



HAL
open science

Physiologie autocrine et potentiel oncogénique de l'hormone de croissance

Hichem Claude Mertani

► **To cite this version:**

Hichem Claude Mertani. Physiologie autocrine et potentiel oncogénique de l'hormone de croissance. Physiologie [q-bio.TO]. Université Claude Bernard - Lyon I, 2006. tel-00129746

HAL Id: tel-00129746

<https://theses.hal.science/tel-00129746>

Submitted on 8 Feb 2007

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

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

PHYSIOLOGIE AUTOCHRINE ET
POTENTIEL ONCOGENIQUE DE
L'HORMONE DE CROISSANCE

Mertani Hichem-Claude

Physiologie Intégrative cellulaire et Moléculaire

CNRS UMR 5123

Université Claude Bernard Lyon I

Villeurbanne, France

Habilitation à Diriger des Recherches

*Présentée avec la permission de la direction de la Recherche
et des Etudes Doctorales de l'Université Claude Bernard Lyon I*

RESUME

La croissance post natale est dépendante des effets physiologiques de l'hormone de croissance ou GH («Growth Hormone») qui se traduisent au niveau cellulaire par une augmentation de la prolifération, de la différenciation et du métabolisme. La libération pulsatile de GH hypophysaire induit une réponse cellulaire adaptée et régulée en fonction des différentes situations physiologiques et conditions homéostatiques. La transduction du signal de la GH est médiée par l'activation de la voie canonique de transduction des signaux des cytokines, Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription (JAK/STAT).

La GH est également produite en des sites extrahypophysaires par les cellules endothéliales, fibroblastiques et épithéliales suivant un mode de régulation bien distinct de celui de l'hypophyse. Cette GH ectopique synthétisée en faible quantité par rapport à la production hypophysaire ne contribue pas à l'élévation de la concentration de GH circulante et agirait comme un facteur local de régulation exerçant ses effets de façon autocrine et paracrine. L'objectif principal exposé dans ce mémoire est de comprendre le rôle physiologique et les conséquences pathologiques de la synthèse de GH autocrine. Cette problématique a été abordée depuis la cellule jusqu'à l'animal entier et expérimentalement testée par un ensemble de techniques de biologie cellulaire, moléculaire et biochimiques.

Nous avons dans un premier temps identifié certains sites de production ectopique de GH tels que les organes du système immunitaire et la glande mammaire et démontré que son expression était régulée en fonction de l'ontogenèse ou de l'état physiologique des animaux. Dans la glande mammaire de souris la GH autocrine participe à son développement en activant les mécanismes de prolifération épithéliale et en s'opposant à la différenciation lactogène. Nous avons également mis en évidence l'expression de GH humaine (hGH) dans les cellules épithéliales et fibroblastiques du sein humain et montré qu'elle était augmentée dans les cas de cancers agressifs. L'élaboration d'un modèle cellulaire de production autocrine de hGH nous a permis de caractériser en détail son rôle dans les cellules carcinomateuses mammaires. La GH induit une augmentation significative du nombre de cellules carcinomateuses par stimulation des mécanismes moléculaires de la prolifération cellulaire et par activation des mécanismes anti-apoptotiques. La production autocrine de hGH induit également une remarquable augmentation des capacités migratoires et invasives des cellules associées à un changement morphologique en type fibroblastique conjointement

à l'acquisition des marqueurs de la transition épithélio-mésenchymateuse. Nous avons par la suite démontré que les mécanismes moléculaires de la progression tumorale mammaire induite par la GH autocrine résultent de l'activation d'un programme transcriptionnel complexe médié par l'action de protéines spécifiques (CHOP, HOXA1, Cycline D1, c-Myc, Bcl-2, Catalase). Cette plateforme transcriptionnelle permet l'activation soutenue de la voie des MAPK ainsi que la stimulation des fonctions antiapoptotiques, antiradicalaires et de chimiorésistance des cellules carcinomateuses. Par la suite nous avons découvert que l'expression constante et forcée de hGH dans une lignée épithéliale mammaire humaine est suffisante pour induire leur transformation oncogénique *in vitro* et *in vivo*, suggérant que la GH pourrait exercer la fonction d'un oncogène impliqué dans les cancers du sein humains.

L'ensemble de nos travaux indique que les effets autocrines et paracrines de la GH se traduisent en situation physiologique par le développement prolifératif de l'épithélium mammaire et en conditions pathologiques stimulent la progression tumorale. L'expression constante de hGH par les cellules épithéliales mammaires humaines est potentiellement responsable de leur transformation oncogénique. L'antagonisme de la voie de transduction du signal de la GH représente donc un nouveau niveau d'intervention thérapeutique.

Abstract

Growth hormone (GH) physiological effects are responsible for post-natal body growth through the induction of cell proliferation, metabolism and differentiation. Pituitary GH is released in a pulsatile mode and induces a cellular response adapted to the variations in homeostatic conditions. The signal transduction pathway of GH is shared with the cytokine receptor superfamily and leads to the activation of the Janus Kinase / Signal Transducer and Activator of Transcription (JAK / STAT) proteins. Extrapituitary sites of GH synthesis by endothelial, fibroblastic and epithelial cells have been described and shown to be distinctly regulated from pituitary GH. This ectopic production of GH is released in small concentration, do not contribute to significant elevation of plasma GH and is thought to exert autocrine/paracrine effects.

The main objective of the work presented here was to uncover the physiological role and pathological consequences of autocrine GH using a panel of molecular techniques from the cellular level to animal studies. First, we identified extrapituitary sites of GH expression including organs of the immune system and the mammary gland and evidenced developmentally and physiologically regulated rGH expression. Autocrine GH production by mammary epithelial cells induced their proliferation and counteracted lactogenic differentiation. We also evidenced hGH gene expression in epithelial and fibroblastic cells of the human breast and shown that it was increased in cases of invasive breast cancer. We next established a model of autocrine production of hGH using human mammary carcinoma cells and demonstrated that GH induces a significant activation of cell proliferation and protection against apoptosis. Migratory and invasive capacities of carcinoma cells were also remarkably increased by autocrine hGH and associated with a morphology reminiscent to fibroblastic type and concomitant with the acquisition of epithelial-mesenchymal transition markers. Next, we demonstrated that tumour progression of human mammary carcinoma cells induced by autocrine hGH was associated with the activation of a transcriptional platform involving specific proteins (CHOP, HOXA1, Cyclin D1, c-Myc, Bcl-2, Catalase) which lead to sustained activation of the MAPK pathway as well as mechanisms of cell survival and chemoresistance. We finally demonstrated that forced expression of the hGH gene is sufficient to promote cellular transformation of human mammary epithelial cell as well as *in vivo* tumour formation suggesting that autocrine GH could act as a human oncoprotein in epithelial cells.

Our work clearly established that GH is an autocrine/paracrine factor physiologically involved in mammary epithelial cell proliferation and pathologically acting as a promoter of tumour progression. Sustained expression of autocrine hGH in human breast epithelial cells result in their oncogenic transformation suggesting the potential use of hGH receptor antagonist as adjunct therapy in human breast cancer.

REMERCIEMENTS

Le travail exposé n'est que la partie immergée et agréable des recherches et ce plaisir résulte de l'effort collectif, du talent et de la bonne volonté de très nombreuses personnes. Je tiens à remercier chaleureusement chercheurs, enseignants, médecins, post-doctorants, ingénieurs, techniciens et étudiants sans qui ce mémoire n'aurait pas existé. La liste serait longue, les oublis inévitables et je ne voudrais offenser personne.

Je veux tout d'abord renouveler mes très sincères remerciements à Mrs Bruno Allard Jean-Yves Blay, Jean-Jacques Diaz, Claude Duchamp, Joël Lachuer, Jean-Marc Péquignot et Peter Lobie pour m'avoir fait l'honneur et le privilège de juger ce travail.

Je remercie aussi tous les membres de l'UMR 5123 pour leur participation directe ou indirecte à ces travaux et sans qui rien n'aurait aboutit. En particulier Mireille Raccurt pour son dévouement à la GH autocrine et son expertise dans les cancers du sein, il n'est pas exagéré de dire qu'elle est irremplaçable. Merci à Hervé Barré et Jean-Marc Péquignot pour m'avoir accueilli au laboratoire et encouragé à développer nos recherches. Merci à Claude Duchamp et Bruno Allard pour leur confiance et encouragements en ces temps ardues. Merci à Gérard Morel pour m'avoir accueilli dans son équipe lors de ma thèse et fait découvrir le monde de la GH. Merci à Mrs Jean Chiesa, Kok-Onn Lee, Tomas Caballero et Michael Waters pour leur amitié et leur aide immense.

Merci aux étudiants thésards de Singapour (Eyleen, Ralph, Zhu, Ling, Anthony, Karmal, Christine, Isabell) de Nouvelle Zélande (Laurent, Séverine) et de Lyon (Cécile, Sahra, Elara, Sophie, Al Hassan, Jérémy, Sébastien) pour leur incommensurable aide. Un grand merci aux post-doctorants, en particulier à Dongxu Liu et Svetlana Mukhina pour nous avoir entraîné au delà de nos objectifs.

Merci à tous mes collègues enseignants chercheurs et chercheurs pour leur bonne volonté et les riches discussions malgré leur précieux temps.

Merci à Peter Lobie pour sa confiance, son amitié et sa clairvoyance.

Je tiens aussi à remercier les organismes ayant financé nos recherches, l'Institute of Molecular and Cell Biology de Singapour, l'Association de la Recherche contre le Cancer, la Ligue contre le Cancer, le Centre Hospitalo-universitaire de Nîmes, la Communauté Economique Européenne, l'Université Claude Bernard Lyon I, le ministère de la recherche et la région Rhône-Alpes.

Et les personnes de l'ombre
qui se reconnaîtront
et sans qui...

TABLE DES MATIERES

PREFACE	1
SITUATION PERSONNELLE	3
CURSUS UNIVERSITAIRE	4
PARCOURS SCIENTIFIQUE	5
PUBLICATIONS	8
ACTIVITES D'ENSEIGNEMENT, D'ENCADREMENT ET AUTRES	13
ACTIVITE DE RECHERCHE	
CONTEXTE DES RECHERCHES	14
ROLE PHYSIOLOGIQUE DE LA GH EXTRAHYPOPHYSIAIRE	
Expression de la GH dans les organes du système immunitaire	17
Expression et rôle de la GH dans les cellules épithéliales mammaires	19
PHYSIOPATHOLOGIE DE LA GH EXTRAHYPOPHYSIAIRE	
Implication de la GH dans les hépatocarcinomes humains	23
Implication de la GH dans les carcinomes mammaires humains	25
Synthèse du récepteur de la GH dans les carcinomes mammaires	28
Synthèse ectopique de hGH dans les carcinomes mammaires	29
EFFETS AUTOCRINES DE LA GH DANS LES CELLULES	
CARCINOMATEUSES MAMMAIRES HUMAINES	
Stratégie expérimentale	32
Validation du modèle cellulaire d'étude des effets autocrines de la GH	33
Modification du phénotype des cellules carcinomateuses	36
Induction de la transition épithélio-mésenchymateuse	39
MECANISMES MOLECULAIRES DE LA PROGRESSION	
TUMORALE INDUITE PAR LA GH AUTOCRINE	
Recherche des gènes cibles de la GH autocrine	44
Rôle de la protéine CHOP	46
Activation des fonctions antiradicalaires	46
Rôle de la protéine HOXA1	49
POTENTIEL ONCOGENIQUE DE LA GH	53
CONCLUSION	59

ABBREVIATIONS

BAK	"bcl-2 homologous antagonist/killer"	
BAX	"bcl2- associated X protein"	
BCL2	"B-cell leukemia/lymphoma 2"	
BCL-xL	"Bcl-2-like protein"	
CAT	"Chloramphenicol Acetyltransferase"	
CHO	"Chinese hamster ovary"	
CHOP :	"C/EBP homologous protein"	
EGF :	Facteur de croissance épidermique "Epidermal Growth Factor"	
ELISA :	"Enzyme-Linked Immunosorbent Assay"	
ERK	"extracellular signal-regulated kinases"	
FAK	"Focal adhesion kinase"	
FGF	"Fibroblast Growth Factor"	
FITC	"Fluorescein isothiocyanate"	
GAS	"Interferon- γ -activated sequence"	
GCS	Glutamine Cystéine Synthétase	
GLE		"GAS-like response element"
GHBP	"growth hormone-binding protein"	
GHR :	"Growth Hormone Receptor"	
GHRH :	"Growth Hormone-Releasing Hormone"	
GpX	Gluthation Peroxydase	
hGH :	"human Growth Hormone"	
HOXA1 :	"Homeobox protein A1"	
IGF-1 :	"Insulin-like growth factor-1"	
IL	"Interleukin"	
IRS :	"Insulin Receptor Substrate"	
JAK :	"Janus Kinase"	
MAPK :	"Mitogen Activated Protein Kinase"	
MCF7 :	"Mammary Carcinoma Fibroblast 7"	
MEC	Matrice extracellulaire	
MEK	"MAPK kinase"	
mGH :	"mouse Growth Hormone"	
MMP :	"Matrix Métalloprotéases "	
MT	Metallothionéine	
NLS :	Séquence signal de localisation nucléaire "nuclear localisation signal"	
PAGE	"Polyacrylamide gel electrophoresis"	
PAX :	"Paired box"	
PI-3K :	"Phosphatidylinositol 3' Kinase"	
Ras :	"rat Rous sarcoma virus oncogene"	
ROS	"Reactive Oxygen Species"	
RT-PCR :	"Reverse Transcriptase- Polymerase Chain Reaction"	
SCID	"Severe Combined Immunodeficiency"	
SIE	"v-sis inducible element"	
SH2	"Src homology 2"	
SOCS :	"Suppressor Of Cytokine Signalling"	
SOD	Superoxyde Dismutase	
Src :	"Rous sarcoma virus"	
STAT :	"Signal Transducer and Activator of Transcription"	
TA	Tissu adipeux	
TEM :	Transition épithélio-mésenchymateu	

PUBLICATIONS

1. **Mertani HC**, Waters MJ, Jambou R, Gossard F, Morel G 1994 Growth hormone receptor/binding protein in rat anterior pituitary. *Neuroendocrinology* 59:483-494
2. Delehaye-Zervas MC, **Mertani HC**, Martini JF, Nihoul-Fekete C, Morel G, Postel-Vinay MC 1994 Expression of the growth hormone receptor gene in human digestive tissues. *J Clin Endocrinol Metab* 78:1473-1480
3. Lobie PE, **Mertani HC**, Morel G, Morales-Bustos O, Norstedt G, Waters MJ 1994 Receptor mediated nuclear translocation of growth hormone. *J Biol Chem* 269:21330-21339
4. Waters MJ, Rowlinson SW, Clarkson RW, Chen CM, Lobie PE, Norstedt G, **Mertani HC**, Morel G, Brinkworth R, Wells CA, Bastiras S, Robins AR, Muscat GE, Barnard RT 1994 Signal transduction by the growth hormone receptor. *Proc Soc Exp Biol Med* 206:216-220
5. **Mertani HC**, Delehaye-Zervas MC, Martini JF, Postel-Vinay MC, Morel G 1995 Localization of growth hormone receptor messenger RNA in human tissues. *Endocrine* 3:135-142
6. **Mertani HC** and Morel G 1995 In situ gene expression of the growth hormone receptor/binding protein in adult male rat. *Mol Cell Endocrinol* 109:47-61
7. Lobie PE, Morel G, **Mertani HC**, Morales-Bustos O, Wood TJJ, Waters MJ, Norstedt G 1995 The growth hormone receptor, growth hormone and the nucleus. *Endocrinol Metab* 2:61-72
8. **Mertani HC**, Pechoux C, Garcia-Caballero T, Waters MJ, Morel G 1995 Cellular localization of the growth hormone receptor / binding protein in the human anterior pituitary gland. *J Clin Endocrinol Metab* 80:3361-3367
9. **Mertani HC**, Waters MJ, Morel G 1996 Cellular trafficking of growth hormone in rat pituitary. *Neuroendocrinology* 63:257-268
10. **Mertani HC**, Testart C, Ouhtit A, Brisson C, Morel G 1996 Gonadotropin-releasing hormone receptor gene expression in rat anterior pituitary. *Endocrine* 4:1-5
11. Liu ND, **Mertani HC**, Norstedt G, Tornell J, Lobie PE 1997 Evidence for an autocrine / paracrine mechanism of growth hormone action. *Exp Cell Res* 237:196-206
12. **Mertani HC**, Garcia-Caballero T, Lambert A, Gerard F, Palayer C, Boutin JM, Vonderhaar BK, Waters MJ, Lobie PE, Morel G. 1998 Cellular expression of growth hormone and prolactin receptors in human breast disorders. *Int J Cancer* 79:202-211
13. Morel G, Berger M, Ronsin B, Recher S, Ricard-Blum S, **Mertani HC**, Lobie PE 1998 In situ reverse transcription-polymerase chain reaction. Applications for light and electron microscopy. *Biol Cell* 90:137-154
14. Lobie PE, Sadir R, Graichen R, **Mertani HC**, Morel G 1999 Caveolar internalization of growth hormone. *Exp Cell Res* 246:47-55
15. **Mertani HC**, Morel G, Lobie PE 1999 Cytoplasmic and nuclear cytokine complexes. *Vit Horm* 57:79-121
16. Kaulsey KK, **Mertani HC**, Morel G, Lee KO, Lobie PE 1999 Autocrine stimulation of human mammary carcinoma cell proliferation by human growth hormone. *Exp Cell Res* 250:35-50

17. Kaulsey KK, **Mertani HC**, Lee KO, Lobie PE 2000 Autocrine human growth hormone enhancement of human mammary carcinoma cell spreading is Jak2 dependent. *Endocrinology* 141:1571-1584
18. Garcia-Caballero T, **Mertani HC**, Lambert A, Gallego R, Fraga M, Pintos E, Forteza J, Chevallier M, Lobie PE, Vonderhaar BK, Beiras A, Morel G 2000 Increased expression of growth hormone and prolactin receptors in hepatocellular carcinoma. *Endocrine* 12:265-271
19. Recher S, Raccurt M, Lambert A, Lobie PE, **Mertani HC**, Morel G Prenatal GH gene expression in rat lymphoid organs. 2001 *J Histochem Cytochem* 49:347-354
20. **Mertani HC**, Zhu T, Goh ELK, Lee KO, Morel G, Lobie PE 2001 Autocrine human growth hormone (hGH) regulation of human mammary carcinoma cell gene expression. Identification of CHOP as a mediator of hGH stimulated human mammary carcinoma cell survival. *J Biol Chem* 276:21464-21475.
21. Raccurt M, Lobie PE, Moudilou E, Garcia-Caballero T, Frappart L, Morel G, **Mertani HC** 2002 High stromal and epithelial human GH gene expression is associated with proliferative disorders of the mammary gland. *J Endocrinol* 175:307-318
22. Zhang X, Zhu T, Chen Y, **Mertani HC**, Lee KO, Lobie PE 2003 Human growth hormone regulated HOXA1 is a human mammary epithelial oncogene. *J Biol Chem* 278: 7580-7590
23. **Mertani HC**, Raccurt M, Abbate A, Kindblom J, Törnell J, Billestrup N, Usson Y, Morel G, Lobie PE 2003 Nuclear translocation and retention of growth hormone. *Endocrinology* 144: 3182-3195
24. Raccurt M, Tam SP, Lau P, **Mertani HC**, Lambert A, Garcia-Caballero T, Li H, McGuckin MA, Morel G, Waters MJ. 2003 Suppressor of cytokine signalling gene expression is elevated in breast carcinoma *Br J Cancer* 89:524-532
25. Mukhina S, **Mertani HC**, Guo K, Lee KO, Gluckman PD, Lobie PE. 2004 Phenotypic conversion of human mammary carcinoma cells by autocrine human growth hormone. *Proc Natl Acad Sci USA*. 101:15166-71.
26. Zhu T, Starling-Emerald B, Zhang X, Lee KO, Gluckman PD, **Mertani HC**, Lobie PE. 2005 Oncogenic transformation of human mammary epithelial cells by autocrine human growth hormone. *Cancer Res*. 65:317-324.
27. Zhu Z, Mukhina S, Zhu T, **Mertani HC**, Lee KO, Lobie PE. 2005 p44/42 MAP kinase dependent regulation of catalase by autocrine human growth hormone protects human mammary carcinoma cells from oxidative stress induced apoptosis. *Oncogene* 24: 3774-3785.
28. Ricci E, Smallwood SA, Chouabe C, **Mertani HC**, Raccurt M, Morel G, Bonvallet R. 2006 Electrophysiological characterization of left ventricular myocytes from obese Sprague-Dawley rat. *Obes Res* 14:778-786
29. Mukhina S, Liu DX, Guo K, Raccurt M, Borges-Bendriess S, **Mertani HC**, Lobie PE. 2006 Autocrine growth hormone prevents lactogenic differentiation of mouse mammary epithelial cells. *Endocrinology* 147: 1818-1829.
30. Raccurt M, Smallwood S, **Mertani HC**, Devost D, Abbaci K, Boutin JM, Morel G. 2006 Cloning, expression and regulation of COUP-TF-II and EAR-2 in the rat anterior pituitary gland. *Neuroendocrinology* 82: 233-244.

CONTEXTE DES RECHERCHES

Pierre Marie¹, grand disciple de Jean-Martin Charcot outre sa contribution décisive à l'étiologie de la sclérose en plaque fut le premier à associer le syndrome de l'acromégalie (gigantisme) à une hypertrophie de la glande pituitaire. C'était en 1886. Depuis, des milliers de chercheurs se sont attachés à comprendre le rôle de l'hypophyse en isolant chacune de ses molécules actives. C'est ainsi que 35 ans après Marie, fut caractérisée la présence d'un principe promoteur de la croissance animale². Une génération plus tard en 1944 Li et Evans isolent à partir de centaines d'hypophyses de bœufs une molécule qui stimule la croissance et qu'ils appellent somatotropine³. En 1971, Earl Sutherland obtient le prix Nobel de Médecine et Physiologie pour ses recherches sur le mécanisme d'action des hormones et on connaît enfin la séquence de la GH humaine (hGH)⁴. Le récepteur de la GH⁵ (GHR) sera cloné et séquencé à partir de foie de lapin et d'homme en 1987. Il faudra attendre 6 années supplémentaires pour que soit caractérisée la voie JAK/STAT⁶ («Janus Kinase/Signal Transducers and Activators of Transcription») de transduction du signal de la GH, et 10 ans pour créer les premières souris «naines» déficientes en récepteur de la GH⁷. En 2006, après 120 ans de recherches, l'hormone de croissance est devenue un considérable enjeu du marché économique que se disputent les grandes entreprises biopharmaceutiques, elle est utilisée comme adjuvant thérapeutique dans les situations de cachexie⁸ (cancer, SIDA, anorexie, grands brûlés), chez l'enfant présentant un retard de croissance⁸ y compris aux Etats-Unis lorsque ce retard n'est pas imputable à l'absence de GH, en gériatrie pour pallier aux insuffisances hormonales et rétablir une sensation de bien-être⁹, dans l'élevage afin d'augmenter la quantité de lait, de muscle, et réduire la masse grasseuse¹⁰, et abonde illégalement dans certains entourages sportifs¹¹. Somme toute, une séduisante panoplie d'effets bénéfiques pour l'organisme qui a rapidement inscrit la GH dans la liste des hypothétiques molécules rajeunissantes.

