



# **Étude de l'implication de la protéine GAS1 dans l'angiogenèse tumorale**

**Mémoire**

**Audrey Turcotte**

**Maîtrise en médecine moléculaire - avec mémoire**  
Maître ès sciences (M. Sc.)

Québec, Canada

# **Étude de l'implication de la protéine GAS1 dans l'angiogenèse tumorale.**

**Mémoire**

**Audrey Turcotte**

Sous la direction de :

Stéphane Gobeil, directeur de recherche

## RÉSUMÉ

La protéine membranaire « Growth Arrest-Specific 1 » (GAS1) est reconnue pour ses effets antitumoraux et anti-métastatiques de par sa capacité à induire l'arrêt du cycle cellulaire, généralement en phase G<sub>0</sub>, et l'apoptose. Cependant, le rôle de GAS1 a été peu étudié et est quelque peu controversé dans le contexte oncologique. De plus, des évidences poussent à croire que cette protéine jouerait un rôle dans le processus angiogénique.

Pour étudier le rôle de GAS1 dans le cancer, des tests *in cellulo* classiques mesurant la prolifération, le cycle cellulaire ainsi que l'apoptose ont été réalisés sur des cellules cancéreuses surexprimant GAS1. Des immunobuvardages ont été utilisés afin de détecter la présence de GAS1 dans les différentes lignées cellulaires et leur milieu de culture. Des xénogreffes utilisant la membrane chorioallantoïque de l'œuf de poulet (essai CAM) ont été réalisées pour évaluer le potentiel tumorigénique et angiogénique des cellules.

La surexpression de GAS1 dans les différentes lignées cellulaires cancéreuses n'a eu aucun effet sur leur prolifération, leur cycle cellulaire ainsi que leur état apoptotique, lorsque mesurés *in vitro*. Cependant, lorsque ces cellules furent testées à l'aide de l'essai CAM, le poids des tumeurs exprimant GAS1 ainsi que l'angiogenèse ont augmenté. Des essais CAM, utilisant entre autres des bouchons de collagène et la protéine GAS1 soluble purifiée, ont démontré que cette dernière stimule indirectement l'angiogenèse.

En résumé, un nouveau rôle pro-angiogénique a été mis en évidence pour la protéine GAS1 soluble. L'angiogenèse tumorale est primordiale à la progression de plusieurs types de cancers incluant le cancer de la prostate. Cette dernière est d'ailleurs ciblée par des traitements anticancéreux. GAS1 soluble représente donc une cible thérapeutique potentielle pour traiter le cancer.

## ABSTRACT

Growth Arrest-Specific 1 (GAS1) is a membrane protein recognized for its antitumor and anti-metastatic effects due to its capacity to induce cell cycle arrest, usually in the G<sub>0</sub> phase, and apoptosis. However, the role of GAS1 has not been the subject of much analysis and is somewhat controversial in cancer. Moreover, evidence leads us to infer that this protein could play a role in angiogenesis.

To study the role of GAS1 in cancer, conventional *in cellulo* tests measuring proliferation, cell cycle and apoptosis were performed on cancer cells overexpressing GAS1. Immunoblotting was used to detect the presence of GAS1 in the different cell lines and their culture medium. Xenografts employing the chorioallantoic membrane of the chicken egg (CAM assay) were used to evaluate the tumorigenic and angiogenic potential of the cells.

GAS1 overexpression in various cancer cell lines showed no effect on their proliferation, cell cycle and apoptotic state when measured *in vitro*. However, when these cells were tested with the CAM assay, weight of tumors expressing GAS1 as well as angiogenesis was increased. CAM assays, using among other things collagen plugs and purified soluble GAS1 protein, demonstrated that the latter indirectly stimulates angiogenesis.

In summary, a new pro-angiogenic role has been demonstrated for soluble GAS1. Tumor angiogenesis is essential to the progression of several types of cancer including prostate cancer. Angiogenesis is therefore the focus of several anticancer treatments. Thus, soluble GAS1 represents a potential therapeutic target for treating cancer.

## TABLE DES MATIÈRES

<b>RÉSUMÉ</b> .....	<b>III</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>IV</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES</b> .....	<b>V</b>
<b>LISTES DES FIGURES</b> .....	<b>VII</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....	<b>VIII</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS ET DES SIGLES</b> .....	<b>IX</b>
<b>REMERCIEMENTS</b> .....	<b>XI</b>
<b>AVANT-PROPOS</b> .....	<b>XII</b>
<b>1. CHAPITRE 1 : INTRODUCTION</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 GAS1 : GÉNÉRALITÉ</b> .....	<b>2</b>
1.1.1 <i>Origine</i> .....	2
1.1.2 <i>Pathologies associées</i> .....	2
1.1.2.1. <i>Le cancer de la prostate et GAS1 : Aperçu</i> .....	3
<b>1.2 STRUCTURE DE LA PROTÉINE GAS1</b> .....	<b>4</b>
1.2.1 <i>Homologie</i> .....	9
1.2.2 <i>GAS1 soluble</i> .....	10
<b>1.3 RÔLES ET FONCTIONS DE GAS1</b> .....	<b>11</b>
1.3.1 <i>GAS1 et l'apoptose</i> .....	12
1.3.2 <i>GAS1 et le cycle cellulaire</i> .....	14
1.3.3 <i>GAS1 et la voie Hedgehog</i> .....	15
1.3.4 <i>GAS1 et l'angiogenèse</i> .....	18
<b>1.4 PROBLÉMATIQUE</b> .....	<b>20</b>
<b>1.5 HYPOTHÈSE</b> .....	<b>20</b>
<b>1.6 OBJECTIFS</b> .....	<b>21</b>
<b>2. CHAPITRE 2 : MATÉRIELS ET MÉTHODES</b> .....	<b>22</b>
<b>2.1 LA CULTURE CELLULAIRE</b> .....	<b>23</b>
2.1.1 <i>Les lignées cellulaires</i> .....	23
2.1.1.1 <i>Les cellules PC-3</i> .....	23
2.1.1.1.1 <i>Expression ectopique de GAS1</i> .....	23
2.1.1.2 <i>Les cellules C8161</i> .....	24
2.1.1.3 <i>Les cellules LOX-IMVI</i> .....	24
2.1.1.4 <i>Les cellules M21</i> .....	25
2.1.2 <i>Les milieux conditionnés</i> .....	25
2.1.2.1 <i>Vérification de la présence protéique dans le milieu conditionné par Slot blot</i> .....	26
<b>2.2 ANALYSE BIOCHIMIQUE DES PROTÉINES CELLULAIRES</b> .....	<b>26</b>
2.2.1 <i>La lyse cellulaire</i> .....	26
2.2.2 <i>Gel SDS-PAGE</i> .....	27
2.2.3 <i>Électrotransfert de protéines sur membrane</i> .....	28
2.2.4 <i>L'immunorévélation</i> .....	28
<b>2.3 LES TESTS DE VIABILITÉ CELLULAIRE</b> .....	<b>29</b>
2.3.1 <i>Le MTT</i> .....	29
2.3.2 <i>La coloration au SRB</i> .....	30
<b>2.4 CYTOMÉTRIE EN FLUX</b> .....	<b>30</b>
2.4.1 <i>Méthode du BrdU</i> .....	30

<b>2.5 LE TEST D' APOPTOSE.....</b>	<b>31</b>
2.5.1 <i>La caspase-3.....</i>	31
<b>2.6 LES TESTS ANGIOGÉNIQUES .....</b>	<b>32</b>
2.6.1 <i>Les cellules endothéliales.....</i>	32
2.6.2 <i>La tubulogenèse sur matrice (in vitro).....</i>	33
2.6.3 <i>Essai de cicatrisation .....</i>	34
2.6.4 <i>Essai de l'anneau aortique de souris .....</i>	34
2.6.5 <i>L'essai CAM (in vivo) .....</i>	34
<b>3. CHAPITRE 3: A SHED FORM OF GAS1 STIMULATES ANGIOGENESIS AND TUMORIGENESIS. (ARTICLE) .....</b>	<b>38</b>
<b>3.1 RÉSUMÉ.....</b>	<b>39</b>
<b>3.2 ABSTRACT.....</b>	<b>40</b>
<b>3.3 INTRODUCTION .....</b>	<b>42</b>
<b>3.4 RESULTS AND DISCUSSION .....</b>	<b>43</b>
<b>3.5 MATERIAL AND METHODS .....</b>	<b>45</b>
<b>3.6 FIGURES AND TABLES .....</b>	<b>49</b>
<b>3.7 SUPPLEMENTAL DATA .....</b>	<b>53</b>
<b>3.8 REFERENCES.....</b>	<b>61</b>
<b>4. CHAPITRE 4 : DISCUSSION, CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>63</b>
<b>4.1 DISCUSSION.....</b>	<b>64</b>
4.1.1 <i>Controverse : les prémices d'une fonction pro-oncogénique de GAS1 .....</i>	64
4.1.2 <i>GAS1 soluble stimule indirectement l'angiogenèse.....</i>	66
4.1.3 <i>GAS1 soluble : un nouvel oncogène ?.....</i>	68
<b>4.2 CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>69</b>
<b>4.3 BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>72</b>
<b>5. CHAPITRE 5: LES ANNEXES .....</b>	<b>86</b>
<b>5.1 ANNEXE 1 .....</b>	<b>87</b>
<b>5.2 ANNEXE 2.....</b>	<b>88</b>

## LISTES DES FIGURES

<b>Figure 1:</b> La protéine humaine GAS1.....	5
<b>Figure 2 :</b> Ancrage GPI.....	7
<b>Figure 3 :</b> Implication de GAS1 dans la voie signalétique Hedgehog.....	17
<b>Figure 4 :</b> La membrane chorioallantoïque.....	35
<b>Figure 5 :</b> Inoculation des cellules sur la CAM. ....	36

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1</b> : Liste des anticorps primaires utilisés pour les immunobuvardages .....	29
<b>Tableau 2</b> : Liste des produits et matériels utilisés.....	88

## LISTE DES ABRÉVIATIONS ET DES SIGLES

- CaP : Cancer de la prostate
- GAS1 : Growth arrest specific 1
- ADAMs: A Disintegrin and Metalloprotease
- CAM: Membrane chorioallantoic
- IL-8 : Interleukine-8
- RNA : Acide ribonucléique
- ADN : Acide désoxyribonucléique
- PCR : Réaction en chaîne par polymérase
- GPI: Glycosylphosphatidylinositol
- RE : Réticulum endoplasmique
- MMP : Métalloprotéases matricielles
- HMEC-1 : Human vascular endothelial cell
- DMSO : Diméthylsulfoxyde
- RPMI-1640: Roswell Park Memorial Institute 1640
- FBS: Fetal serum bovine
- HEPES: acide 4 — (2-hydroxyéthyl)-1 — pipérazine éthane sulfonique
- PBS: Phosphate buffered saline
- siRNAs: Small interfering RNA
- CO<sub>2</sub>: Dioxyde de carbone
- HEK293T: Transfection of Human Embryonic Kidney
- Gas: Growth arrest specific
- VSG: Variant Surface Glycoprotein
- ERK: Extracellular signal-regulated kinases
- HH: Hedgehog
- RGD : (Arg-Gly-Asp) peptid
- GDNF : Glial Cell Line-derived Neurotrophic Factor
- GFR $\alpha$ : GDNF family receptor- $\alpha$
- Phas-1: Growth arrest-specific protein 1 homolog
- NIH 3T3: Mouse NIH 3T3 cell line
- CEP-1: Transcription factor cep-1
- VEGF: Vascular endothelial growth factor
- EGFR: Epidermal Growth Factor receptor
- PI3K: Phosphoinositide 3-Kinase
- AKT : Protéine kinase B
- LCR : Liquide céphalo-rachidien
- NMDA : Acide N-méthyl-D-aspartique
- DMEM : Dulbecco's Modified Eagle's medium
- HRP : Horse Radish Peroxidase
- MTT : Bromure de 3 -(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5 -diphenyl tétrazolium
- SRB: Sulforhodamine B
- DTT: Dithiothréitol
- HUVEC: Umbilical Vein Endothelial Cells
- PECAM: Platelet endothelial cell adhesion molecule

- BrdU: Bromodésoxyuridine
- VEGFR-2: Vascular endothelial growth factor receptor-2
- CDO: Cell adhesion associated oncogene regulated
- SMO: Smoothened
- BOC: Transmembrane protein Brother of Cdo
- SHH: Sonic hedgehog
- PTCH1: Patched 1
- VE-cadhérine: Vascular endothelial cadherin
- MDAMB231 : Lignée cellulaire du cancer du sein
- ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire
- SDS : Ddodécylsulfate de sodium
- TEMED: Tetramethylethylenediamine
- APS : Ammonium Persulfate
- TBS: Tris-buffered saline
- TCGA: The Cancer Genome Atlas
- Ret: Rearranged During Transfection
- HES : Coloration à l'hématoxyline-éosine-safran
- NK: Natural Killer
- HCl : Chlorure d'hydrogène
- NaCl : Chlorure de sodium
- T24 : Lignée cellulaire de carcinome de la vessie humain
- SAOS-2 : Lignée cellulaire d'ostéosarcome humain
- SV40 : Virus simien 40
- SH-SY5Y : Lignée cellulaire de neuroblaste de la moelle osseuse humain
- FACS : Fluorescence activated cell sorting
- a.a.: Acide aminé

## REMERCIEMENTS

Tout d'abord, j'aimerais remercier mon directeur de recherche, le Dr Stéphane, de m'avoir accueilli au sein de son équipe. Ces deux années sous sa direction m'ont permis de développer ma culture scientifique pratique, mais aussi théorique. Merci pour le soutien financier et surtout pour la richesse de cette formation avec l'opportunité de travailler des projets très intéressants et me permettant ainsi de découvrir une multitude de techniques en protéomique, génomique et de biologie moléculaire. Merci énormément !

Ensuite, je voudrais dire un gigantesque merci à mon bras droit « The Great One », le Dr Martin Perreault sans qui je ne saurais pas rendre là aujourd'hui. Il a su m'épauler au-delà de mes espérances. Il m'a montré ce qu'est un esprit critique. Merci pour ton humour qui a su mettre une ambiance dynamique dans le laboratoire. Un merci gros à mon bras gauche, la professionnelle de recherche Marie-France Côté pour son aide très précieuse qu'elle m'a apportée tout au long de mes travaux.

Coraline, je te dis un merci particulier. Toi qui m'as formée à mon arrivée dans l'équipe. Merci pour tes discussions tant scientifiques que personnelles. Tu as amené une touche spéciale au laboratoire ! Je te souhaite la meilleure des chances pour ta continuation !

Je dis merci à tous les membres du laboratoire avec qui j'ai eu l'honneur de côtoyer et de travailler. Guillaume, tu es une mine d'or côté ressources scientifiques !! Joël, merci pour tes conseils lors de ma maîtrise !

Finalement, un merci que je ne saurais quantifier à ma super famille que j'aime de tout mon cœur ! Vous m'avez donné la motivation et la force de finir en beauté mes études. Lots of love Papounet, Mamounie et Babe!!

MERCI À TOUS !!!

## AVANT-PROPOS

Ce mémoire intitulé : « Étude de l'implication de la protéine GAS1 dans l'angiogenèse tumorale. » est présenté à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval afin d'obtenir le grade de M. Sc. et est rédigé sous forme d'insertion d'article.

L'article présenté au chapitre 3 a pour titre : « A shed form of the protein GAS1 stimulates tumor growth. ». Il est en processus final de rédaction et sera soumis dans le journal scientifique « Blood » (facteur d'impact de 11, 841 en 2016) sous peu.

Pour cet article, j'ai (2<sup>e</sup> auteure) eu le privilège de participer activement à la majorité des procédures d'expérimentation, de concert avec le Dr Martin Perreault (1<sup>er</sup> auteur), de collecter les données, de préparer les figures, de traiter et d'interpréter les résultats. La professionnelle de recherche Mme Marie-France Côté (3<sup>e</sup> auteure) est responsable de tout ce qui est en rapport aux expériences menées sur les œufs de poulet (essai CAM, etc.). J'ai participé à la rédaction de l'ébauche du manuscrit. Au final, le professeur Stéphane Gobeil a conceptualisé l'étude, effectué l'analyse et l'interprétation des résultats, la rédaction ainsi que la révision du manuscrit avec l'aide du Dr Martin Perreault.

# **1. CHAPITRE 1 : INTRODUCTION**

## 1.1 GAS1 : Généralité

### 1.1.1 Origine

En 1988, le Dr Schneider a découvert l'existence de gènes impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire via un modèle murin (Schneider, C. et al., (1988)). Un criblage a été effectué afin d'identifier les gènes exprimés spécifiquement dans des cellules de souris (fibroblaste NIH 3T3) en arrêt de croissance. Ceux-ci sont nommés les gènes *Gas* (Growth arrest specific) 1 à 6. Notre intérêt se porte sur *Gas1*, car notre laboratoire a démontré en 2008 (Gobeil, S. et al., (2008)) que ce gène est un suppresseur de métastase chez le mélanome, et de plus, la littérature le considère comme un gène ayant des fonctions antitumorales (Domínguez-Monzón, G. et al., (2009)) (Zarco, N. et al., (2012)) (Jiménez A, López-Ornelas, A. et al., (2014)). Des recherches subséquentes ont confirmé sa capacité à freiner le cycle cellulaire en phase G<sub>0</sub> afin d'empêcher la cellule d'entrer en phase de synthèse (Del Sal, G. et al., (1995)) et ce, dans différents types cellulaires tels que les cellules musculaires (Leem, YE. et al., (2011)) et les adipocytes (Shugart, EC. et al., (1995)). En contrepartie, de récentes études démontrent que *Gas1* est impliqué au niveau de l'embryogenèse en potentialisant la voie Hedgehog, une voie dite protumorale (Martinelli, D.C et al., (2007a)) (Martinelli, D.C et al., (2007b)) (Allen, BL. et al., (2007)). Cette bivalence amène un questionnement sur la vraie nature de *Gas1*.

### 1.1.2 Pathologies associées

Depuis sa découverte, le gène *GAS1* a été associé à plusieurs processus biologiques et pathologiques. Ce gène pourrait être impliqué dans des pathologies comme les maladies rénales, des anomalies du développement et aussi l'Alzheimer. En effet, des scientifiques ont prouvé chez la souris qu'il y avait une augmentation du taux de production de plaque  $\beta$ -amyloïde autour des neurones lorsque *Gas1* n'est pas exprimé ou qu'il y avait une mutation dans son ancre GPI (Chapuis, J. et al., (2011)) (Chapuis, J. et al., (2012)). Il semble également que la perte de fonction de *Gas1* entraîne un état hypoplasique des reins chez le modèle murin en raison de la diminution des taux de prolifération et de l'épuisement

prématuré des cellules progénitrices du néphron résultant en une maladie rénale telle que des reins hypoplasiques (Kann, M. et al., (2015)). Aussi, dû à son interaction avec la voie Hedgehog, *Gas1* a aussi été associé à des anomalies du développement, telles que les malformations craniofaciales (la microphthalmie) chez les rongeurs (Seppala, M. et al., (2007)) et l'holoprosencéphalie chez l'homme (Martinelli, D.C. and Fan, C.M. (2009)) (Ribeiro, L. et al., (2010)).

On peut voir que *Gas1* possède des propriétés pléiotropiques dont les fonctions diffèrent selon le contexte cellulaire. Effectivement, de récentes études associent *Gas1* à la différenciation musculaire (Leem, Y.E. et al., (2011)), au développement cardiaque (Xie, L. et al., (2012)), à la prolifération de cellules mésangiales du rein (van Roeyen, CR. et al., (2013)) ainsi qu'à la maladie de Parkinson (Sun, XL. et al., (2016)).

