6.

Thompson Coon J, Hoyle M, Green C, Liu Z, Welch K, Moxham T *et al* Bevacizumab, sorafenib tosylate, sunitinib and temsirolimus for renal cell carcinoma: a systematic review and economic evaluation. *Health Technol Assess* **14**: 1-184, iii-iv.

Tong WG, Wierda WG, Lin E, Kuang SQ, Bekele BN, Estrov Z *et al* Genome-wide DNA methylation profiling of chronic lymphocytic leukemia allows identification of epigenetically repressed molecular pathways with clinical impact. *Epigenetics* **5**.

Torday JS, Rehan VK (2006). Up-regulation of fetal rat lung parathyroid hormone-related protein gene regulatory network down-regulates the Sonic Hedgehog/Wnt/betacatenin gene regulatory network. *Pediatr Res* **60**: 382-8.

Toro JR, Wei MH, Glenn GM, Weinreich M, Toure O, Vocke C *et al* (2008). BHD mutations, clinical and molecular genetic investigations of Birt-Hogg-Dube syndrome: a new series of 50 families and a review of published reports. *J Med Genet* **45**: 321-31.

Tsang TE, Shawlot W, Kinder SJ, Kobayashi A, Kwan KM, Schughart K *et al* (2000). Lim1 activity is required for intermediate mesoderm differentiation in the mouse embryo. *Dev Biol* **223**: 77-90.

Tunuguntla HS, Jorda M (2008). Diagnostic and prognostic molecular markers in renal cell carcinoma. *J Urol* **179**: 2096-102.

V

Vainio S, Lin Y (2002). Coordinating early kidney development: lessons from gene targeting. *Nat Rev Genet* **3**: 533-43.

Varis A, Wolf M, Monni O, Vakkari ML, Kokkola A, Moskaluk C *et al* (2002). Targets of gene amplification and overexpression at 17q in gastric cancer. *Cancer Res* **62**: 2625-9.

Varjosalo M, Taipale J (2007). Hedgehog signaling. *J Cell Sci* **120**: 3-6.

Varjosalo M, Taipale J (2008). Hedgehog: functions and mechanisms. *Genes Dev* **22**: 2454-72.

Venegas-Ferrin M, Sudou N, Taira M, del Pino EM Comparison of Lim1 expression in embryos of frogs with different modes of reproduction. *Int J Dev Biol* **54**: 195-202.

Verine J, Lehmann-Che J, Soliman H, Feugeas JP, Vidal JS, Mongiat-Artus P *et al* Determination of angptl4 mRNA as a diagnostic marker of primary and metastatic clear cell renal-cell carcinoma. *PLoS One* **5**: e10421.

Villavicencio EH, Walterhouse DO, Iannaccone PM (2000). The sonic hedgehog-patched-gli pathway in human development and disease. *Am J Hum Genet* **67**: 1047-54.

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

W

Wang L, Zhang ZG, Gregg SR, Zhang RL, Jiao Z, LeTourneau Y *et al* (2007). The Sonic hedgehog pathway mediates carbamylated erythropoietin-enhanced proliferation and differentiation of adult neural progenitor cells. *J Biol Chem* **282**: 32462-70.

Way JC, Chalfie M (1988). *mec-3*, a homeobox-containing gene that specifies differentiation of the touch receptor neurons in *C. elegans*. *Cell* **54**: 5-16.

West KA, Castillo SS, Dennis PA (2002). Activation of the PI3K/Akt pathway and chemotherapeutic resistance. *Drug Resist Updat* **5**: 234-48.

Wilhelm S, Carter C, Lynch M, Lowinger T, Dumas J, Smith RA *et al* (2006). Discovery and development of sorafenib: a multikinase inhibitor for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov* **5**: 835-44.

Woldrich JM, Mallin K, Ritchey J, Carroll PR, Kane CJ (2008). Sex differences in renal cell cancer presentation and survival: an analysis of the National Cancer Database, 1993-2004. *J Urol* **179**: 1709-13; discussion 1713.

Y

Yasuoka Y, Kobayashi M, Kurokawa D, Akasaka K, Saiga H, Taira M (2009). Evolutionary origins of blastoporal expression and organizer activity of the vertebrate gastrula organizer gene *lhx1* and its ancient metazoan paralog *lhx3*. *Development* **136**: 2005-14.

Yates JW, Chalmer B, McKegney FP (1980). Evaluation of patients with advanced cancer using the Karnofsky performance status. *Cancer* **45**: 2220-4.

Yoshikawa K, Shimada M, Miyamoto H, Higashijima J, Miyatani T, Nishioka M *et al* (2009). Sonic hedgehog relates to colorectal carcinogenesis. *J Gastroenterol* **44**: 1113-7.

Yoshimoto T, Matsuura K, Karnan S, Tagawa H, Nakada C, Tanigawa M *et al* (2007). High-resolution analysis of DNA copy number alterations and gene expression in renal clear cell carcinoma. *J Pathol* **213**: 392-401.

Z

Zagoria RJ, Traver MA, Werle DM, Perini M, Hayasaka S, Clark PE (2007). Oncologic efficacy of CT-guided percutaneous radiofrequency ablation of renal cell carcinomas. *AJR Am J Roentgenol* **189**: 429-36.

Zisman A, Pantuck AJ, Dorey F, Said JW, Shvarts O, Quintana D *et al* (2001). Improved prognostication of renal cell carcinoma using an integrated staging system. *J Clin Oncol* **19**: 1649-57.

Zisman A, Pantuck AJ, Wieder J, Chao DH, Dorey F, Said JW *et al* (2002). Risk group assessment and clinical outcome algorithm to predict the natural history of patients with surgically resected renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* **20**: 4559-66.

ANNEXES



CHAPITRE 6



1 RÉSUMÉ EN FRANÇAIS

Le cancer du rein demeure résistant aux thérapies, malgré le développement récent des stratégies anti-angiogéniques. De nombreux gènes jouent un rôle critique au cours du développement, notamment du rein. Une modification de leur expression entraîne l'apparition de pathologies. Le concept que ces acteurs intervenant dans l'homéostasie puissent être réexprimés par des cellules cancéreuses a émergé récemment. Nous avons recherché ici si la cancérogenèse et la progression tumorale associées au rein font appel à des voies/marqueurs développementaux. Nos investigations se sont portées spécifiquement sur la voie développementale du sonic hedgehog (SHH) et par la suite sur le facteur de transcription néphrogénique Lim1.

L'accès aux tumeurs humaines et l'exploitation de lignées cellulaires nous a permis d'analyser l'expression de cette voie signalétique et de ce marqueur néphrogénique dans le carcinome à cellules rénales (CCR). Des inhibiteurs pharmacologiques ainsi que l'utilisation de transfections de siRNA/cDNA ont été utilisés pour évaluer l'effet *in vitro* de ces acteurs du développement sur la prolifération et l'apoptose des cellules cancéreuses. La migration a été étudiée par l'utilisation de chambres de Boyden et l'activation/interaction d'autres voies oncogéniques a été recherchée par Western blot. Finalement une approche *in vivo* avec l'utilisation de souris nude xénotreffées a permis une validation pré-clinique du blocage de ces voies, dans une optique de caractériser des cibles thérapeutiques potentielles innovantes.

Nous avons montré que la voie HH et que Lim1 sont réexprimés dans les tumeurs et dans l'ensemble des lignées humaines. Leur inhibition entraîne une diminution importante de la prolifération ainsi que de la migration cellulaires. *In vivo*, une inhibition de la croissance tumorale voire des régressions ont été observées en ciblant cette voie et ce marqueur ; tous deux participant à la régulation d'autres voies oncogéniques.

Le ciblage de voies impliquées dans le développement peut constituer une innovation thérapeutique importante dans le traitement des cancers du rein et pose une pièce supplémentaire dans le puzzle moléculaire des mécanismes cancéreux. De plus, une évaluation de Lim1, voire des effecteurs de la voie HH, pourrait constituer une piste pour la caractérisation d'un marqueur pronostique/diagnostique dans le CCR.

Mots clés : Carcinome à cellules rénales (CCR) – Hedgehog (HH) – Lim1 – Gli – développement.

2 RÉSUMÉ EN ANGLAIS

Kidney cancer remains resistant to therapies despite the discovery of targeted therapies. Several genes play essential roles in human development, particularly during nephrogenesis. An alteration of their expression leads to many pathologies. The concept suggesting that these actors could be expressed by cancer cells has recently emerged. In our studies, we investigated if cancerogenesis and tumor growth in renal cell carcinoma (RCC) are linked to the developmental pathways. For this purpose, we focussed particularly on the developmental sonic hedgehog (SHH) pathway, and then on the nephrogenic transcription factor Lim1.

The expression of the SHH pathway and of Lim1 in RCC were analysed on RCC cell lines and tumors from human RCC. The proliferative and apoptosis effects of the SHH pathway and of Lim1 on kidney cancer cells were evaluated *in vitro* with pharmacological inhibitors and transfection assays (siRNA/cDNA). Their involvement in kidney cancer cells migration (through transwells) and invasion (with coated matrix) were also studied, as well as their interaction with oncogenic pathways by Western blot. Focussed on the description of therapeutical innovation, we used xenografted mice to analyze the effects of the inhibition of these developmental pathways/markers *in vivo*.