¹ Marie Sur deux cas d'acromégalie. Hypertrophie singulière non congénitale des extrémités supérieures, inférieures et céphaliques 1886 Rev Med Paris. 6:297

² Evans & Long The effect of anterior lobe administered intraperitoneally upon growth, maturity and olfactory cycles of rat 1921. Anat. Rec. 21:62

³ Li & Evans The isolation of pituitary growth hormone 1944 Science 99 183

⁴ Lindholm Growth hormone : historical notes 2006 Pituitary. 9:5

⁵ Leung *et al.*, Growth hormone receptor and serum binding protein: purification, cloning and expression 1987 Nature. 330:537

⁶ Argetsinger *et al.*, Identification of JAK2 as a growth hormone receptor-associated tyrosine kinase 1993 Cell. 74:237

⁷ Zhou *et al.*, A mammalian model for Laron syndrome produced by targeted disruption of the mouse growth hormone receptor/binding protein gene (the Laron mouse) PNAS. 94:13215

⁸ Shalet *et al.*, The diagnosis of growth hormone deficiency in children and adults 1998 Endocr Rev. 19:203

⁹ Human growth hormone and human aging 1993 Endocr Rev. 14:20

¹⁰ Scanes *et al.*, The anterior pituitary gland: lessons from livestock 2005 Domest Anim Endocrinol. 29:23

¹¹ Saugy *et al.*, Human growth hormone doping in sport 2006 Br J Sports Med.40:35

Dans ces circonstances idéales, comment la GH a-t-elle pu basculer de son statut d'élixir de jeunesse à celui de funeste acteur du cancer? La raison est relativement simple, rétrospectivement et incombe à la découverte des facteurs de croissance¹³ et des recherches qui ont bouleversé la compréhension des mécanismes de prolifération cellulaire et du cancer¹⁴. Ces molécules «signal» sont émises par les cellules de manière régulée et vont exercer leurs effets de façon autocrine et/ou paracrine, voire endocrine¹⁵. Les quantités produites sont généralement subtiles mais bien suffisantes pour modifier l'homéostasie du microenvironnement tissulaire et induire des réponses cellulaires adaptatives mitogéniques¹⁵. Ils sont nécessaires aux processus physiologiques de différenciation et de croissance¹⁶ et complètement dérégulés dans les tissus cancéreux. Ce dysfonctionnement induit l'activation persistante de la voie de signalisation ras-MAP («Mitogen Activated Protein») kinase, devenue l'archétype des voies de prolifération cellulaire et cible importante des nouvelles thérapies anti-cancer¹⁷. Le lien entre ces molécules «informatives» et le développement des cancers est donc bien défini, mais où se trouvent les interférences avec la signalisation de la GH produite en rythme et quantité importante par l'hypophyse? Le rôle primordial de la GH hypophysaire est d'assurer la croissance et le renouvellement des tissus de l'organisme¹⁸. Un nombre imposant de travaux a montré qu'elle pouvait exercer ses effets directement ou via l'induction de la synthèse de facteurs de croissance, le plus classiquement décrit étant l'IGF-1¹⁹ ou somatomédine C. La GH stimule donc la synthèse de facteurs de croissance potentiellement impliqués dans la progression tumorale mais son implication ne se limite pas uniquement à une action indirecte. L'avènement des technologies de l'ADN recombinant a permis une expansion illimitée des perspectives d'étude de la biologie de la GH initiée par le clonage de son récepteur⁵. La remise en cause de la théorie affirmant que les actions de la GH étaient exclusivement transmises par les IGF-I hépatiques sera définitive lors de la démonstration de l'expression ubiquitaire du GHR faisant de toute cellule de l'organisme une cible de l'hormone²⁰. La caractérisation de ce récepteur a aussi et surtout révélé l'existence d'une nouvelle famille de molécules, de plus de 30 membres aujourd'hui, la super famille des récepteurs des cytokines²⁰. Au niveau de leur structure, les récepteurs des cytokines sont tous constitués d'un seul domaine transmembranaire²⁰. Quand à leur fonction ces récepteurs sans activité de type tyrosine kinase intrinsèque, propagent leurs signaux par di/trimérisation et systématiquement via la voie de transduction du signal JAK/STAT²¹.

¹³ Karin Signal transduction from cell surface to nucleus in development and disease 1992 FASEB J. 6:2581

¹⁴ Gschwind *et al.*, The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy 2004 Nat Rev Cancer. 4:361

¹⁵ Schlessinger Cell signaling by receptor tyrosine kinases 2000 Cell. 103:211

¹⁶ Carpenter The EGF receptor: a nexus for trafficking and signaling. 2000 Bioessays. 22:697

¹⁷ Sebolt & Herrera Targeting the mitogen-activated protein kinase cascade to treat cancer 2004 Nat Rev Cancer. 4:937

¹⁸ Ho *et al.*, Metabolic actions of growth hormone in man 1996 Endocr J. 43:S57

¹⁹ Le Roith *et al.*, The somatomedin hypothesis 2001 Endocr Rev. 22:53

²⁰ Kelly *et al.*, The prolactin/growth hormone receptor family 1991 Endocr Rev. 12:235

²¹ Leonard Role of Jak kinases and STATs in cytokine signal transduction. 2001 Int J Hematol. 73:271

Suivant le «contexte» cellulaire qui dépend par exemple du type de cellule ou de l'état physiologique, l'activation de la voie JAK/STAT recrute des molécules qui exercent aussi bien un rôle dans la régulation du métabolisme et la différenciation cellulaire que dans l'activation des mécanismes de prolifération ou d'apoptose²¹. Par conséquent, l'implication de la voie de signalisation JAK/STAT dans les processus de prolifération tumorale s'est logiquement imposée et constitue aujourd'hui un domaine très dynamique dans la recherche de nouvelles thérapies anti-cancéreuses²³. La richesse des résultats sur le rôle des cytokines dans les processus tumoraux est aussi à l'origine des recherches sur la biologie de la GH dans les cancers, mais encore faut-il la reconnaître comme cytokine et la démarquer de son dogmatique rôle d'hormone. La propension à identifier la GH à une cytokine²⁴ s'explique par les caractéristiques communes de ces molécules. Leur faible poids moléculaire (8-50 kDa), leur mode d'action de type autocrine/paracrine/intracrine/endocrine, leurs effets pléiotropes, leur forte implication dans les fonctions immunitaires, et bien sur le fait qu'elles agissent *via* des récepteurs structurellement et fonctionnellement très identiques. Mais ce qui a permis de distinguer radicalement son rôle de cytokine est la découverte de sites de synthèse extrahypophysaire de GH dans de nombreux tissus et cellules²⁵. Cette découverte réalisée à une époque où les pathologies cancéreuses sont en expansion, a permis à plusieurs équipes de recherches de caractériser l'implication de la GH et des IGF-I dans les tissus tumoraux²⁶⁻²⁷ et précipité le développement de molécules antagonistes du GHR²⁸.

C'est dans ce contexte scientifique de la fin des années 1990 que vont s'initier les travaux de recherche présentés aujourd'hui. En m'appuyant sur certains de nos articles publiés et des résultats inédits, je ferai tout d'abord la démonstration d'une synthèse extrahypophysaire de GH en conditions physiologiques et expliciterai son rôle dans la prolifération des cellules épithéliales mammaires. Puis je présenterai les résultats impliquant la GH en conditions physiopathologiques en prenant comme exemple les cancers du foie et du sein humains. Nous verrons par la suite comment, à partir d'un modèle de production autocrine/paracrine de GH, nous avons caractérisé les conséquences morphofonctionnelles de cette synthèse dans des cellules cancéreuses mammaires humaines. Enfin, la dernière partie présentera les résultats les plus récents qui démontrent que la synthèse d'hormone de croissance par les cellules épithéliales de sein humain peut induire leur transformation en cellules tumorales.

²³ Dranoff Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy 2004 Nat Rev Cancer. 1:11

²⁴ Waters *et al.*, Growth hormone as a cytokine 1999 Clin Exp Pharmacol Physiol. 26:760

²⁵ Harvey & Hull Growth hormone. A paracrine growth factor? 1997 Endocrine. 7:267

²⁶ Garderen & Schalken Morphogenic and tumorigenic potentials of the mammary growth hormone/growth hormone receptor system 2002 Mol Cell Endocrinol. 197:153

²⁷ Khandwala *et al.*, The effects of insulin-like growth factors on tumorigenesis and neoplastic growth 2000 Endocr Rev. 21:215

²⁸ Muller *et al.*, Clinical review 166: Growth hormone receptor antagonists 2004 J Clin Endocrinol Metab. 89:1503

ROLE PHYSIOLOGIQUE DE L'HORMONE DE CROISSANCE EXTRAHYPOPHYSIAIRE

Expression de l'hormone de croissance dans les organes du système immunitaire

Recher *et al.*, J Histochem Cytochem.2001, 49:347

Entre les années 1970 et 1990, plusieurs groupes mettent en évidence dans des tissus non endocriniens une synthèse ectopique d'hormones hypophysaires²⁹ comme par exemple l'adrénocorticotropine et la proopiomélanocortine, et hypothalamiques³⁰ (e.g. «corticotrophin releasing factor», somatocrinine). Cette production aberrante d'hormones, encore mal comprise, est généralement associée à des pathologies sévères³¹ (maladie de Cushing, cancers). L'expression extrahypophysaire^{25, 32} de GH est également mise en évidence dans un nombre croissant de tissus dont le cerveau, le testicule, l'ovaire et les organes lymphoïdes. Une littérature abondante décrit les effets de la GH sur les fonctions immunitaires adultes³³⁻³⁵, en particulier son rôle sur la différenciation des thymocytes, et la prolifération des lymphocytes et des cellules progénitrices myéloïdes. En revanche, son implication dans les mécanismes du développement du système immunitaire est mal connue. Les objectifs de cette étude étaient donc de mettre en évidence l'expression ectopique de GH en conditions physiologiques et déterminer sa régulation en fonction du développement du système immunitaire. Pour cela nous avons eu recours à des techniques de mise en évidence et localisation de l'expression de gène (RT-PCR, hybridation *in situ*, RT-PCR *in situ*) appliquées à des tissus de fœtus de rat à 18 jours de gestation que nous avons comparé aux tissus immunitaires de rats adultes.

²⁹ Rees Concepts in ectopic hormone production 1976 Clin Endocrinol. 5:363S

³⁰ Clark Ectopic hormone production 1988 Baillieres Clin Endocrinol Metab. 4:967

³¹ Schally *et al.*, Hypothalamic hormones and cancer 2001 Front Neuroendocrinol. 22:248

³² Harvey *et al.*, Pituitary and extrapituitary growth hormone: Pit-1 dependence? 2000 Can J Physiol Pharmacol. 78:1013

³³ Welniak *et al.*, The role of growth hormone in T-cell development and reconstitution. 2002 J Leukoc Biol. 71:381

³⁴ Savino *et al.*, In vivo effects of growth hormone on thymic cells 2003 Ann N Y Acad Sci. 992:179

³⁵ Meazza *et al.*, Effect of growth hormone (GH) on the immune system. 2004 Pediatr Endocrinol Rev. 3:490

Nous avons ainsi montré que l'expression du gène de la rGH est détectable dans toutes les cellules du système immunitaire rat. Nous l'avons de plus localisée dans les tissus fœtaux spécifiquement dans les thymocytes immatures, dans les lymphocytes circulants et dans les cellules hématopoïétiques hépatiques. L'ADNc de la rGH amplifié dans les cellules immunitaires fœtales est identique à celui exprimé dans l'hypophyse et son expression relative est augmentée dans les tissus du système immunitaire de rat adulte (Fig.1).

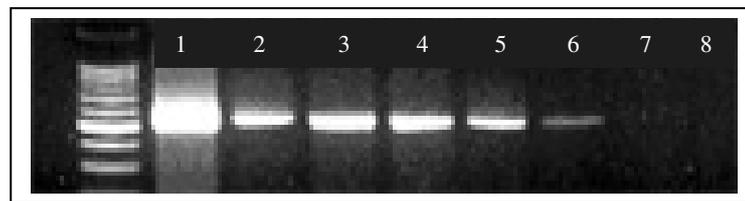


Figure 1. Expression du gène rGH dans les tissus immunitaires de rat par RT-PCR. Chez l'adulte: hypophyse (1), rate (2), thymus (3), plaques de Peyer (4). Chez le fœtus de 18 J: thymus (5), foie (6). Contrôles négatifs (7, 8).

Ces résultats nous ont permis d'une part d'identifier les cellules immunitaires responsables de la production de GH et d'autre part d'exposer ses potentiels effets de type autocrine/paracrine sur les fonctions immunitaires et hématopoïétiques durant le développement fœtal. La rGH hypophysaire n'étant exprimée qu'à partir du 19^{ème} jour de gestation, il est fort probable que cette production ectopique par des cellules indifférenciées soit impliquée dans la régulation d'expression de cytokines indispensables à la maturation des cellules progénitrices lymphoïdes, myéloïdes et endothéliales. Cette hypothèse qui n'a encore jamais été explorée pourrait l'être sur des cellules souches de moelle osseuse, ce qui constituerait un argument décisif en faveur du rôle de la GH dans les fonctions immunitaires.

La GH est donc synthétisée dans des tissus autres que l'hypophyse de façon régulée et en des quantités très faibles, ce qui suggère que son mode d'action puisse être différent et sans doute plus subtil que celui de la GH endocrine hypophysaire. Une hypothèse que nous démontrerons par la suite en étudiant les effets autocrines/paracrines de la GH produite par les cellules épithéliales mammaires.

Expression et rôle de l'hormone de croissance dans les cellules épithéliales mammaires

Mukhina *et al.* Endocrinology. 2006, 147: 1818

Afin de préciser les fonctions de la GH extrahypophysaire nous avons changé de modèle et analysé son expression et rôle au cours du développement de la glande mammaire de souris. La glande mammaire est un tissu exceptionnellement plastique qui prolifère et régresse au gré du cycle menstruel et des périodes de gestation/lactation sous une régulation hormonale fine. La GH est une des hormones fondamentales de la mammogenèse comme l'atteste la perte de sa structure et fonctionnalité chez les souris Knock-Out du GHR³⁶. De même, l'hypophysectomie provoque la régression rapide du parenchyme mammaire et seule l'injection de GH et de prolactine est capable de le restaurer³⁷. Cependant, des travaux contradictoires ont été publiés, certains limitant l'action de la GH aux mécanismes de prolifération et d'autres aux phénomènes de différenciation de la glande mammaire. L'existence d'une synthèse de GH dans les cellules épithéliales de la glande mammaire canine augmentée par un traitement aux progestatifs est connue depuis les travaux de Mol *et coll*³⁸, mais chez les rongeurs cette synthèse n'avait jamais été mise en évidence.

Dans la perspective de clarifier une partie de la controverse entre des effets prolifératifs ou de différenciation, nous avons entrepris de rechercher la synthèse de GH dans la glande mammaire de souris, étudier sa régulation en fonction de l'ontogenèse et de l'état physiologique et déterminer son rôle *in vitro*. Nous avons prélevé les glandes mammaires de souris adultes vierges et à différents temps de gestation, de lactation et d'involution, puis réalisé une étude dynamique de l'expression de la GH de souris (mGH) par les techniques de RT-PCR, immunohistochimie et hybridation *in situ*. Parallèlement nous avons utilisé la lignée murine HC-11 d'origine épithéliale afin de définir les effets autocrines/paracrines de la GH sur les capacités prolifératives, anti-apoptotiques et de différenciation de ces cellules.

³⁶ Gallego *et al.*, Prolactin, growth hormone, and epidermal growth factor activate Stat5 in different compartments of mammary tissue and exert different and overlapping developmental effects 2001 Dev Biol. 229:163

³⁷ Talwalker & Meites. Mammary lobulo-alveolar growth induced by anterior pituitary hormones in adrenoovariectomized and adreno-ovariectomized-hypophysectomized rats 1961 Proc Soc Exp Biol Med. 107:880

³⁸ Mol *et al.*, Progesterin-induced mammary growth hormone (GH) production 2000 Adv Exp Med Biol. 480:71

Dans cette étude nous montrons que l'expression de mGH est détectable dans les cellules épithéliales de glande mammaire de souris quasi exclusivement pendant la puberté (Fig. 2). L'expression de mGH dans la glande mammaire est très faible durant la période de gestation et complètement absente durant les périodes de lactation et d'involution.

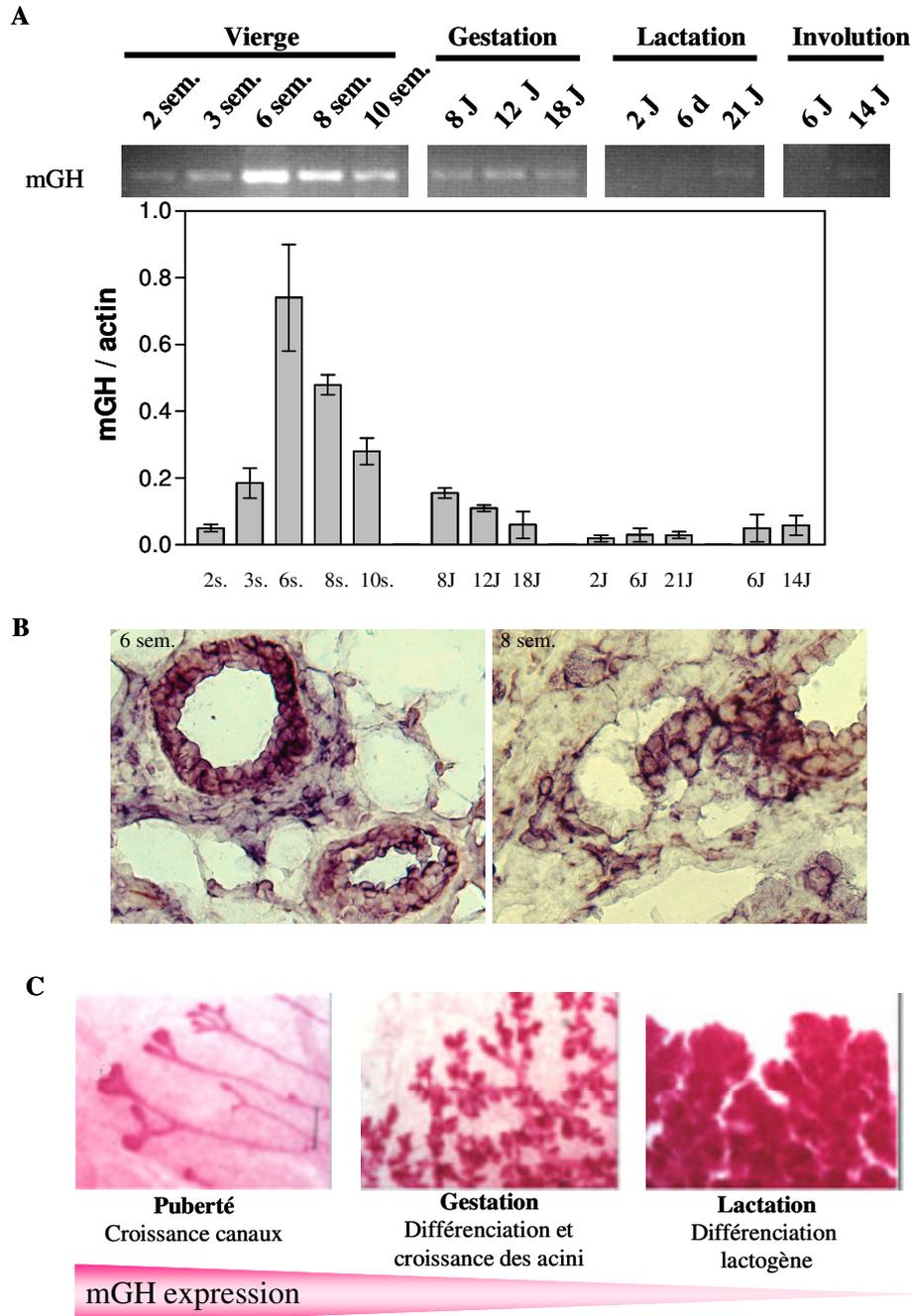


Figure 2. Expression de la mGH au cours du développement de la glande mammaire de souris.

A. Mise en évidence de l'expression de mGH par RT-PCR et quantification des ARNm en fonction des stades physiologiques.

B. Localisation de l'expression de mGH dans la glande mammaire de souris vierges à 6 et 8 semaines. Le signal d'hybridation *in situ* est localisé dans les cellules épithéliales des canaux et plus faiblement dans les cellules stromales adjacentes.

C. Schéma récapitulatif de régulation de l'expression de mGH dans la glande mammaire de souris en fonction de la puberté, de la gestation et de la lactation.

L'approche fonctionnelle de la biologie de la GH autocrine nous a permis de montrer dans un premier temps que les cellules HC-11 expriment un niveau basal faible de mGH détectable par RT-PCR. La différenciation forcée des cellules HC-11 par la dexaméthasone, l'insuline et la prolactine s'accompagne d'une forte induction du gène de la caséine β et induit la perte d'expression endogène de mGH. A l'inverse, la surexpression forcée de mGH dans les cellules HC-11 abolit l'expression du gène de différenciation de la caséine β , stimule leur prolifération et réduit le nombre de cellules apoptotiques. L'utilisation de la lignée HC-11, nous a également permis de démontrer que la surexpression de mGH perturbe la réalisation de la structure spécifique des acini sécrétoires en 3 dimensions dans une membrane basale reconstituée de Matrigel[®] (Fig. 3). Nous n'avons pas élucidé dans cette étude les mécanismes moléculaires induits par la mGH et responsables de ses effets prolifératifs, mais des résultats récents du laboratoire montrent que l'effet antiapoptotique est pour sa part médié par l'activation des protéines kinases Akt et JAK2 (Mertani *et al.*, non publié).

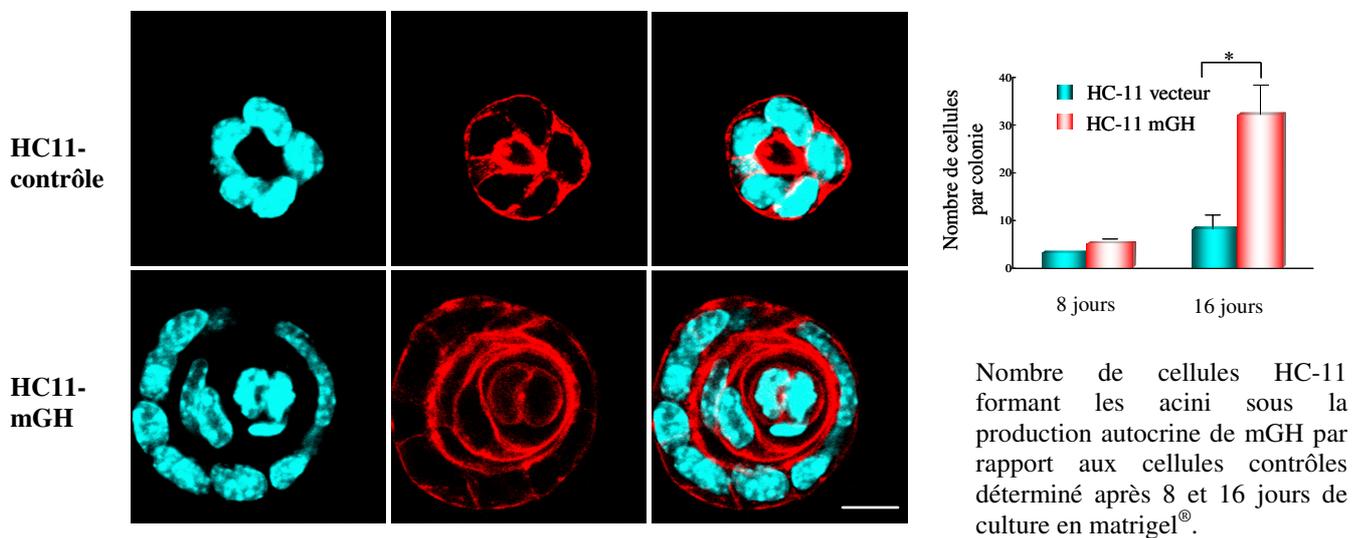


Figure 3. Effets autocrines/paracrines de la GH exercés *in vitro* sur la prolifération cellulaire. Aspect morphologique et taille des acini formés à 16 jours de culture en matrigel[®] par les cellules HC-11-mGH vs. cellules contrôles. L'immunofluorescence bleue (Hoechst) localise les noyaux cellulaires, tandis que la fluorescence rouge (phalloïdine-TRITC) indique l'actine du cytosquelette.

Ces travaux indiquent clairement que l'expression épithéliale de mGH dans la glande mammaire de souris participe au développement de ses caractéristiques prolifératives et s'oppose à la différenciation du phénotype lactogène. Cette action proliférative de la GH autocrine est similaire à celle rapportée dans les myoblastes de souris C2C12³⁹ et pourrait se généraliser à l'ensemble des tissus qui la produise. Les résultats de cette étude soulèvent de nombreuses questions, en particulier sur la nature des régulations de l'expression de GH dans les cellules épithéliales mammaires durant le développement ou durant les phases du cycle sexuel. D'autres aspects primordiaux qui devront être abordés concernent l'identification des voies de transduction du signal GH activées et leurs interactions avec les voies de signalisation des facteurs de croissance, des cytokines, des chémokines et des protéines de la matrice extracellulaire. Le dialogue entre cellules épithéliales et stromales qui s'établit dans le microenvironnement de la glande mammaire est en effet primordial pour son développement et sa différenciation⁴⁰⁻⁴². La réalisation d'animaux transgéniques, knock-out ou Cre/lox pour le gène de la GH ciblé dans la glande mammaire serait un moyen pertinent pour délimiter le rôle physiologique de l'hormone au cours du développement de la glande mammaire, et cette approche est actuellement en cours de réalisation au travers d'une collaboration.