Des travaux démontrent un rôle fondamental de *Gas1* dans la suppression tumorale (discuté en détail dans la section 1.3) (Del Sal, G., et al., (1995)) (Domínguez-Monzón, G. et al., (2009)) (Zarco, N. et al., (2012)) (Jiménez A, López-Ornelas, A. et al., (2014)). Il s'avère que le cancer est très souvent associé à la perte d'expression de ce gène. Pour ne nommer que quelques exemples : le gliome (Zamorano, A. et al., (2004)), le mélanome (Gobeil, S. et al., (2008)), le cancer du côlon (Li, Q. et al., (2016)) ou encore notre maladie d'intérêt qu'est le cancer de la prostate (Bettuzi, S. et al., (2000)).

#### *1.1.2.1. Le cancer de la prostate et GAS1 : Aperçu*

Le cancer de la prostate est aujourd'hui un problème de santé publique majeur. Au Canada, il s'agit du cancer masculin le plus couramment diagnostiqué où l'incidence a atteint 21 600 nouveaux cas en 2016. Le CaP est la troisième cause de décès par cancer, après les cancers du poumon et du côlon et rectum (statistiques Canada 2016). Parmi les cancers, celui de la prostate est particulièrement mortel de par son atteinte osseuse via les métastases.

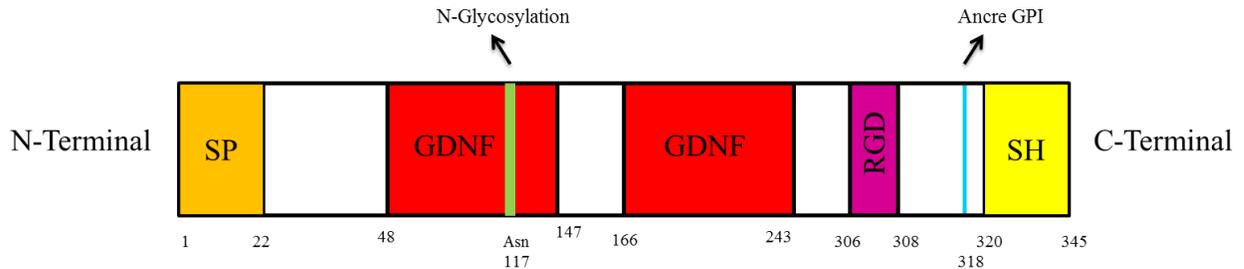
Les sites métastatiques les plus fréquents sont ganglionnaires et osseux. L'extension ganglionnaire est d'abord pelvienne puis rétropéritonéale. Les atteintes osseuses touchent préférentiellement le bassin, la colonne vertébrale, les côtes et le sternum (McNeal, JE. et al., (1988)). Ces métastases osseuses causent approximativement 80 % de la mortalité des patients atteints de ce type de cancer (Sturge, J., et al., (2011)).

Cependant, la diversité de ses fonctions et les études sur son interaction avec la voie Hedgehog (Martinelli, D.C. et al., (2007b)) pourraient remettre en question son statut antitumoral dans le cancer de la prostate. En somme, il est important de poursuivre les recherches sur GAS1, car comprendre sa fonction pourrait permettre d'établir des stratégies de traitement contre le cancer.

## **1.2 Structure de la protéine GAS1**

Situé sur le chromosome 9 au niveau de la région 9q21.3-q22 (Del Sal G, et al., (1994)), le gène *GAS1* code pour une protéine aux propriétés pléiotropiques. Elle est localisée au niveau de la membrane cellulaire. La protéine GAS1 est composée de 345 acides aminés (Del Sal, G. et al., (1992)) pour une masse moléculaire d'environ 45 KDa (Del Sal G. et al., 1994)). Cette protéine extracellulaire possède une structure complexe dont certains éléments restent inconnus à ce jour. Parmi les éléments structurels connus, on retrouve un signal peptide (SP), un site de N-glycosylation sur l'Asn117, une section hydrophobe (SH) en C-terminal, un motif RGD ainsi que deux domaines GDNF. (Figure 1)

GAS1 humain  
45 kDa



**Figure 1 :** La protéine humaine GAS1 : Elle est constituée d'un signal peptide (a.a 1 à 22) à son extrémité N-terminal, de 2 domaines GDNFs (a.a. 48 à 147 et 166 à 243), d'une séquence RGD (a.a 306 à 308), d'une ancre GPI (a.a 318) et d'une section hydrophobe (a.a 320 à 345) à son extrémité C-terminal. (Schéma par Audrey Turcotte)

L'extrémité N-terminal de la protéine GAS1 contient une séquence d'acides aminés hydrophobes correspondant à un signal peptide. Cette portion de la protéine est nécessaire pour cibler le peptide naissant vers le réticulum endoplasmique (RE) en vue de son exportation vers le compartiment extracellulaire (Stebel, M. et al., (2000)). En ce qui a trait au site de N-glycosylation présent sur GAS1, il permet l'addition de glucides à la chaîne peptidique en croissance dès son entrée dans la lumière du RE. Lors de cette réaction, un oligoside se lie à un acide aminé asparagine (Asn) disponible, appartenant à une séquence consensus Asn-X-Ser/Thr (X représente n'importe quel acide aminé à l'exception de la proline pour des raisons d'encombrement stérique) (Pasikowska, M. et al., (2012)). Cette modification post-traductionnelle est importante à la fois pour la structure (Imperiali, B. et al., (1999)), la fonctionnalité (Patterson, M. et al., (2005)) et la stabilité protéique (Tan, M. et al., (2014)). Effectivement, en établissant des contacts directs avec des acides aminés dans la protéine pliée, le site de N-glycosylation prodigue à la protéine une meilleure stabilité (Slynko, V. et al., (2009)) (Culyba, E.K. et al., (2011)).

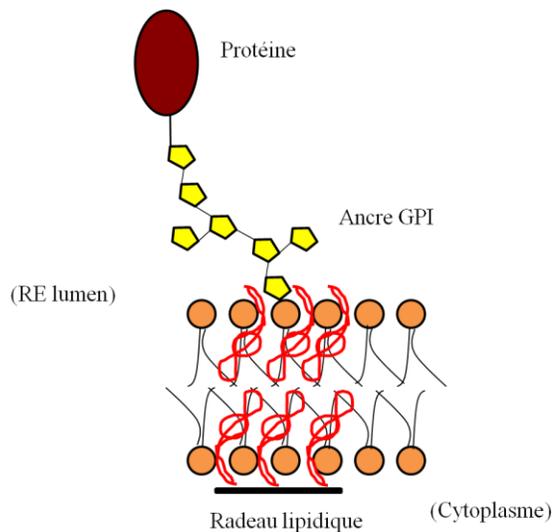
De plus, la N-glycosylation des protéines de surface module les signaux d'interaction de la cellule avec son environnement (autres cellules ou matrice extracellulaire), jouant ainsi un rôle dans la communication cellulaire, la prolifération ou la migration, comme c'est le cas pour les intégrines (Gu, Z. et al., (2011)). Aussi, il a été observé que ce site de N-glycosylation pourrait avoir une implication fonctionnelle pour la liaison de GAS1 avec la

voie Hedgehog (Lee, CS. et al., (2001)) (Martinelli, D.C. et al., (2007a)). En effet, une équipe de chercheur, Lee et al., a utilisée une forme mutée de GAS1 avec une inversion de l'acide aminé 155 glutamine (N) pour un alanine (A) (c'est-à-dire GAS1N/A), présenté en surface, mais non N-glycosylé. Cette mutation a eu pour conséquence une forte diminution de son affinité pour la protéine Sonic Hedgehog.

L'extrémité C-terminal de la protéine GAS1 est principalement constitué d'acides aminés hydrophobes permettant l'ancrage de GAS1 à la membrane plasmique via une ancre GPI (Mayor, S. et al., (2004)) (Stebel, M. et al., (2000) (glycosylphosphatidylinositol : glycolipide permettant l'ancrage de diverses molécules aux membranes cellulaires, principalement des protéines) dans des radeaux lipidiques (Roberts, W.L. et al., (1988)) (Cabrera, JR. et al., (2006)) (Stebel, M. et al., (2000)). Cette ancre est constituée d'éthanolamine, d'une chaîne glycosidique courte, d'un myo-inositol et d'un diacylglycerolphosphate (Figure 2) (Stebel, M. et al., (2000)) (Ruaro, ME. et al., (2000)). L'ancrage GPI représente une alternative aux ancrages peptidiques des protéines transmembranaires (Low, MG. et al., (1989)). Il constitue un atout non négligeable, car il occupe un espace moindre qu'un polypeptide membranaire (Low, MG. et al., (1991)) (Ferguson, MA. et al., (1986)), permet la libération de la protéine dans le milieu extracellulaire après l'action de phospholipases endogènes ou bactériennes (Low, MG. et al. (1991)) (Low, MG. et al. (1989)). Il améliore la mobilité de la protéine dans la membrane, (Low, MG. et al., (1991)) (Ferguson, MA. et al., (1986)), sert de signal de ciblage (Low, MG. et al., (1991)) et peut donner naissance à des seconds messagers (Low, MG. et al., (1991)) (Low, MG. et al., (1989)) (Anderson, RG. et al., (1993)).

Certaines protéines ancrées par GPI sont impliquées dans le contact cellulaire et l'adhésion. D'autres, comme les protéines CD55 et CD59, sont importantes dans la régulation de la cascade du complément (Patel, D., & Witt, S. N. (2017)). Pour sa part, le VSG, une protéine ancrée par GPI retrouvée chez le *T. brucei*, forme une couche protectrice autour du parasite trypanosome (Ferguson, MA. et al., (1999)). Bien que de nombreuses protéines ancrées par GPI aient été caractérisées, certaines, comme la protéine prion, n'ont pas encore de fonction identifiée (Taylor, D.R. et al., (2006)).

Pour GAS1, l'ancre GPI semble être une caractéristique importante permettant d'expliquer le mécanisme de relargage de sa partie soluble. C'est via cette ancre que GAS1 posséderait la capacité de s'attacher à la membrane extracellulaire de la cellule et d'exercer ses fonctions. En effet, un chercheur, Ruaro *et al.* a clairement démontré son importance pour GAS1. Il a muté l'ancre GPI en ajoutant un domaine Fc humain à GAS1 et l'a fait exprimer de façon ectopique par des cellules (GAS1-Fc). Ce changement a altéré la structure de GAS1 expulsée à l'extérieur de la cellule d'une telle manière que cette forme de GAS1 qui est ancrée à la membrane par un domaine transmembranaire n'est plus fonctionnelle (Ruaro, ME. et al., (2000)).



**Figure 2 : Ancrage GPI.** Insertion d'une protéine dans la membrane cellulaire par un ancrage lipidique (glycosylphosphatidylinositol (GPI)). (Schéma illustré par Audrey Turcotte)

La séquence RGD est un motif protéique composé de L-arginine, de glycine et d'acide L-aspartique. Cette séquence est un élément ayant pour fonction principale la reconnaissance cellulaire (Ruoslahti, E. et al., (1986)). Les peptides RGD sont impliqués dans la cohésion cellulaire et sont retrouvés dans de nombreuses protéines dont les intégrines. Ces dernières peuvent être utilisées pour revêtir les échafaudages synthétiques dans l'ingénierie des tissus afin d'améliorer l'attachement cellulaire en imitant les conditions *in vivo* (Jeschke, B. et al., (2002)). Jusqu'à ce jour, aucune information n'est connue sur les rôles de cette séquence RGD chez la protéine GAS1.

Finalement, le domaine GDNF (facteur neurotrophique dérivé des cellules gliales), riche en cystéine, se trouve en 2 copies dans la protéine GAS1. Le GDNF facilite la formation d'un complexe physique entre GFR $\alpha$  et RET conduisant à l'activation de la tyrosine kinase RET favorisant ainsi la survie neuronale (Klein, RD. et al., (1997)). D'autre part, la protéine GAS1 possède une forte similitude structurelle avec la famille des GDNF $\alpha$ , qui médient les réponses GDNF à travers le récepteur tyrosine kinase RET (Cabrera, JR, et al., (2006)) (Buj-Bello, A. et al., (1997)).

Dans le but de comprendre les mécanismes d'action de GAS1, des chercheurs ont analysé l'implication de GAS1 dans la formation du complexe récepteur GFR $\alpha$ 1-RET et les effets en aval de la voie de signalisation RET. Les données obtenues semblent dire que GAS1 serait lié à la GFR $\alpha$  et pourrait avoir une fonction régulatrice dans la signalisation RET. GAS1 aurait la capacité de réduire la phosphorylation de la tyrosine 1062 (López-Ramírez, MA. et al., (2008)) du récepteur RET et ainsi, en diminuer la signalisation (Cabrera, JR. et al., (2006)). D'une manière indépendante du ligand, GAS1 aurait pour rôle de retenir RET au niveau des radeaux lipidiques, de superviser le recrutement d'ERK sur le domaine membranaire et de bloquer l'activation d'AKT sans affecter l'activation d'ERK. Cette hypothèse a été prouvée pour AKT chez le neuroblastome SH-SY5Y (López-Ramírez, MA. et al., (2008)). Ceci indique que la fonction pro-apoptotique de GAS1 pourrait être associée à son interaction avec RET et à l'inhibition d'une voie de survie dépendante de GDNF (Schueler-Furman, O. et al., (2006)).

Malgré les connaissances acquises sur les structures composant la protéine GAS1, la recherche visant à comprendre la fonctionnalité des éléments constituant la protéine GAS1 demeure primordiale.

### 1.2.1 Homologie

GAS1 est une protéine hautement conservée puisqu'elle est exprimée chez plus de 40 espèces (incluant les invertébrés) (Ensemble data 2016 : [doi:10.1093/nar/gkv1157](https://doi.org/10.1093/nar/gkv1157)).

Il a été suggéré par Hättinen *et al.* et Rosti *et al.* que GAS1 soit une protéine dite ancestrale. En effet, sa structure est conservée, et ce, malgré l'évolution des espèces. On retrouve des homologues dans l'embranchement animal des chordés (e.g. *Ciona* et *Amphioxus*), des arthropodes et des vers ronds (Hättinen, T. *et al.*, (2007)) (Rosti, K. *et al.* (2015)). L'espèce ayant le plus d'homologie avec la protéine mature humaine est la souris avec un pourcentage de près de 85 % (Stebel, M. *et al.*, (2000)). Cependant, l'homologie entre les séquences retrouvées chez les mammifères (e.g. le chacal) et celles retrouvées chez les invertébrés est faible, 14 à 19 % pour l'homologue de *Gas1* de *C. elegans* (*Phas-1*) (Agostoni, E. *et al.*, (2002)). Il demeure à savoir si les gènes d'insecte ou de ver identifiés comme homologues de *Gas1* partagent effectivement l'une des fonctions de *Gas1* des vertébrés.

Parmi les éléments les plus conservés entre espèces, on retrouve une boucle large de 10-15 acides aminés non structurée dans le domaine N-terminal de la protéine GAS1. Cette boucle est présente chez les vertébrés supérieurs, dont les mammifères et le poulet, mais non chez les poissons (Rosti, K. *et al.* (2015)). La fonction de cette boucle particulière demeure inconnue à ce jour. L'ancre GPI est une autre structure conservée chez GAS1. En effet, un des orthologues de GAS1, PHAS-1, possède également une ancre GPI qui est essentielle au développement de l'organisme *C. elegans* (Murata, D. *et al.*, (2012)). L'ancre GPI est un élément protéique important et il est retrouvé chez de nombreux eucaryotes, y compris les protozoaires, les champignons, les plantes, les insectes et les mammifères (Nosjean, O. *et al.*, (1997)). Chez les vertébrés, les protéines ancrées par GPI ont été identifiées dans tous les principaux types de cellules et tissus (Nosjean, O. *et al.* (1997)). Il en est de même pour la drosophile (*Drosophila*) (Guo, Z. and Wang, Z. (2009)) (Hayashi, S. *et al.*, (1993)). Étant donné que les protéines possédant une ancre GPI sont des protéines

membranaires (Nosjean, O. et al., (1997)), cela suggère que les homologues de GAS1 humain détenant cette caractéristique sont aussi des protéines membranaires.

Un fait important à souligner est que GAS1 murin et GAS1 de poulet (*Gallus gallus*) auraient des similarités en ce qui a trait à leur fonctionnalité puisqu'elles peuvent toutes deux inhiber la prolifération des cellules NIH 3T3 lors de leur surexpression (Lee, C.S. and Fan, C.-M. (2001)). Grâce à cette caractéristique, il est possible d'étudier cette dernière dans différents modèles *in vivo* et *in vitro*. Même avec une faible homologie, une similitude fonctionnelle est constatée entre les gènes *Phas-1* du *C. elegans* et *GAS1* humain. Effectivement, le gène *Phas-1* est impliqué lors de l'apoptose suite à son activation par CEP-1 (orthologue de p53 humain) (Derry, B. et al., (2007)) tout comme *Gas1* à la capacité d'induire l'apoptose à l'aide d'une co-expression de p53 (Zamorano, A. et al., (2003)). De plus, la surexpression de *Phas-1* dans des cellules NIH 3T3 provoque des effets similaires à son homologue murin (Agostoni, E. et al., (2002)).

En résumé, la grande homologie interspèces de la protéine GAS1 rend possible son étude chez plusieurs modèles d'animaux dont le poulet et la souris.

### 1.2.2 *GAS1 soluble*

La protéine GAS1 est ancrée à la membrane plasmique via une ancre GPI. Ce type d'ancrage membranaire est retrouvé chez des protéines de type membranaires plasmatiques. Ce sont des protéines périphériques ou des protéines membranaires intégrales. Ces dernières correspondent aux protéines associées à la bicouche lipidique de la membrane plasmique et celles qui y sont liées de manière covalente. Elles font face à l'environnement extracellulaire (Varki, A. Cummings, RD. Esko, JD. et al., editors (2009)). Les protéines à ancre GPI peuvent être relarguées de la membrane par certains enzymes pour enclencher un effet sur des cellules (Jiménez A, López-Ornelas, A. et al., (2014)).

Les protéines nommées ADAMs (A Disintegrin And Metalloproteinase) 10 et 17 seraient impliquées dans le clivage de GAS1 comme observé dans certaines maladies rénales telle que la glomérulonéphrite (van Roeyen, CR. et al., (2013)). Les ADAMs (10 et 17) sont des métalloprotéases ayant pour principales fonctions l'adhésion cellulaire et la protéolyse (Edwards, DR, et al., (2008)). Par exemple, dans les cellules de gliome, ADAM17 augmente l'excrétion de VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) soluble et active la voie EGFR-PI3K-AKT, contribuant à l'invasivité et l'angiogenèse (Zheng, X. et al., (2012)). Aussi, ADAM10 favorise la migration des cellules de gliome en clivant la N-cadhérine à la surface cellulaire (Zheng, X. et al., (2012)).

GAS1 est exprimée dans divers organes. Sa forme soluble a été retrouvée chez différents types cellulaires, dont les cellules mésangiales glomérulaires et les fibroblastes (Estudillo, E. et al., (2016)). Il a été démontré que la protéine GAS1 soluble est présente dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) et est exprimée dans le plexus choroïde (CP) du rat adulte, principal producteur de LCR. En outre, il a été confirmé que la protéine GAS1 est présente dans le plasma sanguin et le foie du rat adulte, la principale source de protéines plasmatiques du sang (Saunders, NR. et al., (2013)). Des études *in vitro* montrent que la lignée cellulaire de fibroblastes NIH 3T3 exprime une forme de GAS1, mais libère deux formes solubles dans le surnageant (Ayala-Sarmiento, AE. et al., (2016)).