Our results demonstrate that the SHH pathway and Lim1 are reexpressed in RCC cell lines and in human tumors. The inhibition of these actors led to a radical decrease of cancer cells proliferation and migration. *In vivo*, targeting these pathways/markers, that we showed to participate to the regulation of oncogenic pathways, induced a decrease of tumor growth and even marked tumor regression.

The developmental pathways implicated in RCC growth could constitute an important therapeutical innovation in the treatment of this cancer, and allow us to put an additional piece in the molecular puzzle of molecular cancer mechanisms. Moreover, the evaluation of Lim1, as well as of the SHH pathway, could pave the way to characterize useful diagnostic/pronostic markers in RCC.

Key words : Renal cell carcinoma (RCC) – Hedgehog (HH) – Lim1 – Gli – development.

3 PUBLICATIONS

- Dormoy V, Beraud C, Lindner V, Thomas L, Coquard C, Barthelmebs M, Jacqmin D, Lang H, Massfelder T. LIM-class homeobox gene Lim1, a novel oncogene in human renal cell carcinoma. *Manuscrit en révision dans Oncogene*.
- Dormoy V, Massfelder T. From developpement to cancer: involvement of nephrogenic pathways in human renal cell carcinoma. *Revue en préparation*.
- Danilin S, Sourbier C, Thomas L, Lindner V, Rothhut S, Dormoy V, Helwig JJ, Jacqmin D, Lang H, Massfelder T (2010). Role of the RNA-binding protein HuR in human renal cell carcinoma. *Carcinogenesis* 31(6):1018-26.
- Dormoy V, Danilin S, Lindner V, Thomas L, Rothhut S, Coquard C, Helwig JJ, Jacqmin D, Lang H, Massfelder T (2009). The sonic hedgehog signaling pathway is reactivated in human renal cell carcinoma and plays orchestral role in tumor growth. *Mol Cancer* 8: 123.

4 POSTERS ET COMMUNICATIONS

- Dormoy Valérian, Béraud Claire, Lindner Véronique, Thomas Lionel, Coquard Catherine, Helwig Jean-Jacques, Jacqmin Didier, Lang Hervé, Massfelder Thierry. From development to cancer: Involvement of LIM-class homeobox gene Lim1 in human renal cell carcinoma. Annual meeting of the American Urological Association (AUA), May 29-June 3, 2010, San Francisco, CA, USA. Moderated poster session.
- Lionel Michat, Valérian Dormoy, Françoise Decker, Patrick Robert, Jérôme Leibovitz. Innovation thérapeutique. Pavillon des sciences, 28 avril, 2010, Montbéliard, France. Débat scientifique.
- Dormoy Valérian, Béraud Claire, Lindner Véronique, Thomas Lionel, Coquard Catherine, Helwig Jean-Jacques, Jacqmin Didier, Lang Hervé, Massfelder Thierry. The developmental LIM-class homeobox gene Lim1 is critical for human renal cell carcinoma growth. Annual congress of the European Association of Urology (EAU), April 16-20, 2010, Barcelone, Spain. Moderated poster session.
- Valérian Dormoy, Lionel Koenig, Eric Zindel, Florent Martin. Homéopathie à plein tube : petits granules...grandes controverses. Pavillon des sciences, 29 mai, 2009, Montbéliard, France. Débat scientifique.
- Valérian Dormoy, Sabrina Danilin Véronique Lindner, Thomas Charles, Lionel Thomas, Jean- Jacques Helwig, Didier Jacqmin, Hervé Lang, Thierry Massfelder. Human renal cell carcinoma growth is suppressed by inhibition of the sonic hedgehog signaling pathway. Annual meeting of the American Urological Association (AUA), April 25-30, 2009, Chicago, IL, USA. Moderated poster session.
- Sabrina Danilin, Carole Sourbier, Lionel Thomas, Veronique Lindner, Sylvie Rothhut, Valérian Dormoy, Jean-Jacques Helwig, Didier Jacqmin, Herve Lang, Thierry Massfelder. RNA-binding protein HUR blockade has potent anti-tumor activities in human renal cell carcinoma both in vitro and in vivo. Annual meeting of the American Urological Association (AUA), April 25-30, 2009, Chicago, IL, USA. Moderated poster session.

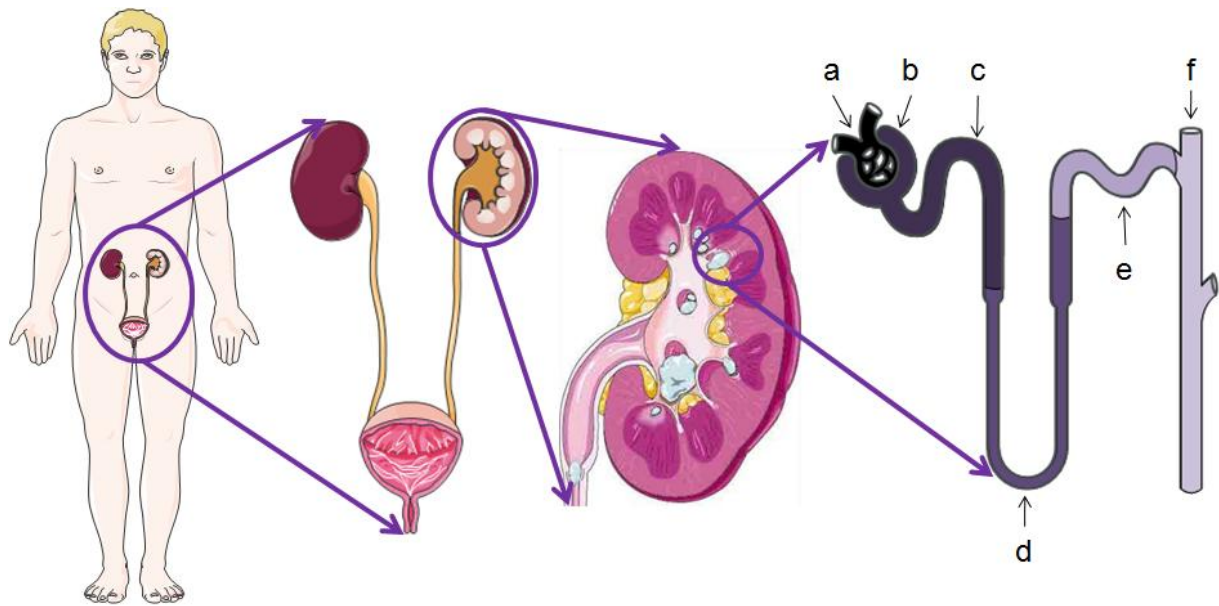


Figure 1. Physiologie rénale et cancers du rein

Localisation du tractus uro-génital chez l'homme, agrandissement sur un rein puis sur l'unité morpho-fonctionnelle, le néphron, avec ces différentes parties : le glomérule (a), la capsule de Bowman (b), le tubule contourné proximal (c), la anse de Henlé (d), le tubule contourné distal (e) et le tube collecteur (f). Les CCR trouvent leur origine dans le tubule rénal, principalement au niveau du tubule contourné proximal et du canal collecteur.