Ces deux études sont la démonstration d'une synthèse ectopique de GH impliquée dans l'établissement et le maintien des fonctions immunitaires et de reproduction. Comment réagiraient les cellules si cette synthèse locale de GH fortement impliquée dans l'induction et le maintien du phénotype épithélial prolifératif n'était plus régulée ? Si l'on considère que son expression est spécifiquement régulée en fonction des différents stades physiologiques, comment se caractérise-t-elle dans les situations pathologiques? Ces questions nous ont conduit sur de nouvelles pistes de recherches, avec comme objectif principal de déterminer la régulation et le rôle de la GH autocrine dans les tissus pathologiques cancéreux.

³⁹ Segard *et al.*, Autocrine growth hormone production prevents apoptosis and inhibits differentiation in C2C12 myoblasts. 2003 Cell Signal. 15:615

⁴⁰ Hovey *et al.*, Establishing a framework for the functional mammary gland: from endocrinology to morphology. 2002 J Mammary Gland Biol Neoplasia. 7:17

⁴¹ Parmar & Cunha Epithelial-stromal interactions in the mouse and human mammary gland in vivo 2005 Endocr Relat Cancer. 11:437

⁴² Bissell *et al.*, Microenvironmental regulators of tissue structure and function also regulate tumor induction and progression: the role of extracellular matrix and its degrading enzymes. 2005 Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 70:343

PHYSIOPATHOLOGIE DE L'HORMONE DE CROISSANCE EXTRAHYPOPHYSAIRE

Implication de l'hormone de croissance dans les hépatocarcinomes humains

Garcia-Caballero *et al.* Endocrine. 2000, 12:265

Le foie est un tissu privilégié des actions de la GH hypophysaire. Les hépatocytes très riches en récepteur et en protéine de liaison («binding protein») de la GH sont particulièrement adaptés pour répondre par une libération importante d'IGF-I⁴³. C'est aussi un tissu doté de capacités prolifératives exceptionnelles comme l'attestent les expériences d'hépatectomies partielles et de suivi de régénération⁴⁴. Il a été démontré récemment que l'intégrité de l'axe GH/IGF-I *in vivo* est indispensable à la régénération hépatique⁴⁵ et implique l'activation soutenue des cycline D1 et A⁴⁶. De même, des souris transgéniques surexprimant l'hormone de croissance bovine (bGH) développent une hypertrophie du foie et une fréquence de tumeurs hépatiques supérieure aux animaux contrôlés⁴⁷. L'hépatocyte représente donc un modèle de choix pour examiner le rôle prolifératif de la GH. L'objectif du travail présenté ici était d'étudier la régulation de l'expression du récepteur de la GH dans les hépatocarcinomes par rapport à du foie normal.

Utilisant les techniques d'hybridation *in situ* semi quantitative et d'immunohistochimie et un nombre important de biopsies humaines, nous avons montré que l'expression du récepteur de la GH dans les hépatocytes cancéreux était fortement augmentée par rapport aux hépatocytes humains normaux. Le GHR se localise dans le cytoplasme mais aussi dans le noyau des cellules cancéreuses suggérant une action nucléaire de la GH au cours de la prolifération tumorale. Les mécanismes de la translocation nucléaire de la GH et son récepteur

⁴³ Muller *et al.*, Mechanisms of action of GH. 2003 J Endocrinol Invest. 26:2

⁴⁴ Fausto Liver regeneration 2000 J Hepatol. 32:19

⁴⁵ Pennisi *et al.* Role of growth hormone (GH) in liver regeneration 2004 Endocrinology. 145:4748

⁴⁶ Desbois-Mouthon *et al.* Hepatocyte proliferation during liver regeneration is impaired in mice with liver-specific IGF-1R knockout 2006 Faseb J. 20:773

⁴⁷ Snibson *et al.*, High, persistent hepatocellular proliferation and apoptosis precede hepatocarcinogenesis in growth hormone transgenic mice 1999 Liver. 19:242

non exposés dans ce mémoire sont aussi un aspect auquel s'intéresse notre équipe⁴⁸. Cependant, il est intéressant de noter que les résultats d'une étude récente confirment l'augmentation du récepteur de la GH dans les hépatocarcinomes et montrent en plus une corrélation positive entre son accumulation nucléaire et le degré d'inflammation induit par le virus de l'hépatite C⁴⁹. Dans le même esprit, des travaux présentés il y a peu indiquent que la transfection stable de l'ADNc du récepteur de la GH couplé à une séquence nucléaire est suffisante pour transformer des lymphocytes en cellules tumorales et invasives⁵⁰. Ce mode d'action a précédemment été démontré dans le cas de l'hormone homologue prolactine dont la translocation nucléaire potentialise les effets prolifératifs induits par l'interleukine 2 sur des lymphocytes T⁵¹, et pourrait s'établir comme un nouveau paradigme dans l'explication des effets tumorigènes des facteurs de croissance⁵².

Notre étude de la régulation de l'expression du GHR dans les hépatocarcinomes, étayée par les données de la littérature nous permet de conclure que l'action hyperproliférative de la GH dans les hépatocytes cancéreux s'explique en partie par l'augmentation de la synthèse de ses récepteurs. Les hépatocarcinomes sont des cancers humains dont l'évolution vers un pronostic défavorable est assez rapide⁵³ et des études supplémentaires permettraient de mieux définir le rôle de la GH dans leur induction et progression. Nous avons initié des recherches sur la possibilité d'une synthèse de GH autocrine dans le foie de rat et d'homme dans diverses situations physiologiques et pathologiques mais elles se sont révélées infructueuses. Ceci ne nous a pas encouragé à explorer plus profondément le rôle de la GH dans les hépatocarcinomes humains, au profit de nos recherches, déjà prometteuses, sur les effets autocrines/paracrines de l'hormone dans les cellules carcinomateuses mammaires.

.....
⁴⁸ Mertani *et al.*, Nuclear translocation and retention of growth hormone 2003 *Endocrinology*. 144:3182

⁴⁹ Vespasiani-Gentilucci *et al.*, Subcellular shift of the hepatic growth hormone receptor with progression of hepatitis C virus-related chronic liver disease 2006 *Histopathology*. 48:822

⁵⁰ Conway-Campbell *et al.*, Nuclear targeting of the growth hormone receptor causes deregulated proliferation and tumorigenesis *in vivo*. 2005 US Endo Society San Diego June OR15-1

⁵¹ Clevenger Nuclear localization and function of polypeptide ligands and their receptors: a new paradigm for hormone specificity within the mammary gland? 2003 *Breast Cancer Res*. 5:181

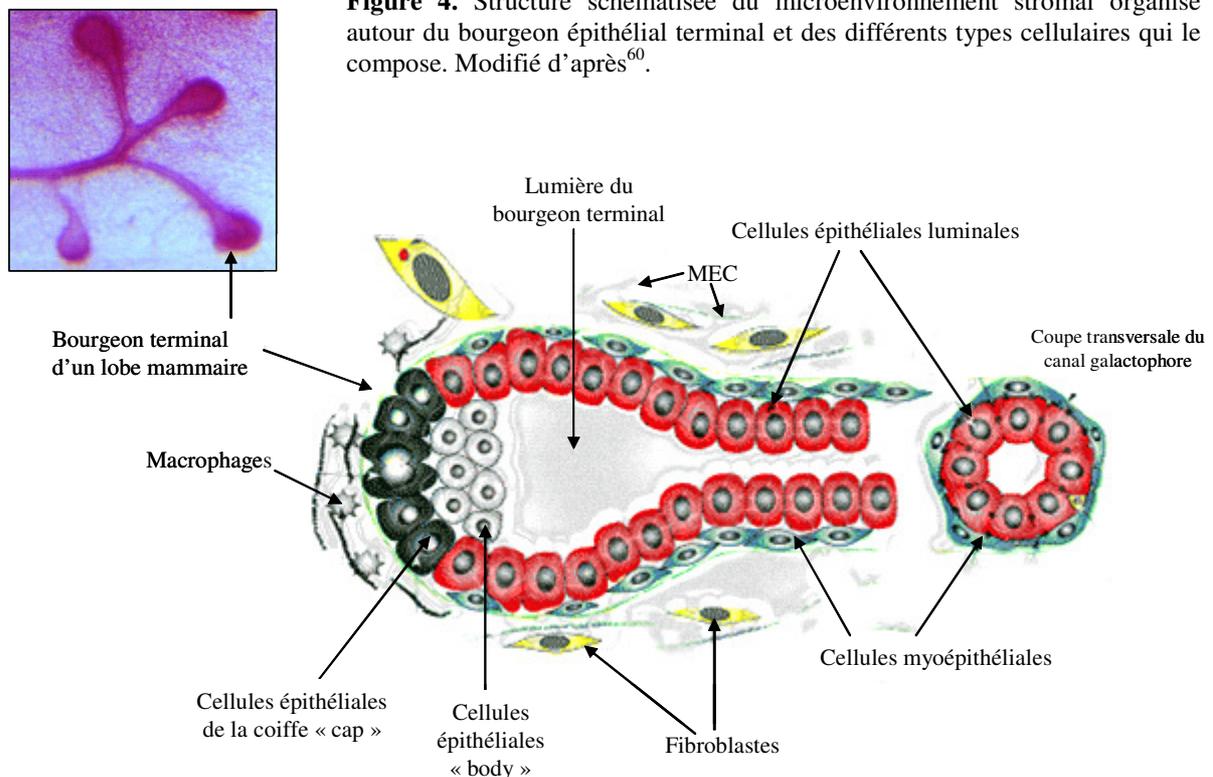
⁵² Massie & Mills The developing role of receptors and adaptors 2006 *Nat Rev Cancer*. 6:403

⁵³ Bruix *et al.*, Focus on hepatocellular carcinoma 2004 *Cancer Cell*. 5:215

Implication de l'hormone de croissance dans les carcinomes mammaires humains

La glande mammaire: un modèle de plasticité cellulaire

Le sein humain possède une structure relativement simple destinée à assurer une fonction bien définie qui est la lactation. L'intégrité de son architecture dépend d'un réseau de signalisation articulé autour de la présence d'hormones, de facteurs de croissance et de protéines de la matrice extracellulaire (MEC). L'unité fonctionnelle du sein, l'épithélium (Fig. 4) est constitué de cellules épithéliales luminales et de cellules myoépithéliales formées à partir de cellules progénitrices et de cellules souches qui se renouvèlent⁵⁴.



Au cours de la puberté, les cellules épithéliales vont former un système canalaire ramifié et se différencier en alvéoles produisant du lait durant la grossesse et la lactation⁵⁵. En dehors de ces périodes d'activité intense, l'épithélium maintient son renouvellement mais

⁵⁴ Lochter Plasticity of mammary epithelia during normal development and neoplastic progression 1998 Biochem Cell Biol. 76:997

⁵⁵ Russo & Russo Biological and molecular bases of mammary carcinogenesis 1987 Lab Invest. 57:112

reste organisé en canaux et bourgeons terminaux formant des acini (Fig. 4). Les acini sont des structures sécrétrices polarisées et maintenues en trois dimensions par un stroma ou mésenchyme constitué de cellules (fibroblastes, myofibroblastes, macrophages, adipocytes et cellules endothéliales) et des composants acellulaires de la MEC (polysaccharides, collagènes, élastine, laminine, fibronectine). La polarité de l'épithélium est maintenue grâce à sa lame basale qui l'ancre dans le tissu conjonctif sous-jacent et filtre les composants solubles qui circulent dans l'environnement stromal^{54, 55}. La plasticité des cellules épithéliales mammaires est remarquable. Elles sont en effet capables de proliférer, d'entrer en quiescence ou de subir l'apoptose en fonction de l'ontogenèse ou des conditions physiologiques. Cette plasticité cellulaire est assez unique parmi les organes différenciés de l'organisme et dépend fortement de l'action d'hormones (GH, prolactine, stéroïdes surrénaliens et sexuels) et de facteurs de croissance systémiques (IGF-1 et 2).

L'importance physiologique du stroma dans la morphogenèse de la glande mammaire a été mise en évidence depuis un certain nombre d'années grâce aux expériences de transplantation hétérotopiques montrant par exemple la transdifférenciation de l'épithélium salivaire en type mammaire suite à son implantation dans du mésenchyme mammaire et inversement⁵⁴. La morphogenèse et l'activité des acini sont donc intimement liées aux activités stromales⁵⁶ et en particulier celles des fibroblastes. Les fibroblastes synthétisent des protéines d'adhésion cellulaires de la MEC (fibronectine, laminine) qui vont interagir avec les cellules épithéliales par l'intermédiaire des protéines intégrines et activer en fonction du contexte hormonal des voies de transduction de signaux de différenciation, de prolifération ou d'apoptose⁵⁷. Les fibroblastes sont aussi capables d'induire la dégradation localisée de la MEC grâce à leur synthèse d'une classe particulière d'enzymes à zinc, les métalloprotéinases matricielles (MMP)⁵⁸. Les fibroblastes synthétisent aussi des facteurs de croissance (IGF-1, EGF, PDGF, HGF, TGF α) ou des facteurs inhibiteurs de croissance (PTGF, TGF α) qui peuvent être séquestrés dans la MEC en attente de réarrangements du microenvironnement mammaire pour se fixer à leurs récepteurs des cellules épithéliales ou stromales^{54, 58-60}.

⁵⁶ Darcy *et al.*, Mammary fibroblasts stimulate growth, alveolar morphogenesis, and functional differentiation of normal rat mammary epithelial cells 2000 *In Vitro Cell Dev Biol Anim.*36:578

⁵⁷ Giancotti & Tarone Positional control of cell fate through joint integrin/receptor protein kinase signaling 2003 *Annu Rev Cell Dev Biol.*19:173

⁵⁸ Kalluri & Zeisberg 2006 *Nature Rev Cancer.* 6:392

⁵⁹ Elenbaas & Weinberg Heterotypic signaling between epithelial tumor cells and fibroblasts in carcinoma formation 2001 *Exp Cell Res.* 264:169

⁶⁰ Cowin *et al.*, Cadherins and catenins in breast cancer 2005 *Curr Opin Cell Biol.* 17:499

Que les cancers du sein soient d'origine génétique ou épigénétique ils se développeront systématiquement à partir des cellules épithéliales⁵⁴. Les exemples de dérégulation de la prolifération épithéliale associés à des anomalies d'expression (surproduction, inhibition, mutations, trafic) des facteurs de croissance et à un dysfonctionnement de leurs récepteurs sont décrits abondamment dans la littérature⁶¹. Certains de ces travaux ont permis de grandes avancées dans le développement de thérapies ciblées comme la mise au point des anticorps monoclonaux du récepteur ErbB2 (HER2/neu)⁶². La prolifération anarchique des cellules épithéliales est donc associée à des perturbations de l'homéostasie du microenvironnement mammaire qui génèrent des interactions dysfonctionnelles avec les protéines de la MEC. La complexité de ces interactions réciproques, chimiques et physiques, et la difficulté de les appréhender de façon intégrée sont l'un des obstacles majeurs au développement de stratégies anti-cancer effectives.

Comme nous l'avons décrit lors de l'étude de la glande mammaire de souris, la GH stimule la prolifération de l'épithélium au dépend de sa différenciation. Nous avons alors voulu tester l'hypothèse que dans les cas de cancer du sein il pouvait exister une corrélation entre le grade de la tumeur et le niveau d'expression des récepteurs de la GH. Lorsque nous avons commencé cette étude, plusieurs travaux avaient montré que l'action de la GH sur les cellules épithéliales mammaires permettait de les sensibiliser aux effets des facteurs mitogènes tels que l'IGF-1 et l'EGF⁶³. A cette époque, la localisation du récepteur de la GH dans les tumeurs bien que n'ayant jamais été établie était considérée comme restreinte aux cellules tumorales. Nous avons alors initié une série d'expériences dont les objectifs étaient de localiser et de caractériser la régulation de l'expression du récepteur de la GH dans les cancers du sein humain.

⁶¹ Blume-Jensen & Hunter Oncogenic kinase signalling 2001 Nature. 411:355

⁶² Shawver *et al.*, Smart drugs: tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy 2002 Cancer Cell. 1:117

⁶³ Nandi *et al*; Hormones and mammary carcinogenesis in mice, rats, and humans: a unifying hypothesis 1995 PNAS. 92:3650

Synthèse du récepteur de la GH dans les carcinomes mammaires

Mertani *et al.* Int J Cancer. 1998, 79:202

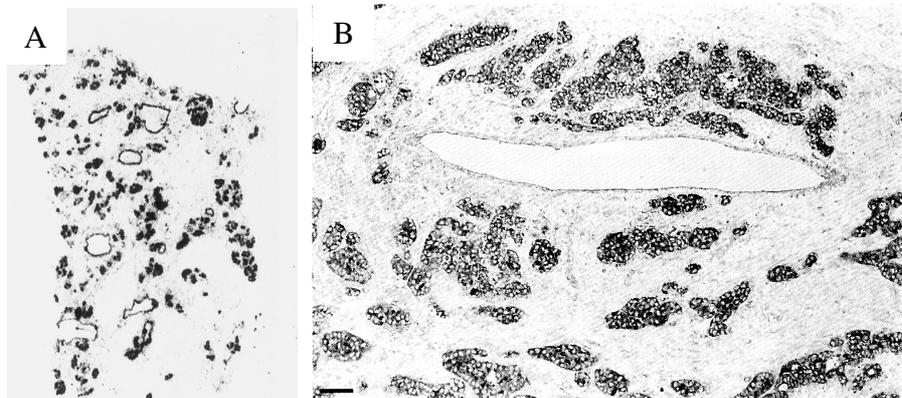
Nos travaux ont permis de mettre en évidence une surexpression du GHR dans les désordres prolifératifs du sein humain par rapport au tissu normal obtenu par réduction mammoplastique. Le récepteur de la GH est localisé préférentiellement dans les cellules épithéliales malignes

(Fig. 5 ci-contre) de tous les stades cancéreux examinés quelque soit leur statut en récepteurs aux hormones stéroïdiennes. De façon similaire à ce qui est observé dans les hépatocarcinomes, il est localisé dans le

Figure 5. Expression du récepteur de la hGH.

A. Mise en évidence par HIS sur une section de sein normal dans les cellules épithéliales des canaux galactophores.

B. Mise en évidence par immunohistochimie sur une coupe de carcinome invasif dans les cellules tumorales principalement.



cytoplasme et le noyau des cellules tumorales. Nous avons également mis en évidence une expression constante de GHR dans les cellules endothéliales et stromales de type fibroblastique. Ce résultat nouveau indique que la majorité des cellules d'un cancer du sein sont donc a priori sensibles à une stimulation exercée par la GH humaine.

L'autre découverte d'importance et qui conditionnera la suite des travaux concerne l'absence de corrélation entre la forte expression du GHR et le grade de la tumeur. En effet toutes les tumeurs analysées, de la plus bénigne (fibroadénome) à la plus agressive (carcinome invasif médullaire) présentent un niveau similaire d'expression du gène du récepteur de la GH. Ce résultat indique distinctement que le rôle potentiel de la GH au cours de la progression tumorale mammaire (passage de la lésion bénigne au carcinome invasif) n'est pas soutenu par des modifications importantes de l'expression de son récepteur. L'étape suivante de ce travail a alors consisté à rechercher la possibilité d'une production autocrine de GH qui pourrait être corrélée aux différents stades cliniques de la progression tumorale.

Synthèse ectopique de hGH dans les carcinomes mammaires

Raccurt *et al.* J Endocrinol. 2002, 175:307

Nous avons recherché la localisation de l'expression du gène de la GH (RT-PCR, RT-PCR *in situ*, hybridation *in situ*) sur une large cohorte d'échantillons de cancers humains du stade *in situ* au stade infiltrant avec ou sans métastases ganglionnaires ainsi que sur des prélèvements de tumeurs bénignes et de sein normal. L'étude quantitative de l'expression de hGH par la technique d'ELISA sur extraits protéiques cellulaires totaux de tissu fraîchement recueilli a été menée en parallèle.

Nous avons ainsi détecté dans le sein normal ainsi que dans tous les cas de cancers examinés la présence de l'ARNm de la hGH, identique à celui exprimé dans l'hypophyse humaine. Dans le sein normal, l'expression de hGH est abondante dans les cellules épithéliales et faible dans les cellules stromales fibroblastiques et endothéliales (Fig. 6). L'expression de hGH dans les cancers du sein humain est très intense dans les cellules tumorales et invariablement plus élevée que dans l'épithélium des zones de tissu «normal» adjacent. Nous avons aussi mis en évidence une forte expression de hGH dans les cellules stromales des cancers (*vs.* stroma normal) et remarqué qu'elle est particulièrement augmentée dans les cellules stromales hyper-réactives situées au front d'invasion tumorale (Fig. 6). Il existe donc une synthèse *de novo* de hGH par les fibroblastes et les lymphocytes activés corrélée à l'amplitude de la réaction stromale. L'analyse de l'expression de la protéine confirme les résultats de PCR et montre que la concentration de hGH mesurée à partir d'extraits protéiques totaux de fibroadénomes et de carcinomes canaux invasifs est plus importante que celle obtenue à partir d'extraits protéiques de sein normal. Enfin, nos résultats montrent que les cellules tumorales qui présentent la plus forte expression du gène de la hGH sont celles des ganglions lymphatiques envahis. Ce dernier résultat atteste de l'implication importante de l'hormone de croissance au cours de la progression tumorale.

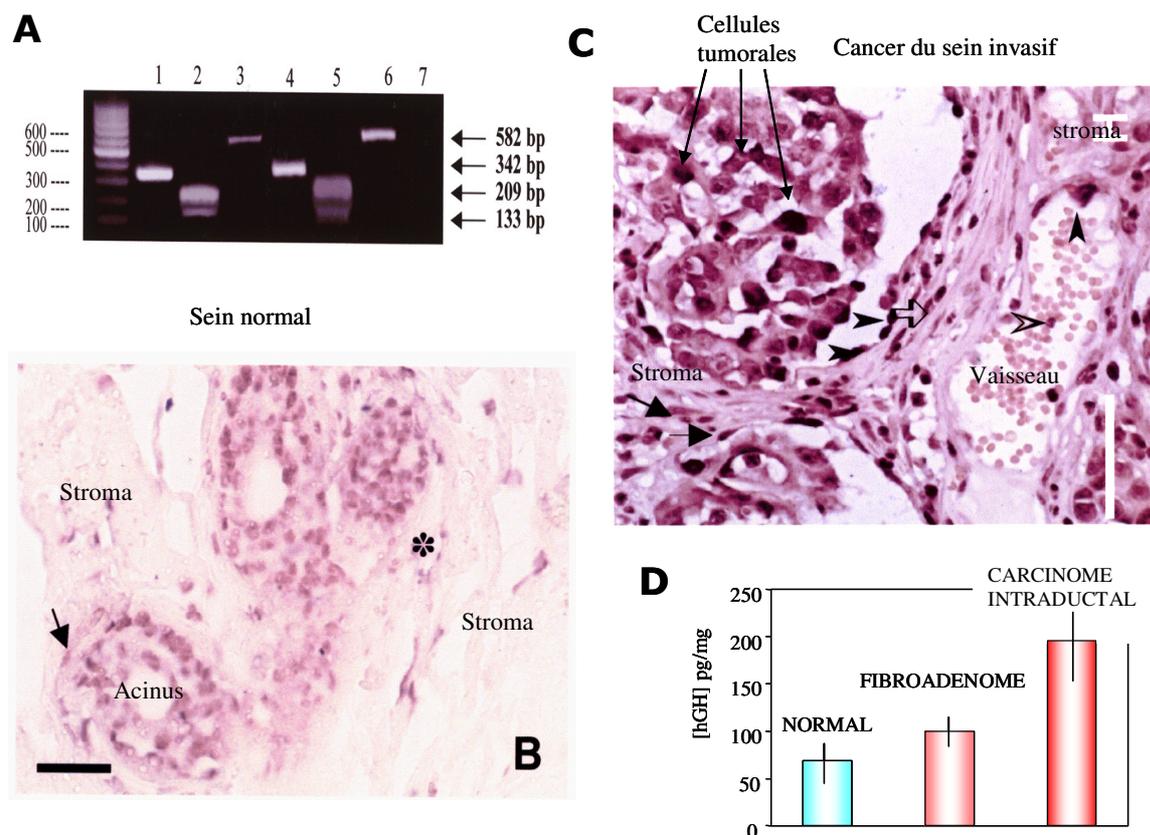


Figure 6. Expression du gène de la hGH dans le sein humain normal et tumoral.