### **1.3 Rôles et fonctions de GAS1**

Plusieurs rôles ont été attribués à la protéine GAS1. En plus de son implication au niveau du cancer comme suppresseur de tumeur (Edvokiou, A. et al., (1998)) (Zarco N. et al., (2012)) et de métastase (Gobeil S. et al., (2008)) (Linja, M. et al., (2009)), GAS1 est aussi associée, principalement via la voie Hedgehog (Lee, CS. et al., (2001)) (Matinelli, D.C. et al., (2007)), à l'embryogenèse (Seppala, M. et al., (2007)) et à l'organogenèse (Rees, WD. et al., (1999)) (Allen, BL. et al., (2011)). Cependant, le spectre des rôles de cette protéine n'est pas entièrement connu. En plus de ceux mentionnés ci-haut, GAS1 a été associée à la maladie d'Alzheimer (Chapuis, J. et al., (2011)) et de Parkinson (Sun, XL. et al., (2016)) sans oublier les maladies rénales (Kann, M. et al., (2016)) (van Roeyen, C.R. et al., (2013)).

Les prochains paragraphes se concentreront sur certaines fonctions associées à GAS1 et qui sont impliquées dans la tumorigenèse.

### 1.3.1 GAS1 et l'apoptose

L'apoptose est une forme active d'autodestruction correspondant à une réponse de l'organisme face à des stimuli physiologiques ou pathologiques. Elle résulte de l'exécution d'un programme hautement régulé, qui consiste en l'activation d'enzymes, par exemple la protéase caspase-3, et en l'expression et la répression de nombreux gènes pro- ou anti-apoptotiques qui vont induire la destruction d'une cellule tout en préservant l'intégrité tissulaire environnante (Evan, G. and Littlewood, T. (1998)). Elle permet de sélectionner et d'éliminer les cellules potentiellement dangereuses pour l'organisme ainsi que les cellules surnuméraires et les cellules dysfonctionnelles (Rai, N.K.. et al., (2005)).

Un joueur important impliqué lors de l'apoptose est la protéine p53. Cette dernière est un facteur de transcription dont le rôle principal est d'empêcher le développement de cellules cancéreuses. En effet, cette molécule est une pierre angulaire de la mort cellulaire, à un point tel que les cellules tumorales l'éliminent fréquemment pour survivre (Amaral, J. D. et al., (2010)). Un groupe a donc mis au point un système bicistronique d'expression de *GAS1* et *p53* grâce à un adénovirus. Ainsi, en infectant des cellules de gliome, il a réussi à induire l'apoptose chez ces cellules (Benitez, JA. et al., (2007)).

La fonction pro-apoptotique de GAS1 est bien étudiée. Cet événement a été observé pour la première fois dans des cellules gliales. En surexprimant la protéine GAS1, une augmentation de l'activité de la caspase-3 (joueur important impliqué au niveau du processus apoptotique), a été observée *in vitro* (Zamorano, A. et al., (2003)). Un article a mis en évidence qu'une augmentation de la protéine GAS1 diminue l'activation de Bad, augmente la phosphorylation de Bax (protéine capable de se lier elle-même et induire l'apoptose) ainsi que l'activité enzymatique de la caspase-3 et mène à l'induction de l'apoptose. Il a été démontré qu'une version soluble de GAS1 possède également la capacité d'induire l'apoptose dans le cancer du sein (Zarco, N. et al., (2012)) ainsi que dans

le cancer gastrique (Wang, H. et al., (2012)). Les scientifiques ont observé qu'une surexpression de cette protéine entraîne une mort cellulaire accrue. (Zamorano, A., et al.,(2003)) (Zamorano, A. et al. (2004)) (Benitez, D.A. et al., (2007)) (Dominguez-Monzon, G. et al., (2009)). GAS1 a la capacité d'induire l'arrêt du cycle cellulaire (voir section 1.3.2) et l'apoptose grâce à sa similarité moléculaire avec les récepteurs la famille GDNF. Cette caractéristique va permettre à GAS1 d'inhiber le signal intracellulaire de survie induit par les GDNF et ainsi engendrer la mort cellulaire (Schueler-Furman, O. et al., (2006)) (Lopez-Ramirez, M.A. et al., (2008)) (Zarco, N. et al., (2012)) (Dominguez-Monzon, G. et al., (2011)). Ceci a démarré une recherche plus approfondie sur le mécanisme apoptotique engendré par *GAS1*, et ce, dans plusieurs pathologies.

Au final, *GAS1* a été identifié lors d'un criblage pour déceler les gènes impliqués lors de la mort neuronale induite par le NMDA. Pour valider ce résultat, le chercheur a exprimé *GAS1* grâce à un vecteur chez des cellules de neuroblastome BM69. Une forte diminution de la viabilité cellulaire a été observée. Cependant, ce phénomène pouvait être restreint si le vecteur de *GAS1* était exprimé en même temps qu'un gène codant pour la protéine Bcl-2 ou OpIAP2, sans toutefois co-immunoprécipiter ensemble (Mellström, B. et al., (2002)). Ces résultats démontrent une mort cellulaire qui diffère des autres études puisque c'est suite à l'expression de *GAS1*, et non par une enzyme de la voie apoptotique que la viabilité cellulaire s'en retrouve diminuée.

De nombreux autres exemples soutiennent le rôle pro-apoptotique de *GAS1*, et ce, dans différents contextes et tissus (Zarco, N. et al., (2012)) (Sun, XL. et al., (2016)). Paradoxalement, il a été démontré que *GAS1* pouvait protéger les cellules endothéliales contre l'apoptose. Ceci est la prémisse d'un potentiel rôle de *GAS1* au niveau de l'angiogenèse (Spagnuolo, R. et al., (2004)).

Bref, ces travaux illustrent bien le caractère pléiotropique de *GAS1* et la complexité associée à sa caractérisation.

### 1.3.2 GAS1 et le cycle cellulaire

Le cycle cellulaire est un processus permettant la division contrôlée des cellules et participe à la croissance et au développement des organismes vivants (Nurse, P. (2000)). Ce processus est finement régulé par de nombreux gènes. Certains permettent la progression des cellules à travers les différentes étapes du cycle cellulaire alors que d'autres ont pour rôle de bloquer les cellules à certaines étapes pour permettre la réparation des dommages à l'ADN par exemple (Kamb, A. et al., (1994)).

Le cycle cellulaire est souvent dérégulé chez les cellules cancéreuses (Collins, K. (1997)). Des expériences faites par l'équipe du Dr Schneider ont démontré chez les fibroblastes murins (NIH 3T3) que *Gas1* est un régulateur du cycle cellulaire (Schneider, C. et al., (1988)). Ceci a été mis en évidence par une augmentation de l'expression de *Gas1* à la suite d'un sevrage en FBS subi par les cellules NIH 3T3. En analysant le paramètre du cycle cellulaire, un rassemblement important de cellules au niveau de la phase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> a été observé. L'équipe de Schneider a démontré que l'ajout de FBS aux cellules en sevrage fait diminuer l'expression de *Gas1* et permet aux cellules de sortir de la phase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> (Schneider, C. et al., (1988)) (Del Sal, G. et al., (1995)).

D'autres expériences ont démontré que l'expression ectopique de *Gas1* inhibe la croissance cellulaire en plus de la synthèse d'ADN (Del Sal, G. et al., (1992)). Un vecteur exprimant *Gas1* a été utilisé et inséré par micro-injection chez les cellules de fibroblastes NIH 3T3. En accord avec son hypothèse, les cellules exprimant le vecteur de *Gas1* ont inhibé la croissance cellulaire, en plus de la synthèse d'ADN (Del Sal, G. et al., (1992)) (Chen-Cleland, TA. et al., (1993)). L'effet antiprolifératif obtenu par l'expression ectopique de ce gène est aussi observé chez des cellules transformées par un oncogène exception faite des cellules transformées par SV40 ou par un adénovirus (Del Sal, G. et al., (1995)). Del Sal (Del Sal, G. et al., (1995)) a conclu que l'arrêt cellulaire induit par *Gas1* dépendait de p53, un gène inactif chez les cellules transformées par SV40 ou par un adénovirus (Del Sal, G. et al., (1995)). De plus, ce chercheur a démontré que le domaine transactivateur de p53 n'était pas nécessaire pour observer l'effet de frein du cycle cellulaire (Del Sal, G. et al., (1995)),

résultat appuyé par Ruaro (Ruaro, M et al., (1997)). Concernant le gène *GAS1* humain, il a été démontré que sa surexpression diminue la prolifération des cellules T24 (carcinome de la vessie) (Del Sal, G. et al., (1994)) et A549 (adénocarcinome du poumon) (Evdokiou, A. et al., (1998)), mais non celle des lignées cellulaires SAOS-2 (dérivée de l'ostéosarcome) et HEK293 (transformée par adénovirus) (Del Sal, G. et al., (1994)) (Del Sal, G. et al., (1995)).

Tous ces travaux ont établi un lien entre *GAS1* et la régulation du cycle cellulaire. Cependant, les mécanismes moléculaires qu'utilise *GAS1* pour contrôler la progression du cycle cellulaire ne sont toujours pas élucidés. Toutefois, le cycle cellulaire est impliqué dans plusieurs phénomènes biologiques tels que l'organogenèse (Tsukaya, H. et al., (2006)) et l'embryogenèse (White, J. et al., (2005)). Ces derniers sont eux-mêmes modulés par plusieurs voies signalétiques dont la voie Hedgehog. De récentes études ont mis en lumière un lien entre *Gas1* et la voie Hedgehog (Matinelli, D.C. et al., (2007a)).

### 1.3.3 GAS1 et la voie Hedgehog

Plusieurs laboratoires ont illustré l'implication de *Gas1* sur la régulation de la voie Hedgehog (Lee, CS. et al., (2001)) (Allen, BL. et al., (2007)) (Matinelli, et al., (2007a)) (Kang, JS. et al. (2007)) (Cohen, MM. Jr. (2010)) (Allen, BL. et al., (2011)) (Izzi, et al., (2011)). L'importance de la signalisation Hedgehog (impliquant le ligand Sonic Hedgehog) dans les processus d'embryogenèse est un fait bien établi dans la communauté scientifique. Que ce soit chez les invertébrés ou les vertébrés, cette voie permet la régulation spatiale et temporelle de la formation de divers tissus, dont le tube neural, les poumons, la peau, le squelette axial, les dents et les membres (Athar M, et al., (2006)) (Dessaud E, et al., (2008)) (Chang, DT. et al., (1994)) (Johnson, RL. et al., (1994)). Elle est, de plus, cruciale au processus d'organogenèse en contrôlant notamment la croissance des doigts et l'organisation du cerveau. Le dysfonctionnement de la signalisation Hedgehog contribue à de nombreuses pathologies humaines, y compris des anomalies congénitales, comme le syndrome de Gorlin et le syndrome de céphalopysyndactylie de Greig (Biesecker, LG (2004)) (Nieuwenhuis, E. and Hui, C.C. (2005a)) ainsi qu'une variété de cancers humains

comme le carcinome basocellulaire (Tojo, M., et al., (2002)), les gliomes (Dominguez-Monzon, G. et al., (2009)), le médulloblastome (Berman D.M, et al., (2002)), les leucémies (Dierks, C. et al., (2008)) et les **cancers** du sein (Kubo, M. (2004)), des poumons (Watkins, D.N, et al., (2003)), du pancréas (Thayer, S.P. et al., (2003)) et de la **prostate** (Sanchez, P. et al., (2004)).

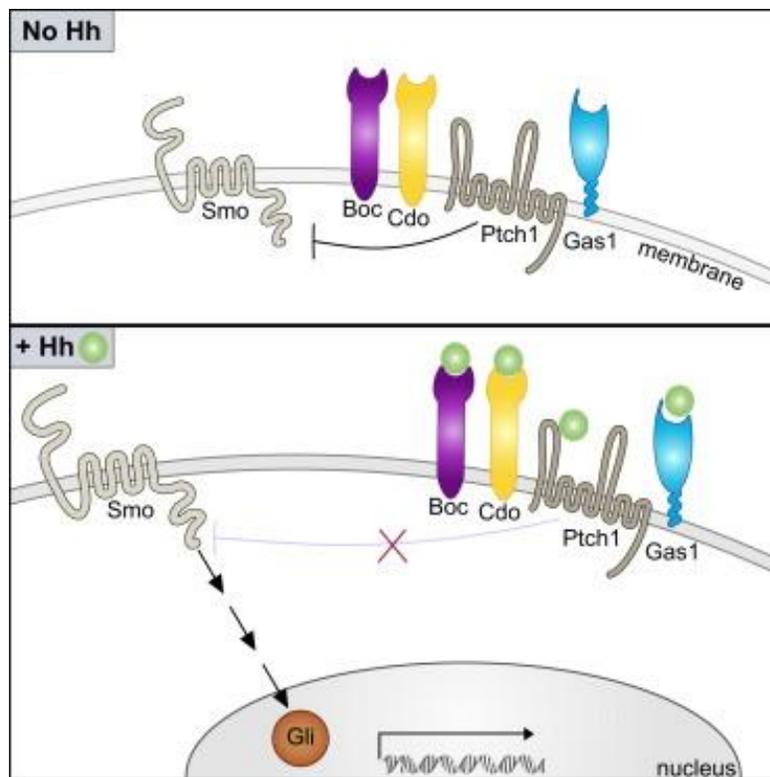
Un rapport récent a souligné l'importance de la signalisation Hedgehog dans l'évolution du microenvironnement tumoral (environnement complexe qui évolue en fonction du comportement des cellules qui le composent) (Yauch, RL. et al., 2008). Il fut démontré que l'activation de la voie HH dans des cellules stromales est nécessaire pour supporter la croissance tumorale de certains modèles de xénogreffe de souris (Varjosalo, M. et al., (2008)). Ainsi, Hedgehog peut influencer la formation de tumeur, la croissance tumorale ou les deux via des mécanismes autonomes et non autonomes des cellules. Par exemple, les ligands SHH produits par des tumeurs et/ou leur environnement stromal conduisent au maintien des cellules souches de la tumeur dans un état prolifératif indifférencié (Jiang, J. et al., (2008)).

GAS1 a d'abord été décrit comme un antagoniste de la signalisation Hedgehog, basé sur des études d'expression ectopique dans le développement de somite (C.S. Lee et al., (2001 a)) et de la dent (Cobourne, M.T. et al., (2004)). Paradoxalement, les phénotypes rapportés pour les souris mutantes *Gas1* comme la microphthalmie (Lee, CS. et al. (2001b)), des problèmes au niveau des éléments cérébelleux (Liu, Y. et al., (2001)) et les déficiences des membres (Liu, W. et al., (2002)) se révèlent être plus cohérents avec une activation de la signalisation Hedgehog (Harfe, B.D. et al., (2004)) (Lewis, P.M. et al., (2004)).

En effet, les données présentées dans l'article de Martinelli et Fan (2007) et celui d'Allen *et al* (2007) démontrent plutôt une régulation positive de la signalisation Hedgehog via GAS1. De plus, Allen *et al* (2011) et Izzi *et al* (2011) ont démontré que GAS1 coopère avec CDO et BOC, deux protéines impliquées dans la signalisation Hedgehog. Comme CDO et BOC lient SHH, important ligand de la voie Hedgehog, il est possible que GAS1, CDO et BOC forment ensemble un complexe physique se liant à SHH. Ceci aurait pour conséquence de

favoriser la signalisation Hedgehog par la présentation éventuelle du ligand au récepteur de SHH nommé PTCH1 (Allen, B. et al., (2011)) (Izzi, L. et al., (2011)) (Figure 3).

Au final, d'autres chercheurs ont démontré une induction fortement diminuée de la voie signalétique Hedgehog chez des souris n'exprimant pas *Gas1* (Seppala, M. et al., (2007)) ou lorsqu'il y a présence d'une mutation faux sens dans *Gas1* chez des patients atteints de holoprosencéphalie (Pineda-Alvarez, DE. et al., (2012)). C'est aussi le cas pour une mutation dans SHH (N115K ; site de glycosylation chez la souris) causant une diminution marquée de la liaison à GAS1 (Martinelli, DC. et al., (2009)). En résumé, GAS1 est un élément important dans la régulation de la voie signalétique Hedgehog. Comme l'activation aberrante de cette voie est associée au cancer, GAS1 pourrait, donc sous certaines circonstances, favoriser le cancer.



**Figure 3 : Implication de GAS1 dans la voie signalétique Hedgehog.** En l'absence de Shh, Boc, Cdon et Gas1 interagissent avec Ptch1 pour former des complexes Boc/Ptch1, Cdon/Ptch1 ou Gas1/Ptch1. En présence de Shh, la liaison de Shh aux complexes de récepteurs Boc/Ptch1, Cdon/Ptch1 et Gas1/Ptch1 conduit à l'activation de Smo, ce qui active les événements de transduction du signal qui entraînent une transcription médiée par Gli ((Allen, B. et al. (2011)).

#### 1.3.4 GAS1 et l'angiogenèse

L'angiogenèse est un processus biologique qui permet la croissance de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de ceux préexistants. Ce processus est essentiel dans la croissance et le développement embryonnaire, dans la guérison de blessures et dans la gestation (Ortega, N. et al., (1997)). Cependant, l'angiogenèse est aussi un processus important pour le passage d'une tumeur d'un stade bénin vers un stade agressif comme dans le cancer de la prostate (Štifter, S. & Đorđević, et al., (2014)).

Certains liens ont été faits entre l'angiogenèse et GAS1. Entre autres, GAS1 serait capable de moduler indirectement l'angiogenèse, de concert avec la voie signalétique Hedgehog, dans le cancer du pancréas (Mathew, E. et al., (2014)). Effectivement, il a d'abord été démontré que *Gas1*, *Boc* et *Cdon* sont exprimés dans des fibroblastes de pancréas normaux ainsi que chez ceux retrouvés dans une Néoplasie intra-épithéliales pancréatique (PanIN). Leur expression augmente pendant la tumorigénèse pancréatique lorsque les fibroblastes activés s'accumulent dans le pancréas (Mathew, E. et al., (2014)). Aussi, la délétion stromale de *Gas1* et *Boc* entraîne une réactivité à HH atténuée qui augmente paradoxalement la croissance tumorale. Compte tenu de l'hétérogénéité des fibroblastes stromaux (Sugimoto, H. et al., 2006), ceux exprimant *Gas1* et *Boc* peuvent inhiber une réponse angiogénique via des ligands de Hedgehog. Les fibroblastes utilisés (CAFs : primary human cancer associated fibroblasts) pour les expériences ont favorisé une augmentation de la croissance tumorale *in vivo*, ce qui concorde avec une augmentation de la vascularisation tumorale associée (Mathew, E. et al., (2014)). Cette vascularisation anormalement formée présente des défauts d'organisation et les vaisseaux sanguins sont peu fonctionnels. De plus, étant très perméable, cela favorise le phénomène d'extravasation plasmatique (passage anormal des éléments sanguins (facteurs, plaquettes, globules blancs, etc.) vers des tissus environnants) (Dvorak et al., (1988)). Elle favorise également le passage de cellules tumorales dans le flux sanguin, et donc l'apparition de foyers métastatiques secondaires (Folkman, J. (1985)).