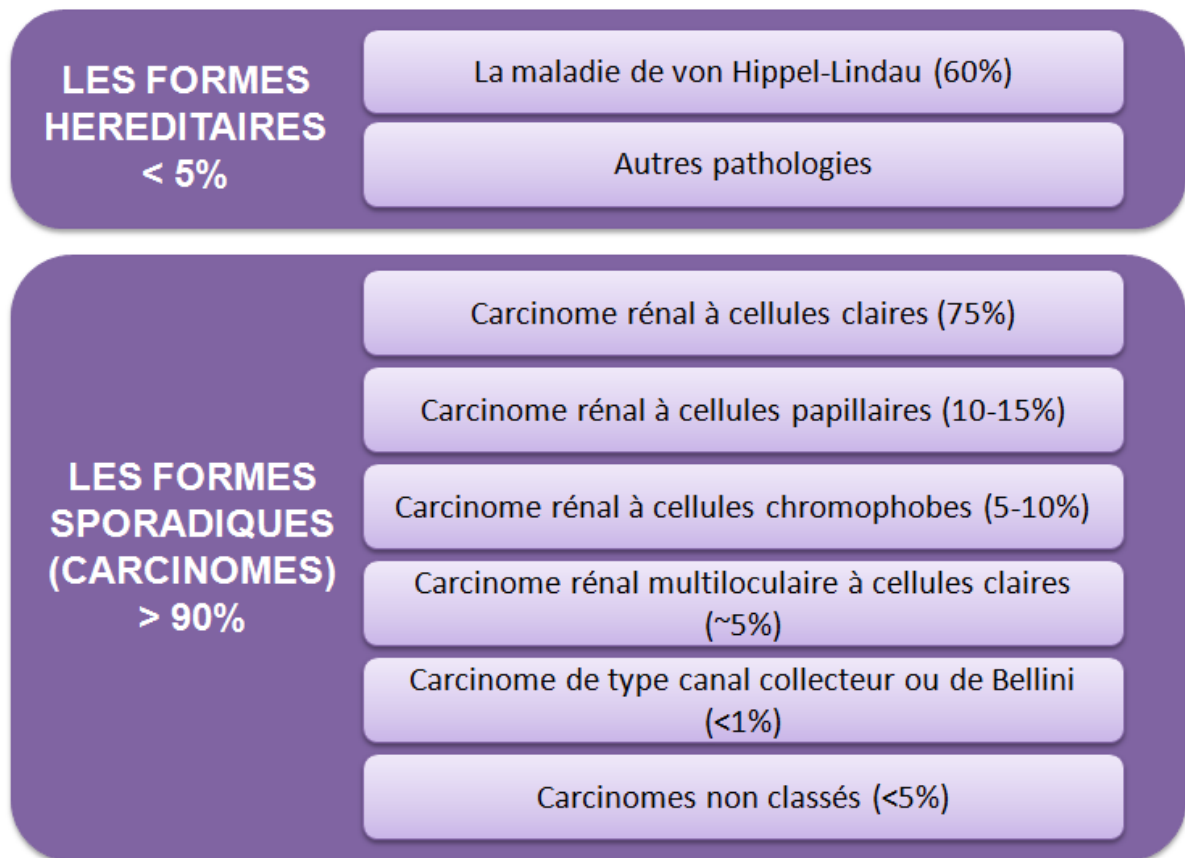


Tableau 1. Classification des cancers du rein

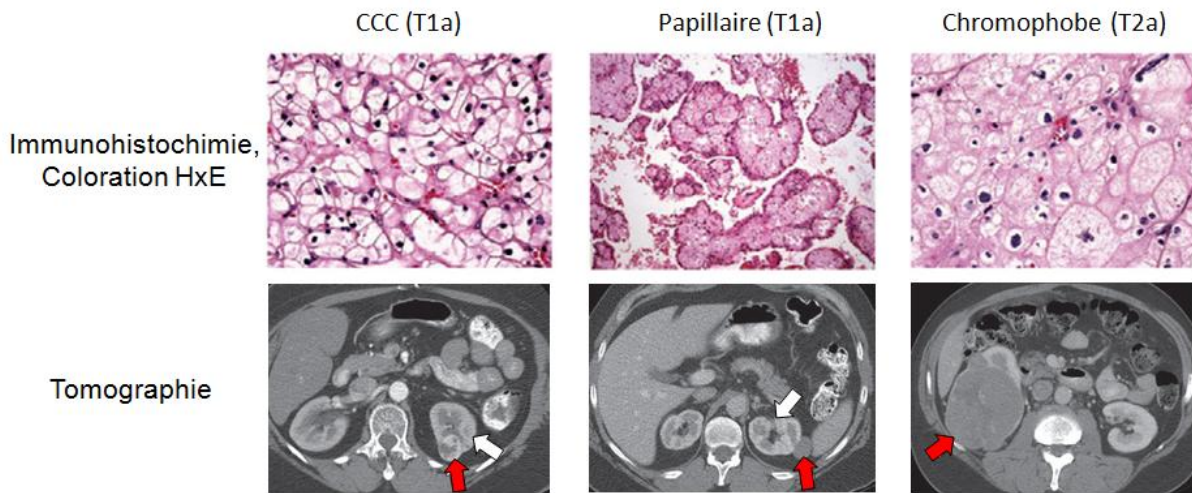


Figure 2. Histologie des CCR

Caractéristiques histologiques et imagerie des 3 principaux types de CCR. Les flèches blanches indiquent la localisation du rein et les flèches rouges indiquent la position de la tumeur rénale. *D'après B.I. Rini et al. (2009). Renal Cell Carcinoma. Lancet; 373: 1119–32.*

T	Tumeur primitive
pTx	Non déterminée / non évaluable
pT0	Absente
pT1	Limitée au rein, ≤ 7cm
pT1a	≤ 4cm
pT1b	> 4cm mais ≤ 7cm dans sa plus grande dimension
pT2	> 7cm
pT3	Étendue
pT3a	envahissement de la graisse périrénale et/ou de la surrénale
pT3b	envahissement de la veine rénale et/ou de la veine cave sous-diaphragmatique
pT3c	envahissement de la veine cave sus-diaphragmatique
pT4	Étendue au fascia de Gerota
N	Adénopathies régionales (hilaires, para-aortiques abdominaux et paracaves)
Nx	Non déterminées / non évaluables
N0	Pas de métastases ganglionnaires
N1	Métastase au niveau d'un seul site
N2	Métastases au niveau de plusieurs sites
M	Métastases à distance
Mx	Non déterminées / non évaluables
M0	Absentes
M1	Métastase (s) à distance

Tableau 2. La classification pTNM





Stade	Classification TNM	Description	Figure	Taux de survie à 5 ans (moyenne)
Stade I	T1a > T1b, N0, M0	Tumeur ≤ 7cm et restreinte au rein. Pas de dissémination au niveau des ganglions lymphatiques ou des organes distants		80-100% (85)
Stade II	T2, N0, M0	Tumeur > 7 cm et restreinte au rein. Pas de dissémination au niveau des ganglions lymphatiques ou des organes distants		70-80% (75)
Stade III	T1a > T3b, N1, M0 T3a > T3c, N0, M0	Tumeur disséminée au niveau d'un ganglion lymphatique proche mais un seul et pas au niveau d'autres organes ET tumeur non disséminée au niveau des ganglions lymphatiques mais au niveau des glandes surrénales, du tissu adipeux autour du rein ou dans la veine cave		0-80% (50)
Stade IV	T4, N0-N1, M0 Tx, N2, M0 Tx, Nx, M1	Tumeur disséminée dans le tissu adipeux et à l'intérieur de la capsule de Gerota ET tumeur disséminée au niveau de plus d'un ganglion lymphatique proche du rein ET tumeur disséminée au niveau d'un ou plusieurs ganglions distants ou au niveau d'un ou plusieurs organes distants		0-20% (10)

Tableau 3. Classification des CCR

Score	Description
0	Pas de différences avec l'état précédent la maladie
1	Activité physique diminuée mais pas d'impotence. Travail sédentaire possible
2	Pas d'impotence et soins personnels. Incapacité à travailler. Alité ou en chaise moins de 50% du temps éveillé
3	Impotence partielle. Alité ou en chaise plus de 50% du temps éveillé
4	Impotence totale. Alité ou en chaise
5	Mort

Tableau 4. L'ECOG performance status

Score (%)	Signes et symptômes
100	Aucun signes
90	Activité normale. Apparitions des premiers signes de la maladie
80	Activité normale malgré quelques difficultés. Plusieurs manifestations symptomatiques de la maladie
70	Autonomie totale. Activité physique diminuée et incapacité à travailler
60	Impotence partielle
50	Aide indispensable. Soins médicaux réguliers
40	Impotence sévère. Soins médicaux et aide particulière permanents
30	Impotence totale. Prise en charge par l'hôpital recommandée mais aucun risque de mort
20	Admission en hôpital nécessaire. Traitement et surveillance obligatoires.
10	Stades terminaux. Progression très rapide et fatale de la maladie
0	Mort