A. Détection par RT-PCR de l'expression de la hGH dans les cellules MCF-7 transfectées stables avec la hGH (ligne 1) ; digestion de 1 par RsaI (2), β -actine des MCF-7-hGH (3) ; sein normal (4) ; digestion de 4 par RsaI (5), β -actine des sein normal (6), contrôle (7).

B. Localisation par RT-PCR *in situ* de l'expression de la hGH dans le sein normal au niveau des cellules épithéliales des acini et myoépithéliales (flèche). L'expression stromale de hGH est faiblement détectée dans quelques cellules stromales dont les endothéliales (astérisque).

C. Localisation de l'expression du gène de la hGH sur une section de cancer invasif du sein, très intense dans les cellules néoplasiques du front d'invasion, mais également forte dans les cellules stromales péri-tumorales fibroblastiques (flèches), endothéliales (pointes de flèches) et lymphocytaires (pointe de flèche évidée).

D. Quantification par Elisa de la concentration de hGH dans les tissus frais de sein normal, de tumeur bénigne (fibroadénome) et de tumeur maligne (carcinome *in situ*).

Récemment, nous avons conforté ces résultats grâce à une collaboration avec le Dr. Jean Chiesa du CHU de Nîmes qui nous a permis de mettre au point un système de cultures primaires purifiées de cellules tumorales mammaires humaines. L'avantage de ces cultures

primaires réside dans le fait qu'elles reflètent plus précisément la pathologie humaine par rapport à des lignées immortalisées, et vont nous permettre de procéder à des tests fonctionnels de prolifération cellulaire et de mesure d'apoptose. Ces cultures ont une durée de vie limitée (1-8 semaines) et nos résultats montrent que l'expression de la hGH est maintenue dans 60 % des tumeurs prélevées à ce jour. Grâce à cette collaboration nous avons montré que la hGH induit une augmentation importante du nombre de cellules carcinomateuses, et que ses effets sont potentialisés par la présence de sérum. Dans ce système, l'augmentation du nombre de cellules par la GH est due à la stimulation de la prolifération cellulaire et non pas à des effets anti-apoptotiques. Ces travaux sont maintenant en attente des essais de traitement des cultures avec l'antagoniste B2036 du GHR. Ces essais devraient nous permettre de confirmer le rôle primordial de la GH autocrine dans les mécanismes de prolifération des cellules carcinomateuses mammaires humaines.

L'ensemble de nos travaux sur l'expression de la hGH et son récepteur dans les cancers du sein humain couplé à une approche fonctionnelle en cultures primaires, suggère que l'expression de hGH dans les cellules tumorales et sa synthèse *de novo* dans les cellules stromales réactives entretiennent la progression tumorale via des effets autocrine/paracrine. Notre objectif suivant consistait alors à déterminer précisément quels pouvaient être les effets cellulaires et moléculaires induits par la production autocrine de hGH au cours de la progression tumorale des cellules de sein humain.

EFFETS AUTOCRINES/PARACRINES DE L'HORMONE DE CROISSANCE DANS LES CELLULES CARCINOMATEUSES MAMMAIRES HUMAINES

Construction et validation d'un modèle cellulaire d'étude des effets autocrines/paracrines de l'hormone de croissance

Stratégie expérimentale

Liu *et al.* Exp Cell Res. 1997, 237:196

Kaulsey *et al.* Exp Cell Res. 1999, 250:35

Afin d'interpréter d'un point de vue fonctionnel la présence de GH ectopique dans les cellules en général et cancéreuses humaines en particulier, nous avons eu recours à l'utilisation d'un ensemble de techniques de biologie cellulaire, moléculaire et de biochimie qui nous ont permis de créer un modèle cellulaire d'effets autocrines de la GH. La stratégie était simple, nous avons cloné l'ADNc de la hGH sous le contrôle du promoteur de la métallothionéine I dans le plasmide pBR322 ainsi que l'ADNc de la bGH sous le contrôle du promoteur de SV 40 dans le plasmide pSV. Ces vecteurs d'expression ont été transfectés dans des cellules humaines (MCF-7, MCF-10A), de rat (BRL) et de hamster (CHO). Les cellules BRL et CHO de type «sauvage» n'expriment pas le récepteur de la GH, nous les avons donc transfectées de façon stable avec différentes constructions (sauvage, dominants négatifs, déficient en internalisation) de l'ADNc du GHR de rat et humain afin de reconstituer la voie de signalisation de la GH. L'expression du GHR en revanche est bien maintenue dans les cellules humaines MCF-7 et MCF-10A. Aucune de ces lignées n'exprime la GH, la prolactine ou l'IGF-I. Comme contrôle, nous avons soit utilisé les plasmides vides soit un plasmide hGH dans lequel le codon «start» ATG d'initiation de la traduction est muté en codon «stop» TTG.

La synthèse et la libération de GH ont été quantifiées par Elisa, confirmées par western blot (WB), RT-PCR et immunofluorescence (IF) observée au microscope confocal. L'activation de la voie JAK-STAT a été testée par WB, IF et immunoprécipitation (IP) en utilisant les anticorps appropriés. La co-transfection de plasmides d'expression de gènes reporter couplés à l'activité chloramphenicol acetyltransferase (CAT) ou luciférase (LUC) et cibles de la GH contenant les promoteurs à éléments de réponse de STAT 1, 3 et 5 a également permis de mesurer l'activation transcriptionnelle induite par la GH autocrine. Nous avons également largement utilisé l'inhibiteur AG490 spécifique de JAK2, les inhibiteurs spécifiques SB203580 de la MAP kinase p38 et PD 98059 des MAPK p44/42 (aussi nommées Erk1/Erk2) et l'antagoniste du récepteur de la GH B2036 afin de déterminer les voies de signalisation impliquées. Cet antagoniste empêche la transduction du signal GH en bloquant spécifiquement la dimérisation du GHR. La prolifération cellulaire a été mesurée suivant les cas par méthode colorimétrique (réduction cellulaire du dérivé MTS du tétrazolium) ou incorporation puis comptage de la thymidine tritiée ou de l'immunofluorescence de la bromodeoxyuridine (BrdU). L'apoptose est quantifiée par marquage des noyaux à l'Hoechst 33258 et comptage des cellules dont l'ADN est typiquement fragmenté.

Validation du modèle

Liu *et al.* Exp Cell Res. 1997, 237:196

Kaulsey *et al.* Exp Cell Res. 1999, 250:35

Les résultats de nos expériences initiales ont montré que les cellules transfectées de façon stable avec l'ADNc de la GH synthétisent correctement la protéine attendue et la sécrète constitutivement dans le milieu dans une gamme de concentration fixe entre 100-150 pM. Pour rappel, la majorité des études *in vitro* ne rapportent des effets cellulaires de la GH exogène qu'à partir d'une stimulation effectuée avec une concentration d'hormone de l'ordre de 100 nM. La faible concentration de GH produite dans chaque lignée cellulaire transfectée est cependant suffisante pour induire une forte activation transcriptionnelle via l'activation des protéines STAT 1, 3 et 5. De plus, cette activité transcriptionnelle de la GH autocrine est bien supérieure à celle induite par une stimulation exogène de GH (100 nM). Enfin, l'activation transcriptionnelle des gènes cibles de STAT 1, 3 et 5 par la GH autocrine est potentialisée par

les facteurs du sérum et l'IGF-I et inhibée par l'antagoniste B2036 du GHR. La figure 7 récapitule la construction du modèle cellulaire MCF7-hGH et ses caractéristiques basiques.

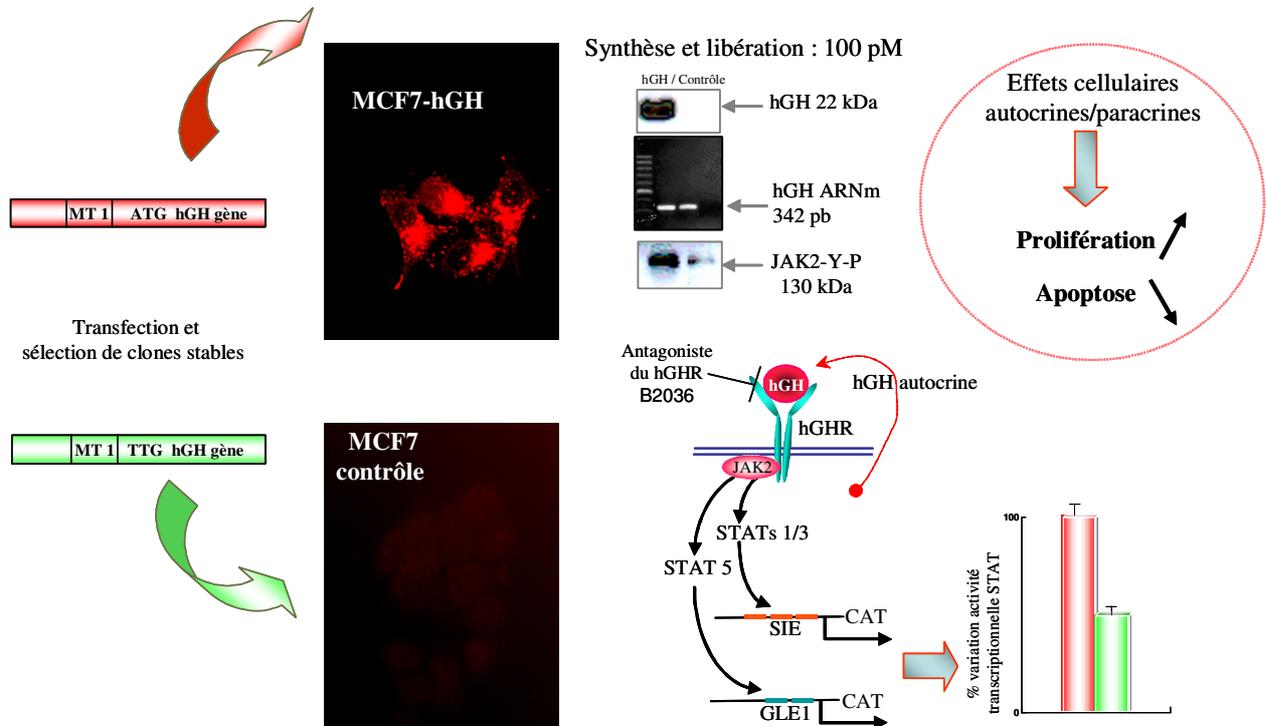


Figure 7. Caractérisation du modèle de production autocrine de hGH par les cellules MCF7-hGH.

Cette figure résume la réalisation des clones stables de cellules MCF7 exprimant la hGH (MCF7-hGH) et des clones obtenus après transfection stable du gène de la hGH dont le codon d'initiation de la traduction a été muté en codon stop (MCF7-contrôle).

La hGH est mise en évidence par IF, WB, et RT-PCR et quantifiée dans le milieu ou sur extraits protéiques totaux par Elisa. La transduction efficace du signal de la hGH autocrine est confirmée par la phosphorylation des résidus tyrosine de la protéine kinase JAK2.

L'activation transcriptionnelle induite par la hGH autocrine est mesurée grâce à des plasmides reporters contenant les éléments de réponse à STAT 1, 3 et 5.

Les effets autocrines / paracrines de la hGH se traduisent par une augmentation significative du nombre de cellules par rapport aux cellules MCF7-contrôle. L'augmentation du nombre de cellules MCF7-hGH étant due à l'activation de la prolifération cellulaire et l'inhibition de l'apoptose.

Nos résultats montrent aussi que la sécrétion de GH par les divers types cellulaires transfectés leur confère un avantage sélectif en terme de prolifération (en milieu sans sérum) et de protection contre l'apoptose induite par la privation de sérum. Les effets prolifératifs et anti-apoptotiques induits par la GH autocrine sont dépendants de l'activation des protéines JAK2 et STAT5, et l'utilisation de l'antagoniste B2036 montre qu'ils s'exercent spécifiquement via l'activation du récepteur de la GH. Nos résultats montrent également que

la stimulation de la prolifération cellulaire par la GH autocrine est dépendante de l'activation des MAPK p38 et p44/42, protéines kinases majeures des voies de transduction des signaux des cytokines et facteurs de croissance⁶⁴. A l'heure actuelle la protéine JAK2 constitue le déclencheur incontournable des différentes voies de signalisation de la GH excepté en ce qui concerne l'activation de la protéine kinase c-Src⁶⁵. La stimulation des cellules produisant la GH par du sérum ou de l'IGF-I induit un effet synergique sur l'augmentation de la prolifération cellulaire suggérant que les voies de signalisation des facteurs sériques, de l'IGF-I et de la GH autocrine/paracrine coopèrent pour augmenter l'état de prolifération cellulaire. En revanche, la production de GH est sans effet sur la forte prolifération cellulaire induite par la stimulation exogène de 17- β -œstradiol. La GH, les IGF et d'autres facteurs de croissance partagent effectivement des molécules informatives communes⁶⁶ telles que les IRS-1 et 2, les protéines STAT, FAK («Focal Adhesion Kinase»), PI3K, c-Crk et les MAPK, alors que la voie d'activation du signal des œstrogènes est indépendante⁶⁷. Des résultats identiques ont été obtenus avec les cellules CHO et BRL transfectées avec les gènes de la hGH ou de la bGH et les différentes constructions du récepteur. Nous n'avons plus utilisé ces lignées par la suite et nous sommes focalisés sur l'étude des effets autocrines de la GH humaine dans les cellules mammaires humaines épithéliales et carcinomateuses.

De manière générale, l'ensemble de ces résultats a permis de valider sur le plan fonctionnel le modèle cellulaire de production autocrine de hGH. En terme de concentration molaire, la GH autocrine/paracrine est un activateur de la prolifération cellulaire et un facteur anti-apoptotique bien plus efficace que la GH exogène. L'étape suivante a consisté à caractériser les effets de la GH autocrine/paracrine au niveau cellulaire et moléculaire et à les comparer à ceux exercés par la GH exogène ou «endocrine».

.....
⁶⁴ Chang & Karin Mammalian MAP kinase signalling cascades 2001 Nature. 410:37

⁶⁵ Zhu *et al.* Identification of a JAK2-independent pathway regulating growth hormone (GH)-stimulated p44/42 mitogen-activated protein kinase activity. GH activation of Ral and phospholipase D is Src-dependent 2002 J Biol Chem. 277:45592

⁶⁶ Zhu *et al.*, Signal transduction via the growth hormone receptor 2001 Cell Signal.13:599

⁶⁷ Koehler *et al.*, Reflections on the discovery and significance of estrogen receptor beta 2005 Endocr Rev. 26:465

Effets autocrines/paracrines de l'hormone de croissance sur le phénotype des cellules carcinomateuses et la transition épithélio-mésenchymateuse

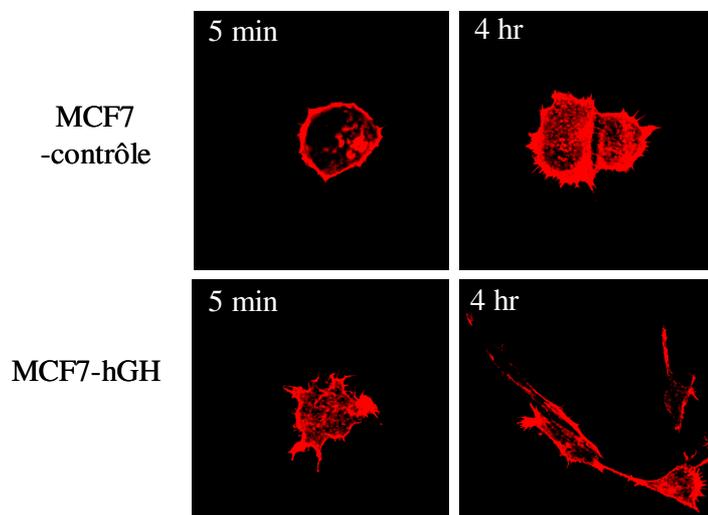
Modification du phénotype des cellules carcinomateuses

Kaulsey *et al.* Endocrinology. 2000, 141:1571

Ayant validé les caractéristiques prolifératives basiques de notre modèle cellulaire de production autocrine de hGH, nous nous sommes intéressés à son rôle sur le phénotype des cellules carcinomateuses mammaires MCF-7. Notre objectif étant de démontrer la potentialité de la GH autocrine à induire un changement phénotypique favorable à la progression tumorale. Pour caractériser les changements phénotypiques induits par la production autocrine de hGH nous avons mis au point une série de tests de mesure des capacités adhésives et migratoires des cellules. La migration cellulaire a été mesurée au travers de chambres poreuses (pores de 8 μm) et par la réalisation du test de cicatrisation («wound healing») *in vitro*.

La production locale de hGH par les cellules MCF-7 a pour conséquence de stimuler leur capacité d'étalement sur un substrat collagénique. En 30 minutes, plus de la moitié des cellules MCF7-hGH (*vs.* 15 % contrôle) se sont déposées sur le substrat et ont formé de nombreuses extensions cytoplasmiques à front large les lamellipodes, ainsi que de longues extensions plus minces les filopodes (Fig 8). L'examen microscopique après 24 heures de culture montre que les cellules MCF7-hGH sont de petite taille et ont une morphologie de type fibroblastique fusiforme (mésenchymateux) avec le noyau généralement dans la partie postérieure par rapport au sens de déplacement (Fig. 9). Les cellules contrôles ont pour leur part conservé la forme cuboïde du type épithélial (Fig.9) des cellules MCF-7 «sauvages».

Figure 8. Effet de la hGH autocrine sur l'étalement cytoplasmique des cellules MCF7. Reformation du cytosquelette d'actine 5 minutes et 4 heures après la mise en culture des cellules produisant la hGH *vs.* cellules contrôles. Observations faites en milieu sans sérum. Immunofluorescence rouge de l'actine F mise en évidence par la phalloïdine-FITC.



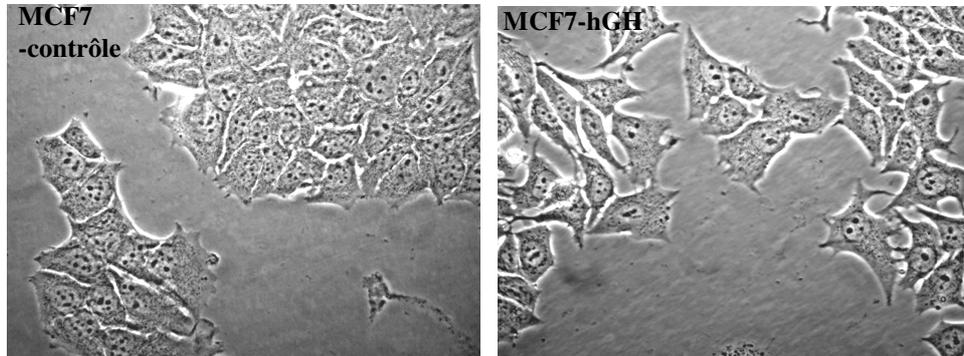


Figure 9. Effet de la production autocrine de hGH sur la morphologie des cellules MCF7. Photographies prises au microscope inversé, les cellules étant à 60 % de confluence et maintenues 14 h sans sérum

A confluence, les cellules contrôles ne prolifèrent plus tandis que les cellules produisant la hGH perdent leur inhibition de contact, se désolidarisent et forment des amas denses en forme de dômes caractéristiques. La production locale de hGH augmente la capacité des cellules à former des colonies en milieu semi-solide d'agar ou en suspension. Cette prolifération indépendante de l'ancrage des cellules MCF7-hGH est fortement potentialisée par la présence de sérum dans le milieu. Les effets de la production de GH se traduisent aussi par la formation de nombreux points focaux d'adhésion où nous avons co-localisé les protéines kinases JAK2 (Fig.10) et FAK phosphorylées. La formation de ces adhésions focales indique une activité d'ancrage importante que l'on peut mettre en relation avec l'augmentation significative des capacités migratoires des cellules sous l'effet autocrine de la GH (Fig. 11 et voir aussi Fig. 14). Enfin, l'acquisition de ce caractère fibroblastique et la perte d'inhibition de contact sont strictement dépendantes de l'activité tyrosine kinase de JAK2 et peuvent être abolies par l'antagoniste B2036 spécifique du GHR.

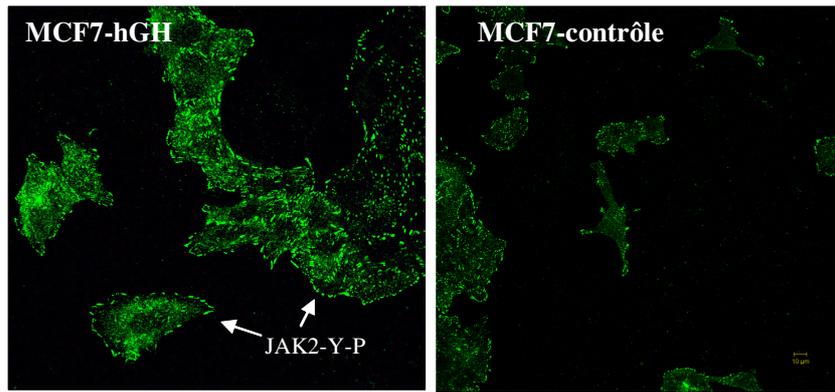


Figure 10. Effets de la production autocrine de hGH sur l'activité de phosphorylation des résidus tyrosines dans les cellules MCF7. Localisation de la protéine JAK2 phosphorylée sur résidus tyrosine (JAK2-Y-P) dans le cytoplasme et aux points d'adhésion focaux (flèches) des cellules produisant la hGH vs. cellules contrôles. Détection par IF confocale après 14h sans sérum.

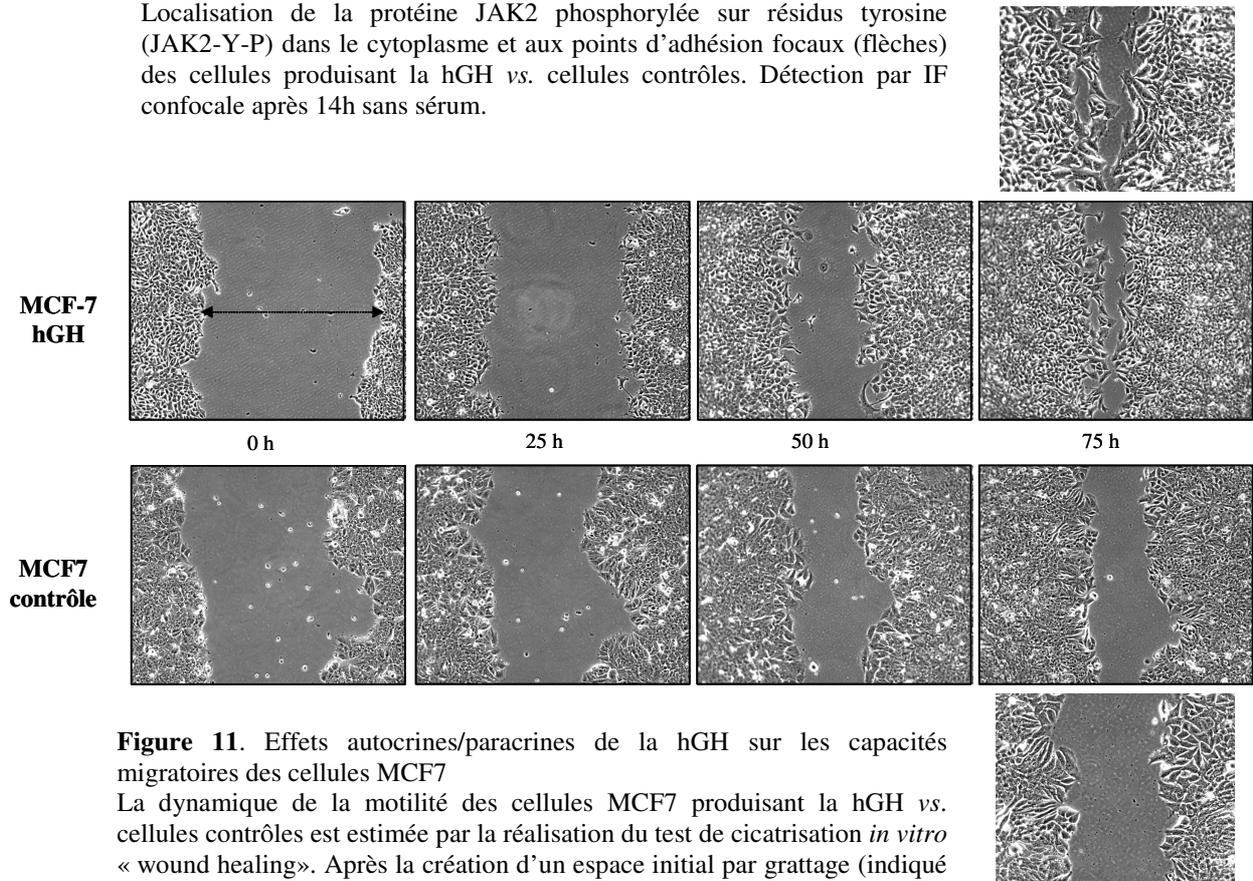


Figure 11. Effets autocrines/paracrines de la hGH sur les capacités migratoires des cellules MCF7
La dynamique de la motilité des cellules MCF7 produisant la hGH vs. cellules contrôles est estimée par la réalisation du test de cicatrisation *in vitro* « wound healing ». Après la création d'un espace initial par grattage (indiqué par la double flèche), les cellules MCF7-hGH se déplacent et recolonisent plus rapidement la surface vierge de la lamelle par rapport aux cellules contrôles. Les cellules sont incubées en milieu sans sérum pendant toute la durée de l'expérience. Observation en contraste de phase X100. Encarts: cellules à 75 h, X200.