Un effet pro-angiogénique potentiel de *GAS1* a été mis en évidence grâce à une étude menée par Spagnuolo *et al.* (Spagnuolo, R. et al., (2004)). Des éléments angiogéniques comme la protéine endothéliale VE-cadherine et le VEGF ont la capacité d'induire l'expression de *GAS1* pour ainsi diminuer le processus apoptotique des cellules endothéliales (Spagnuolo, R. et al., (2004)). En résumé, l'étude de Spagnuolo a utilisé des ARNs interférents (les siRNAs) ainsi que des cellules exprimant la protéine VE-cadhérine sous différentes formes (type sauvage ou tronqué). Il a été observé que les cellules exprimant la VE-cadhérine de type sauvage présentaient des niveaux d'expression plus élevés de *GAS1* par rapport aux cellules exprimant une protéine tronquée de la VE-cadhérine (Spagnuolo, R., et al., (2004)). Dans le système utilisé, l'inhibition de l'expression de *GAS1* par siRNA réduit l'effet protecteur du VEGF sur les cellules endothéliales. Au final, l'augmentation de l'expression de *GAS1* peut protéger les cellules endothéliales des dommages causés par une lésion ischémique, alors que l'inhibition de son expression peut augmenter la mort endothéliale et induire une régression vasculaire dans des maladies prolifératives. Ces données suggèrent que *GAS1* joue un rôle pro-angiogénique dans les conditions étudiées.

Selon un autre chercheur, Jiménez, A. et al. (2014), la forme soluble de la protéine GAS1 inhiberait la croissance tumorale et l'angiogenèse dans un modèle murin du cancer du sein démontrant ainsi un rôle anti-angiogénique pour cette protéine. Il est connu que l'inhibition de la kinase ERK 1/2 régule les protéines Bcl-2 et favorise la mort des cellules tumorales (Balmanno, K. et al., (2009)) (Eberle, J., & Hossini, A. M. (2008)). Dans l'article de Jiménez, il a été démontré que GAS1 soluble inhibe l'activation de ERK d'une manière indépendante de RET et sans affecter l'activation de AKT. Ceci suggère que GAS1 soluble, en l'absence de RET, induit l'arrêt du cycle cellulaire et non l'apoptose en interférant avec ERK ni avec l'activation de AKT (Jiménez, A. et al., (2014)). Pour le prouver, des analyses *in vivo* sur un modèle murin ont été réalisées. À cette fin, des cellules MDA MB 231 ont été inoculées dans des souris immunosupprimées pour induire le développement de tumeurs. Les résultats montrent que GAS1 soluble a réduit considérablement la croissance tumorale chez la souris. Il a été observé par immunohistochimie, que les tumeurs traitées par GAS1 soluble ont un signal plus faible de VE-cadhérine comparativement aux tumeurs contrôles.

Ceci indique une diminution de vaisseaux sanguins chez les tumeurs d'intérêt. Afin de vérifier si cela provient d'un effet direct de GAS1 soluble, des tests *in vitro* ont été réalisés. Le milieu contenant du GAS1 soluble a réduit la migration des cellules endothéliales, mais sans altérer leur viabilité. (Jiménez, A. et al. (2014)). Dans le contexte de ces expériences, GAS1 montrerait un potentiel anti-angiogénique.

Même si les données disponibles à ce jour sur le rôle de GAS1 dans l'angiogenèse sont contradictoires, elles suggèrent tout de même que cette protéine est impliquée dans ce processus important pour le développement tumoral.

#### **1.4 Problématique**

Les propriétés antitumorales de GAS1 ont été démontrées dans plusieurs types de cancer incluant celui de la prostate. Comme démontré dans le chapitre précédent, GAS1 pourrait, sous certaines circonstances, promouvoir le cancer. Les données disponibles prêtent des rôles aussi bien pro- qu'anti-angiogénique à GAS1. On a découvert récemment que selon le contexte, GAS1 pouvait être libérée de la membrane plasmique. Il est donc possible que la forme soluble et la forme membranaire de GAS1 aient des effets opposés sur le processus angiogénique expliquant un double rôle de GAS1 dans le cancer. Il est primordial d'investiguer davantage ce sujet et de valider le rôle de GAS1 sur l'angiogenèse tumorale afin de mieux comprendre le mécanisme d'action de cette protéine.

#### **1.5 Hypothèse**

À la lumière de la littérature illustrant l'implication controversée de GAS1 dans un contexte oncologique, notre hypothèse est que la forme soluble de GAS1 stimule l'angiogenèse, et de ce fait, promeut la croissance tumorale de différents cancers incluant le cancer de la prostate.

## 1.6 Objectifs

Comme premier objectif, nous avons voulu déterminer les effets de l'expression ectopique de GAS1 dans une lignée cellulaire cancéreuse du CaP. Nos objectifs spécifiques furent : 1) Identifier la lignée cellulaire du CaP. ; 2) Valider l'expression de la protéine GAS1 dans la lignée choisie ; 3) Déterminer l'effet de l'expression ectopique de GAS1 sur des paramètres cellulaires de bases (cycle cellulaire, apoptose, prolifération).

Par la suite, nous avons vérifié l'impact de l'expression de GAS1 sur la tumorigénicité de cellules CaP dans un modèle *in vivo* ainsi que sur l'angiogenèse. Les objectifs spécifiques de ce 2<sup>e</sup> volet d'étude étaient 1) Greffer des cellules PC-3 exprimant GAS1 chez l'œuf de poulet (essai CAM); 3) Déterminer le volume des tumeurs formées et le niveau d'angiogenèse.

Les résultats de cette 2<sup>e</sup> partie ont démontré que l'expression de GAS1 augmente la croissance tumorale et l'angiogenèse. Dans la 3<sup>e</sup> partie, nous avons initié des études pour déterminer le rôle de la forme soluble de GAS1 dans l'angiogenèse en nous fixant les objectifs suivants : 1) Vérifier si les PC-3 expriment une forme soluble de GAS1 2) Déterminer l'effet de GAS1 soluble sur l'angiogenèse dans des modèles *in vitro* ; 3) Déterminer l'effet *in vivo* (dans l'œuf de poulet) des cellules PC-3 exprimant différentes formes de GAS1 via plusieurs types de supports ; 4) Quantifier le nombre de vaisseaux sanguins tumoraux formés sur la CAM suite à l'ajout de GAS1 soluble (forme recombinante et milieux conditionnés de PC-3 surexprimant GAS1).

N'ayant pas observé d'effet de GAS1 soluble sur l'angiogenèse *in vitro*, nous avons voulu déterminer si une réponse immunitaire pouvait être impliquée dans l'angiogenèse médiée par GAS1 soluble dans notre essai CAM. Comme dernier objectif, nous avons testé l'effet de l'ibuprofène et d'un anti-IL-8 sur l'angiogenèse induite par GAS1 soluble.

## **2. CHAPITRE 2 : MATÉRIELS ET MÉTHODES**

## 2.1 La culture cellulaire

### 2.1.1 Les lignées cellulaires

#### 2.1.1.1 Les cellules PC-3

Les cellules **PC-3** (PC-3 ATCC® CRL-1435™) ont été établies à partir d'une métastase osseuse d'un homme de 62 ans ayant un adénocarcinome prostatique de grade IV et ayant suivi une hormonothérapie (Kaighn, ME. et al., (1979)). Ces cellules sont dites androgéno-indépendantes, car elles ne répondent pas au traitement hormonal et peuvent survivre en absence d'androgènes. Ces cellules, dont le temps de doublement est d'environ 33 heures, forment des monocouches uniformes.

Les cellules sont cultivées dans du milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) supplémenté avec 10 % de sérum bovin fœtal (FBS). Il est complété avec de la L-glutamine 2mM, de la pénicilline (100 UI/mL) et de la streptomycine (100 µg/mL). Les cellules sont maintenues à 37 °C, en atmosphère humide enrichie en CO<sub>2</sub> (95 % air - 5 % CO<sub>2</sub>) dans un incubateur. Le milieu de culture, la trypsine, la pénicilline, la streptomycine et le FBS ont été fournis par Invitrogen (Canada). Les flacons de cultures ont été fournis par Corning.

#### 2.1.1.1.1 Expression ectopique de GAS1

Une particularité importante des cellules PC-3 est qu'elles n'expriment pas *GAS1*. C'est pourquoi nous les avons modifiées dans le but de mieux comprendre notre protéine d'intérêt dans un contexte oncologique. Les cellules PC-3 ont été transfectées de façon stable avec le vecteur pcDNA3 ((de C.M. Fan, Carnegie Institution of Washington) dans le vecteur rétroviral pQCXI-puro (Clontech)) contenant soit l'ADNc du gène *GAS1* humain, soit l'ADNc du gène de la luciférase. Les clones stables ont été sélectionnés par l'addition, dans le milieu de culture, de doses de puromycine (Sigma-Aldrich). L'expression de *GAS1* a été validée par PCR quantitative et par Western blot (voir section 2.2). Les cellules

obtenues sont désignées **PC-3/GAS1** et **PC-3/Luciférase** respectivement. Il en est de même pour les lignées C8161, LOX-IMVI et M21.

#### *2.1.1.2 Les cellules C8161*

Les cellules **C8161** (C8161 (RRID:CVCL\_6813)) ont été établies à partir d'une métastase de la paroi abdominale d'une femme ménopausique avec un mélanome malin récurrent (Bregman, M.D. et al., (1983)).

Les cellules sont cultivées dans du milieu RPMI (Roswell Park Memorial Institute 1640) supplémenté avec 10 % de FBS. Il est complété avec de la L-glutamine 2mM, de la pénicilline (100 UI/mL) et de la streptomycine (100 µg/mL) ainsi que de l'HEPES (20 mM). Les cellules sont maintenues à 37 °C, en atmosphère humide enrichie en CO<sub>2</sub> (95 % air - 5 % CO<sub>2</sub>) dans un incubateur. Le milieu de culture, la trypsine, la pénicilline, la streptomycine et le FBS ont été fournis par Invitrogen (Canada). Les flacons de cultures ont été fournis par Corning.

#### *2.1.1.3 Les cellules LOX-IMVI*

Les cellules **LOX-IMVI** (LOX-IMVI (RRID:CVCL\_1381)) ont été établies à partir d'une métastase ganglionnaire axillaire amélanotique développée chez un homme de race blanche de 58 ans (Fodstad, Ø. et al., (1988)). Ces cellules, dont le temps de doublement est d'environ 20,5 heures sont semi-adhérentes.

Les cellules sont cultivées dans du milieu RPMI supplémenté avec 10 % de FBS. Il est complété avec de la L-glutamine 2mM, de la pénicilline (100 UI/mL) et de la streptomycine (100 µg/mL). Les cellules sont maintenues à 37 °C, en atmosphère humide enrichie en CO<sub>2</sub> (95 % air - 5 % CO<sub>2</sub>) dans un incubateur. Le milieu de culture, la trypsine, la pénicilline, la streptomycine et le FBS ont été fournis par Invitrogen (Canada). Les flacons de cultures ont été fournis par Corning.

#### 2.1.1.4 Les cellules M21

Les cellules **M21** (M21 (RRID:CVCL\_D031)) ont été établies à partir d'une métastase d'une femme ayant un mélanome (Felding-Habermann, B. et al., (1992)).

Les cellules sont cultivées dans du milieu RPMI supplémenté avec 10 % de FBS. Il est complété avec de la L-glutamine 2mM, de la pénicilline (100 UI/mL) et de la streptomycine (100 µg/mL). Les cellules sont maintenues à 37 °C, en atmosphère humide enrichie en CO<sub>2</sub> (95 % air - 5 % CO<sub>2</sub>) dans un incubateur. Le milieu de culture, la trypsine, la pénicilline, la streptomycine et le FBS ont été fournis par Invitrogen (Canada). Les flacons de cultures ont été fournis par Corning.

#### 2.1.2 Les milieux conditionnés

Dans le cadre de ce mémoire, des milieux étant conditionnés, soit par les cellules exprimant la protéine GAS1 soit par les cellules exprimant la protéine luciférase, ont été utilisés. Ceux-ci ont été utiles pour étudier l'effet potentiel de la forme soluble de GAS1 sur les paramètres de prolifération cellulaire, du cycle cellulaire, de l'apoptose ainsi que sur l'angiogenèse. Un milieu conditionné est un milieu contenant les facteurs libérés par des cellules ou un explant tissulaire au cours d'une période de culture (Dowling, P. et al. (2011)).

Des cellules (1,5 million de cellules/10 mL) ont été mises en culture et ont incubé pendant 48 heures avant d'être récoltées avec leurs milieux de culture dans des tubes de 15 mL. Les tubes ont été centrifugés à 1500 rpm pendant 5 minutes puis les milieux ont été filtrés à l'aide de filtre (0,45 micron) et aliquotés dans des tubes eppendorfs de 1,5 mL.

### *2.1.2.1 Vérification de la présence protéique dans le milieu conditionné par Slot blot*

Le *Slot blot* fut utilisé pour vérifier la présence de GAS1 soluble dans les milieux conditionnés des différentes lignées cellulaires (voir section 2.1.1).

C'est un procédé rapide d'application de protéines directement sur une membrane de nitrocellulose. Un échantillon, par exemple du milieu de culture, est appliqué sur la membrane et les protéines se lient à cette dernière alors que les autres composants de l'échantillon passent à travers. La protéine d'intérêt est ensuite détectée grâce à un anticorps spécifique (Brown, T. (2001)).

Deux cents  $\mu\text{L}$  de chacun des milieux conditionnés ont été déposés sur une membrane de nitrocellulose qui fut par la suite rincée dans du PBS 1 X. On procède alors à la fixation des protéines à la membrane à l'aide d'une solution de fixation (tampon de transfert, méthanol 20 %). La membrane est incubée dans la solution de fixation à température pièce sous agitation pendant 1h. Les protéines sur la membrane sont alors disponibles pour immunanalyse. Pour la suite, on procède aux mêmes étapes que la section 2.2.4.

## **2.2 Analyse biochimique des protéines cellulaires**

Les immunobuvardages de type Western ont été utilisés pour analyser l'expression de protéines dans les différents types cellulaires. Plusieurs étapes ont été nécessaires. Nous avons d'abord lysé ces cellules puis analysé les protéines par gel SDS-PAGE et immunotransfert pour finir par une immunorévélation.

### 2.2.1 La lyse cellulaire

La lyse cellulaire est une étape nécessaire avant de procéder à la migration des protéines sur gel. Cette étape consiste à briser la membrane cellulaire afin de libérer tous les constituants.

Pour ce faire, les cellules sont lavées deux fois au PBS 1X froid puis récoltées et centrifugées à 600 g pendant 5 minutes à 4 °C. Le culot cellulaire obtenu est ensuite remis en suspension dans environ 30 µL de PBS 1X froid pour être immédiatement dosé. La quantité de protéines dans les échantillons est évaluée selon la méthode de Bradford avec la trousse « Biorad Assay » (Bradford, M.M. (1976)). Par la suite, les échantillons sont dilués dans un tampon de charge dénaturant (tampon 4X : 250mM Tris-HCl pH 6,8, 8 % SDS, 8mM β-mercaptoéthanol, 40 % glycérol [v/v], Bleu de Bromophénol 0.4 % [p/v]) afin de limiter les agrégats de protéines et la dégradation.

### 2.2.2 Gel SDS-PAGE

La technique d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (dodécylsulfate de sodium (Laemmli, 1970)) permet de séparer les protéines en fonction de leur masse moléculaire dans des conditions dénaturantes (Al-Tubuly, AA. (2000)). Les échantillons protéiques sont dénaturés dans le tampon de charge et par chauffage (10 minutes à 95 °C). Un mélange protéique contenant des protéines de tailles connues sert d'étalon (marqueur moléculaire). Chaque protéine étalon est colorée (en bleu) de façon à suivre sa migration et son transfert sur membrane. Les échantillons et le marqueur moléculaire sont déposés sur un gel de polyacrylamide constitué d'un gel de concentration (composition : 6 % acrylamide, 125 mM Tris-HCl pH 6,8, 0,1 % SDS, 0,15 % APS et 0,1 % TEMED) et d'un gel de séparation dont le pourcentage d'acrylamide est choisi en fonction du poids moléculaire des protéines à séparer (gel de 10 % d'acrylamide : 375 mM Tris-HCl pH 8,8, 0,1 % SDS, 0,15 % APS et 0,1 % TEMED). Le tampon de migration est composé de Tris 25 mM, glycine 192 mM, SDS 0,1 % (p/v). La migration des échantillons protéiques s'effectue en deux étapes. Tout d'abord, le gel est mis à migrer à 80 V le temps de concentrer les échantillons à l'entrée du gel de séparation, puis la tension est augmentée à 100 V. La migration est arrêtée lorsque le front de migration atteint le bas du gel.

Suite à cela, le gel peut avoir deux utilisations :

- Il peut être coloré dans une solution contenant du bleu de Coomassie (0,25 % (p/v), de l'acide acétique 9 % (v/v) et de l'éthanol 45 % (v/v)) pour visualiser les protéines.

L'excès de colorant est ensuite éliminé par plusieurs bains d'acide acétique 7,5 % (v/v) et éthanol 5 % (v/v).

– Les protéines du gel peuvent être transférées sur une membrane de nitrocellulose ou PVDF.

### 2.2.3 Électrotransfert de protéines sur membrane

L'électrotransfert est utilisé ici en vue d'une immunorévélation des protéines et les membranes utilisées sont en nitrocellulose. Le transfert est réalisé en conditions « semi wet » via un tampon de transfert composé de 25 mM Tris ; 200 mM glycine ; 20 % méthanol. Un étagement est effectué de la façon suivante : trois couches de coussinets fibreux imbibées de tampon de transfert, deux couches de papier absorbant (Whatman) imbibées de tampon de transfert sur lesquelles la membrane puis le gel d'acrylamide sont déposés ; le tout est recouvert de deux couches de papier absorbant et de coussinets fibreux imbibés de tampon de transfert. Le transfert est réalisé à raison de 25 mA par membrane pendant 1 heure.

La membrane peut être colorée de façon réversible à l'aide d'une solution de rouge ponceau 0,2 % (Sigma), afin de vérifier que les protéines ont bien été transférées. Le marqueur moléculaire utilisé lors de la migration étant coloré et visible sur la membrane, cette étape n'est pas nécessaire en dehors des étapes de mise au point des conditions de transfert.

### 2.2.4 L'immunorévélation

Pour la révélation de protéines, la membrane est incubée pendant une heure à température ambiante dans une solution de blocage composée de 25 mM Tris pH 7,4 ; 150 mM NaCl ; 2 mM KCl (TBS) et de lait en poudre 5 %. Par la suite, l'anticorps primaire est dilué dans une solution de blocage et la membrane est incubée pendant une nuit à 4 °C sous agitation. Après trois lavages de la membrane dans du TBSTween-20 (1 mL de Tween-20 pour 1L de solution), cette dernière est incubée avec pendant 1h à température pièce avec l'anticorps

secondaire dilué dans le tampon de blocage (1/5000). Cet anticorps secondaire est couplé à la HRP (Horse Radish Peroxidase) et permet une révélation par chimiluminescence via le système ECL (GE Healthcare). Les zones luminescentes sont révélées sur un film photographique. Afin d'observer le changement du niveau d'expression de la protéine d'intérêt, les bandes d'intérêt sont normalisées en utilisant l'actine.

**Tableau 1 : Liste des anticorps primaires utilisés pour les immunobuvardages**

<b>Anticorps</b>	<b>Origine</b>	<b>Protéine reconnue</b>	<b>Compagnie</b>	<b>Dilution</b>
<b>Anti- hGas1</b>	chèvre	GAS1 humain	R&D Systems; Biotech	1/1000
<b>MAB1501R</b>	souris	Actine	Santa Cruz	1/10000

### **2.3 Les tests de viabilité cellulaire**

Nous avons utilisé ces tests de viabilité cellulaire pour étudier l'effet de l'expression ectopique de GAS1 sur la prolifération cellulaire des cellules PC-3, LOX-IMVI, C8161 et M21.