Tableau 5. L'échelle de Karnofsky

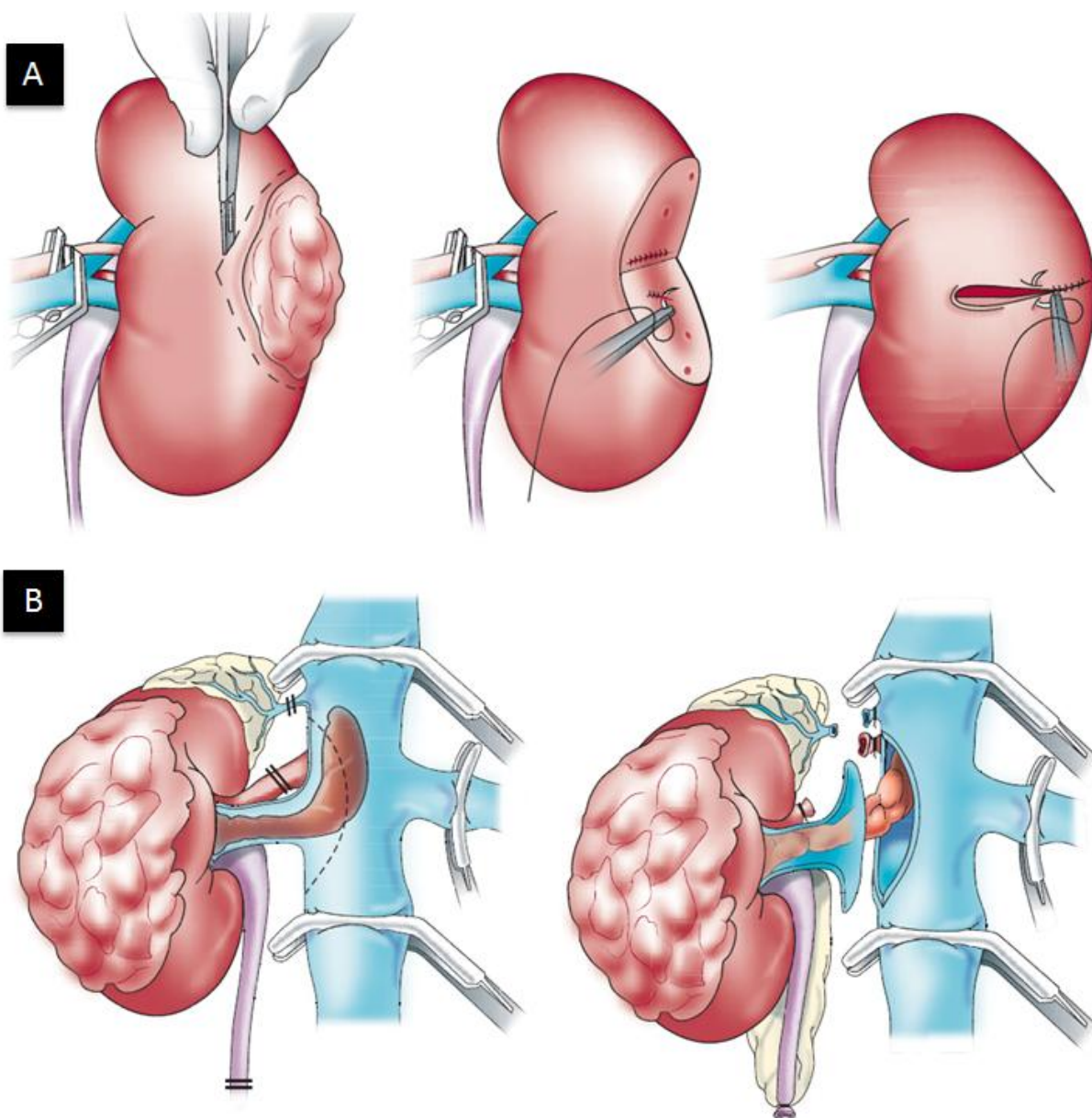


Figure 3. Chirurgie du CCR

Il existe deux principaux types de chirurgie d'exérèse. (A) Exérèse partielle d'une tumeur localisée avec occlusion temporaire du système vasculaire puis reconstruction du rein. (B) Exérèse totale du rein après clampage de l'artère rénale et du réseau veineux. La veine rénale est excisée et l'excision est étendue jusqu'à la veine cave inférieure. Des sutures sont effectuées après que le rein ait été retiré. *D'après B.I. Rini et al. (2009). Renal Cell Carcinoma. Lancet; 373: 1119-32.*

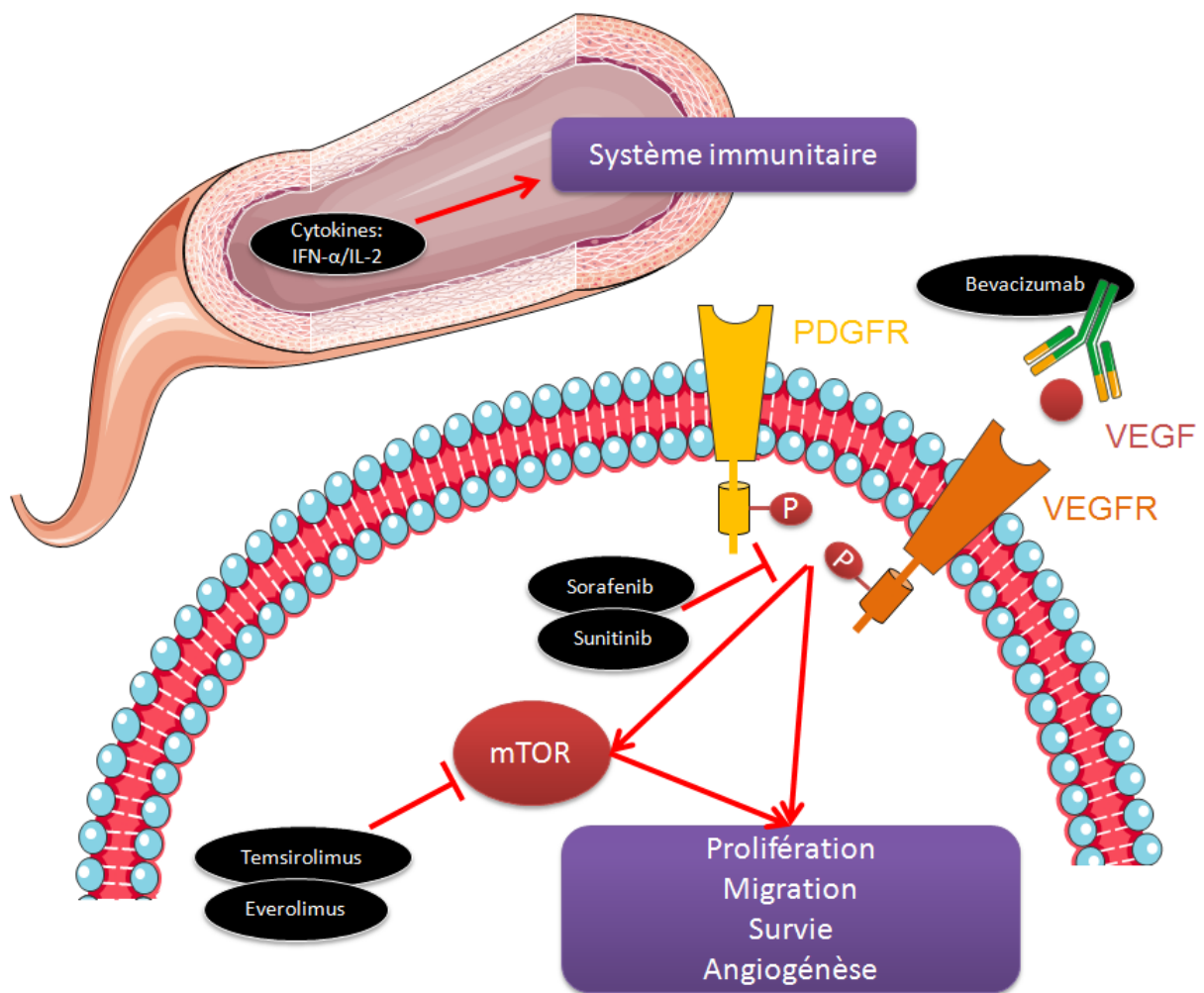


Figure 4. Les traitements du CCR

L'arsenal thérapeutique actuel pour le CCR est constitué de l'immunothérapie par les cytokines (IFN- α et IL-2) stimulant le système immunitaire pour contrer la croissance tumorale. Les thérapies ciblées agissent notamment sur les voies du PDGF et du VEGF avec le bevacizumab, le sorafenib ou encore le sunitinib, et plus en aval directement sur mTOR avec le temsirolimus et l'everolimus.

IFN- α , interféron- α ; IL-2, interleukine-2 ; mTOR, mammalian target of rapamycin ; PDGF, platelet-derived growth factor ; VEGF, vascular endothelium growth factor.

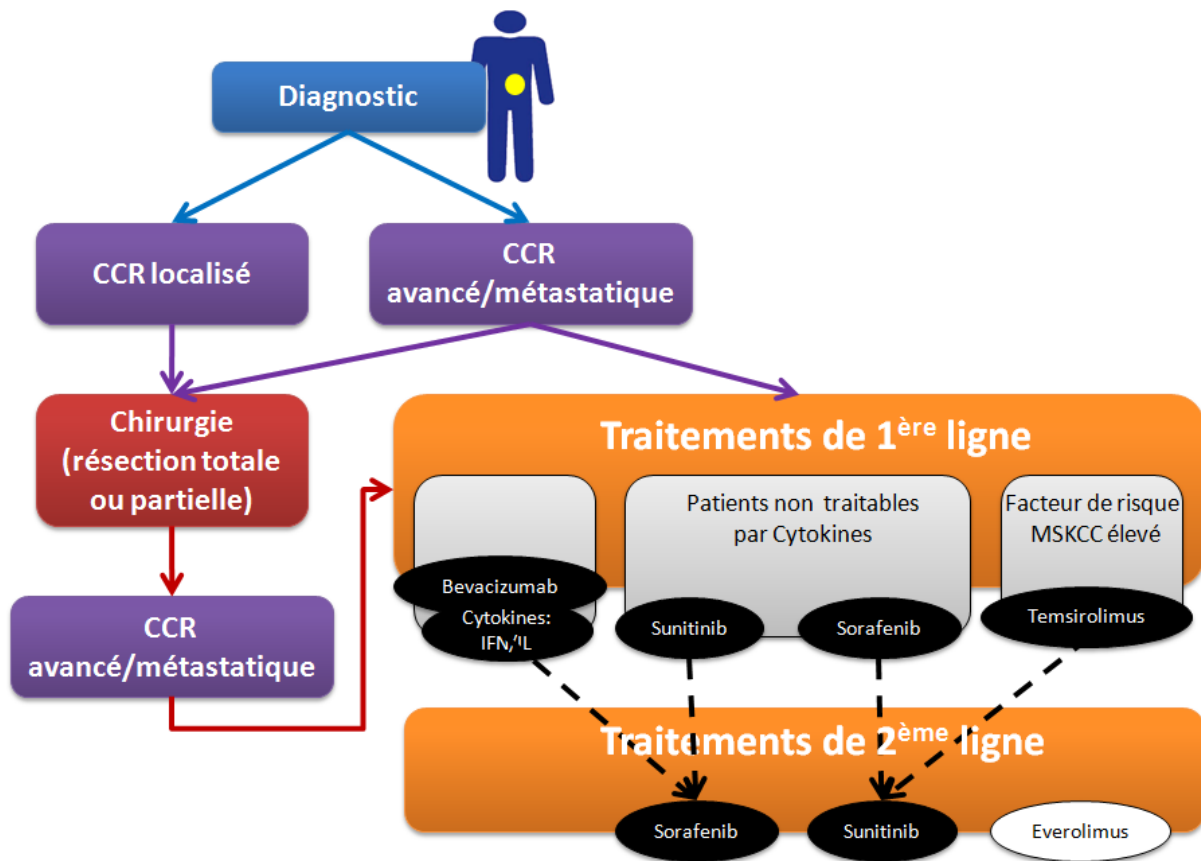


Figure 5. Schéma classique clinique et thérapeutique du CCR

En simplifiant au maximum, au diagnostic, deux situations se présentent : le patient est atteint d'un CCR localisé ou d'un CCR métastatique. Dans tous les cas, une chirurgie d'exérèse est réalisée. Puis dans le cas d'apparition de métastases ou si la tumeur primaire s'est déjà dispersée, un traitement adapté à chaque patient en fonction de différents critères histologiques, cliniques et génétiques est proposé.