Ces résultats sont la démonstration d'une remarquable augmentation des capacités migratoires associée à un changement morphologique des cellules carcinomateuses MCF7 induits par la production autocrine de hGH.

Induction de la transition épithélio-mésenchymateuse

Mukhina *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA. 2004, 101:15166

Nous venons de voir que la production de hGH par les cellules cancéreuses MCF-7 influence positivement l'acquisition d'un phénotype cellulaire de type mésenchymateux favorable à la croissance tumorale. Une autre caractéristique tumorale du phénotype mésenchymateux réside dans l'acquisition de propriétés invasives. Ces propriétés d'invasion que l'on retrouve systématiquement dans les cellules métastatiques sont supportées par l'activation et la sécrétion de métalloprotéinases matricielles qui induisent l'hydrolyse des protéines de la matrice extracellulaire favorisant alors le déplacement des cellules dans la MEC. L'activité MMP généralement absente des cellules épithéliales, augmente lors du phénomène de transition épithélio-mésenchymateuse⁶⁸⁻⁷⁰ (TEM) induite par différents facteurs génétiques ou épigénétiques et indissociable de la progression tumorale. La TEM s'accompagne également de l'induction et de la répression des acteurs moléculaires (Fig. 12).

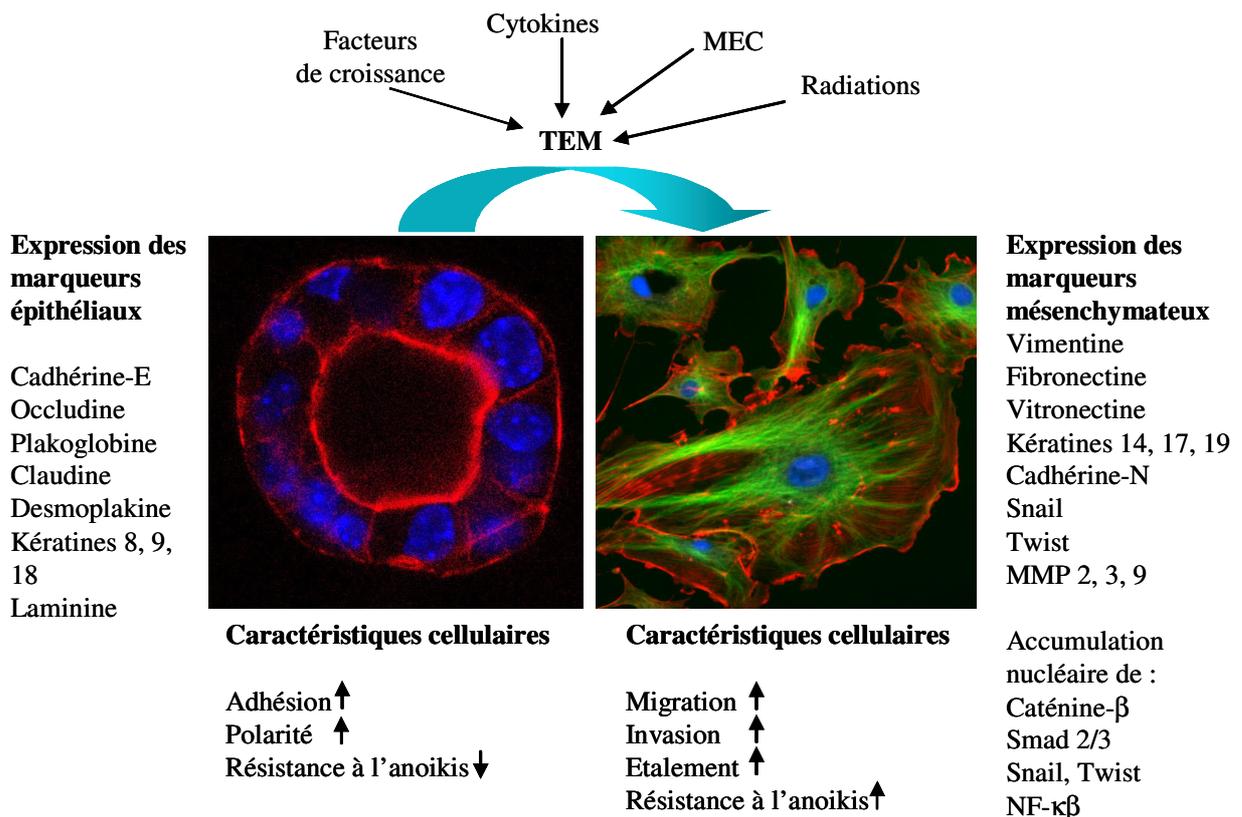


Figure 12. Régulations phénotypiques et moléculaires mises en place lors de la transition épithélio-mésenchymateuse induite par différents facteurs.

⁶⁸ Petersen *et al.*, The plasticity of human breast carcinoma cells is more than epithelial to mesenchymal conversion 2001 Breast Cancer Res. 3:213

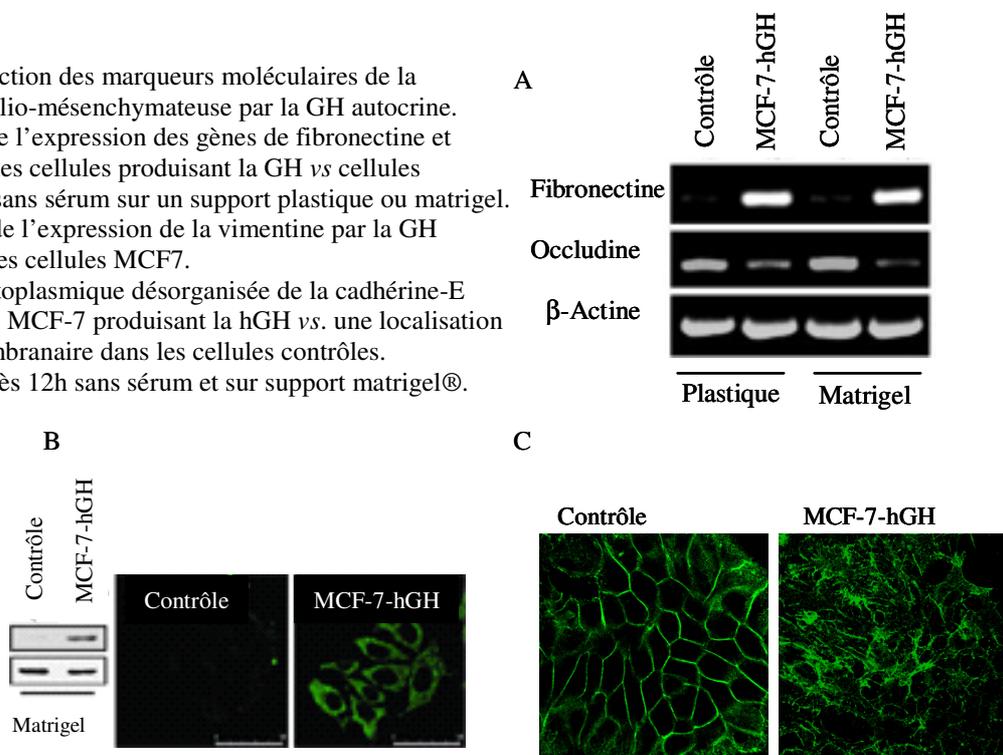
⁶⁹ Thiery & Sleeman Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression 2002 Nat Rev Cancer. 2:442

⁷⁰ Lee *et al.* The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease 2006 J Cell Biol. 172:973

Notre objectif spécifique était d'étudier la séquence d'événements moléculaires impliquée dans la TEM et l'invasion en relation avec la production locale de hGH dans les cellules MCF-7. Les modifications d'expression de certains marqueurs de la TEM (fibronectine, ocludine, vimentine, E-cadhérine, α -caténine, β -caténine et la plakoglobine) ont été investiguées par RT-PCR, WB et IF en microscopie confocale. Les propriétés d'invasion cellulaire sont mesurées en puits recouverts de Matrigel[®] et les métalloprotéinases impliquées sont recherchées par la technique de zymographie (PAGE, 0.2% gélatine).

Les résultats obtenus montrent que la production de GH autocrine par les cellules MCF-7 stimule fortement l'expression génique et protéique des deux marqueurs mésenchymateux fibronectine et vimentine (Fig. 13). En revanche, elle réprime l'expression de la protéine ocludine, un composant structural majeur des jonctions serrées épithéliales.

Figure 13. Induction des marqueurs moléculaires de la transition épithélio-mésenchymateuse par la GH autocrine.
 A. Régulation de l'expression des gènes de fibronectine et ocludine dans les cellules produisant la GH vs cellules contrôles. 12 h sans sérum sur un support plastique ou matrigel.
 B. Stimulation de l'expression de la vimentine par la GH autocrine dans les cellules MCF7.
 C. Rétention cytoplasmique désorganisée de la cadhérine-E dans les cellules MCF-7 produisant la hGH vs. une localisation strictement membranaire dans les cellules contrôles.
 Observation après 12h sans sérum et sur support matrigel[®].



Les effets autocrines de la GH induisent également une désorganisation des jonctions adhérentes qui se manifeste par la rétention cytoplasmique de la cadhérine E (Fig. 13) et l'inhibition d'expression de la protéine plakoglobine (non montré). L'expression des protéines α caténine et β caténine des jonctions adhérentes n'est en revanche pas altérée par la hGH autocrine. Les changements phénotypiques des cellules MCF-7 induits par la production de GH s'accompagnent donc de l'augmentation d'expression de marqueurs moléculaires spécifiques des cellules mésenchymateuses et de l'inhibition des marqueurs épithéliaux.

A l'opposé du comportement observé pour les cellules contrôle et les cellules MCF-7 « sauvages », les cellules MCF7-hGH ont acquis la capacité d'envahir efficacement une matrice collagénique reconstituée à partir de Matrigel® (Fig. 14). L'utilisation d'inhibiteurs de l'activité des MMP nous a permis de montrer que les capacités invasives de ces cellules sont dues essentiellement à l'activation des métalloprotéinases 2 et 9 au niveau transcriptionnel, traductionnel et fonctionnel. De plus, les propriétés invasives des cellules MCF7-hGH sont abolies en présence d'un inhibiteur pharmacologique de la protéine kinase c-Src. Enfin, nous avons montré que l'inhibition de l'expression de la protéine plakoglobine, constituant majeur des desmosomes et hémidesmosomes, par la GH autocrine constitue une étape déterminante dans l'acquisition des propriétés migratoires et invasives par les cellules MCF7.

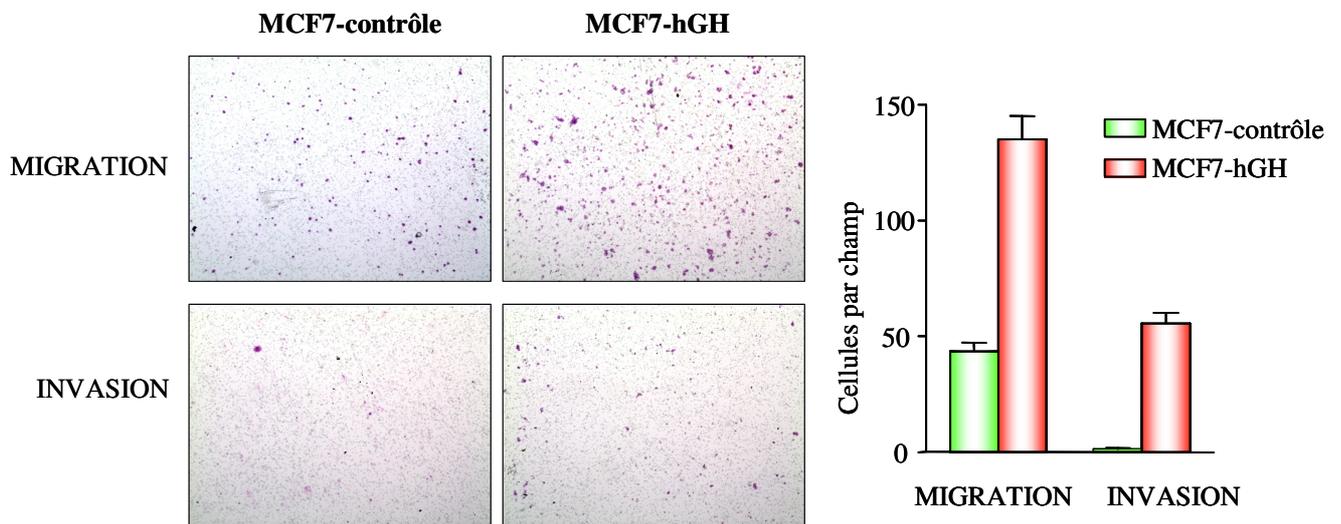


Figure 14. Effets autocrines/paracrines de la hGH sur les capacités migratoires et invasives *in vitro* des cellules MCF7-hGH par rapport aux cellules contrôles. La production autocrine de hGH stimule la migration à travers des inserts poreux et permet une augmentation importante de l'invasion des cellules MCF7 au travers d'une membrane basale reconstituée (couche de matrigel®). Les cellules ayant atteint le fond des puits sont visualisées par coloration au crésyl violet puis comptées au microscope inversé.

Contrairement à la GH autocrine, nous avons découvert que la GH exogène est sans effet sur l'invasion des cellules MCF-7 bien qu'elle stimule efficacement leur motilité. Finalement, c'est au cours de ce travail que nous nous sommes rapprochés de la physiopathologie humaine en réalisant les premières expériences d'implantation orthotopique.

Nous avons ainsi mis en évidence que l'implantation des cellules MCF-7 produisant la GH dans le tissu conjonctif et graisseux mammaire de souris SCID (severe combined immunodeficient mice) induit la formation de tumeurs solides (Fig. 15). Ces tumeurs contrairement à celles induites par les cellules contrôles, présentent un stroma lâche, ne sont pas entièrement encapsulées et montrent de nombreux îlots d'invasion dans les tissus sous-jacents musculaires et conjonctifs en accord avec les propriétés invasives de ces cellules caractérisées *in vitro*.

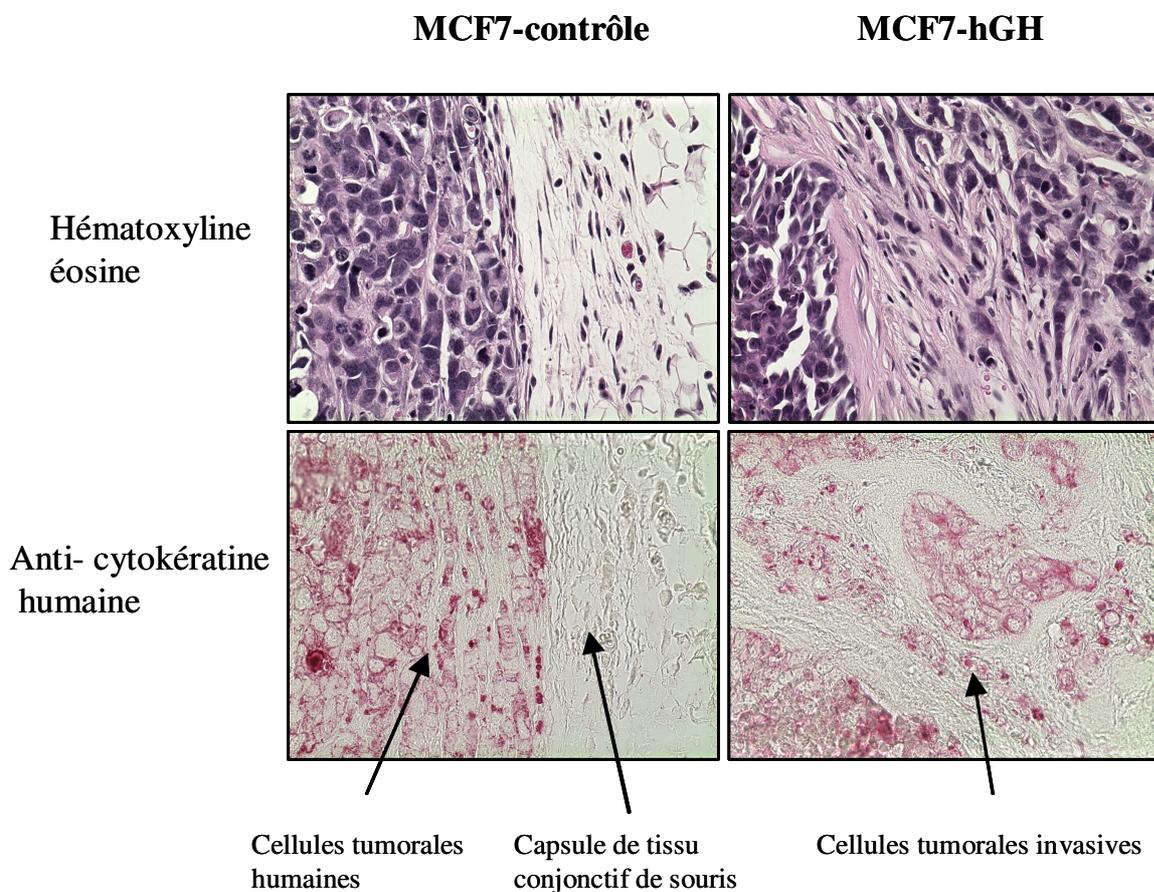


Figure 15. Effets de la production autocrine de hGH sur le développement tumoral *in vivo* des cellules MCF7. La production autocrine de hGH par les cellules MCF7 implantées dans le tissu adipeux mammaire de souris immunodéficientes SCID résulte en la formation de tumeurs solides d'un volume moyen supérieur à celui des cellules contrôles. La coloration hématoxyline/éosine montre que les tumeurs formées par les cellules MCF7-hGH s'infiltrent localement dans le tissu conjonctif par rapport aux cellules des tumeurs contrôles qui restent bien encapsulées. La détection de la cytokératine humaine par immunohistochimie confirme le caractère invasif des cellules MCF7-hGH dans le tissu conjonctif adjacent de souris.

La figure 16 récapitule schématiquement les régulations moléculaires exercées par la GH autocrine dans les cellules MCF7 mises en évidence par nos travaux.

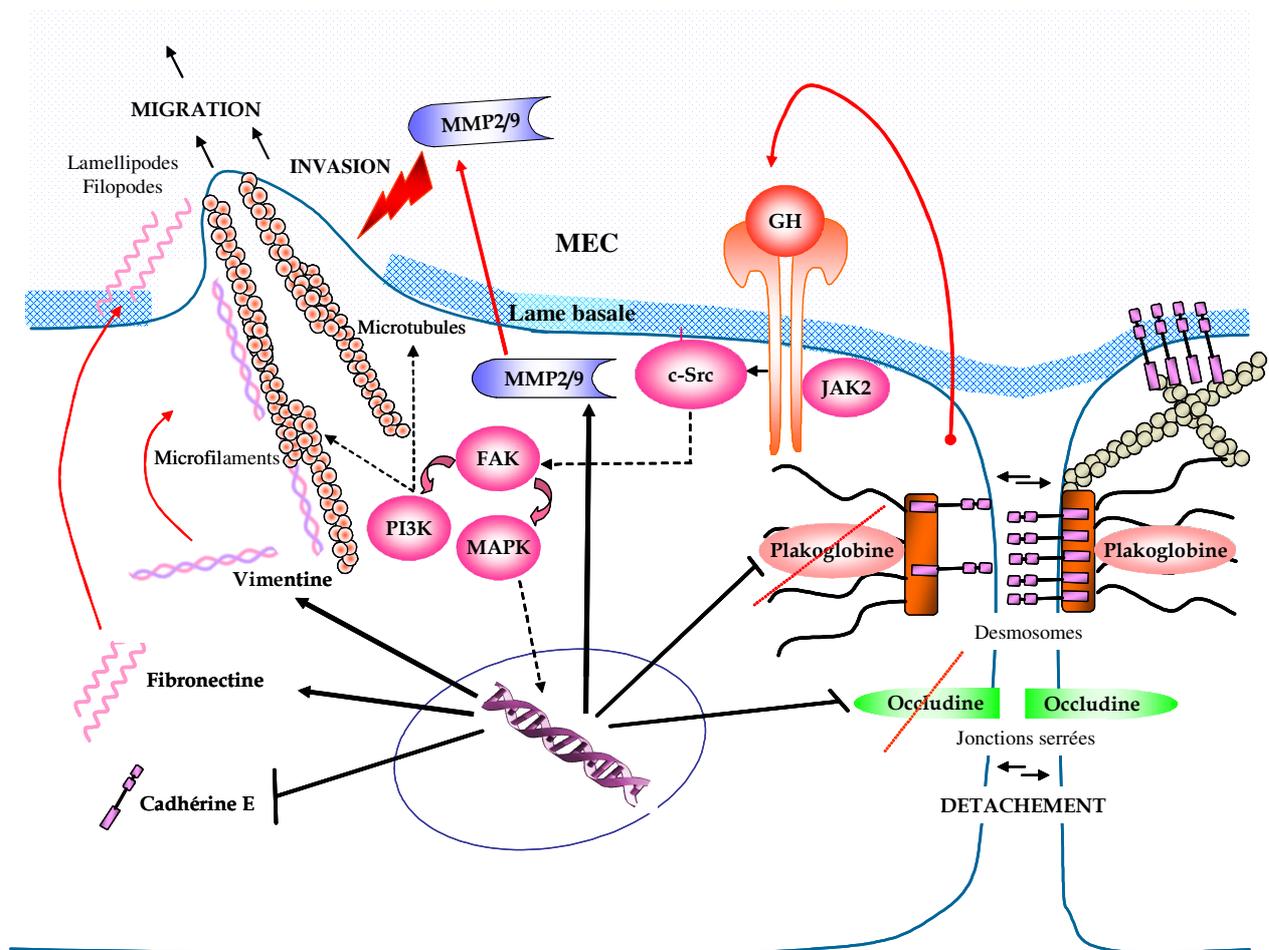


Figure 16. Effets autocrines/paracrines de la hGH sur la progression tumorale des cellules MCF7.

La production continue de hGH induit un changement morphologique de type fibroblastique, stimule l'expression des marqueurs de la transition épithélio-mésenchymateuse et favorise les processus d'invasion, de perte de contact et de migration cellulaire. L'induction de la TEM et la production des métalloprotéinases 2 et 9 sont médiées par l'activation des protéines kinases JAK2 et c-Src. Le mécanisme de régulation de l'expression des gènes qui induisent la TEM par c-Src n'a pas été élucidé mais d'autres travaux suggèrent une implication directe de la protéine FAK et de la voie des MAPK⁶⁶. De même, les mécanismes de réorganisation du cytosquelette permettant la migration des cellules n'ont pas été décryptés mais sont probablement dépendants de l'activité de la phosphatidyl-inositol 3' kinase (PI3K) induite également par la protéine FAK comme démontré par ailleurs⁶⁶ (flèches pointillées).