#### **2.3.1 Le MTT**

Le test du MTT est un test colorimétrique couramment utilisé pour la quantification de la prolifération, la viabilité et la toxicité cellulaire. Le MTT (bromure de 3 — [4,5 dimethylthiazol-2-yl]-2, 5 — diphenyltetrazolium (Sigma-Aldrich)) est un sel de tétrazolium. En présence de cellules métaboliquement actives, le MTT (jaune) est clivé par des succinates déshydrogénases de la chaîne respiratoire mitochondriale pour former des cristaux de formazan violets ((Figure 5) (Mosmann, T. (1983)). Après solubilisation des cristaux avec du DMSO, l'absorbance de la solution colorée obtenue est mesurée à 570 nm

par spectrophotométrie. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de cellules métaboliquement actives.

Pour ce test, les cellules sontensemencées en plaques 96 puits et incubé à 37°C. Après traitement, 10 µL de réactif MTT à 5 mg/ml sont ajoutés directement dans le milieu de culture, puis il y a une incubation à 37 °C pendant 1 heure. Les milieux de culture sont par la suite aspirés et les cristaux de formazan formés sont solubilisés dans 50 µl de DMSO 100 %. La densité optique est ensuite mesurée par spectrophotométrie (570 nm).

### 2.3.2 La coloration au SRB

Le dosage de sulforhodamine B (SRB) est utilisé pour déterminer la densité cellulaire, en fonction de la quantité de protéines cellulaires présente. Le procédé décrit ici a été optimisé pour des cellules adhérentes dans un format de 96 puits. Après une période d'incubation de 48 heures, les monocouches cellulaires sont fixées avec 50 µl/puit d'acide trichloroacétique à 50 % (poids/volume) de 30 minutes (température pièce) à une journée (4°C). Ensuite, la plaque est rincée trois fois à l'aide d'eau courante et elle est laissée à l'air libre toute la nuit afin de sécher. La 2<sup>e</sup> phase est l'étape de la coloration. Un volume de 75 µL/puit de solution SRB est ajouté. Une incubation d'au moins 15 minutes à température pièce est nécessaire. L'excès de colorant est éliminé par lavage répétitif avec 1 % (vol/vol) d'acide acétique. Le colorant lié aux protéines est dissous dans une solution de Tris 10 mM pour la détermination de la densité optique à 510 nm en utilisant un lecteur de microplaque.

## 2.4 Cytométrie en flux

Dans le cadre de ces travaux, la cytométrie en flux fut utilisée pour étudier le cycle cellulaire et la prolifération cellulaire.

### 2.4.1 Méthode du BrdU

La méthode du BrdU est un type de marquage qui fut utilisé pour étudier le cycle cellulaire suite à l'expression de GAS1 par diverses lignées cellulaires (voir section 2.1). Cette même méthode a été utilisée pour observer l'effet potentiel de sa forme soluble sur les cellules endothéliales HMEC-1 (voir section 2.6.1).

La prolifération cellulaire peut être étudiée à l'aide de tests basés sur la fluorescence évaluant la synthèse de l'ADN par incorporation de thymidine. Le bromo-désoxyuridine (5-bromo-2'-désoxyuridine, BrdU) est un nucléoside synthétique qui est un analogue de la thymidine. Le BrdU est couramment utilisé dans la détection des cellules proliférantes dans les tissus vivants. Le BrdU a la capacité de s'incorporer dans l'ADN de la cellule lorsqu'elle est en phase de synthèse (phase S). De cette manière, elle substitue la thymidine lors de la réplication de l'ADN et permet de déterminer si un traitement affecte la prolifération. Des anticorps spécifiques contre le BrdU sont ensuite utilisés pour détecter le produit chimique incorporé, marquant ainsi les cellules qui répliquaient activement leur ADN. L'incorporation de BrdU est normalement analysée en cytométrie en flux par marquage avec un anticorps conjugué anti-BrdU et l'analyse du cycle cellulaire est effectuée à l'aide du colorant d'ADN Propidium Iodide (PI).

Le protocole adapté de Zhu, H. (2012) *Propidium Iodide Staining of Cells for FACS Analysis* a été utilisé.

## **2.5 Le test d'apoptose**

### **2.5.1 La caspase-3**

Cet essai permet de mesurer le niveau d'apoptose dans les cellules en évaluant l'activité enzymatique de la caspase-3 (EnzChek® Caspase-3 Assay Kit #1). Suivant un traitement, les cellules ( $1 \times 10^6$ /puit d'une plaque 6 puits) sont trypsinisées et transférées dans des tubes eppendorfs. Elles sont ensuite centrifugées et lavées au PBS 1X (les cellules peuvent être gardées à  $-80^\circ\text{C}$  pour effectuer l'analyse plus tard). Les cellules sont ensuite remises en

suspension dans 60 µL de tampon de lyse 1 X. Les suspensions sont incubées au congélateur à -20 °C durant vingt minutes pour permettre la lyse des cellules. Les suspensions sont mises dans une étuve à 37°C afin de compléter le cycle de congélation/décongélation. Pendant la centrifugation des suspensions cellulaires (5000 rpm pendant 5 minutes), une solution de tampon 2X A est préparée : 400 µL de tampon de réaction 5X + 10 µl DTT 1M + 590 µL H<sub>2</sub>O. Un volume de 50 µL de solution A est ajouté à chacune des suspensions. Une plaque de 96 puits est préparée. Chaque puits contient 50 µL de surnageant de la suspension cellulaire et 50 µL de solution B qui contient le substrat fluorescent de la caspase-3 (10 µL de Z-DEVD-R110 5mM + 990 µL de réaction buffer 2X A). La plaque est analysée à l'aide d'un appareil de spectrométrie à une longueur d'onde de 380 nm. Les résultats des cellules exposées aux différentes conditions ont été comparés à ceux des cellules témoins.

## **2.6 Les tests angiogéniques**

Les modèles d'angiogenèse *in vitro* et *in vivo* sont utilisés pour tester l'efficacité des composés anti- (ou pro-) angiogéniques. De nombreux tests sont actuellement disponibles, chacun faisant appel à une ou plusieurs des caractéristiques des cellules endothéliales lors de l'angiogenèse : la prolifération, la migration, la formation de nouveaux capillaires et le recrutement de péricytes (Vailhe, B. et al. (2001)).

### **2.6.1 Les cellules endothéliales**

Les cellules endothéliales primaires représentent le modèle expérimental de prédilection pour les modèles d'angiogenèse *in vitro*. Les HUVECs (Human Umbilical Vein Endothelial Cell; don du Dr Charles Doillon, CRCHU de Québec, Université Laval ; Jaffe, E.A. et al. (1973)) et les HMECs (Human Microvascular Endothelial Cells; don du Dr Charles Doillon, CRCHU de Québec, Université Laval) sont les deux types cellulaires les plus fréquemment utilisés. Les cellules HMEC-1, garde les caractéristiques des cellules

endothéliales notamment au niveau de l'expression de marqueurs endothéliaux tels que PECAM-1, VE-Cadhérine et le récepteur VEGFR-2. Elles conservent également leur capacité à former un réseau de type vasculaire sur du Matrigel (Marchetti, M et al. (2008)).

Contrairement aux cellules endothéliales primaires qui deviennent sénescents après quelques passages, les cellules HMEC-1 sont décrites pour conserver leur phénotype endothélial après de nombreux passages. Cependant, il s'agit de cellules immortalisées. De ce fait, certains tests faisant appel à la migration et la prolifération de ces cellules doivent être confirmés dans d'autres modèles expérimentaux. Pour étudier l'angiogenèse, différents tests ont été développés. Le modèle d'angiogenèse parfait regrouperait les différentes étapes de l'angiogenèse depuis le décollement des cellules de leur membrane basale jusqu'à la formation de capillaires reliés en un réseau fonctionnel (Freshney, R. I. & Freshney, M.G. (2004)). Chaque test *in vitro* est réducteur, mais permet d'étudier un ou plusieurs paramètres du processus complet. Devant la complexité du processus étudié, c'est la combinaison de plusieurs tests qui permet de comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires mis en jeu au cours de l'angiogenèse (Sanyal, S. (2006)).

#### 2.6.2 La tubulogenèse sur matrice (*in vitro*)

Ce test mesure la capacité des cellules endothéliales, étalées à des densités diverses de confluences avec le support de matrice extracellulaire approprié, à former des structures de type capillaire (par exemple des tubes) (Lawley, T.J. and Kubota, Y. (1989)) (Wang, B. et al., (2003)). Ce test fut utilisé pour déterminer la capacité de GAS1 à favoriser ou inhiber la formation des tubes *in vitro*.

Les cellulesensemencées sur la matrice adhèrent rapidement et s'organisent en quelques heures (de 4h à 24h, voire 1h sur Matrigel) en un réseau de cordons cellulaires. La réponse aux facteurs pro- ou anti-angiogéniques dans ce système est quantifiée selon quatre critères : la longueur des tubules formés et leur nombre, la surface occupée par le réseau et le nombre de points de jonction entre ces tubules. Le matériel et la méthodologie choisis sont décrits à la section 3.5 du mémoire.

### 2.6.3 Essai de cicatrisation

Ce test *in vitro* est une méthode facile, peu coûteuse et bien développée pour mesurer la migration cellulaire *in vitro*. Les étapes de base impliquent la création d'une « éraflure » dans une monocouche cellulaire, la capture des images au début et à intervalles réguliers pendant la migration cellulaire jusqu'à la fermeture de la rayure. Les images sont ensuite comparées grâce au logiciel Image J pour quantifier le taux de migration des cellules (Liang, C. C., et al., (2007)). Dans cette étude, des cellules HMEC-1 et des milieux conditionnés sont utilisés. Le protocole est expliqué en détail dans l'article à la section 3.5.

### 2.6.4 Essai de l'anneau aortique de souris

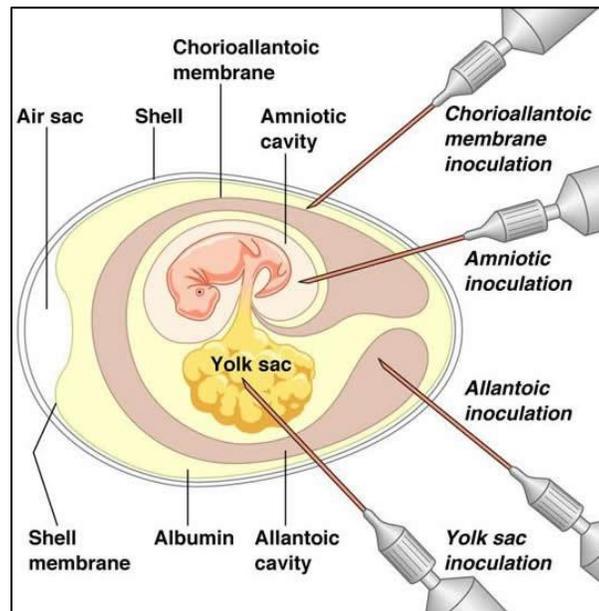
C'est un essai quantitatif de l'angiogenèse. Les aortes de souris coupées en sections (anneaux) sont utilisées pour ce test. Le test de l'anneau aortique permet l'analyse de la prolifération cellulaire, la migration, la formation de tube, la ramification des microvaisseaux, le recrutement périvasculaire et le remodelage - sans avoir besoin de dissociation cellulaire - pour fournir une image plus complète des processus angiogéniques comparés aux tests cellulaires traditionnels (Baker, M. et al., (2012)).

Pour la réalisation de cette expérience, des sections d'aortes provenant de souris C57BL/6 ayant 12 semaines d'âge sont incorporées à des bouchons de fibrine dans des plaques 6 puits. Les anneaux aortiques sont par la suite exposés aux conditions expérimentales à tester et l'angiogenèse est mesurée. Le protocole est disponible à la section 3.5 du mémoire.

### 2.6.5 L'essai CAM (*in vivo*)

La membrane chorioallantoïque (CAM) (Figure 4) est un tissu respiratoire spécialisé présent dans les espèces aviaires lorsqu'ils sont à l'état d'embryon. Elle permet l'échange gazeux entre l'embryon et l'atmosphère entourant l'œuf (Romanoff, AL. (1960)). Chez l'embryon de poulet, le chorioallantoïde se forme entre les jours 4 et 5 de développement,

lorsque la couche mésodermique externe de l'allantoïde fusionne avec la muqueuse mésodermique du chorion, et un réseau de vaisseaux sanguins se forme progressivement entre les deux couches. La partie centrale de la CAM est complètement développée aux jours 8 à 10. C'est à ce moment qu'elle devient capable de soutenir les greffes de tissus, tandis que les périphéries de la CAM se développent et s'étendent jusqu'à ce que la CAM enveloppe complètement l'embryon au jour 12 d'incubation. En outre, elle contient des protéines de la matrice extracellulaire telles que la fibronectine, la laminine, le collagène, l'intégrine alpha (v) beta3 et la MMP-2, ce qui en fait un modèle attrayant pour étudier l'angiogenèse (Richardson, M., & Singh, G. (2003)), l'invasion tumorale et la métastase (Lokman, N. et al., (2012)).

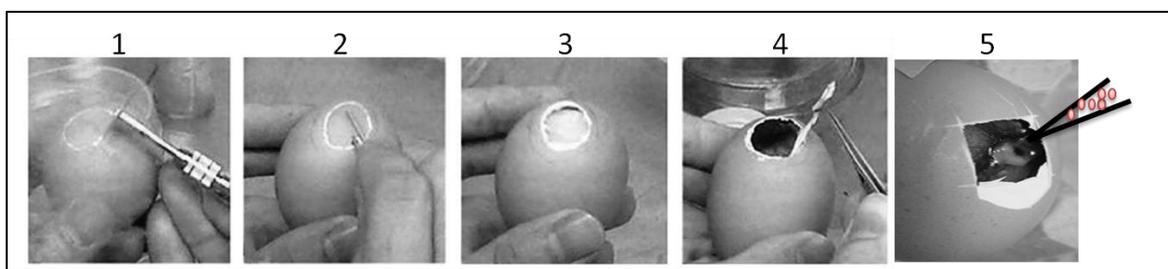


**Figure 4 : La membrane chorioallantoïque.** La CAM est composée d'un épithélium multicouche; l'ectoderme à l'interface aérienne, le mésoderme (ou le stroma) et l'endoderme à l'interface avec le sac allantoïde (Valdes, T. et al., (2002)).

La CAM permet la greffe de différents types cellulaires, dont les cellules tumorales humaines, et c'est un outil utile pour l'analyse du potentiel pro-angiogénique des cellules. Le matériel à tester (cellules ou autres) est déposé sur la CAM à travers une fenêtre découpée dans la coquille de l'œuf. Le matériel angiogénique peut être introduit sous la forme de petits morceaux de matériaux polymérisés tels que des polymères synthétiques

biologiquement inertes (bouchon de collagène), contenant des protéines purifiées (comme GAS1 recombinant) ou imprégnées de milieux conditionnés. Une quantité de cellules peut être aussi déposée directement sur la CAM (Figure 5) (voir section 3.5).

La période d'incubation subséquente varie de 1 à 7 jours après quoi l'angiogenèse peut être quantifiée par l'analyse d'images. L'évolution temporelle de la formation de nouveaux vaisseaux sanguins sur la CAM peut être facilement effectuée en analysant les images prises à différents moments après la greffe des cellules tumorales ou du support de collagène en utilisant un stéréoscope équipé d'un appareil photo numérique.



**Figure 5 : Inoculation des cellules sur la CAM.** (Schéma adapté de (Durupt, F., et al., (2012)) et (Zhou, Q., et al., (2013))

Pour nos expériences, les amas de cellules cancéreuses et les supports de collagène sont récoltés entre 4 et 7 jours après l'implantation. Concernant les tumeurs, elles sont pesées puis fixées dans une solution de fixation pour, au final, en faire des coupes histologiques. Il en est de même pour les supports de collagène sauf qu'ils ne sont pas pesés. Ces étapes permettent d'évaluer le potentiel protumoral et pro-angiogénique de GAS1.

Pour étudier l'implication de GAS1 face au système immunitaire de l'œuf, l'ibuprofène et un anticorps contre l'interleukine-8 (IL-8) ont été utilisés selon les indications de Bekes et al (Bekes, EM. Et al., (2011)). L'ibuprofène est un composé chimique connu pour diminuer l'inflammation et son efficacité a été prouvée dans des essais CAM (Witling, J. et al., (1991)). L'interleukine-8 (IL-8) est une cytokine chimio-attractante sécrétée par des cellules granulaires comme les macrophages/monocytes et les neutrophiles (Varney, M.L. et al., (2001)) (Bickel, M. (1993)). Ces composés ont été injectés dans une veine de la

CAM, juste avant de procéder à la greffe du bouchon de collagène contenant GAS1 recombinant. Ces bouchons sont récoltés puis colorés au HES dans le but de visualiser les vaisseaux sanguins et l'infiltration cellulaire dans le support.

En résumé, l'essai CAM est utilisé dans le but d'étudier la croissance tumorale suite à l'expression de GAS1 par des cellules cancéreuses et pour vérifier si GAS1 a un potentiel angiogénique (voir section 2.1). Les détails méthodologiques sont présentés à la section 3.5.

**3. CHAPITRE 3 : A SHED FORM OF GAS1 STIMULATES ANGIOGENESIS AND TUMORIGENESIS. (ARTICLE)**

### 3.1 Résumé

GAS1 est une protéine pléiotropique classée comme suppresseur de tumeur/métastase en raison de sa capacité à induire l'apoptose et l'arrêt du cycle cellulaire dépendamment du contexte. Inversement, le rôle de cette protéine en tant que régulateur positif de la voie Sonic Hedgehog, considérée comme pro-oncogène, est bien caractérisé. À la lumière de ces informations contradictoires, nous avons cherché à mieux comprendre le rôle du GAS1 dans le cancer. La protéine GAS1 est attachée à la membrane cytoplasmique via une ancre GPI et peut être libérée (soluble ou shedded (sGAS1)) de la membrane par clivage enzymatique. Nous émettons donc l'hypothèse que la protéine GAS1 attachée à la membrane agit comme suppresseur de tumeur/métastase alors que sGAS1 favorise le développement du cancer. À l'aide du modèle de xéno greffe utilisant la membrane chorio-allantoïde (CAM) de l'embryon de poulet, nous avons trouvé que le sGAS1 augmente la croissance tumorale et la vascularisation de plusieurs lignées cellulaires cancéreuses. Lorsque les animaux ont reçu une injection d'ibuprofène ou d'un anticorps neutralisant l'IL8, l'effet protumoral de sGAS1 a été réduit, indiquant l'implication d'une réponse immunitaire dans ce processus. L'injection avec un anticorps anti-GAS1 a également réduit la croissance tumorale dans le modèle de xéno greffe du poulet (essai CAM). Fait important, l'interrogation de la base de données TCGA a révélé que l'expression de *GAS1* est inversement corrélée à la survie dans une cohorte pan-cancers de plus de 10 000 patients, ajoutant aux preuves que *GAS1* pourrait favoriser la progression du cancer. Ces résultats démontrent la nécessité d'enclencher d'autres études sur le rôle de la forme membranaire et de la forme excrétée de GAS1 dans le cancer. D'autant plus que sa fonction protumorale pourrait être potentiellement ciblée sur le plan thérapeutique.