Nom de l'essai clinique	Auteurs	Journal de publication
Phase 3 trial of <u>everolimus</u> for metastatic renal cell carcinoma : final results and analysis of prognostic factors.	Motzer RJ, et al.; for the RECORD-1 Study Group	Cancer. 2010 Jun 14. [Epub ahead of print]
Phase II trial of <u>bevacizumab</u> and <u>everolimus</u> in patients with advanced renal cell carcinoma.	Hainsworth JD, et al.	J Clin Oncol. 2010 May 1;28(13):2131-6. Epub 2010 Apr 5.
Phase III trial of <u>bevacizumab plus interferon alfa</u> versus <u>interferon alfa</u> monotherapy in patients with metastatic renal cell carcinoma: final results of CALGB 90206.	Rini BI, et al.	J Clin Oncol. 2010 May 1;28(13):2137-43. Epub 2010 Apr 5.
Phase III trial of <u>bevacizumab plus interferon alfa-2a</u> in patients with metastatic renal cell carcinoma (AVOREN): final analysis of overall survival.	Escudier B, et al.	J Clin Oncol. 2010 May 1;28(13):2144-50. Epub 2010 Apr 5.
<u>Interferon alfa-2a</u> versus combination therapy with <u>interferon alfa-2a, interleukin-2, and fluorouracil</u> in patients with untreated metastatic renal cell carcinoma (MRC RE04/EORTC GU 30012): an open-label randomised trial.	Gore ME, et al.	Lancet. 2010 Feb 20;375(9715):641-8. Epub 2010 Feb 10.
Study comparing <u>bevacizumab plus temsirolimus</u> versus <u>bevacizumab plus interferon-alpha</u> in advanced renal cell carcinoma subjects (INTORACT).	Printz C.	Cancer. 2010 Jul 2;116(14):3309. [Epub ahead of print]
<u>Sunitinib</u> in patients with metastatic renal cell carcinoma: Birmingham experience.	Ansari J, et al.	Oncol Rep. 2010 Aug;24(2):507-10.
Long-term stable disease in metastatic renal cell carcinoma: <u>sorafenib</u> sequenced to <u>sunitinib</u> and <u>everolimus</u> : a case study.	Beck J, et al.	Med Oncol. 2010 Jul 1. [Epub ahead of print]
A phase II clinical trial of <u>ixabepilone</u> (Ixempra; BMS-247550; NSC 710428), an epothilone B analog, in patients with metastatic renal cell carcinoma.	Huang H, et al.	Clin Cancer Res. 2010 Mar 1;16(5):1634-41. Epub 2010 Feb 23.
An early phase II trial of <u>S-1</u> in Japanese patients with cytokine-refractory metastatic renal cell carcinoma.	Naito S, et al.	Cancer Chemother Pharmacol. 2010 Feb 16. [Epub ahead of print]
Phase I/II Trial of <u>Sunitinib</u> Plus <u>Gefitinib</u> in Patients With Metastatic Renal Cell Carcinoma.	Motzer RJ, et al.	Am J Clin Oncol. 2010 May 3. [Epub ahead of print]
A pilot clinical trial testing <u>mutant von Hippel-Lindau peptide</u> as a novel immune therapy in metastatic renal cell carcinoma.	Rahma OE, et al.	J Transl Med. 2010 Jan 28;8:8.
<u>Pazopanib</u> in locally advanced or metastatic renal cell carcinoma: results of a randomized phase III trial.	Sternberg CN, et al.	J Clin Oncol. 2010 Feb 20;28(6):1061-8. Epub 2010 Jan 25.
Phase 1 trial of <u>allogeneic gene-modified tumor cell vaccine RCC-26/CD80/IL-2</u> in patients with metastatic renal cell carcinoma.	Buchner A, et al.	Hum Gene Ther. 2010 Mar;21(3):285-97.
A clinical phase I/II trial with the <u>monoclonal antibody cG250 (RENCAREX((R)))</u> and <u>interferon-alpha-2a</u> in metastatic renal cell carcinoma patients.	Siebels M, et al.	World J Urol. 2010 May 30. [Epub ahead of print]
Comparison of <u>laparoendoscopic single-site radical nephrectomy</u> with <u>conventional laparoscopic radical nephrectomy</u> for localized renal-cell carcinoma.	Park YH, et al.	J Endourol. 2010 Jun;24(6):997-1003

- Essais cliniques avec des traitements indiqués dans le cancer du rein pour étudier une nouvelle association et/ou une indication pour un groupe de patients particulier.
- Essais cliniques avec de nouvelles molécules ou comparant des techniques de chirurgie dans le cancer du rein.

Tableau 6. CCR et essais cliniques : les études du premier semestre 2010

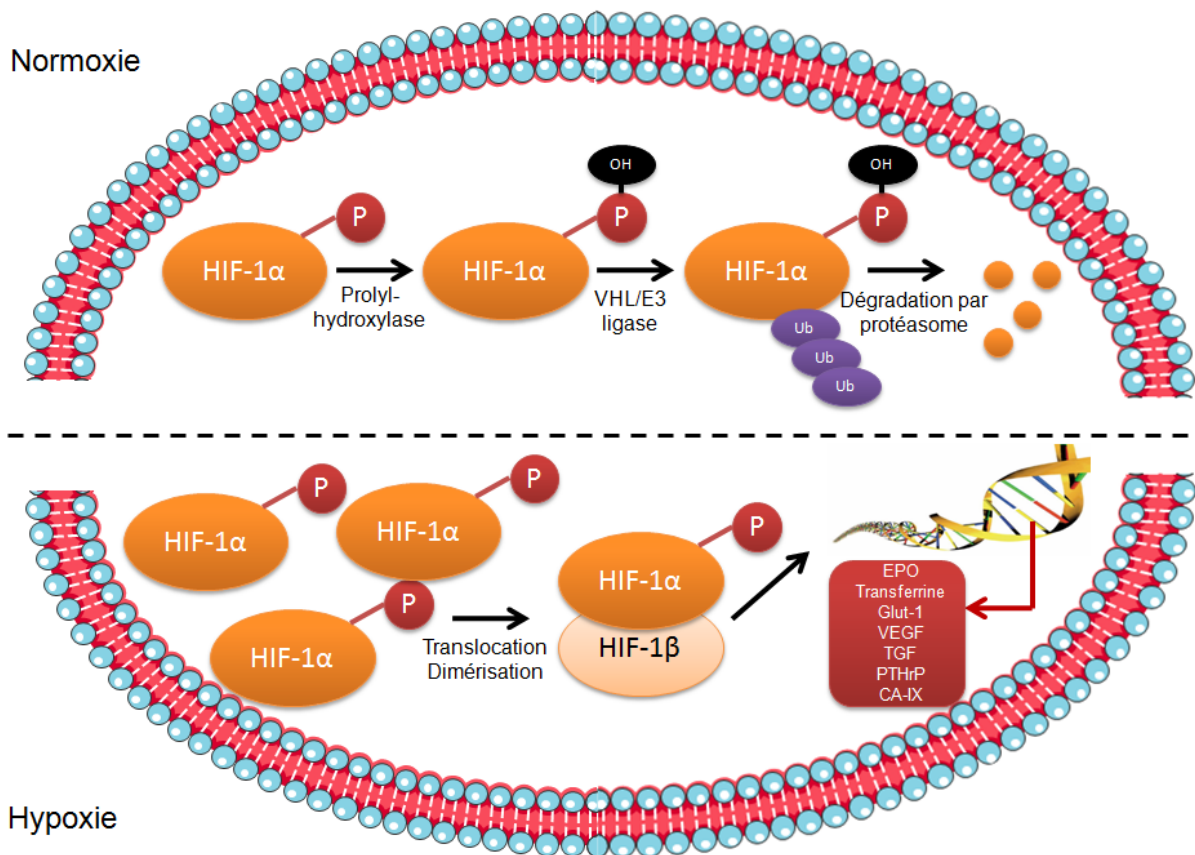


Figure 6. Le système VHL/HIF

A la base des dernières avancées thérapeutiques, la compréhension du système VHL/HIF demeure un axe de recherche important dans le cadre du CCR. En condition normoxique, les facteurs HIFs sont dégradés au niveau du protéasome par un complexe intégrant notamment VHL et une ligase. En condition hypoxique, comme c'est le cas lors de l'apparition d'un cancer, les facteurs HIFs en excès ne sont plus dégradés et s'accumulent pour finalement se dimériser et stimuler la transcription de gènes impliqués dans la prolifération, la migration ou l'apoptose. Lorsque le VHL est inactivé, ce qui est le cas dans la majorité des CCC, HIFs n'est plus dégradé quelle que soit la disponibilité en oxygène dans la tumeur.