Collectivement, ces résultats indiquent que la production de hGH autocrine par les cellules tumorales MCF-7 modifie fortement leurs caractéristiques épithéliales pour former des cellules au phénotype fibroblastique et induit l'activation des marqueurs moléculaires de la TEM. La synthèse de GH par les cellules carcinomateuses MCF-7 leur permet d'augmenter leurs capacités migratoires et d'acquérir des propriétés invasives. Enfin, les effets autocrines/paracrines de la GH dans les cellules MCF7 se maintiennent *in vivo* et se caractérisent par l'envahissement localisé du microenvironnement mammaire.

MECANISMES MOLECULAIRES DE LA PROGRESSION TUMORALE INDUITE PAR LA PRODUCTION D'HORMONE DE CROISSANCE DANS LES CELLULES CARCINOMATEUSES MAMMAIRES HUMAINES

La synthèse de GH par les cellules carcinomateuses MCF-7 modifie leur morphologie et augmente leurs capacités prolifératives, anti-apoptotiques, migratoires et invasives. Notre objectif était de déterminer les mécanismes responsables de ces changements cellulaires grâce à une panoplie de techniques: cDNA microarray, transfections, RNAi, mesure d'activité transcriptionnelle, mesures de prolifération, d'apoptose et d'activités antioxydantes, RT-PCR, WB, IP, IF en confocal, inhibiteurs pharmacologiques, implantations orthotopiques.

Recherche des gènes cibles de l'hormone de croissance autocrine/paracrine

Mertani *et al.* J Biol Chem. 2001, 278: 7580

Grâce à une technique de criblage sur membrane de l'expression de 588 gènes humains («cDNA microarray», Clontech®) nous avons identifié 24 gènes dont l'expression est significativement augmentée et 28 dont l'expression est inhibée par la production autocrine/paracrine de hGH. Les gènes régulés positivement codent principalement pour des protéines de synthèse, de réparation et de recombinaison de l'ADN. Les gènes régulés négativement codent majoritairement pour des facteurs activateurs ou répresseurs de la transcription. L'analyse du patron d'expression (Fig. 17) des 52 gènes régulés n'a pas mis en évidence de «clusters» spécifiques qui pourraient immédiatement expliquer les effets de la hGH sur la progression tumorale des cellules carcinomateuses mammaires humaines.

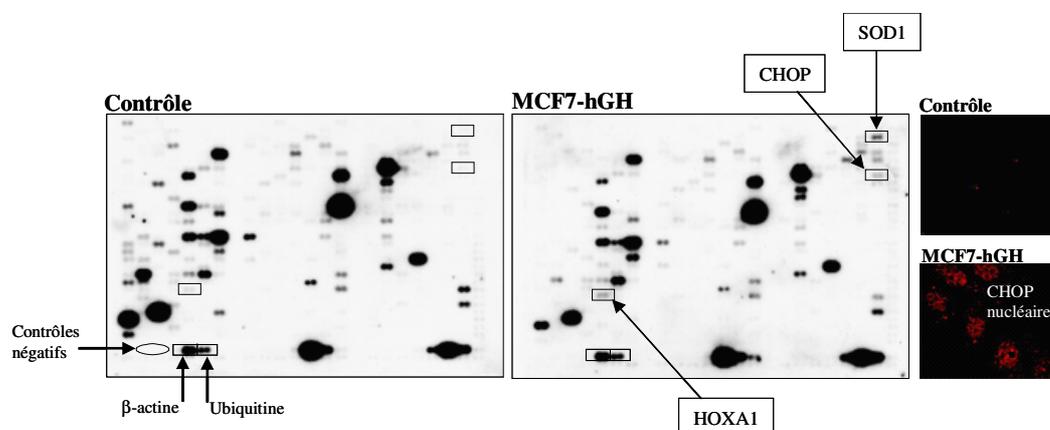


Figure 17. Régulations du transcriptome des cellules MCF-7 par les effets autocrines de la hGH. Patrons d'expression des 588 gènes présents sur la membrane et régulés par la hGH autocrine vs. cellules contrôles. Localisation des trois gènes activés par la GH autocrine, CHOP, SOD1 et HOXA1. Visualisation par IF de l'induction de la protéine CHOP dans le noyau des cellules MCF7-hGH.

L'absence de cluster spécifique d'activation ou de répression de gènes peut s'expliquer dans la mesure où nous utilisons des cellules ayant à la base un potentiel tumoral établi. L'analyse des gènes cibles de la GH autocrine dans les cellules MCF-7 a récemment été menée sur puce Affymetrix. Une nouvelle fois, aucun cluster spécifique n'est apparu et sur 19000 gènes analysés, le groupe de Peter Lobie en a identifié 321 activés et 152 inhibés par la GH autocrine⁷¹. De même, nous venons de réaliser une analyse protéomique des effets autocrine de la GH et nous n'avons pas mis en évidence de variations significatives de l'expression de 500 protéines cellulaires⁷². En revanche, nous avons très clairement mis en évidence que la GH stimule l'activité de certaines de ces protéines⁷², comme par exemple la protéine «paired box» PAX5. Au delà des limites de cette méthodologie discutées par ailleurs⁷², l'absence de variations dans la synthèse protéique suggère que les effets de la GH autocrine induisent préférentiellement des variations qualitatives (phosphorylation, acétylation, glycosylation, ubiquitination) du protéome des cellules MCF-7. Ces variations subtiles d'activité seraient alors suffisantes pour modifier le comportement et le phénotype cellulaire. Cependant cette hypothèse n'exclut pas, comme nous allons le voir par la suite, que la hGH puisse induire également des variations de synthèse de certaines protéines spécifiques. En effet, grâce aux résultats du criblage de gènes nous avons identifié et caractérisé en détail le rôle de trois protéines impliquées dans les mécanismes hyperprolifératifs induits par la production autocrine de hGH dans les cellules carcinomateuses. Il s'agit du facteur de transcription CHOP («C/EBP homologous protein»), l'enzyme super oxyde dismutase (SOD), et la protéine à homéodomaine HOXA1 («homeobox domain containing protein»-A1). Nous avons choisi ces cibles en raison de leur forte induction d'expression génique par la GH autocrine, et aussi du fait qu'elles n'avaient jamais été décrites ni dans la transduction du signal GH ni dans les mécanismes de progression tumorale.

.....
⁷¹ Xu *et al.*, Gene expression profiling to identify oncogenic determinants of autocrine human growth hormone in human mammary carcinoma 2005 J Biol Chem. 280:23987

⁷² Vouyovitch Analyse protéomique des effets autocrines et paracrines de l'hormone de croissance 2006 Mémoire de M2R. CNRS UMR 5123 Université Claude Bernard Lyon 1

Mécanismes de la progression tumorale induite par l'hormone de croissance autocrine/paracrine

Rôle de la protéine CHOP

Mertani *et al.* J Biol Chem. 2001, 278: 7580

La protéine CHOP est une petite protéine nucléaire qui fonctionne en dimère avec les facteurs de transcription de la famille C/EBP, et qui est précocement activée en réponse à un stress cellulaire⁷³. Nos résultats de «cDNA microarray» montrent une activation importante (X5) de l'expression du gène CHOP (Fig. 17). Nous avons confirmé que la production locale de hGH stimule l'expression de CHOP au niveau transcriptionnel et traductionnel et induit son accumulation nucléaire (Fig. 17). Il en résulte comme attendu une élévation importante de l'activité transcriptionnelle de CHOP sur ses gènes cibles. La réalisation de clones stables MCF-7 surexprimant CHOP montre que la protéine n'influence pas significativement la prolifération des cellules mais leur confère une protection renforcée contre l'apoptose induite par privation de sérum. Enfin, nous avons trouvé que les mécanismes d'activation de CHOP par la GH autocrine dépendent de l'activité des protéines kinases JAK2 et MAPK p38. Le facteur de transcription CHOP, stimulé par la GH autocrine de façon dépendante de l'activation de la MAPK p38, exerce donc un effet anti-apoptotique qui concourt à l'élévation significative du nombre de cellules carcinomateuses mammaires humaines.

Activation des fonctions antiradicalaires

Zhu *et al.* Oncogene. 2005, 24: 3774

L'analyse du transcriptome activé par la GH autocrine a également montré une forte activation (X13) du gène codant pour l'enzyme superoxyde dismutase, que nous avons confirmé au niveau traductionnel et en terme d'activité. La SOD est une enzyme antioxydante

induite par les espèces réactives de l'oxygène (espèces oxygénées activées ou ROS) qui a pour effet de neutraliser les ions superoxydes en les transformant en peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). L'H₂O₂ est ensuite catabolisé en eau et dioxygène (O₂) par d'autres enzymes antioxydantes telles que la catalase, la glutamine cystéine synthétase (GCS) et la glutathion peroxydase (Gpx). Les activités enzymatiques SOD, catalase, Gpx et GCS sont donc couplées et permettent aux cellules de résister aux effets délétères du stress oxydatif⁷⁴. Les cellules cancéreuses ont en général un faible taux d'enzymes antioxydantes, ce qui les sensibilise face au stress oxydatif⁷⁵.

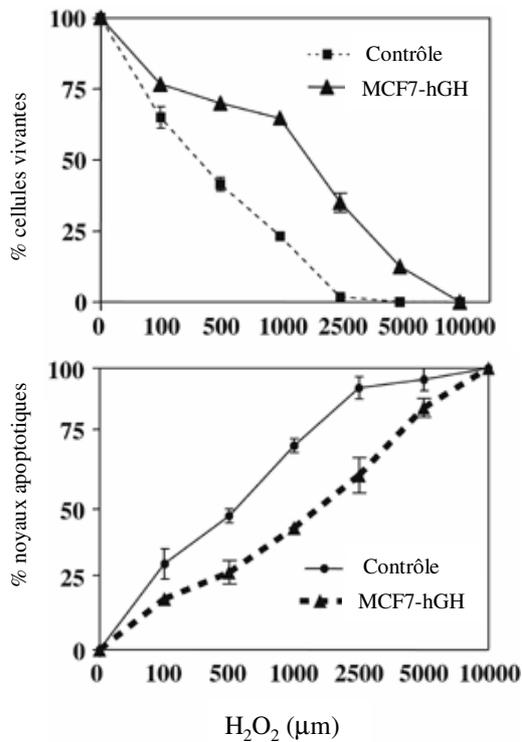
Précédemment, nous avons montré que la production de GH permet aux cellules carcinomateuses MCF-7 de résister à l'apoptose induite par la privation de sérum et identifié la protéine CHOP comme l'un des médiateurs de cette protection. Au vu de la forte activation de la SOD nous avons alors émis l'hypothèse que la GH autocrine pourrait aussi contrebalancer les mécanismes apoptotiques induits par le stress oxydatif. Nos résultats confirment cette hypothèse en montrant que l'apoptose provoquée par des agents inducteurs de ROS (H₂O₂, daunorubicine, glutamate, dihydrochloride) est significativement retardée dans les cellules MCF-7 qui produisent la hGH (Fig. 18). En accord avec cet effet protecteur, nous avons mis en évidence une augmentation de l'expression des enzymes SOD1, catalase, Gpx et GCS, et mesuré une forte activité antioxydante dans les cellules produisant la GH. Les résultats montrent également que l'activité enzymatique de la catalase qui exerce un rôle prépondérant contre les ROS est fortement augmentée dans les cellules produisant la GH, et son inhibition s'accompagne de la perte des effets protecteurs de la hGH autocrine. La stimulation de l'expression et de l'activité de l'enzyme catalase est dépendante de l'activité kinase de JAK2 et de la voie de signalisation des MAPK p44/42 (Fig. 18). Contrairement aux effets constatés de la GH autocrine, la GH exogène est sans effet sur l'expression de la catalase (Fig. 18) et sur l'activité antioxydante totale des cellules MCF-7. En conséquence, la hGH exogène n'exerce un effet que faiblement protecteur contre l'apoptose induite par les ROS.

⁷³ Oyadi & Mori Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress 2004 Cell Death Differ. 11:381

⁷⁴ Matsuzawa & Ichijo Stress-responsive protein kinases in redox-regulated apoptosis signaling 2005 Antioxid Redox Signal. 7:472

⁷⁵ Oberley & Oberley Antioxidant enzyme levels in cancer 1997 Histol Histopathol. 12:525

A



B

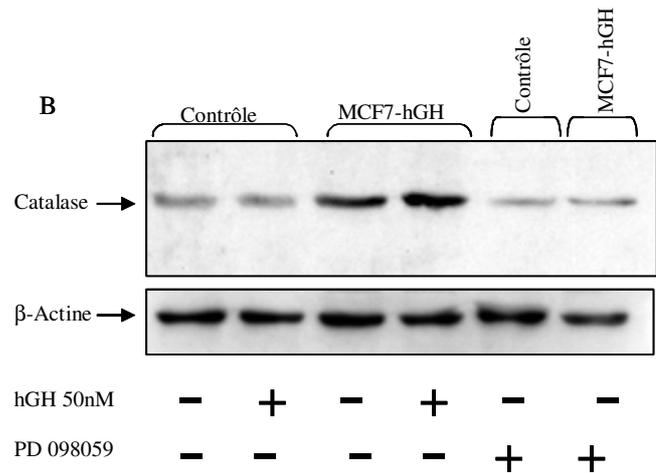


Figure 18. Effets autocrates/paracrine de la hGH sur les fonctions cellulaires antiradicalaires.
 A. Prolifération et apoptose des cellules produisant la GH vs. cellules contrôles en milieu sans sérum et en concentrations croissantes d'H₂O₂.
 B. Régulation de l'expression de la catalase par les cellules produisant la GH vs. cellules contrôles en milieu sans sérum. Effets de la stimulation exogène de hGH et de l'inhibiteur (PD 098059) de la voie des MAPK p44/42 sur l'expression du gène de la catalase.

Ce travail montre donc que la production autocrine de hGH renforce la résistance à l'apoptose provoquée par un stress oxydatif chimique en stimulant l'expression et l'activité des enzymes antioxydantes. La GH autocrine participe de cette manière au maintien des propriétés tumorales et à la survie des cellules carcinomateuses mammaires humaines.

Rôle de la protéine HOXA1

Zhang *et al.* J Biol Chem. 2003, 278: 7580

L'étude des gènes régulés par la GH autocrine a également montré une forte augmentation de l'expression génique du facteur de transcription HOXA1. Ce gène fait partie de la famille de gènes codant pour les protéines à homéodomains qui sont crucialement liées aux processus de développement et de contrôle de la prolifération cellulaire⁷⁶. Nous avons vérifié et confirmé l'augmentation de l'expression de HOXA1 induite par la GH autocrine au niveau génique et protéique et montré aussi une augmentation de son activité transcriptionnelle. L'expression et l'activité de HOXA1 ne sont en revanche pas modifiées par une stimulation exogène de hGH, soulignant à nouveau les différences entre action autocrine et effets endocrines de la hGH. En réalisant des clones stables de cellules MCF-7 exprimant HOXA1 nous avons observé que cette protéine exerce un rôle légèrement stimulateur de la prolifération cellulaire mais particulièrement protecteur contre l'apoptose qui se traduit par une augmentation considérable du nombre de cellules. Nous avons alors recherché les cibles moléculaires de la protéine HOXA1 pouvant expliquer ces effets cellulaires. Les résultats obtenus montrent que la surexpression de HOXA1 s'accompagne d'une augmentation de l'expression protéique de la cycline D1 (initiatrice de la progression en phase G1 du cycle cellulaire) et une inhibition de l'expression des protéines p21 (waf1/cip1) et p27 (kip1) (inhibitrices de la cycline cdk2 associée à la transition G1/S) pouvant expliquer son effet sur la prolifération cellulaire. Nous avons également mis en évidence que la surexpression de HOXA1 induit une forte augmentation de l'expression de la protéine Bcl-2 et n'altère pas les niveaux d'expression de Bax, Bak, Bcl-xL, Fas, FADD et p53 (Fig. 19). L'implication décisive de la protéine Bcl2 dans la médiation des effets anti-apoptotiques de HOXA1 a par la suite été confirmée en utilisant des oligonucléotides anti-sens et un inhibiteur pharmacologique de Bcl2.

L'intérêt vis-à-vis du rôle anti-apoptotique de la protéine HOXA1 a été renforcé lorsque nous avons mis en évidence que sa surexpression confère une forte résistance cellulaire à l'apoptose provoquée par le traitement chimique à la doxorubicine (molécule anti-cancer). La doxorubicine, bien qu'efficace sur l'activation de la protéine p53, son principal médiateur apoptotique, n'inhibe que légèrement l'expression de Bcl-2 dans les cellules qui surexpriment HOXA1 (Fig. 19). Le maintien de l'expression de Bcl-2 permet donc une explication partielle de la chimiorésistance développée par les cellules surexprimant HOXA1.

⁷⁶ Pearson *et al.*, Modulating Hox gene functions during animal body patterning 2005 Nat Rev Genet. 12:893

Cette diminution de sensibilité aux effets cytotoxiques de la doxorubicine suggérait que la protéine HOXA1 exerce un rôle fondamental et alors insoupçonné dans le développement des cancers. Nous avons alors initié une nouvelle série d'expériences relatives aux propriétés oncogéniques de HOXA1. Nous avons déterminé le pouvoir tumorigène de HOXA1 en montrant, dans un premier temps, que sa surexpression dans les cellules MCF7 leur permet d'acquérir une très forte capacité de prolifération indépendante de leur ancrage au support plastique et dépendante de Bcl2 (Fig. 19B). Ensuite, afin de déterminer si la surexpression de HOXA1 pouvait, par elle-même, induire la transformation oncogénique de cellules épithéliales mammaires «normales», nous avons eu recours à la lignée mammaire MCF-10A. Cette lignée immortalisée spontanément est d'origine fibrokystique, dépendante de l'ancrage pour sa survie et non tumorigène *in vivo*. La surexpression stable de la protéine HOXA1 dans les cellules MCF-10A résulte en une augmentation significative de leur prolifération ainsi qu'une réduction très importante de leur taux d'apoptose en accord avec les résultats obtenus sur les cellules MCF7. Le fait le plus remarquable est que la surexpression de HOXA1 dans les cellules MCF-10A leur permet d'acquérir la capacité à former des colonies en milieu semi-solide d'agar sous la dépendance de Bcl-2 (Fig. 19). La protéine HOXA1 agit donc *in vitro* comme un oncogène.

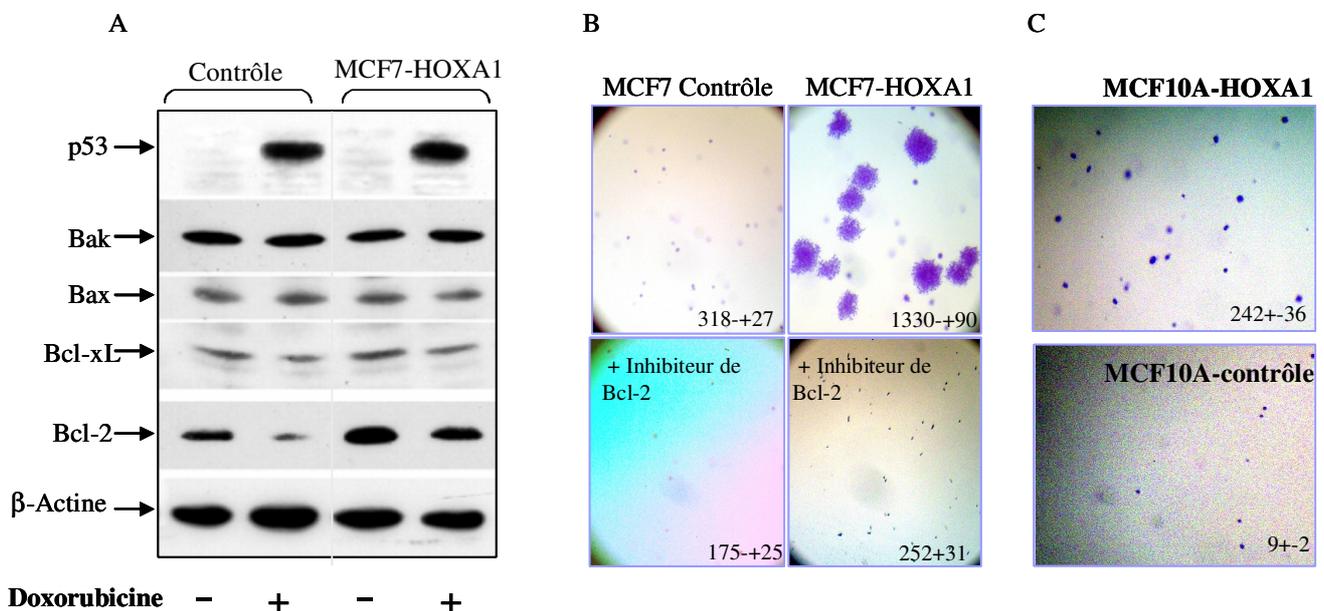


Figure 19. Effets de la surexpression de HOXA1 dans les cellules mammaires humaines carcinomateuses MCF-7 et immortalisées MCF10A.

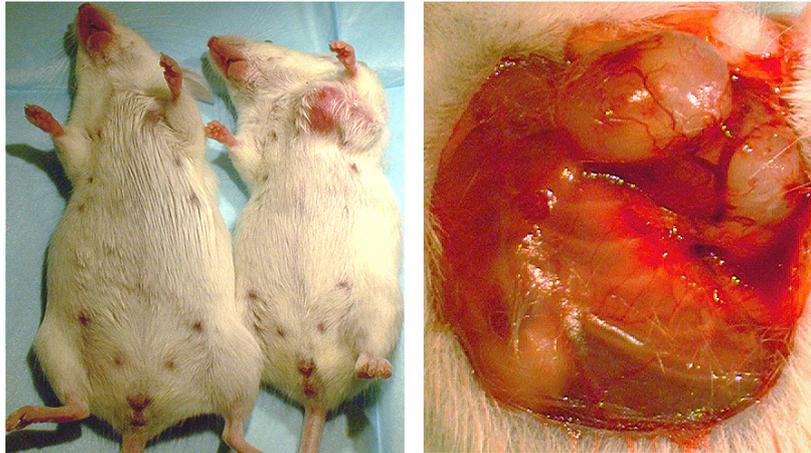
A. HOXA1 induit l'expression de la protéine Bcl-2 qui se maintient malgré le traitement à la doxorubicine et s'oppose ainsi à l'apoptose.

B. HOXA1 stimule fortement la croissance indépendante de l'ancrage des cellules MCF7 d'une manière dépendante à nouveau de l'activité de Bcl-2.

C. HOXA1 induit la transformation des cellules épithéliales mammaires immortalisées MCF10A qui acquièrent la capacité à former des colonies en agar. Le nombre moyen de colonies formées en agar semi solide est indiqué en bas à droite de chaque photo.

Finally, MCF-10A cells overexpressing HOXA1 maintain their oncogenic properties *in vivo* and form solid locally invasive tumors (Fig. 20 and Tab.1) after their implantation in the mammary tissue of SCID mice. HOXA1 is therefore also an *in vivo* activated oncogene.

A



B

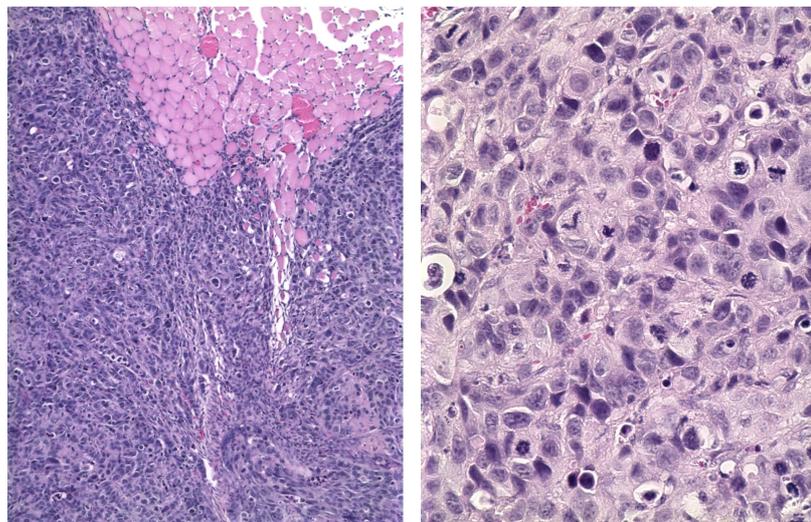


Figure 20. Potentiel oncogénique *in vivo* de la protéine HOXA1.