### 3.2 Abstract

GAS1 is a pleiotropic protein classified as a tumor/metastasis suppressor because of its ability to induce apoptosis and cell cycle arrest in a context dependent manner. Conversely, the role of this protein as a positive regulator of the Sonic Hedgehog pathway, considered as pro-oncogenic, is well characterized. In light of these conflicting evidences, we sought to better understand the role of GAS1 in cancer. GAS1 is attached to the cytoplasmic membrane by a GPI anchor and can be released *i.e.* (soluble or shedded (sGAS1)) from the membrane by enzymatic cleavage. We thus hypothesized that membrane-bound GAS1 holds tumor/metastatic suppressor activities while its shedded form promotes cancer development. Using the chicken embryo chorioallantoic membrane (CAM) xenograft model, we found that sGAS1 increases angiogenesis and tumor growth. Treatments with ibuprofen or an anti-IL-8 antibody reduced the proangiogenic effect of sGAS1 indicating that an immune response is involved in this process. Injection with an anti-GAS1 antibody diminished growth of *GAS1*-expressing tumors in the CAM xenograft model. Importantly, interrogation of the TCGA database found that *GAS1* expression inversely correlates with survival in a pan-cancer cohort of more than 10 000 patients adding to the evidence that GAS1 could promote cancer progression. These results beg for more studies on the role of both the membrane-bound and shedded form of GAS1 in cancer, especially as its protumoral function could potentially be therapeutically targeted.

## **A shed form of GAS1 stimulates angiogenesis and tumorigenesis**

Martin Perreault<sup>a</sup>, Audrey Turcotte<sup>a</sup>, Marie-France Coté<sup>a</sup>, André Tchernof<sup>a, c</sup>, Jean Gosselin<sup>a, b</sup> and Stéphane Gobeil<sup>a, b\*</sup>

<sup>a</sup> *CHU de Québec Research Center - Université Laval, Québec (Québec), Canada.*

<sup>b</sup> *Department of Molecular Medicine, Faculty of Medicine, Université Laval, Québec (Québec), Canada.*

<sup>c</sup> *Department of Nutrition, Faculty of Medicine, Université Laval, Québec (Québec), Canada.*

\* Corresponding author:

Dr. Stéphane Gobeil

CHU de Québec Research Center (CHUL, R-4772),

2705 Laurier Boulevard, Québec (Québec), G1V 4G2, Canada

Phone : +1 418 654 2296 ; Fax : +1 418 654 2298

E-mail: [Stephane.Gobeil@crchudequebec.ulaval.ca](mailto:Stephane.Gobeil@crchudequebec.ulaval.ca)

### 3.3 Introduction

Growth arrest specific 1 (GAS1) is a glycosylphosphatidyl inositol (GPI)-anchored protein with high sequence homology among vertebrates, suggesting it is important for organism homeostasis (Lee, C.S. et al., (2001)). During embryonic development, GAS1 positively regulates, in a cell-autonomous manner, the pro-survival Hedgehog (HH) pathway (Martinelli, D.C. et al., (2007)) and was thus hypothesized as an enhancer of tumorigenesis (Martinelli, D.C. et al., (2007)). However, numerous evidences classify GAS1 as a tumor and metastasis suppressor gene (Gobeil, S. et al., (2008)) (Li, Q. et al., (2016)). Membrane-bound GAS1 was shown to promote cell cycle arrest in G0 (Segovia, J., & Zarco, N. (2014)) but conflicting results exist over its impact on apoptosis, ranging from a causal to protective role (Segovia, J., & Zarco, N. (2014)) (Sapgnolo, R. et al., (2004)). These potentially opposing roles support its classification as a pleiotropic protein Segovia, J., & Zarco, N. (2014)).

In rodents, GAS1 can be found anchored to the cytoplasmic membrane or in a soluble form (van Roeyen, CR. et al., (2013)). The metalloproteinases ADAM10 (van Roeyen, CR. et al., (2013)) and the tumor necrosis factor alpha-converting enzyme ADAM17 were shown to participate in GAS1 shedding (van Roeyen, CR. et al., (2013)). ADAM17 and ADAM10 have been proposed as therapeutic targets based on their pro-inflammation and pro-angiogenesis roles resulting in tumor growth and metastatic progression (Saftig, P. et al., (2011)). In most functional studies, the role of the membrane-bound versus the shed form of GAS1 (sGAS1) was not explored. Interestingly, there are several examples of proteins showing opposite functions depending on their cellular localization. Context and/or tissue dependent shedding of GAS1 could explain the pleiotropic effects associated with this protein; GAS1 releases from the cell membrane could relieve cancer cells from its tumor and metastasis suppressor activity and sGAS1 could positively affect tumorigenesis.

Using various approaches, we demonstrate for the first time a role for GAS1 in cancer progression showing that its shedded form promotes angiogenesis and tumor growth and that its expression negatively correlates with cancer patients' survival.

### 3.4 Results and Discussion

The PC-3 cancer cell line was shown to highly express *ADAM17* and *ADAM10* (Zhu, L. B, et al., (2014)) (Effenberger, T. et al., (2014)) whereas *GAS1* expression could not be detected (supplemental Figure 1) making this cell line a relevant model for gain-of-function studies on s-GAS1. We engineered PC-3 cells to ectopically express the human *GAS1* gene or the luciferase gene (LUC) as a control (supplemental Figure 1). As expected, sGAS1 was detected in the PC-3/GAS1 culture media and its shedding was prevented by an ADAM10 and ADAM17 inhibitor (Figure 1A). We next tested the tumorigenic potential of our cellular models in a chick chorioallantoic membranes (CAM) xenograft model (Kuefer, R. et al., (2004)). PC-3/GAS1 tumors were significantly heavier compared to PC-3/LUC and wild type PC-3 tumors (Figure 1B), without affecting the chick embryo weights (data not shown). However, PC-3/GAS cells showed no significant advantage over PC-3/LUC cells in *in vitro* cell proliferation assays (supplemental Figure 2). Analysis showed that chorioallantoic membranes bearing *GAS1*-expressing tumors were more vascularized than their *LUC* counterparts (Figure 1C). Accordingly, H&E staining revealed that GAS1 tumors had more blood vessels than the LUC tumors (Figure 1D). These *in vitro* and *in vivo* results were validated in the M21, C8161 and LOX-IMVI cancer cell lines ectopically expressing *GAS1* (supplemental Figure 3, 4 and 5). Importantly, intravenous injection of purified recombinant sGAS1 in chick embryos significantly increased the weight of wild type PC-3 tumors (Figure 1E) suggesting that it is responsible, at least in part, for the gain in tumor weight observed in GAS1 tumors. In summary, Figure 1 demonstrates that GAS1 promotes tumor growth and angiogenesis *in vivo*.

To further study the effect of GAS1 on angiogenesis, we embedded conditioned media containing sGAS1 in collagen plugs (CP) that were grafted onto chick chorioallantoic membranes (CP-CAM assay). H&E-Saffron staining demonstrates that the CPs containing sGAS1 conditioned media were more vascularized than their controls (Figure 2A). To determine if sGAS1 could induce angiogenesis by itself, we submitted purified recombinant sGAS1 to the CP-CAM assay and found that CPs containing sGAS1 were more vascularized than their vehicle controls (Figure 2B) thereby demonstrating that sGAS1 is a pro-angiogenic factor. These findings are conflicting with previous observations showing

that a soluble form of GAS1 decreases angiogenesis in MDA MB 231 xenografts. However, this dichotomy could potentially be explained by the difference in cancer type and animal models (*nu/nu* mouse vs chicken) used by the two studies (Jiménez, A. et al., (2014)). Interestingly, the dose of recombinant sGAS1 (50 ng/ml) used in our setting is comparable to the dose of VEGF needed to obtain a comparable response in the same experimental design (Lai, H. et al., (2015)). Proper folding is required for sGAS1 to exert its pro-angiogenic property as when heat-denatured, it failed to stimulate vascularization in the CP-CAM assay (Figure 2B). In support of this observation, mutation of *GAS1* N-glycosylation site, which is required for its folding (Rosti, K. et al., (2015)), hampered GAS1 protumoral function (supplemental Figure 6). The pro-angiogenic potency of sGAS1 conditioned media and recombinant sGAS1 was next evaluated using *in vitro* angiogenesis assays. No significant effects were found suggesting that sGAS1 indirectly influences angiogenesis (supplemental Figure 7). GAS1 has been classified as a putative amplifier of inflammation in cancer (Atsumi, T. et al., (2014)). We thus explored the possibility that it would stimulate angiogenesis through an immune response by performing the CP-CAM assay in presence of ibuprofen or anti-IL-8 (Bekes, EM. et al., (2011)). Both treatments prevented cell infiltration in the collagen plugs and the pro-angiogenic effect of sGAS1 (Figure 2C). Together, data from Figure 2 demonstrates that sGAS1 indirectly stimulates angiogenesis potentially via an immune response. We next evaluated the expression of *GAS1* in 10264 cancer patients from the TCGA database. The pan-cancer Kaplan-Meier analysis clearly demonstrates that patients with tumors expressing high levels of *GAS1* transcript have an inferior survival prognostic with a significance of  $p < 1.168e-9$  and a log-rank test statistics score of 41.14 (Figure 3). This is in line with our experiments showing a pro-oncogenic effect of GAS1. Segregation of the TCGA data shows *GAS1* poor survival prognostic for several cancers. *GAS1* expression strongly associates with low-grade glioma and glioblastoma, ovarian and colorectal cancer survival (supplemental Figure 8A, B and C). Unexpectedly, *GAS1* expression does not correlate with prostate cancer patients' survival (supplemental Figure 8D). However, our results showing that intravenous injection of recombinant sGAS1 increased wild type PC-3 tumor growth suggest that sGAS1 originating from the cancer stromal tissue or from the bloodstream could influence prostate cancer progression although *GAS1* expression by prostate cancer does not affect survival.

Supporting this hypothesis, we detected the presence of sGAS1 in human blood (data not shown) as previously demonstrated in rats and mice. These results reveal that *GAS1* has a major impact on cancer outcomes and highlight the urgent need to investigate the protumorigenic role of this gene.

Altogether our results suggest that GAS1 could be exploited as a therapeutic target. To evaluate whether GAS1 protumoral effect could be neutralized using a systemic strategy, we intravenously injected an anti-GAS1 antibody in our CAM model xenografted with PC-3/GAS1 or OVCAR-3 cells. OVCAR-3 are ovarian cancer cells endogenously expressing and secreting GAS1 (Figure 4A). Anti-GAS1 antibody had no effects on PC-3/LUC tumor growth, whereas it significantly decreased the weight of PC-3/GAS1 tumors (Figure 4B). Importantly, the anti-GAS1 antibody also decreased the weight of the OVCAR-3 tumors (Figure 4C). The non-specific isotype antibody did not affect tumor growth (Figure 4B). These results uncover GAS1 as a potential therapeutic target.

This is the first report showing a pro-angiogenic and pro-tumorigenic role for GAS1. The effect of sGAS1 on angiogenesis could explain the increased weight of tumors expressing *GAS1*. Although our observations conflict with much of the literature on the subject, our study on a large cohort of cancer patients showing that *GAS1* expression negatively correlates with survival strongly support an oncogenic role for this gene. Opposing functions for membrane-bound GAS1 and sGAS1 could explain that this gene is associated with diametrically opposite roles in cancer. Our findings in conjunction with current knowledge clearly establish the importance of *GAS1* in cancer. Our work opens up a new field of research on the oncogenic function of this gene and more particularly on the role sGAS1 in the angiogenic and tumorigenic processes.

### **3.5 Material and methods**

#### *Cell cultures*

PC-3, M21, C8161, LOX-IMVI and OVCAR-3 cells were obtained from the NCI and cultured with recommended medium supplemented with L-glutamine (2 mM), 100 IU

penicillin/mL, 100 µg streptomycin/mL and 10% fetal bovine serum. *GAS1* was subcloned from the expression vector pcDNA3-Gas1 (from C.M. Fan, Carnegie Institution of Washington) into the retroviral vector pQCXI-puro (Clontech). The same procedure was applied for the LUC gene. Retroviruses were produced as previously described (Gobeil, S. et al., (2008)). Cells were transduced with the viruses for 24 h before puromycin selection (Gobeil, S. et al., (2008)).

#### *CAM and CP-CAM Xenograft Assays*

Eggs were obtained and prepared as described (Fortin, S. et al., (2013)). A cell suspension ( $3.5 \times 10^6$  cells/egg) cells or a collagen plug (Côté, MF. et al., (2016)) was applied on the CAMs. Purified recombinant sGAS1 (human protein) was purchased from R&D system (Cat#2636-GS-050). Ibuprofen and an antibody against interleukin-8 (IL-8) were used according to the indications of Bekes et al (Bekes, EM et al. (2011)). These compounds were injected into a vein just prior to grafting the collagen plugs. The anti-GAS1 antibody was intravenously injected at 3.6 µg/egg (R&D system, Cat#AF2636). The eggs were euthanized at 4 °C. Samples (tumors and collagen plugs) were harvested, fixed in formaldehyde 3.7%, embedded in paraffin and cut at 4 µm (Leica microtome). Deparaffination and rehydration were performed in toluene and ethanol. Slides were stained with Hematoxylin-Harris, Eosin Y (H&E) or H&E with Safran de Gatinois alcoholic 2% (HES), dried and mounted in Permount to visualize the blood vessels and cell infiltration.

#### *Immuno quantification*

Slot blotting for the detection of GAS1 in cell culture medium was performed using a bio-Dot SF (Bio Rad, Canada) according to manufacturer protocol. The antibodies used were anti-hGAS1 (Cat#P54826; R&D system) and anti-goat IgG (Cat#HAF109; R&D system). sGAS1 was quantified by ELISA (Cat#2636-GS-05; R&D system) according to manufacturer protocol.

### *Preparation of Conditioned Media*

Cells lines were seeded in their respectively basal medium (BM) supplemented with 10% FBS and grown until 90% confluence. After washing cells with phosphate-buffered saline (PBS), BM (without serum) was added for 24 hours. Thereafter, BM (with serum) was replaced and conditioned for 48 hours at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> after which it was collected, centrifuged at 5000 *rpm* for 5 minutes to remove cell debris, filtered (0.22 μm pore size, Merck Millipore, Billerica, MA, USA). Control conditioned medium samples underwent the same procedure as described above, but in the absence of cells.

### *Tube Formation Assay*

The tube formation assay was performed using the thick gel method of preparation. Briefly, after thawing overnight, the Matrigel (Corning, Corning, NY, USA) was plated into a pre-cooled 48-well plate (Nunc™, Thermo Fisher Scientific) (180 μl per well) using a chilled pipet tip. After polymerization of Matrigel at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, for 45 minutes, HMECs were inoculated in 350 μl of endothelial basal medium (EBM) at the density of  $4.5 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> on top of the Matrigel. The 48-well plate was then incubated for 1 hour at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>. A volume (350 μl) of different conditioned media was carefully placed in the 48-well plate, on the HMECs, and incubated for 16 hours at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>. We used the HMECs' EMB media as control (not conditioned). After incubation all wells were photographed (×10 amplification) using an inverted microscope with a conjugated camera. The tubule formation was quantified on four random fields per replicate, using the Angiogenesis analyzer from Image J.

### *Wound-Healing Assay*

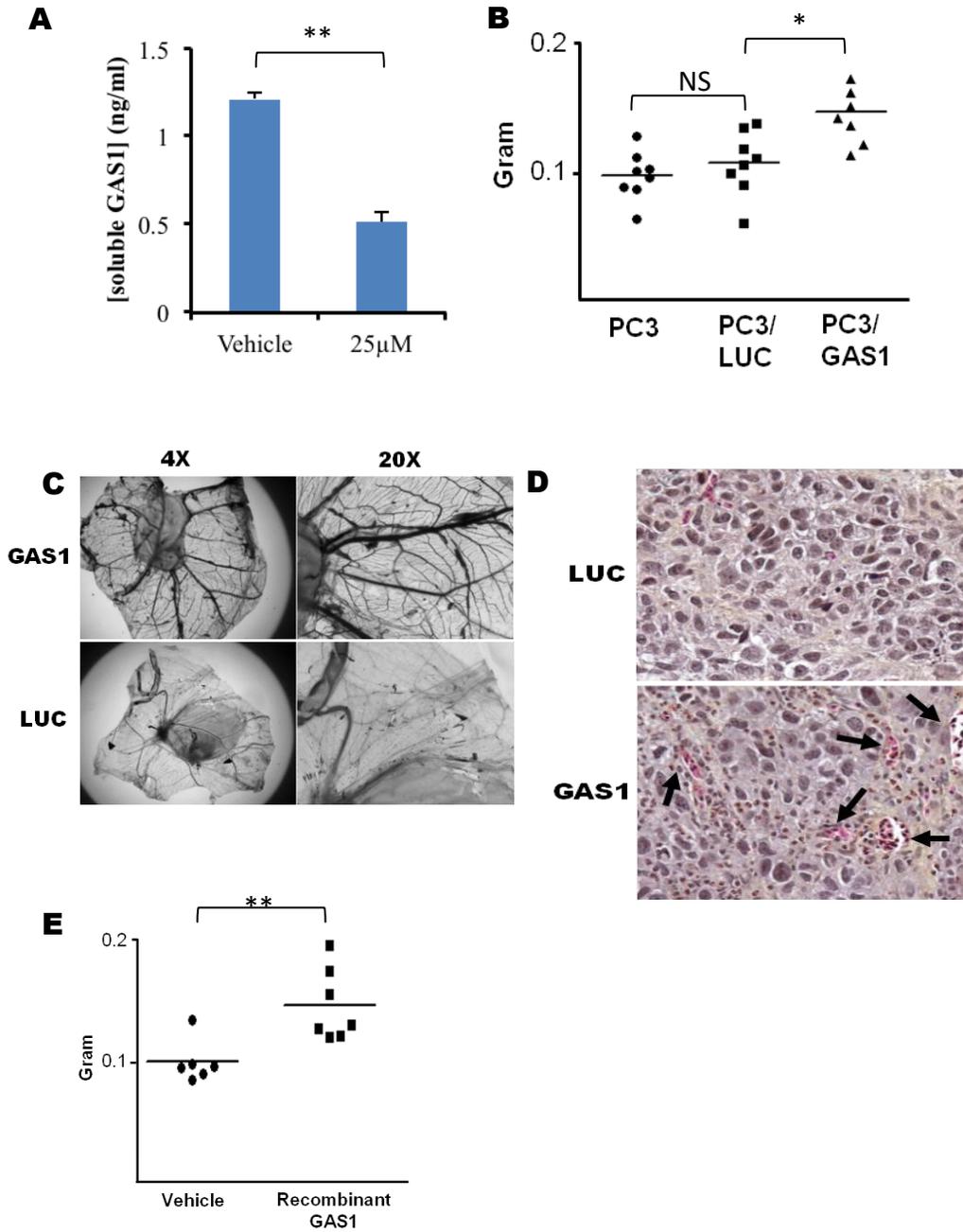
HMECs were plated to confluence in a 24-well plate (previously coated with gelatine 0.2%) with EBM supplemented with 10% FBS. After an overnight incubation, wounds were created in the cell monolayer by scrapping the plate with a sterile pipette tip. Following a wash with sterile PBS1X, the conditioned media were added for 72 hours at 37 °C, 5%

CO<sub>2</sub>. Photographs were taken with a fluorescence microscope with a 10X magnification and three independent wound areas were measured every 24 hours from 0 to 72 hours.