CA-IX, anhydrase carboxylase IX ; EPO, érythropoïétine ; Glut-1, Glucose transporteur-1 ; HIF, Facteur induit par l'hypoxie ; PTHrP, Protéine apparentée à l'hormone parathyroïdienne ; TGF, transforming growth factor ; VEGF, vascular endothelium growth factor.

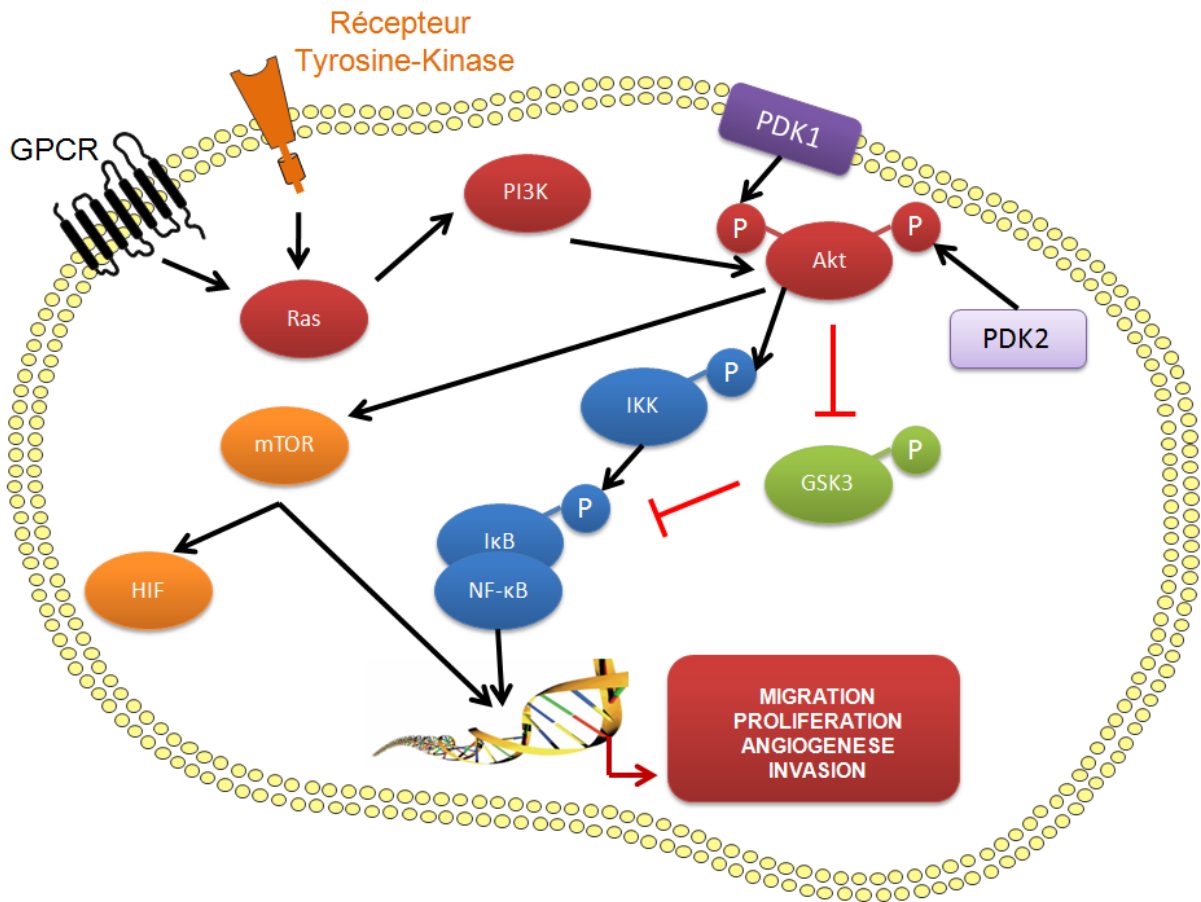


Figure 7. Les voies oncogéniques impliquées dans le CCC

De récents travaux menés au sein du laboratoire ont mis en évidence l'implication de l'axe PI3K/Akt et de la protéine mTOR dans les processus de prolifération et de migration cellulaire pour expliquer la croissance tumorale du CCC.

Akt, serine/threonine protein kinase ; *GPCR*, G protein-coupled receptor ; *GSK3*, Kinase glycogène synthase 3 ; *HIF*, Hypoxia Induced Factor ; *IκB*, inhibitor of kappa B ; *IKK*, Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase ; *mTOR*, mammalian target of rapamycin ; *NF-κB*, Nuclear Factor κB ; *PDK*, pyruvate dehydrogenase kinase ; *PI3K*, Phosphoinositide 3-kinase.

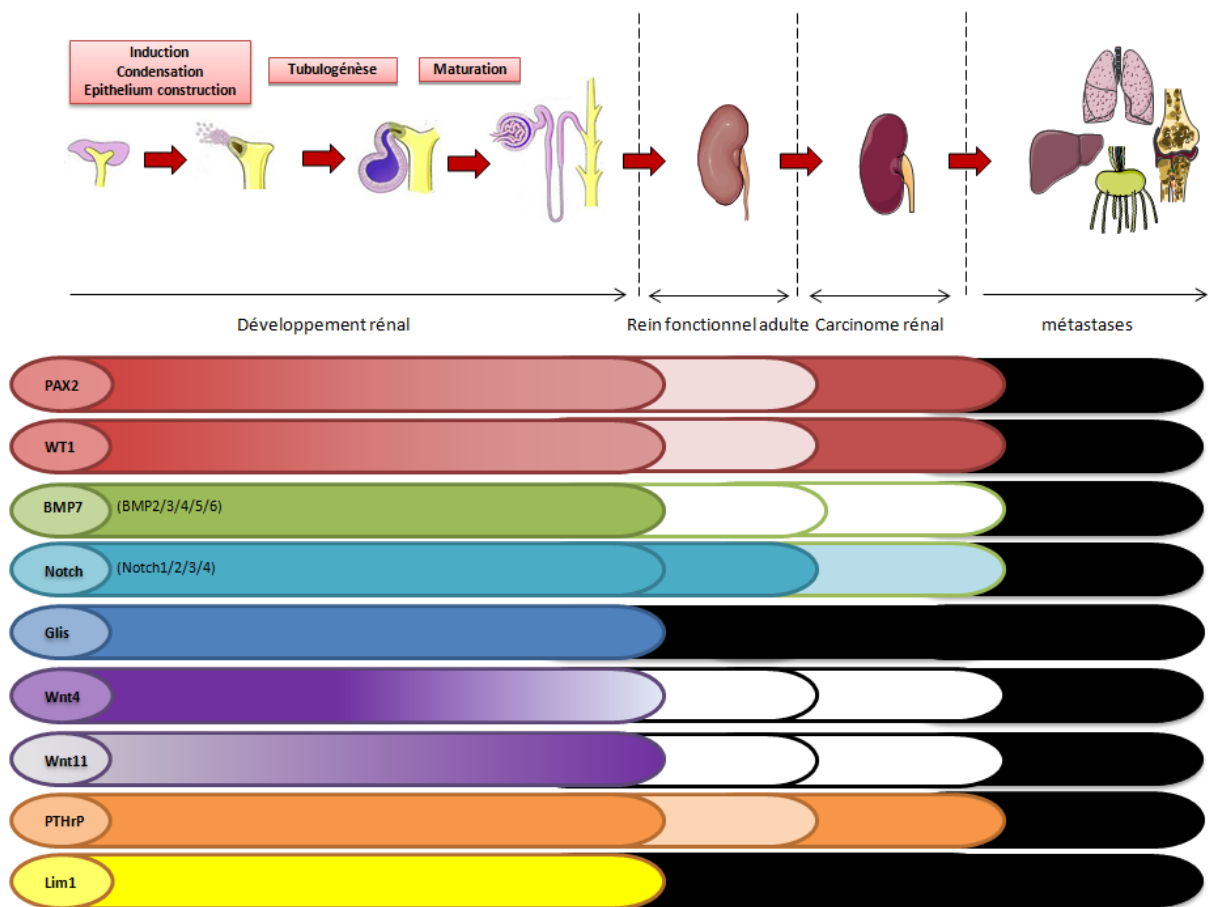


Figure 8. Développement du rein : acteurs moléculaires impliqués

Pour l'ensemble des étapes du développement rénal, de nombreux gènes jouent un rôle crucial afin de contrôler les processus cellulaires guidant la construction d'un rein fonctionnel adulte. Ces mêmes acteurs du développement peuvent intervenir dans les mécanismes cancéreux et plus loin dans la dispersion lors de l'apparition de métastases. Pour chaque protéine considérée, l'intensité de la coloration est proportionnelle à l'expression de la protéine. Une absence de couleur indique une absence de la protéine et le noir indique l'absence d'information dans le contexte scientifique du début de thèse.

BMP4, Bone morphogen protein-4 ; Gli, Glioma-associated oncogene homolog ; Lim1, LIM-class homeobox gene 1 ; PAX2, Paired box gene 2 ; PTHrP, Protéine apparentée à l'hormone parathyroïdienne ; WT1, Wilms' tumor suppressor gene.