A. Les cellules MCF-10A surexprimant HOXA1 et implantées dans le tissu adipeux mammaire de souris immunodéficientes SCID se développent en tumeurs palpables très vascularisées. Aucune tumeur ne se forme avec les cellules MCF-10A contrôle (souris à gauche).

B. Colorations hématoxyline/éosine montrant l'invasion locale du muscle sous-jacent par les cellules MCF10A surexprimant HOXA1, et un plus fort grossissement montre le pléomorphisme cytoplasmique et l'activité mitotique élevée de ces cellules maintenue *in vivo*.

Cellules	Implantation	Nombre de cellules	Incidence des tumeurs		Volume moyen tumeurs (mm ³)	
			+ Matrigel	+ PBS	+ Matrigel	+ PBS
MCF-10A contrôle	TA mammaire	5 x 10 ⁶	0/10	0/10	∅	∅
MCF-10A HOXA1	TA mammaire	5 x 10 ⁶	10/10	9/10	903 +- 286	734 +- 55

Tableau 1. La surexpression de HOXA1 dans les cellules immortalisées humaines MCF-10A induit *in vivo* la formation de tumeurs plus volumineuses lorsqu'elles sont implantées en présence de Matrigel®.

Ces expériences permettent de conclure que la production autocrine de GH stimule la protéine HOXA1 qui exerce un puissant effet anti-apoptotique médié par l'activation de la protéine Bcl2. Ces expériences mettent également en évidence que la protéine HOXA1 se comporte *in vitro* et *in vivo* comme un oncogène et suggère donc un mécanisme par lequel la GH autocrine pourrait induire la transformation tumorale des cellules épithéliales humaines.

L'ensemble de ces données indique que la production ectopique de hGH par des cellules carcinomateuses mammaires humaines stimule les mécanismes de prolifération et s'oppose à l'apoptose via l'activation d'un programme transcriptionnel impliquant les protéines CHOP, SOD, catalase et HOXA1 de façon dépendante de la voie des MAP kinases (Fig. 21). Compte tenu du potentiel oncogénique et de la chimiorésistance exercés par la surexpression de la protéine HOXA1, nous avons par la suite testé l'hypothèse que la hGH participe à la transformation tumorale de cellules épithéliales mammaires via l'activation de HOXA1.

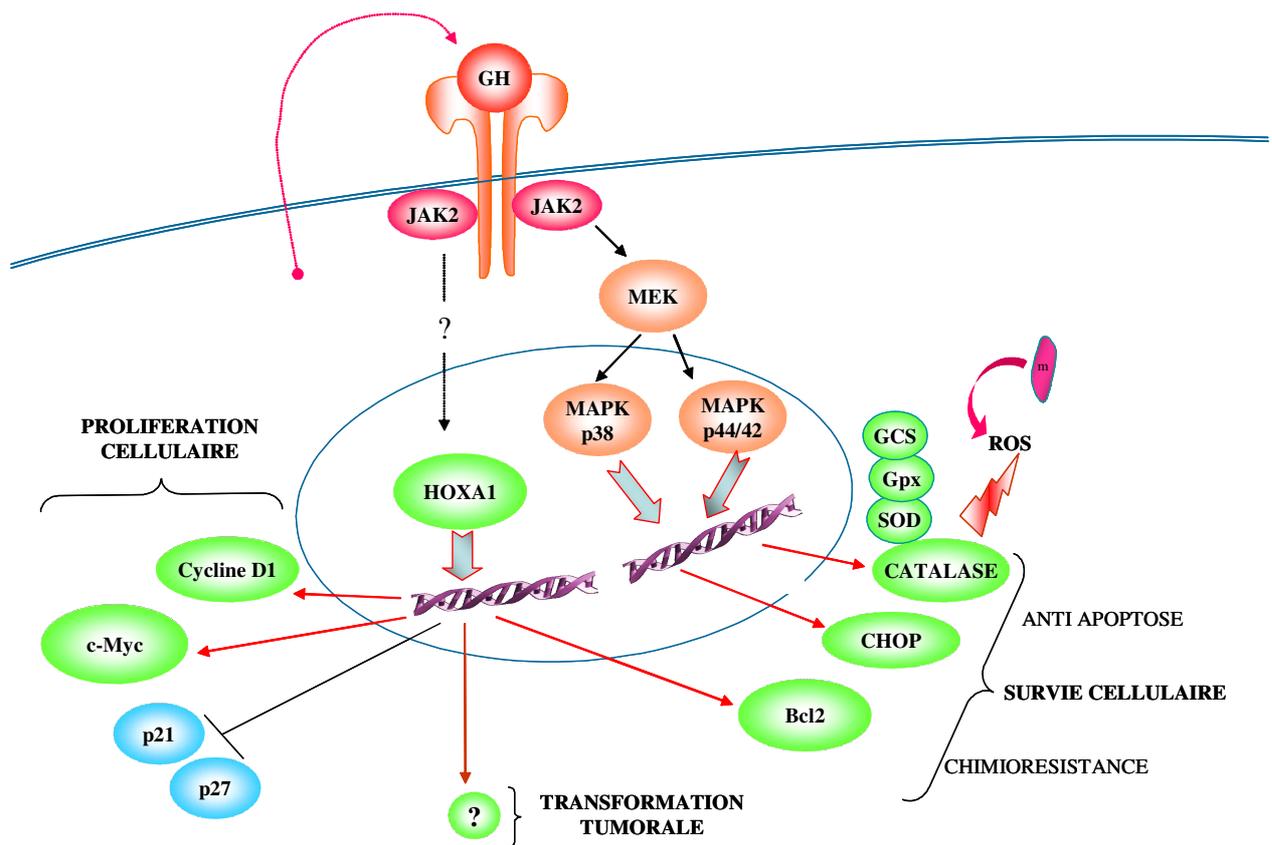


Figure 21. Schéma récapitulatif des mécanismes moléculaires induits par la hGH autocrine dans les cellules carcinomateuses mammaires MCF7.

La stimulation de la voie des MAPK p38 et p44/42 via la protéine JAK2 associée au récepteur de la GH supporte un ensemble d'activations moléculaires qui induisent la prolifération (Cycline D1, c-Myc), inhibent l'apoptose (CHOP), neutralisent les radicaux libres (Catalase) et favorisent la chimiorésistance (Bcl-2). La protéine HOXA1 activée par la GH est le facteur qui commande en partie cette plateforme transcriptionnelle. Le mécanisme d'induction de HOXA1 par JAK2 est encore inconnu tout comme l'ensemble des facteurs en aval de l'activation de HOXA1 et responsables de la transformation tumorale.

POTENTIEL ONCOGENIQUE DE L'HORMONE DE CROISSANCE VIA SES EFFETS AUTOCRINES/PARACRINES

Zhu *et al.* Cancer Res. 2005, 65:317

L'immortalisation des cellules épithéliales mammaires⁷⁷ peut se réaliser expérimentalement par transformation virale (virus Epstein-Barr, antigène T du virus Simian 40, protéines E1A/E1B de l'adenovirus et E6/E7 du papillomavirus) ou par surexpression de la sous unité catalytique transcriptase inverse de l'enzyme télomérase (hTERT) qui a l'avantage de limiter l'aneuploïdie. En revanche, la transformation tumorale⁷⁸ des cellules épithéliales mammaires humaines est dépendante d'une séquence d'événements génétiques et épigénétiques singulièrement complexe faisant appel à plusieurs oncogènes dont *ras*.

Les résultats des travaux sur les effets induits par la GH autocrine nous ont amené à tester l'hypothèse que la GH pourrait exercer un rôle tumorigène direct. Nos objectifs consistaient donc à déterminer le rôle de la production de hGH sur l'immortalisation et/ou la transformation des cellules épithéliales mammaires. A ce moment là nous n'avions pas accès aux cultures primaires de cellules mammaires humaines et nous avons donc utilisé les cellules MCF-10A (immortalisées, aneuploïdes, «normales», non transformées) que nous avons transfectées de façon stable avec le gène de la hGH. Les effets cellulaires et moléculaires dans les clones obtenus ont ensuite été caractérisés avec les différentes méthodes décrites.

Les résultats obtenus montrent clairement que la production faible mais continue de hGH dans les cellules MCF-10A stimule leur prolifération (X2.5) et les protège de l'apoptose (X2) induite par la privation de sérum, en accord avec les résultats des effets observés dans les cellules carcinomateuses MCF-7. La morphologie épithéliale des cellules MCF-10A se transforme également en type mésenchymateux sous l'effet de la production autocrine de GH (Fig. 22). Au niveau moléculaire, la GH autocrine stimule fortement l'expression et l'activité des protéines c-Myc, cycline D1 et Bcl-2 (Fig. 22), et cet effet est à nouveau dépendant de l'activité kinase de la protéine JAK2.

⁷⁷ Hanahan & Weinberg The hallmarks of cancer 2000 Cell. 100:57

⁷⁸ Rangarajan *et al.*, Species- and cell type-specific requirements for cellular transformation
2004 Cancer Cell. 6:171

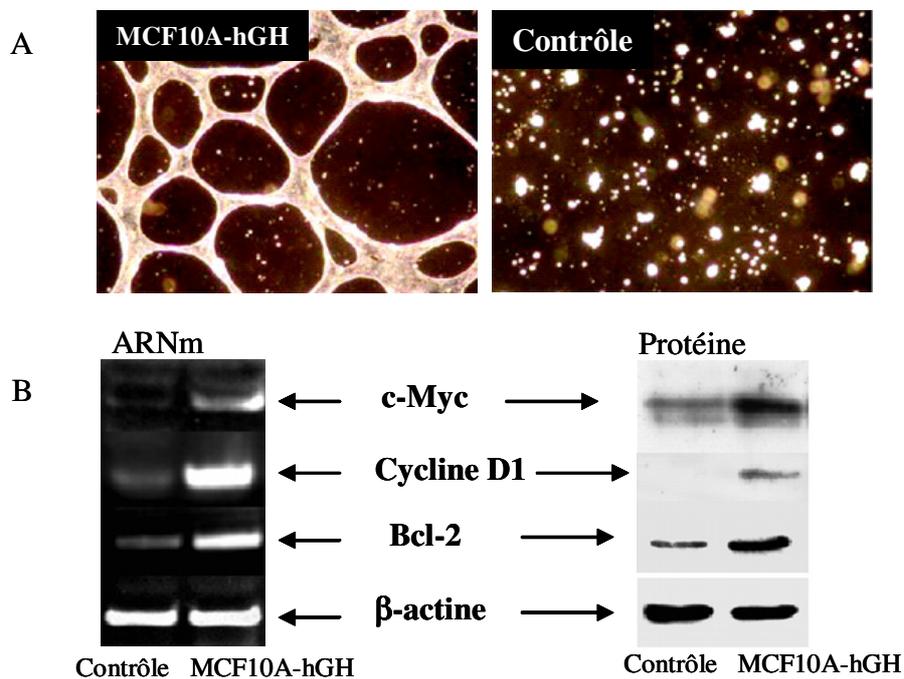


Figure 22. Modifications phénotypiques induites par la production autocrine de hGH dans les cellules épithéliales immortalisées MCF-10A vs. cellules contrôles.

A. La production autocrine de hGH modifie la morphologie des cellules MCF10A-hGH qui, cultivées sur une surface recouverte de Matrigel[®], s'organisent en 2 dimensions pour former des réseaux connectés alors que les cellules contrôle adoptent une organisation globulaire (observation en contraste de phase).

B. La GH autocrine active l'expression des gènes et protéines du cycle cellulaire c-Myc et cycline D1 ainsi que celle de la protéine anti-apoptotique Bcl-2. Il en résulte une augmentation considérable du nombre total de cellules MCF10A-hGH par rapport aux cellules contrôles.

Observées en trois dimensions, les cellules MCF-10A surexprimant la hGH ne sont plus polarisées, ne reforment plus des acini caractéristiques et maintiennent une forte activité de prolifération (Fig. 23). Le facteur HOXA1 exerce à nouveau un rôle majeur dans la médiation des effets autocrines/paracrines de la GH, puisque son inhibition par la technique d'ARNi a pour conséquence de diminuer la prolifération cellulaire en milieu agar et les effets anti-apoptotiques de la GH autocrine et cela via une diminution importante de l'expression des protéines c-Myc, Cycline D1 et Bcl-2.

En conditions normales, les cellules MCF-10A prolifèrent en matrigel sous forme d'amas jusqu'au 8^{ème} jour puis les cellules du centre subissent l'apoptose créant alors une lumière centrale dans l'acini qui stoppe alors sa croissance. Les cellules se polarisent et activent un programme de survie dépendant de la présence de facteurs de croissance⁷⁹.

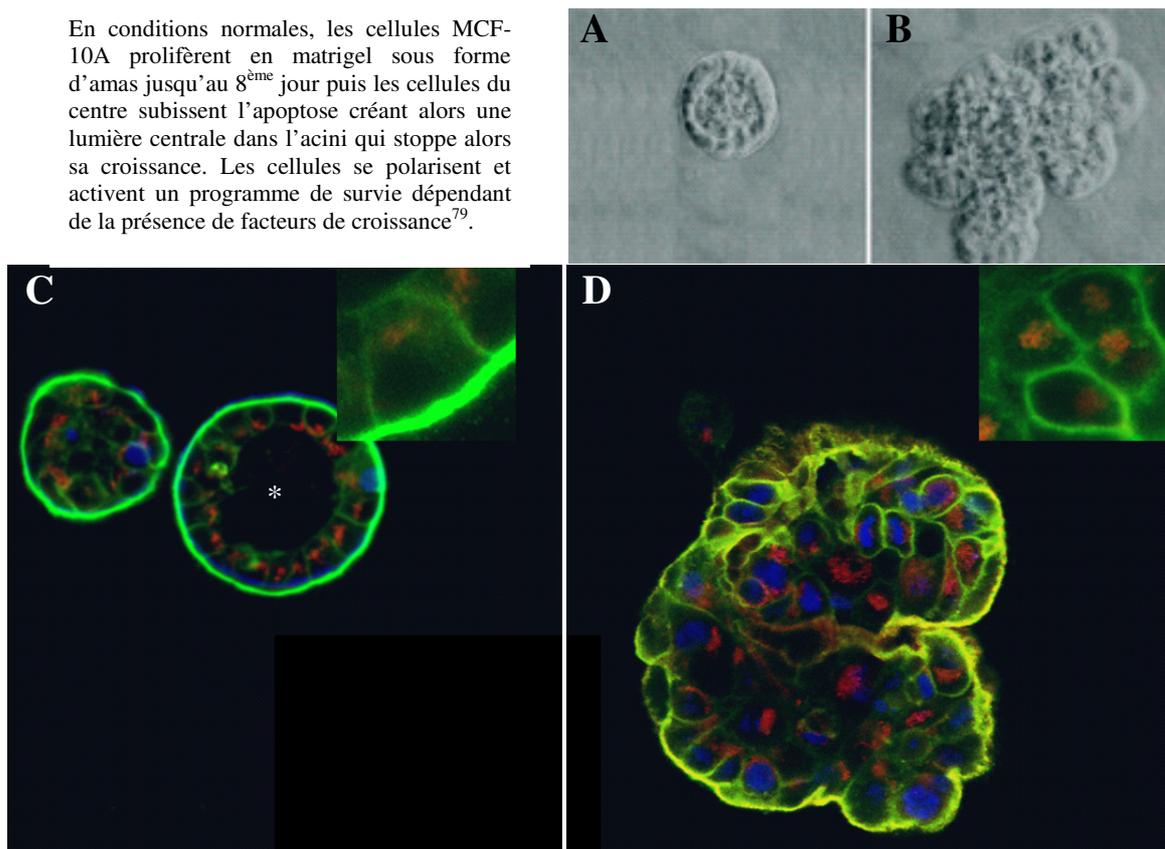


Figure 23. Modifications morphofonctionnelles induites par la production autocrine de hGH dans les cellules immortalisées MCF-10A vs. cellules MCF-10A contrôle.

La production autocrine de hGH stimule la prolifération, s'oppose à l'apoptose, et désorganise la polarisation des cellules épithéliales MCF10A.

A. Architecture caractéristique d'acini formés en trois dimensions par les cellules MCF-10A contrôle après 18 jours de croissance en matrigel (*, lumière centrale). Observation en contraste de phase.

B. La production autocrine de hGH induit la formation de colonies plus importantes et sans lumière.

C. Structure et activité des acini formés par les cellules MCF10A-contrôles en Matrigel®.

D. Structure et activité des acini formés par les cellules MCF10A-hGH en Matrigel®.

Les résultats ont été obtenus par triple détection immunofluorescente des marqueurs apicaux (GM130 en rouge), de la membrane basale (Intégrine $\alpha 6$ en vert) et des cellules en forte activité de prolifération (Ki-67 en bleu). Observation en microscopie confocale. Les deux inserts correspondent à un plus fort grossissement.

La découverte d'importance réside dans l'acquisition du pouvoir transformant des cellules MCF-10A sous l'effet de la production autocrine de hGH. En effet, elles deviennent capables de proliférer en suspension indépendamment de leur adhésion au support plastique et forment de nombreuses colonies en milieu semi-solide d'agar (Fig.24). La croissance des colonies de cellules MCF-10A produisant la hGH n'est possible que si le milieu de culture contient du sérum et dépend de l'activité kinase de la protéine JAK2 (Fig. 24) et n'est pas affectée par la présence d'inhibiteurs de l'activité de c-Src. La suppression par la technique

⁷⁹ Debnath & Brugge Modelling glandular epithelial cancers in three-dimensional cultures 2005 Nat Rev Cancer. 9:675

d'ARN interférent de l'expression des protéines HOXA1, c-Myc, Bcl-2 et cycline D1 abolit également la croissance en agar des cellules MCF-10A produisant la hGH (Fig.24), ce qui indique que la transformation oncogénique induite par la hGH autocrine nécessite l'activation de protéines impliquées dans la prolifération et la survie cellulaire. La stimulation quotidienne par la hGH exogène pendant 21 jours est en revanche sans effet sur la formation de colonies cellulaires en agar (Fig. 24), ce qui souligne à nouveau les différences fondamentales entre les actions moléculaires de la GH exogène (endocrine) par rapport à la GH autocrine.

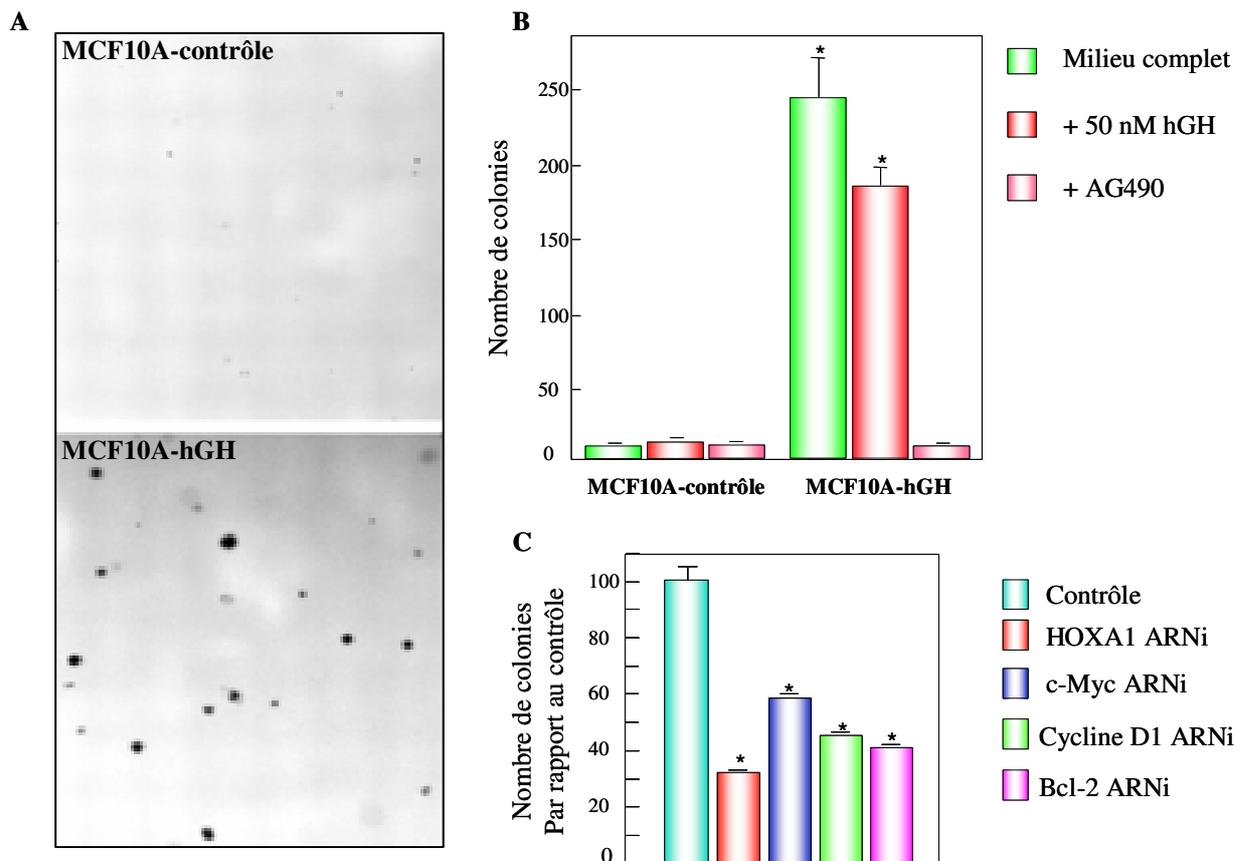


Figure 24. Induction de la croissance indépendante de l'ancrage des cellules MCF-10A par la production autocrine de hGH et mécanismes moléculaires de régulation.
 A. Visualisation des colonies formées en milieu semi-solide d'agar par les cellules MCF10A-hGH.
 B. Effets de la stimulation exogène de hGH (50 nM) et de l'inhibiteur de l'activité kinase de JAK2 (AG490, 50 μ M) sur le nombre de colonies formées par les cellules MCF10A-hGH en milieu semi-solide d'agar.
 C. Effets de la suppression par ARNi de l'expression des gènes HOXA1, c-Myc, cycline D1 et Bcl-2 sur le nombre de colonies formées par les cellules MCF10A-hGH en milieu agar par rapport aux cellules MCF10A-hGH transfectées avec l'ARNi contrôle.

Le potentiel oncogénique de la GH autocrine dans les cellules MCF-10A se maintient *in vivo* puisque l'implantation de ces cellules en présence de Matrigel® dans le tissu adipeux mammaire de souris Nude athymiques (nu/nu) va induire en trois semaines la formation de tumeurs solides (Fig. 25). Ces tumeurs sont particulièrement vascularisées, localement invasives dans le tissu musculaire et conjonctif et maintiennent leur sécrétion de hGH après remise en culture. Mais, aucune métastase pulmonaire ou hépatique n'est détectable six semaines après l'implantation.

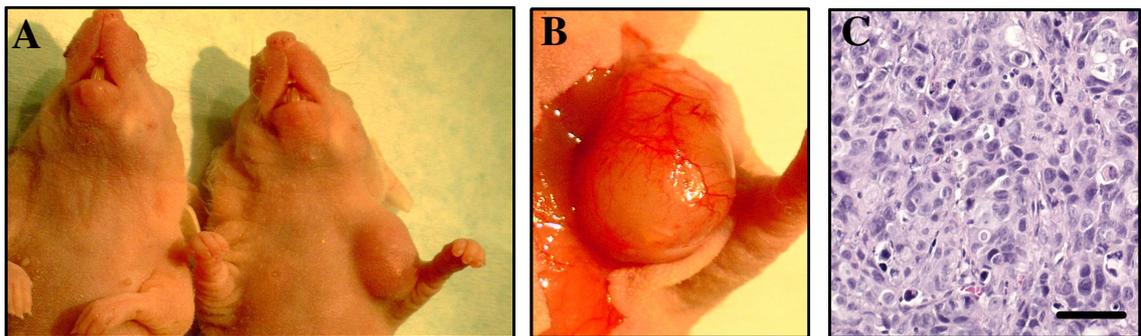


Figure 25. Potentiel oncogénique *in vivo* l'hormone de croissance humaine.