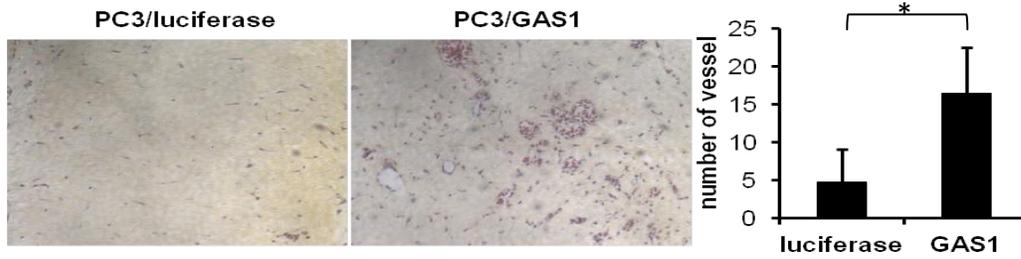
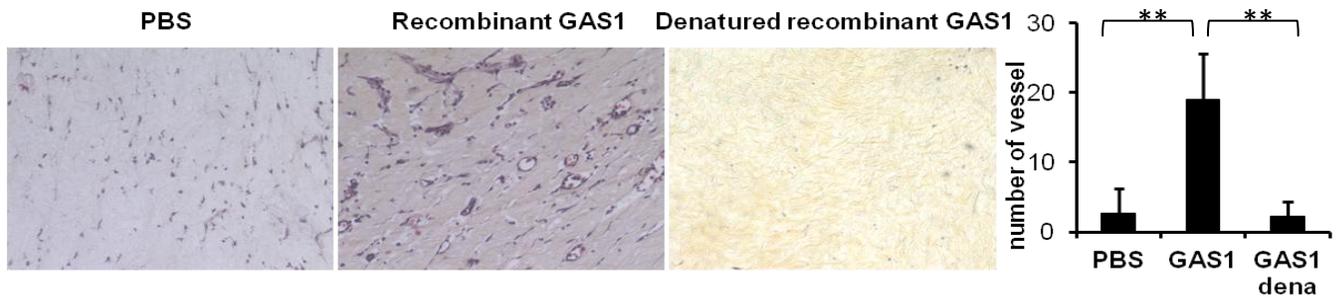
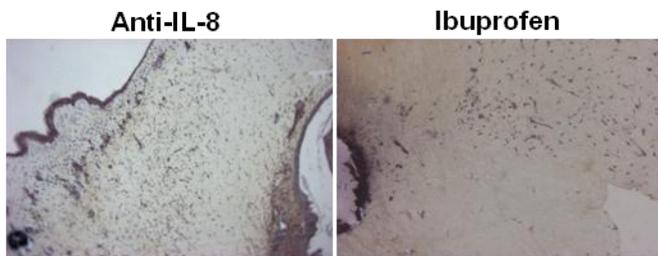
#### *Mice Aortic Rig Bioassay*

The thoracic aorta was surgically excised from 12-week-old Balb/c mice. After removal of the periaortic fibro-adipose tissue, the aorta was sectioned into 2 mm ring-like segments that were rinsed in 1X PBS and embedded in a fibrin gel. Immediately after embedding, the aortic rings were submitted to the treatments (2.5 mg/L VEGF (Figure 1A), 20% fetal bovin serum and Opti-MEM medium). The rings were incubated at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> for maximum 14 days. All assays were performed in 12 replicates. An inverted optic microscope was used to monitor the angiogenesis progress in individual wells. One week after the incubation, the aortic outgrowth was evaluated by counting new microvessels every 3 days for 2 weeks. Rings were fixed with a blue methylene solution on day 14. A Mann–Whitney U test (a nonparametric test used to determine if two independent samples selected from populations have the same distribution) was employed to assess the angiogenic response between groups (data not shown).

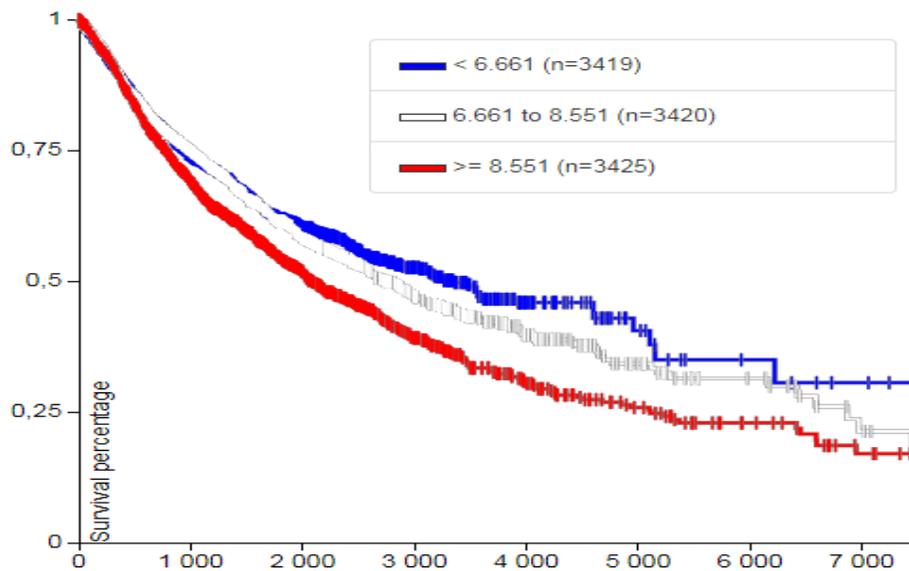
### 3.6 Figures and tables



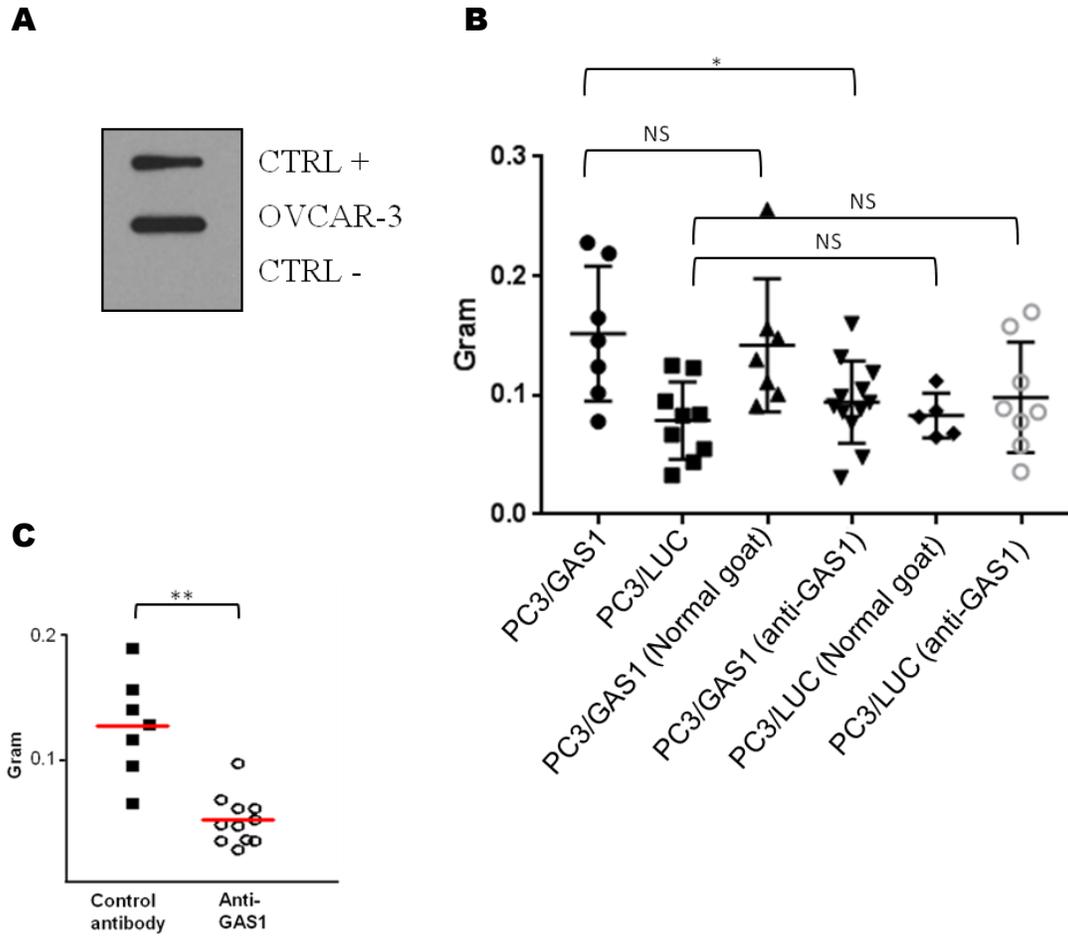
**Figure 1: GAS1 stimulates tumor growth and angiogenesis.** A) Concentration of shed GAS1 in culture media of PC3/GAS1 cells treated with GW280264X (25 µM) or vehicle for 3 hours as measured by ELISA ( $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ ; Student's t-test). B) PC-3, PC-3/LUC and PC-3/GAS1 tumor weights after 7 days on CAM ( $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ ; ANOVA). C) Representative pictures of CAMs from PC-3/luciferase and PC-3/GAS1 tumors. D) Histological sections of PC-3/luciferase and PC-3/GAS1 tumors (H&E staining). E) PC-3 tumor weights after 7 days on CAM following intravenous injection at day 1 with either PBS or recombinant sGAS1 (3.6 ng/egg) ( $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ ; Student's t-test).

**A****B****C**

**Figure 2: sGAS1 stimulates angiogenesis in the CP-CAM assay.** A) Representative pictures of histological sections (HES staining) from collagen plugs containing PC-3/LUC and PC-3/GAS1 conditioned media (CP-CAM, 6 days; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ; Student's t-test). B) HES-stained histological sections of collagen plugs with recombinant or denatured recombinant sGAS1 (50 ng/ml) after a 6-day CP-CAM assay (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ; ANOVA). C) Histological sections (HES staining) of PC-3/GAS1 conditioned media collagen plugs in presence of ibuprofen or anti-IL-8 (CP-CAM, 6 days).

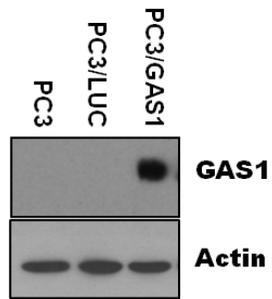


**Figure 3: *GAS1* expression inversely correlates with cancer patients' survival. Kaplan-Meier survival curve from 10 264 cancer patients (TCGA database; pan-cancer). Patients were stratified according to *GAS1* expression levels (blue=low, white=medium, red=high). The Kaplan-Meier plot was obtained from the Xena Browser (UCSC).**

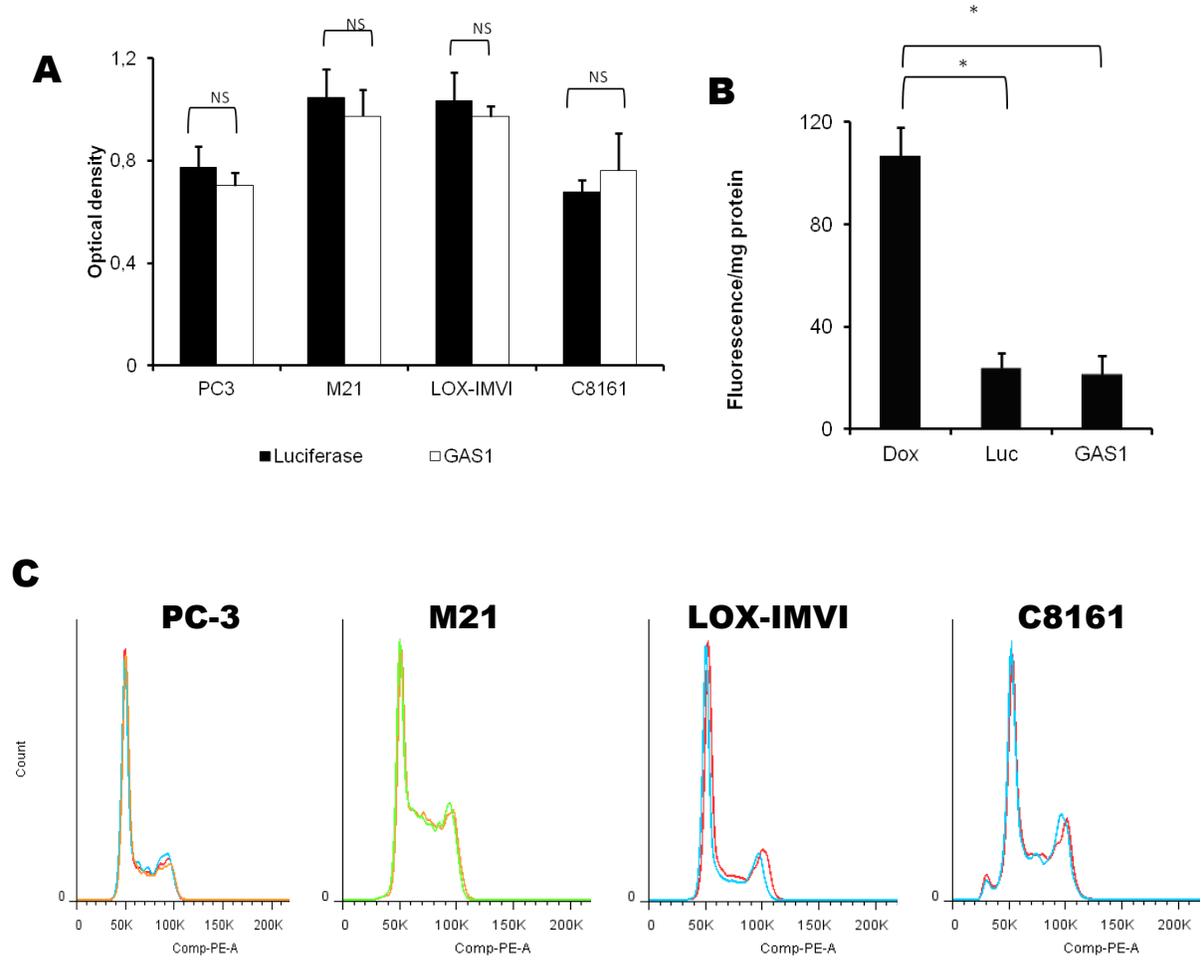


**Figure 4: Anti-GAS1 antibody significantly reduces the protumoral effect of GAS1.** A) Detection of sGAS1 in extracellular media of OVCAR cells by Dot Blot (CTRL+ PC3/GAS1; CTRL- RPMI not conditioned). B) Eggs bearing PC-3/GAS1, PC3/LUC (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ; ANOVA) or C) OVCAR3 tumors were injected with 3.6  $\mu\text{g}$  of anti-GAS1 or anti-goat antibody on day 2 (tumor weights after 7 days of incubation on CAM). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ; Student's t-test.

### 3.7 Supplemental data

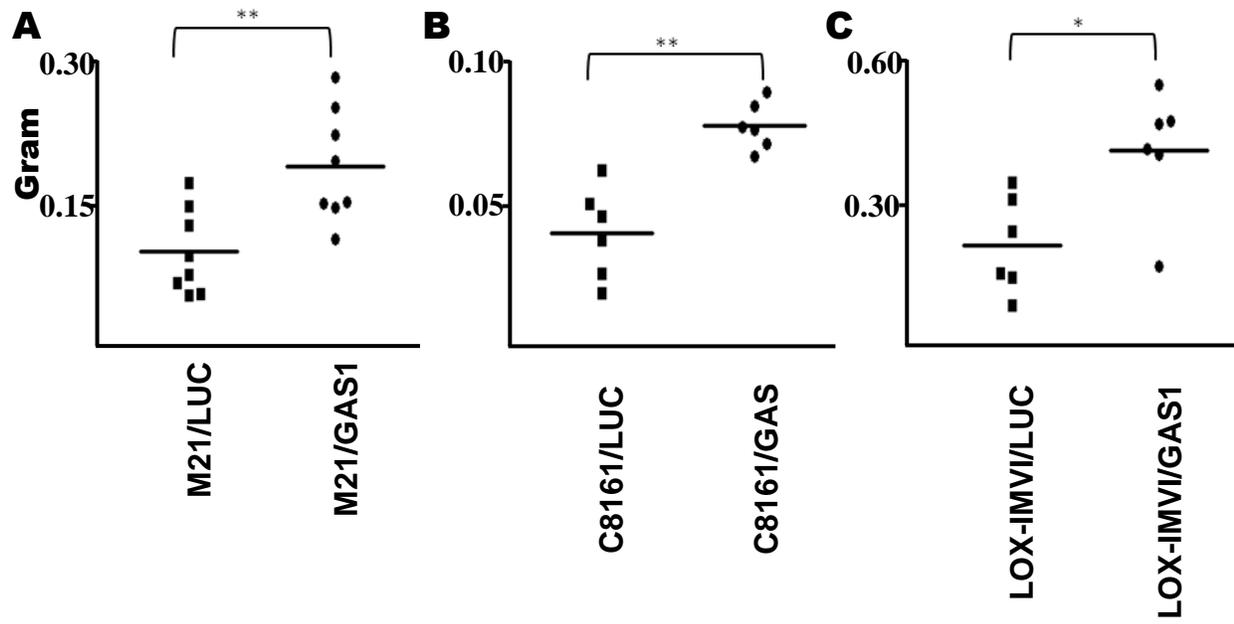


**Supplemental Figure 1: GAS1 expression in PC-3, PC-3/LUC and PC-3/GAS1.** Western blot of PC-3, PC-3/LUC and PC-3/GAS1 with anti-GAS1 and anti-actin.