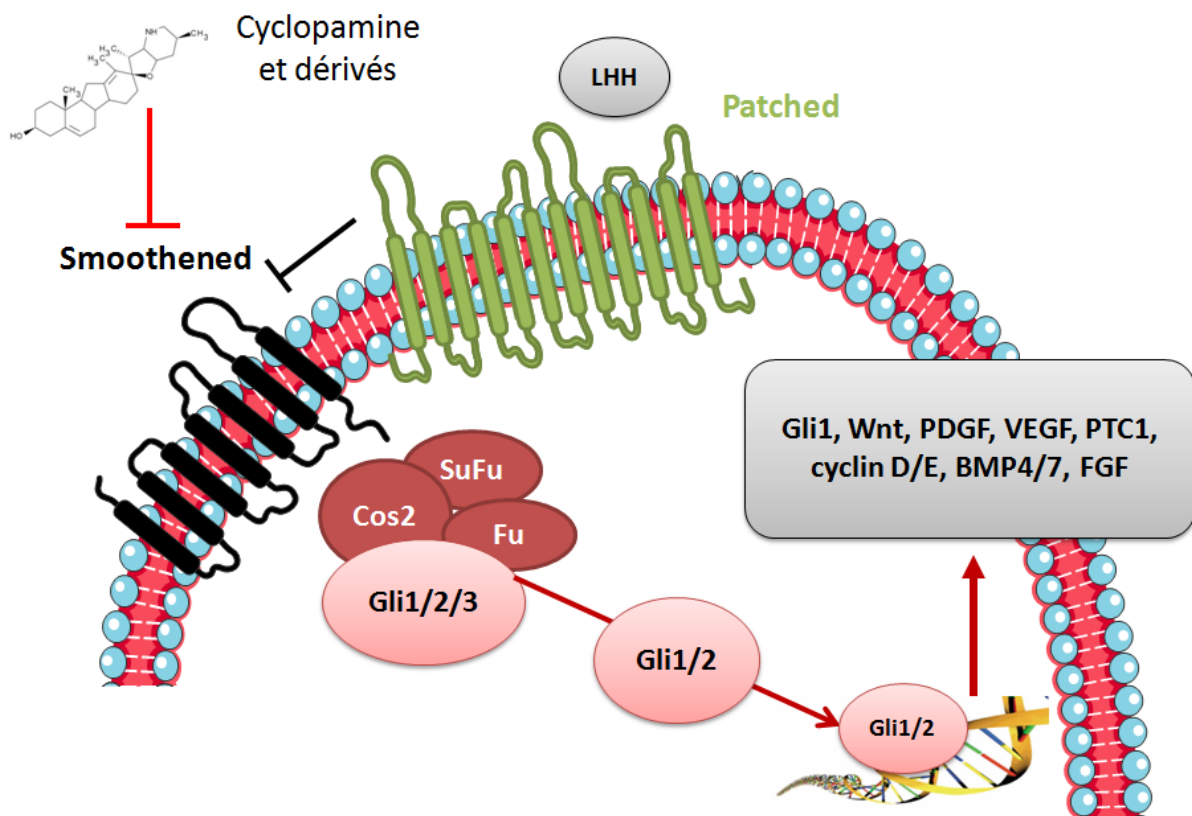


Figure 9. Description de la voie HH

En absence du ligand de la voie HH, le récepteur patched réprime l'activité de smoothened. En présence du ligand, la voie HH est activée par levée de l'inhibition de patched sur smoothened, les facteurs de transcription Glis vont être activés et selon leur régulation, ils vont pouvoir activer la transcription de leurs gènes cibles. La cyclopamine ainsi que ses dérivés agissent en tant qu'inhibiteur de la voie HH en supprimant l'activité du récepteur smoothened.

BMP, Bone morphogen protein ; Cos2, costal2 ; FGF, fibroblast growth factor ; Fu, fused homolog ; Gli, Glioma-associated oncogene homolog ; LHH, ligand hedgehog ; PDGF, platelet-derived growth factor ; SuFu, suppressor of fused homolog ; VEGF, vascular endothelium growth factor.

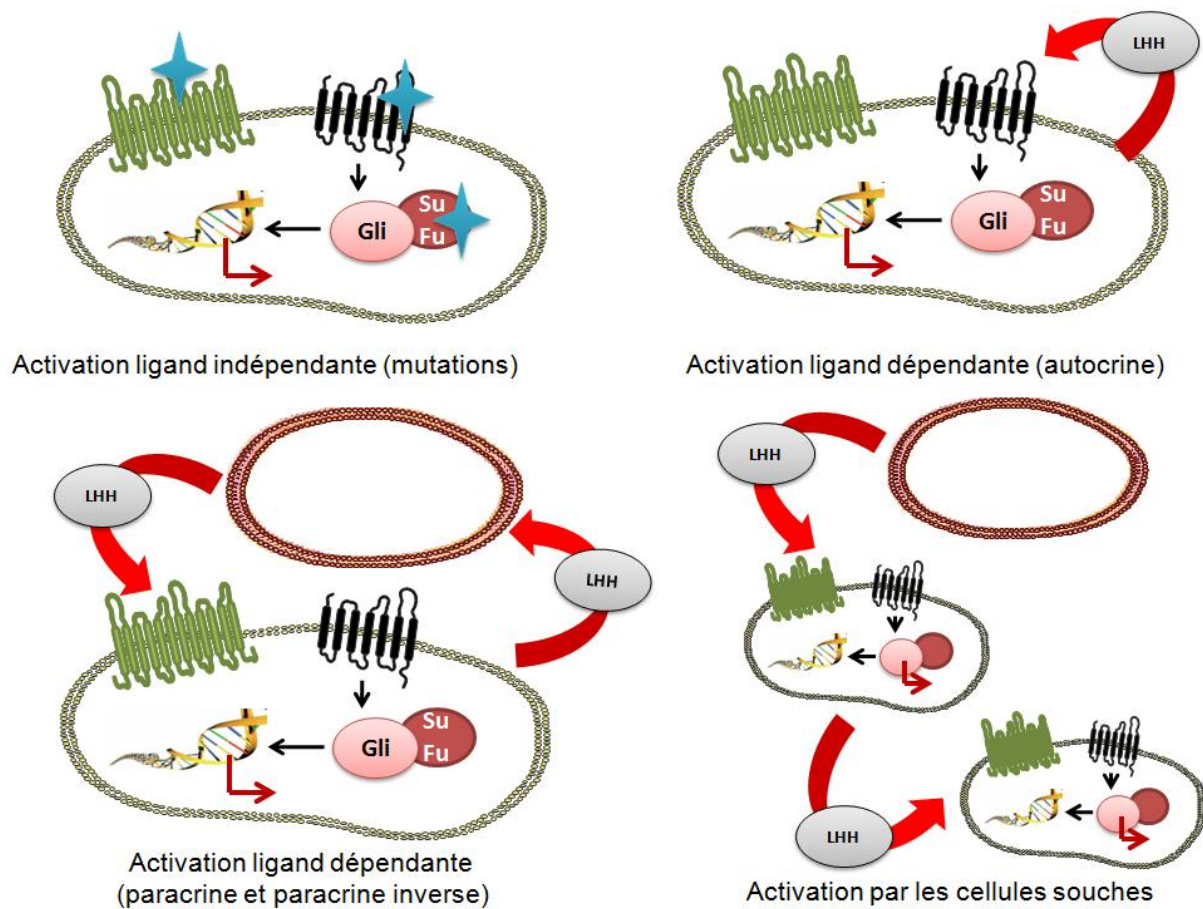


Figure 10. La voie HH dans le cancer

Quatre modalités d'activation de la voie HH ont été décrites concernant le cancer. Une activation indépendante du ligand due à une modification de l'un ou l'autre des récepteurs de la voie en raison de mutations. Une activation nécessitant la présence du ligand sur son récepteur, le ligand étant produit par la cellule cancéreuse elle-même (autocrine), ou par une autre cellule (paracrine et paracrine inverse). Finalement une activation en cascade via la libération du ligand par des cellules souches.

Gli, Glioma-associated oncogene homolog ; *LHH*, ligand hedgehog ; *SuFu*, suppressor of fused homolog.

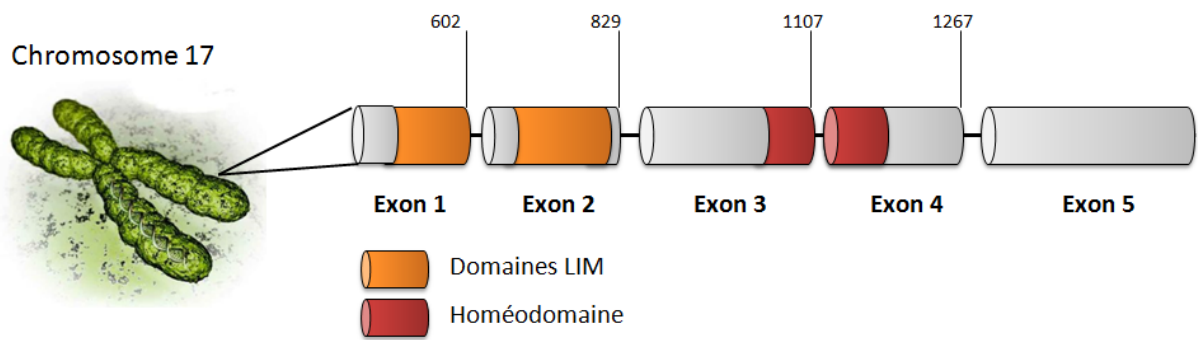


Figure 11. Structure du gène Lhx1

Le gène Lhx1 se situe sur le chromosome 17 humain. Il contient 5 exons séparés par 4 introns de taille variable. Les domaines LIM sont intégralement dans l'exon 1 et l'exon 2 tandis que l'homéodomaine est compris entre les exons 3 et 4.