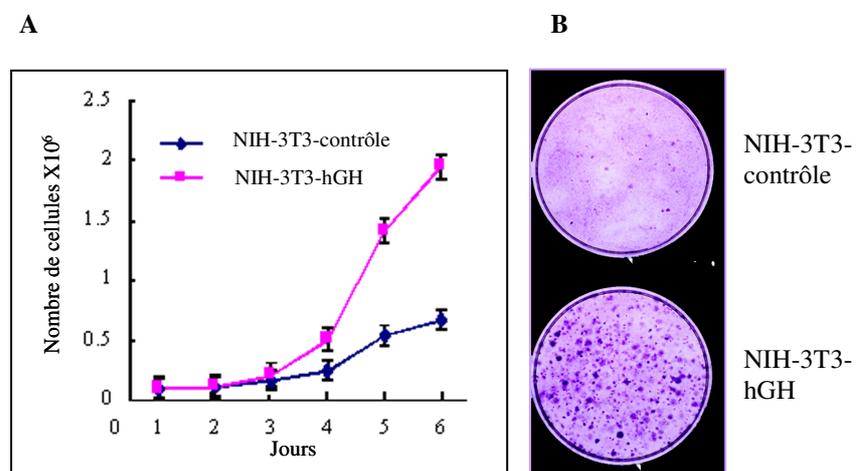
A. Les cellules MCF-10A surexprimant la hGH et implantées en présence de Matrigel® dans le tissu adipeux mammaire de souris immunodéficientes Nude se développent en tumeurs palpables alors qu'aucune tumeur ne se forme à partir des cellules MCF-10A contrôle (à gauche).

B. L'examen nécropsique montre que les tumeurs formées à partir des cellules MCF-10A-hGH sont fortement vascularisées.

C. Coloration hématoxyline éosine montrant que les cellules MCF-10A surexprimant la hGH et développées *in vivo* en tumeur présentent une morphologie cytoplasmique et nucléaire homogène.

Enfin, l'expression stable du gène de la hGH dans les fibroblastes murins non transformés NIH-3T3 stimule leur croissance en monocouche et induit leur croissance indépendante de leur attachement en milieu agar (Fig. 26) indiquant que l'effet tumorigène est potentiellement généralisable à tout type cellulaire exprimant la GH autocrine/paracrine.

Figure 26. Effets autocrines/paracrines de la hGH dans les cellules fibroblastiques murines NIH-3T3
L'expression stable du gène de la hGH stimule fortement la croissance des NIH-3T3 en monocouche (A) et induit la formation de colonies en milieu agar semi solide (B)



Le maintien d'une expression constante de hGH est donc suffisant en soi pour induire via l'activité soutenue de la protéine à homéodomaine HOXA1 la transformation oncogénique de la lignée épithéliale humaine MCF-10A *in vitro* et la formation de tumeurs dans la glande mammaire de souris athymiques. L'activation des gènes nécessaires à la prolifération (cycline D1, c-Myc) et à la survie cellulaire (Bcl-2) par la GH autocrine est sous la dépendance de HOXA1 et accompagne la transformation tumorigène des cellules MCF-10A comme résumé sur la figure 27.

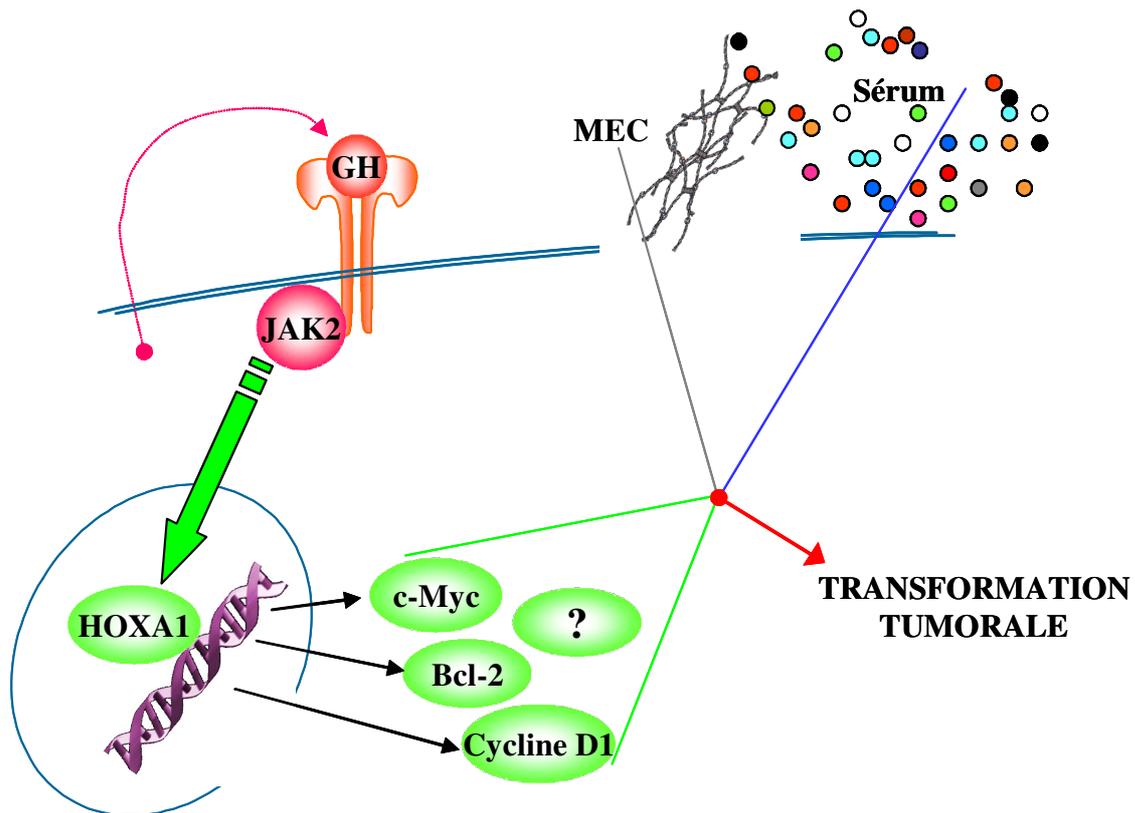


Figure 27. Transformation cellulaire induite par les effets autocrine/paracrine de la hGH.

L'activation soutenue des protéines c-Myc, cycline D1 et Bcl-2 entretenue par la surexpression de HOXA1 est associée à la transformation oncogénique des cellules épithéliales MCF10A. Cette transformation oncogénique est supportée par des acteurs moléculaires supplémentaires activés par le sérum et les protéines de la matrice extracellulaire qui restent à déterminer. De même que les protéines en aval de l'activation de HOXA1 et responsables de la transformation oncogénique sont encore inconnues

Ces résultats suggèrent donc que la synthèse de GH humaine par les cellules épithéliales mammaires pourrait exercer la fonction d'un oncogène et induire la formation de tumeurs dans le sein humain. Une hypothèse qu'il reste désormais à tester.

Les travaux de recherche présentés concernent l'étude de la biologie de l'hormone de croissance autocrine en conditions physiologiques et dans des situations de pathologies cancéreuses. Nous avons mis en évidence la présence ectopique de GH dans le thymus, la rate, les plaques de Peyer et la moelle osseuse de rat. Nous avons également montré que l'expression de GH est présente dans ces tissus chez le fœtus révélant son rôle potentiel au cours du développement du système immunitaire. Chez la souris, les cellules épithéliales de la glande mammaire synthétisent également la GH de façon variable en fonction de l'ontogenèse et de l'état physiologique. L'expression autocrine de GH est maximale pendant la puberté, période durant laquelle la glande mammaire croît de façon isométrique soit au même rythme que le reste du corps, et absente durant les périodes de gestation et de lactation suggérant son implication directe au cours du développement de la glande mammaire. Nous avons par la suite focalisé notre approche fonctionnelle de la GH autocrine en prenant comme modèle des cellules de la glande mammaire. La remarquable plasticité de ces cellules *in vivo* est modulée par la composition du microenvironnement stromal faisant de la glande mammaire un modèle privilégié d'étude des adaptations cellulaires aux contraintes physiques et/ou chimiques du milieu. Nos résultats obtenus *in vitro* indiquent clairement que les effets autocrines/paracrines de la GH induisent la prolifération épithéliale, retardent l'apoptose et s'opposent à la différenciation lactogène. Bien que non prouvés pour l'instant il est probable que ces effets se manifestent également *in vivo* et participent indirectement au contrôle de la quantité de lait produit. Si les effets de la GH hypophysaire se limitent comme décrit dans la littérature à la période prépubertaire de croissance allométrique de la glande⁵⁴, alors la GH épithéliale autocrine exercerait une action complémentaire à la GH hypophysaire probablement impliquée dans le développement des canaux galactophores. La GH est donc à la fois un facteur endocrine majeur de la croissance de la glande mammaire et un nouvel acteur autocrine/paracrine des communications cellulaires qui assurent l'intégrité structurale et fonctionnelle de ce tissu. La compréhension des mécanismes de régulation et d'action de la GH autocrine dans les cellules épithéliales reste cependant incomplète bien que certaines hypothèses puissent être élaborées à partir de nos résultats obtenus sur biopsies et cellules cancéreuses. Les études réalisées sur les lignées « normales » (HC-11, MCF-10A) sont distantes de la physiologie et ne prennent pas en compte le réseau des communications entre fibroblastes, myofibroblastes, adipocytes et cellules épithéliales. C'est pourquoi, l'utilisation de modèles animaux couplée à des expériences de transplantations orthotopiques et évalués par les techniques cellulaires, moléculaires et *in silico* permettra une compréhension plus

précise de la physiologie de la GH autocrine et de son rôle par rapport à la GH hypophysaire dans la fonction et le développement de la glande mammaire.

Le dysfonctionnement des mécanismes de régulation de la plasticité des cellules épithéliales mammaires peut aboutir à des pathologies dont les plus dramatiques se manifesteront par l'initiation d'un cancer. En France, en 2000, le cancer du sein représentait la forme la plus fréquente des cancers féminins avec 42000 cas recensés⁸⁰. La production autocrine de GH maintient l'épithélium mammaire dans un état prolifératif qui devient plus sensible à l'action des carcinogènes. Cela peut être l'une des raisons pour lesquelles les rongeurs déficients en GH ou transgéniques Knock-Out du récepteur sont plus résistants à l'induction chimique de tumeurs mammaires⁸¹. Notre étude de la biologie de la GH en conditions pathologiques montre en premier lieu que l'expression de son récepteur est plus élevée dans les tissus cancéreux hépatiques et mammaires par rapport aux tissus normaux. Cependant il n'existe pas de corrélation entre le niveau d'expression du récepteur et le stade de la progression tumorale. En revanche, la synthèse de hGH augmente fortement dans les cellules cancéreuses mammaires en fonction du grade de la tumeur et de façon concomitante à l'acquisition d'une forte expression stromale. Concrètement, cela indique que si la GH est impliquée dans la progression tumorale du sein *in vivo* son action est liée à l'élévation de sa production cellulaire carcinomateuse et fibroblastique locale plutôt qu'au nombre de ses récepteurs. Compte tenu des effets prolifératifs de la GH décrits dans la littérature²⁰ nous avons initié un travail de recherche basé sur l'hypothèse que la perturbation de l'homéostasie cellulaire induite par la production autocrine de hGH induit la désorganisation structurale de la glande mammaire et favorise l'augmentation du nombre de cellules cancéreuses. Afin de vérifier cette hypothèse nous avons mis au point et caractérisé un modèle cellulaire de production de hGH autocrine en utilisant les lignées immortalisées de cellules MCF-7 et MCF-10A, cette dernière étant assimilée à une lignée épithéliale normale sans propriétés transformantes. Conscients des limites de ces modèles cellulaires par rapport à la pathologie humaine, la complexité des mécanismes mis en jeu nous impose cette approche réductionniste. Néanmoins, de par la complémentarité des techniques adoptées nous sommes désormais mieux à même de définir le rôle de la GH autocrine au cours de la progression tumorale du sein humain.

⁸⁰ Bases de données du Centre international de Recherche sur le Cancer :

<http://www.iarc.fr/FR/Databases/index.php>

⁸¹ Swanson & Unterman 2002 The growth hormone-deficient Spontaneous Dwarf rat is resistant to chemically induced mammary carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 23:977

Nous montrons ainsi que les effets de la GH autocrine vont favoriser les voies d'activation de la multiplication cellulaire et de protection contre l'apoptose, et accentuer certains mécanismes de chimiorésistance. Une des conséquences les plus importantes de la production autocrine de hGH est sa capacité *in vitro* à induire la transition épithélio-mésenchymateuse des cellules mammaires qui acquièrent une morphologie de type fibroblastique. Sous l'effet de la GH autocrine, les cellules MCF7 sont plus mobiles et invasives *in vitro* et forment des colonies plus nombreuses en milieu agar. Ces propriétés concourent à la formation de tumeurs plus volumineuses et localement invasives dans le stroma mammaire de souris immunodéficientes. La compréhension des mécanismes moléculaires de cette progression tumorale nous a permis de démontrer que la production faible et continue de hGH permet l'activation et le maintien d'une plateforme transcriptionnelle gouvernée par l'oncoprotéine HOXA1. Des protéines fondamentales pour l'activation du cycle cellulaire comme la cycline D1 ou pour la protection contre l'apoptose comme Bcl-2 sont hyperactivées en réponse à la GH autocrine sous le contrôle génique exercé par HOXA1. D'autres protéines sont également activées par la GH autocrine qui comme c-Myc favorisent la prolifération cellulaire ou qui comme CHOP, la catalase et la SOD renforcent la survie cellulaire. La figure 28 résume l'ensemble des effets autocrine/paracrine de la GH décrits et impliqués dans la progression et la transformation tumorale des cellules mammaires humaines.

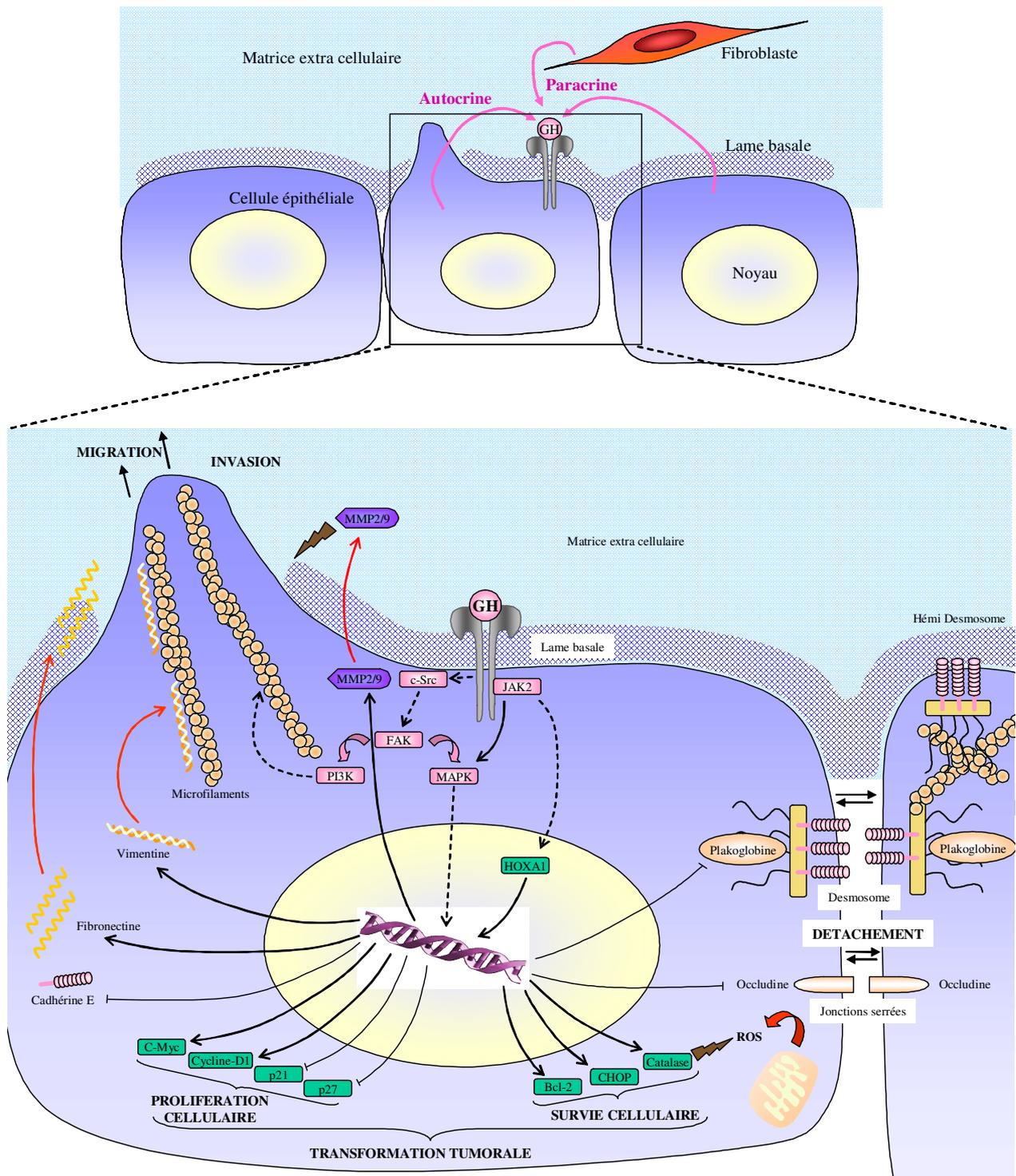


Figure 28. Schéma récapitulatif des effets autocrines et paracrines induits par la GH dans les cellules mammaires humaines.

La production de hGH par les cellules épithéliales, fibroblastiques et cancéreuses induit un ensemble de réorganisations morphofonctionnelles caractérisé par une modification de la morphologie cellulaire, un accroissement des capacités invasives et migratoires et une perte d'adhésions intercellulaires. Au niveau moléculaire, les effets de la GH autocrine se traduisent par l'activation d'une plateforme transcriptionnelle gouvernée par l'oncoprotéine HOXA1 qui permet d'augmenter les capacités prolifératives et antiapoptotiques des cellules. Enfin, l'hyperactivation de HOXA1 par l'expression forcée de hGH favorise les mécanismes de transformation tumorale par un mécanisme encore inconnu.

La production de GH autocrine induit donc l'amplification des signaux prolifératifs et antiapoptotiques permettant d'accentuer le potentiel tumoral des cellules MCF-7 et de transformer les cellules MCF-10A. Ces cellules se dotent en effet de toutes les caractéristiques transformantes que nous sommes capables de déterminer actuellement. Elles forment des colonies en agar, adoptent une morphologie fibroblastique, ne s'organisent plus en acini typiques en trois dimensions et produisent des tumeurs solides chez l'animal. Les cellules MCF-10A forment une lignée proche des cellules épithéliales mammaires normales, leur transformation confère à la GH autocrine un rôle de véritable oncogène qui pourrait être impliqué dans les cancers du sein humain. Des études extensives en cultures primaires de cellules épithéliales mammaires humaines ou en co-culture avec des cellules cancéreuses permettront de clarifier le rôle oncogénique de la GH autocrine, en particulier sur les altérations des activités nucléaires et l'instabilité génomique, deux événements propices à la transformation tumorale. Ces études permettront d'apporter la preuve univoque de l'implication de la GH humaine dans l'initiation et la progression des cancers humains *via* une stimulation de type autocrine et/ou paracrine.

Une question émerge qui préoccupe la communauté scientifique : Quelle est l'incidence des traitements thérapeutiques par la GH sur la formation de tumeurs ? L'utilisation fréquente de GH humaine permet en effet de traiter certaines formes de retards de croissance liées au syndrome de Turner ou provoquées par l'irradiation de tumeurs hypophysaires. La majorité des études publiées chez l'enfant tendent à démontrer que le traitement substitutif par la hGH n'entraîne pas de développement tumoral apparent⁸². Néanmoins, l'injection quotidienne de hGH à des primates induit une hyperplasie significative de la glande mammaire et une augmentation de son index de prolifération⁸³. Au cours de nos travaux, nous avons systématiquement reproduit les conditions d'action de la hGH endocrine par une stimulation exogène de hGH afin de les comparer à la GH autocrine. Nous sommes arrivés à la conclusion que les modes d'actions de la GH autocrine et endocrine se différencient radicalement en terme d'activation moléculaire et de réponse cellulaire, et qu'il existe une spécificité d'action de la GH autocrine dont l'énigme reste intacte. Nous ne pouvons que soumettre certaines hypothèses qui expliqueraient ces différents modes d'actions. La première étant que la GH autocrine est produite continuellement en très faible quantité et donc suivant un mode radicalement différent par rapport à la libération pulsatile en concentration élevée de GH hypophysaire¹⁸.

⁸² Jenkins *et al.*, 2006 Does growth hormone cause cancer? Clin Endocrinol. 64:115

⁸³ Ng *et al.*, 1997 Growth hormone treatment induces mammary gland hyperplasia in aging primates. Nat Med. 10:1141

Les cinétiques d'interaction entre la GH et son récepteur sont donc probablement différentes, soutenue dans le cas de la GH autocrine et alternative dans le cas de la GH endocrine. Cette hypothèse est confortée par les nombreux travaux qui montrent que les différences de modalités pulsatiles de production de GH entre les genres sont directement responsables de profils d'expression géniques sexuellement distincts⁸⁴. D'autre part en conditions physiologiques, l'arrivée d'un pulse de GH hypophysaire est suivie au niveau cellulaire de l'internalisation des complexes ligand-récepteur et d'une désensibilisation temporaire de la cellule²⁰. La concentration locale de GH et la régulation du trafic de son récepteur à la membrane plasmique conditionnent donc la réponse cellulaire. Cette régulation spatiale et temporelle du récepteur n'a pas été retrouvée dans nos modèles cellulaires de production autocrine de hGH où nous montrons que le récepteur de la GH est continuellement synthétisé en abondance (Liu *et al* ECR 1997). Des effets de type intracrines de la GH pourraient également expliquer la différence d'action par rapport à la GH endocrine mais nos travaux sur un modèle cellulaire synthétisant de la GH amputée de sa séquence signal d'exocytose ont réfuté cette possibilité (Mertani *et al.* non publié). Malgré l'absence d'explication décisive entre les modes d'actions autocrine et endocrine de la GH la transformation oncogénique des cellules MCF-10A n'est observée que dans le cas d'une stimulation autocrine, ce qui conforte l'idée que les traitements thérapeutiques par la GH ne sont pas promoteurs de tumeurs mammaires.

La formation d'une tumeur primaire à partir d'une cellule normale est un processus qui se réalise par étapes successives encore mal comprises. Récemment décrite *in vitro* la transformation oncogénique de cellules épithéliales mammaires humaines nécessite la surexpression de l'oncoprotéine H-rasV12, de la sous unité hTERT catalytique de la télomérase et de l'antigène T large du virus SV40⁷⁷. Nos travaux montrent que la simple expression forcée de hGH permet de transformer les cellules humaines MCF-10A. Cependant, les mécanismes de cette transformation oncogénique ne se déclenchent qu'en présence de sérum *in vitro* et de Matrigel[®] *in vivo* ce qui souligne à nouveau leur complexité.

⁸⁴ Ahluwalia *et al.*, 2004 Sexual dimorphism of rat liver gene expression: regulatory role of growth hormone revealed by deoxyribonucleic Acid microarray analysis. Mol Endocrinol. 18:747

Si le développement des cancers est bien la conséquence de l'acquisition d'un avantage prolifératif et antiapoptotique des cellules qui privilégie une voie de transduction du signal au détriment des autres, alors cette caractéristique pourrait être utilisée afin d'imaginer des thérapies ciblées sur la voie sélectionnée. Dans le cas de la GH autocrine, l'utilisation d'antagonistes du récepteur pourrait freiner la progression tumorale, mais il faudra identifier les facteurs de régulation de son expression épithéliale mammaire en conditions physiologiques, pathologiques, ou lors de stimulation nutritionnelles, pharmacologiques ou environnementales et susceptibles de contribuer à la tumorigenèse du sein humain. Nos travaux se sont focalisés sur l'action autocrine de la hGH comme modèle d'étude de régulation des mécanismes de prolifération cellulaire. Son implication au cours de la progression tumorale mammaire rappelle l'importance des ligands endogènes synthétisés dans les tissus cancéreux et en particulier leur implication dans les phénomènes de récurrence de certains cancers hormonaux dépendants.

A Lyon

Le 24 Septembre 2006