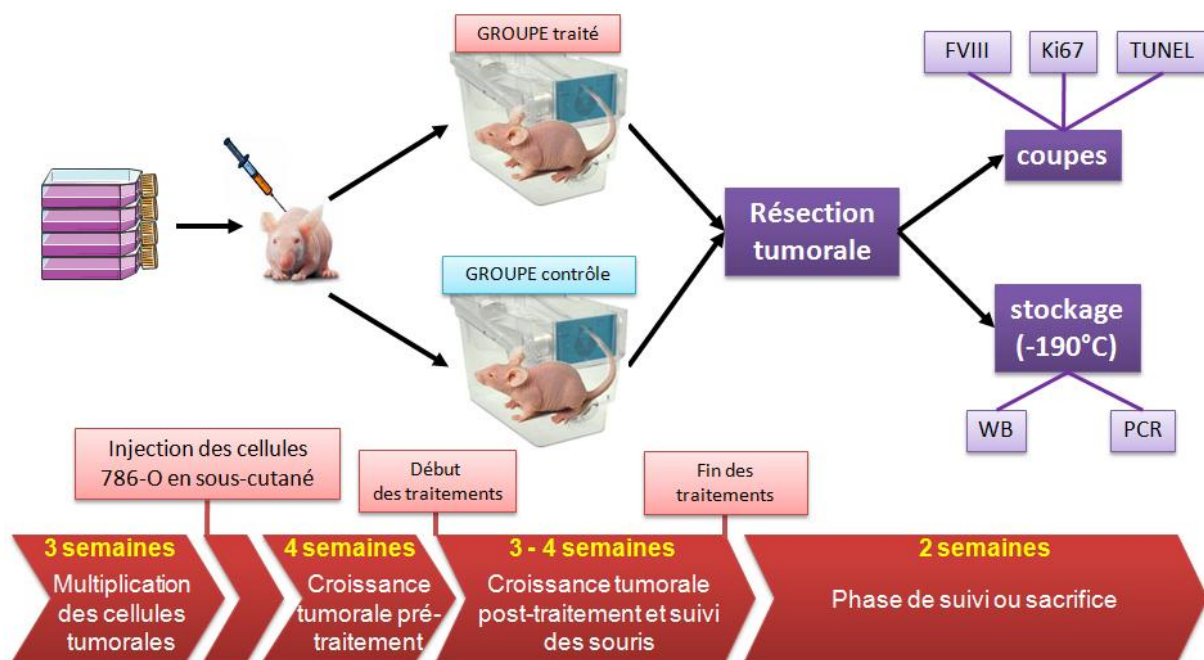


Figure 12. Protocole d'implantation de xénogreffes et de traitement des souris nude

Les cellules 786-O sont cultivées dans des flasques de 75 cm² jusqu'à confluence. Dix millions de cellules sont injectées en sous cutané dans les souris nude. Après 4 semaines, les tumeurs ont atteint un volume de 100 mm³ ce qui permet d'initier les traitements. Les souris sont séparées en plusieurs groupes, des groupes contrôle et des groupes qui recevront le ou les traitements analysés. A l'issue de la période de traitement, les souris sont anesthésiées et la tumeur est prélevée afin de réaliser des coupes histologiques et des analyses biochimiques.

Gène	Amorce sens (5'>3')	Amorce anti-sens (3'>5')
GAPDH	GCAAGTGGCATGGACTG	GGAAGGTGAAGGTCGGAGTC
GLI1	GTGCAAGTCAAGCCAGAACA	ATAGGGGCCTGACTGGAGAT
GLI2	TTTATGGGCATCCTCTCTGG	AAGGCTGGAAAGCACTGTGT
GLI3	CTTGCAAGCCAGGAGAAAC	TGTTGGACTGTGTGCCATTT
SHH	GCTCGGTGAAAGCAGAGAAC	CCAGGAAAGTGAGGAAGTCG
PATCHED	TCTCGGATCATTGTGATGGA	AGGCTCAGCACTAGGCATGT
SMOOTHENED	CAACCTGTTTGCCATGTTTG	CTCTTCTTGATCCGCTTTGG
pCM6-XL5	GTGAAACCCCGTCTCTACCA	CTATTGGGAACCAAGCTGGA
Lhx1	CTTCTCCGGTGTTCGGTA	TCATGCAGGTGAAGCAGTTC

Tableau 7. Liste des amorces utilisées dans les études

Anticorps	Sources	Dilution
β-actine	Monoclonal, souris, Sigma-Aldrich	1/5000
GAPDH	Monoclonal, souris, Millipore	1/5000
α-tubuline	Monoclonal, souris, abcam	1/5000
Akt total	Monoclonal, souris, Millipore	1/250
Phospho-Akt (S473)	Monoclonal, souris, Millipore	1/200
GSK3_{α/β} total	Monoclonal, lapin, Millipore	1/500
Phospho-GSK3_{α/β} (Ser21/9)	Polyclonal, lapin, Cell Signaling	1/500
NF-κB total	Polyclonal, lapin, Millipore	1/250
Phospho-NF-κB (S468)	Polyclonal, lapin, Cell Signaling	1/250
ERK1/2 total	Polyclonal, lapin, Cell Signaling	1/500
Phospho-ERK1/2	Monoclonal, souris, Millipore	1/500
SHH	Polyclonal, lapin, Santa Cruz Biotechnology	1/500
Gli1	Polyclonal, lapin, Millipore	1/500
Cycline D1	Polyclonal, lapin, Cell Signaling	1/500
Pax2	Polyclonal, lapin, abcam	1/500
Lim1	Polyclonal, lapin, Millipore	1/500
VEGF	Monoclonal, souris, Millipore	1/1000
TGFβ1	Polyclonal, lapin, Santac Cruz Biotechnology	1/1000
Paxilline	Monoclonal, souris, Invitrogen	1/500
Fibronectine	Monoclonal, souris, Cell Signaling	1/500
Tenascine-C	Monoclonal, souris, Cell signaling	1/500
MMP9	Monoclonal, lapin, Millipore	1/500

Tableau 8. Liste des anticorps utilisés dans les études

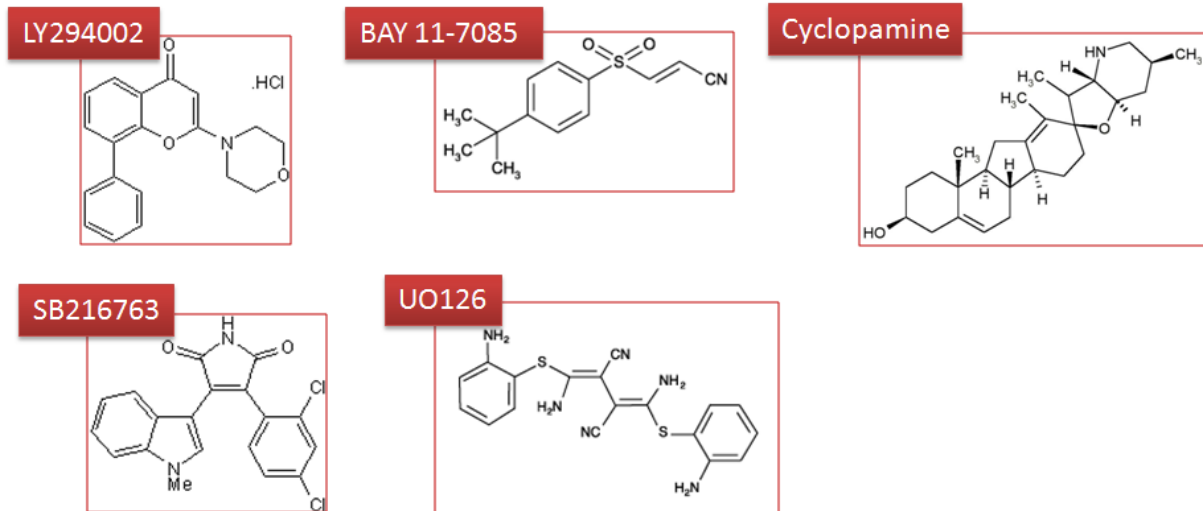


Figure 13. Les inhibiteurs des différentes voies étudiées

Structure des agents pharmacologiques utilisés pour réaliser les différentes études présentées dans cette thèse : le LY294002 ($C_{19}H_{17}NO_3$), inhibiteur de la voie PI3K/Akt ; le BAY11-7085 ($C_{13}H_{15}NO_2S$), inhibiteur de NF- κ B ; la cyclopamine ($C_{27}H_{41}NO_2$), inhibiteur de la voie HH ; le SB216763 ($C_{19}H_{12}N_2O_2Cl_2$), inhibiteur de GSK3 et le UO126 ($C_{18}H_{16}N_6S_2$), inhibiteur des MAPK.