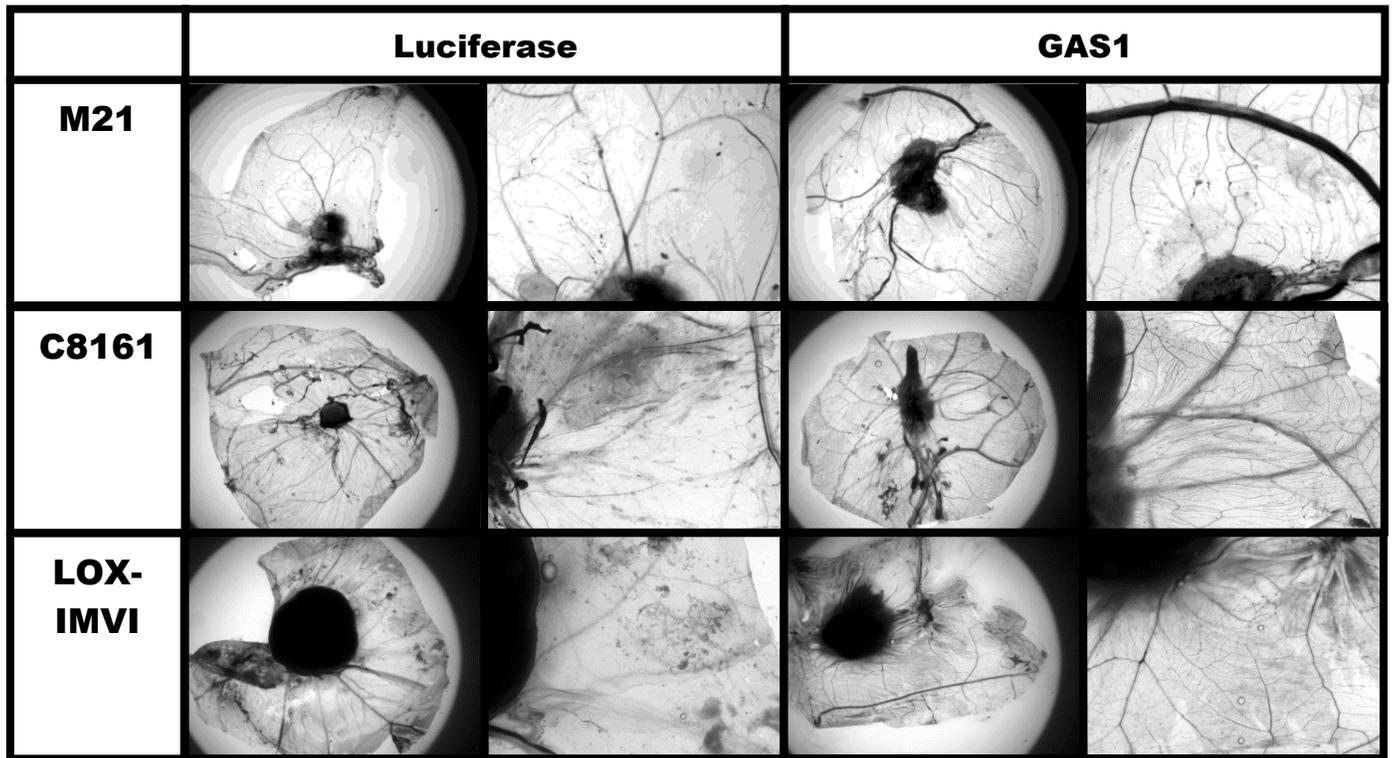


	PC-3			M21		LOX-IMVI		C8161	
	Wild type	Luciferase	GAS1	Luciferase	GAS1	Luciferase	GAS1	Luciferase	GAS1
Sub G1	0.9	0.7	0.8	0.8	0.8	0.2	0.1	4.8	3.7
G0/G1	48.1	53.8	49.4	27.1	27.9	53.4	50.0	47.7	46.1
S	31.3	27.6	26.7	51.7	50.3	29.1	28.4	21.8	27.0
G2/M	19.6	17.9	23.1	20.5	21.1	17.3	21.5	25.7	23.2

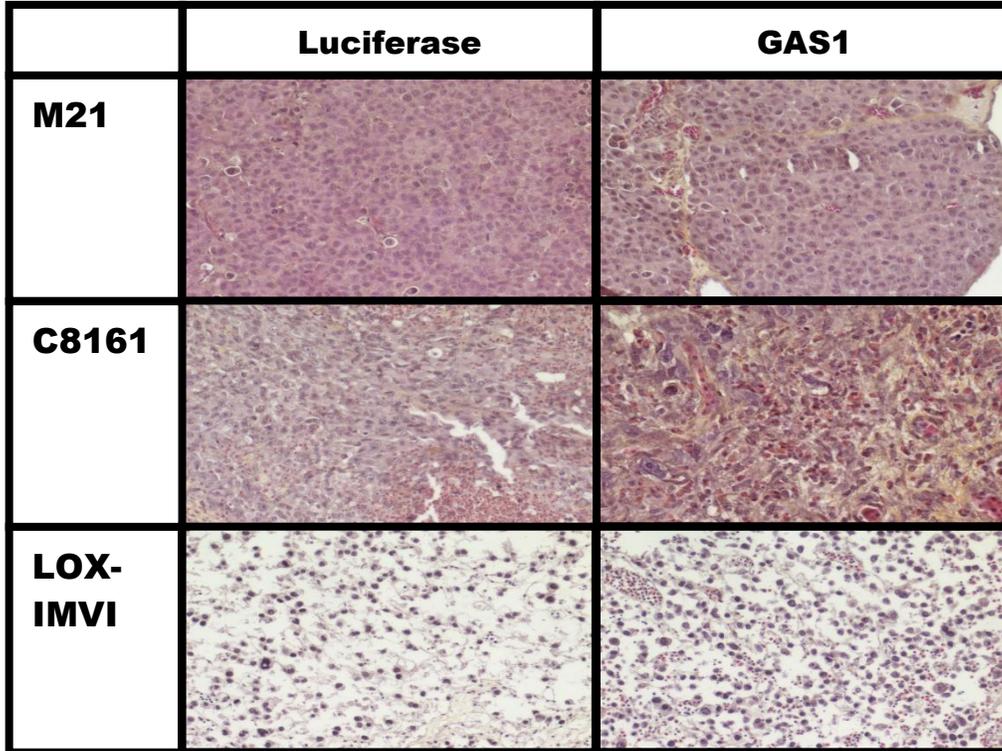
**Supplemental Figure 2: Ectopic expression of GAS1 in PC-3, M21, LOX-IMVI and C8161 cells does not influence proliferation.** A) Proliferation of PC-3, M21, LOX-IMVI and C8161 ectopically expressing GAS1 or luciferase evaluated by MTT. Data represent the average of triplicate from two experiments  $\pm$  SD. B) Caspase 3 activity in PC-3/GAS1, PC-3/luciferase or PC-3 treated with 1 $\mu$ M of doxorubicin (DOX) as a control for 24 hours. Data represent the average of triplicate from two experiments  $\pm$  SD. C) FACS propidium iodine cell cycle analysis of PC-3, M21, LOX-IMVI and C8161 ectopically expressing GAS1 or luciferase. \* $p$  < 0.05, \*\* $p$  < 0.01; Student's t-test.



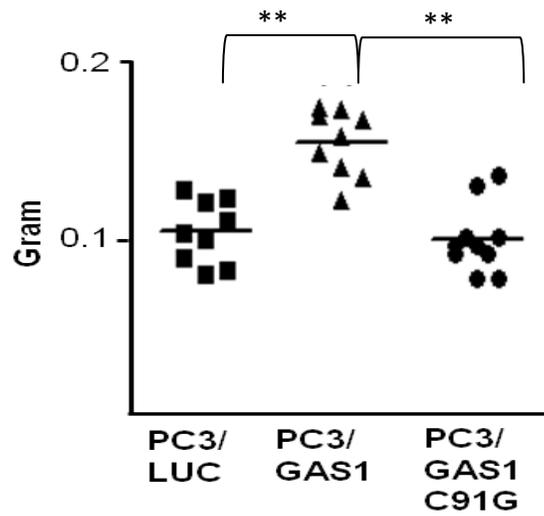
**Supplemental Figure 3: GAS1 stimulates M21, LOX-IMVI and C8161 tumor growth in the CAM assay.** A) M21/luciferase or M21/GAS1, B) C8161/luciferase or C8161/GAS1, C) LOX-IMVI/luciferase or LOX-IMVI/GAS1 cells tumor weight after a 7-day incubation on CAM. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ; Student's t-test. LUC: luciferase.



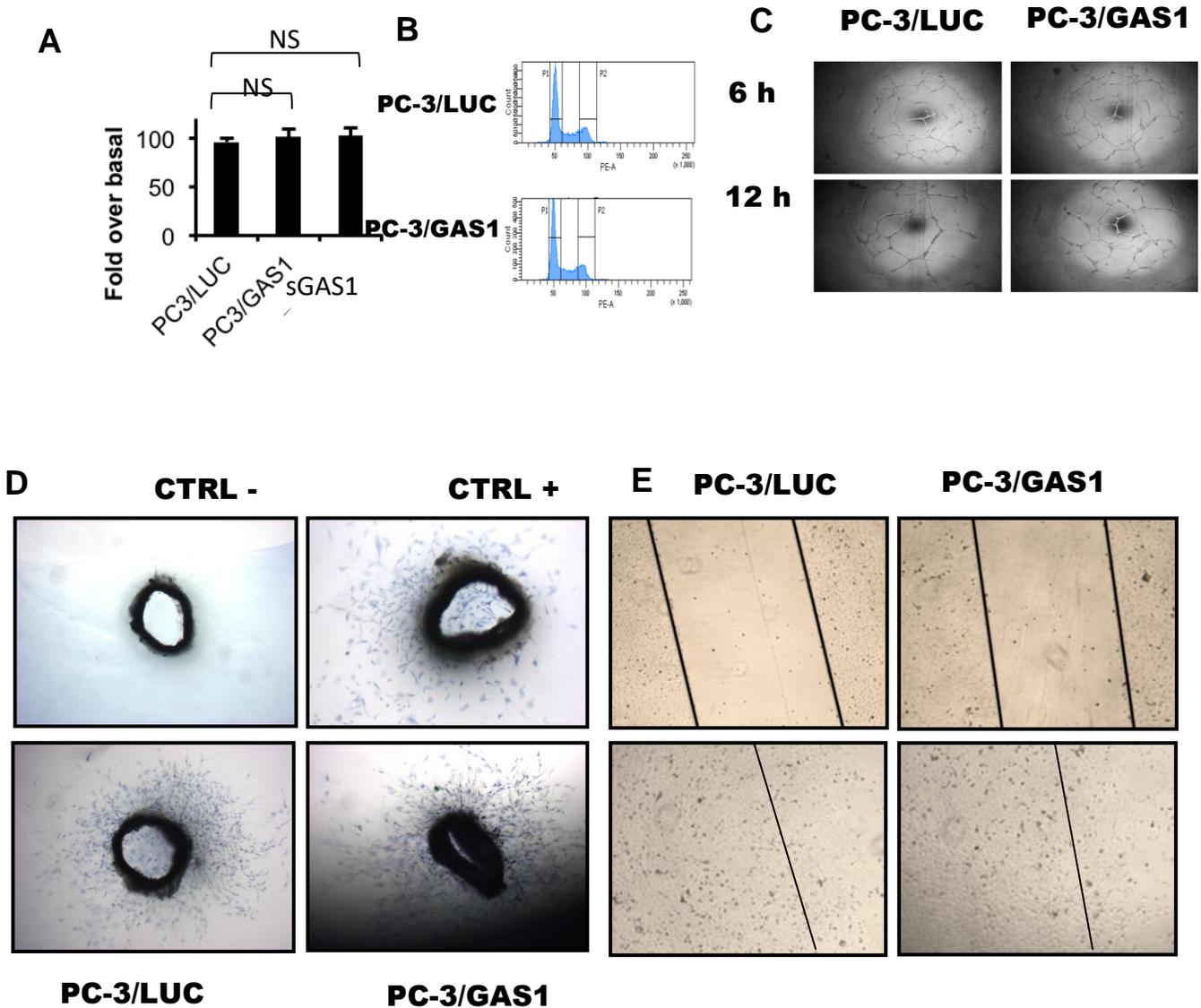
**Supplemental Figure 4: GAS1 expression stimulates vascularization in CAMs bearing M21, C8161 and LOX-IMVI tumors. Representative pictures (4X and 20X) of the CAMs after a 7-day incubation.**



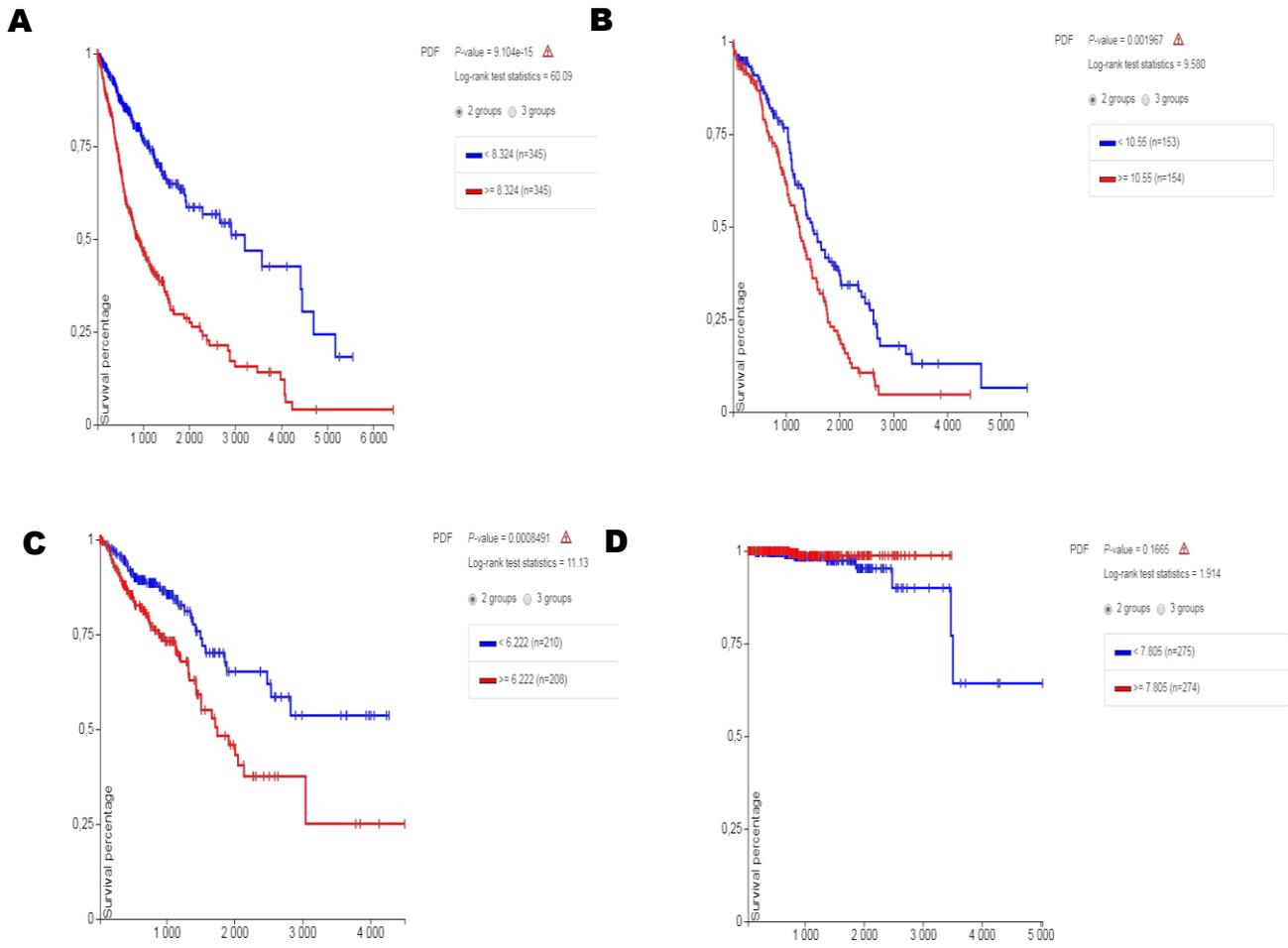
**Supplemental Figure 5: GAS1 expression increases angiogenesis in M21, C8161 and LOX-IMVI tumors.** Histological sections (H&E staining) of M21, C8161, LOX-IMVI tumors expressing *GAS1* or the *luciferase* gene (7 days on CAM).



**Supplemental Figure 6: Mutation of the GAS1 N-glycosylation site abrogates its protumoral effect.** PC-3/LUC, PC-3/GAS1 and PC3/GAS1C91G cells tumor weights after 7 days on CAM ( \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  ; ANOVA).



**Supplemental Figure 7: *In vitro* analysis of sGAS1 angionogenic potential.** A) Cell proliferation of HMEC cells treated with 50 ng/ml of recombinant sGAS1, PC-3/LUC or PC-3-GAS1 conditioned media (72 hours; MTT analysis). Data represent the average of duplicate experiments comprising 3 replicates  $\pm$  SD. (Student's t-test. B) Cell cycle analysis of HMEC cells treated with PC-3/LUC or PC-3-GAS1 conditioned media. C) HMEC cells submitted to the tube formation assay in presence of PC-3-luciferase or PC-3-GAS1 conditioned media. D) Mice aortic rings (methylene blue coloration) embedded in fibrin plugs and cultured in presence of culture media (CTRL-), 20% FBS (CTRL +), PC-3/LUC or PC-3-GAS1 conditioned media. E) Representative images of "wound-healing" assays with HMEC cells treated with PC-3/LUC or PC-3-GAS1 conditioned media.



**Supplemental Figure 8: Kaplan-Meier survival analysis stratified in high and low *GAS1* expression.** A) Low grade glioma and glioblastoma (690 patients), B) ovarian cancer (307 patients), C) colon and rectal cancer (418 patients) and D) prostate cancer (549 patients). The Kaplan-Meier plots were obtained from the Xena Browser (UCSC) using the TCGA data.

### 3.8 References

- Atsumi, T., Singh, R., Sabharwal, L., Bando, H., Meng, J., Arima, Y., ... & Ogura, H. (2014). Inflammation amplifier, a new paradigm in cancer biology. *Cancer research*, 74 (1), 8-14.
- Bekes, E. M., Schweighofer, B., Kupriyanova, T. A., Zajac, E., Ardi, V. C., Quigley, J. P., & Deryugina, E. I. (2011). Tumor-recruited neutrophils and neutrophil TIMP-free MMP-9 regulate coordinately the levels of tumor angiogenesis and efficiency of malignant cell intravasation. *The American journal of pathology*, 179 (3), 1455-1470.
- Cote, M. F., Turcotte, A., Doillon, C., & Gobeil, S. (2016). Three-Dimensional Culture Assay to Explore Cancer Cell Invasiveness and Satellite Tumor Formation. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (114).
- Effenberger, T., von der Heyde, J., Bartsch, K., Garbers, C., Schulze-Osthoff, K., Chalaris, A., ... & Rabe, B. (2014). Senescence-associated release of transmembrane proteins involves proteolytic processing by ADAM17 and microvesicle shedding. *The FASEB Journal*, 28 (11), 4847-4856.
- Expression of GAS1. (2017). <http://www.proteinatlas.org/ENSG00000180447-GAS1/cancer/tissue/prostate+cancer>.
- Fortin, S., Brasseur, K., Morin, N., Asselin, É., & Bérubé, G. (2013). New platinum (II) complexes conjugated at position 7 $\alpha$  of 17 $\beta$ -acetyl-testosterone as new combi-molecules against prostate cancer: Design, synthesis, structure–activity relationships and biological evaluation. *European journal of medicinal chemistry*, 68, 433-443.
- GAS1 gene expression. (2017). <http://www.gtexportal.org/home/gene/GAS1>
- Gobeil, S., Zhu, X., Doillon, C. J., & Green, M. R. (2008). A genome-wide shRNA screen identifies GAS1 as a novel melanoma metastasis suppressor gene. *Genes & development*, 22 (21), 2932-2940.
- Jiménez, A., López-Ornelas, A., Estudillo, E., González-Mariscal, L., González, R. O., & Segovia, J. (2014). A soluble form of GAS1 inhibits tumor growth and angiogenesis in a triple negative breast cancer model. *Experimental cell research*, 327 (2), 307-317.
- Kuefer, R., Hofer, M. D., Altug, V., Zorn, C., Genze, F., Kunzi-Rapp, K., ... & Gschwend, J. E. (2004). Sodium butyrate and tributyrin induce in vivo growth inhibition and apoptosis in human prostate cancer. *British journal of cancer*, 90 (2), 535.
- Lai, H., Zhao, Z., Li, L., Zheng, W., & Chen, T. (2015). Antiangiogenic ruthenium (II) benzimidazole complexes, structure-based activation of distinct signaling pathways. *Metallomics*, 7 (3), 439-447.

Lee, C. S., & Fan, C. M. (2001). Embryonic expression patterns of the mouse and chick Gas1 genes. *Mechanisms of development*, 101 (1), 293-297.

Li, Q., Qin, Y., Wei, P., Lian, P., Li, Y., Xu, Y., ... & Cai, S. (2016). Gas1 inhibits metastatic and metabolic phenotypes in colorectal carcinoma. *Molecular Cancer Research*, 14 (9), 830-840.

Martinelli, D. C., & Fan, C. M. (2007). Gas1 extends the range of Hedgehog action by facilitating its signaling. *Genes & development*, 21 (10), 1231-1243.

Rosti, K., Goldman, A., & Kajander, T. (2015). Solution structure and biophysical characterization of the multifaceted signalling effector protein growth arrest specific-1. *BMC biochemistry*, 16 (1), 8.

Saftig, P., & Reiss, K. (2011). The “A Disintegrin And Metalloproteases” ADAM10 and ADAM17: novel drug targets with therapeutic potential?. *European journal of cell biology*, 90 (6-7), 527-535.

Segovia, J., & Zarco, N. (2014). Gas1 is a pleiotropic regulator of cellular functions: from embryonic development to molecular actions in cancer gene therapy. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 14 (14), 1139-1147.

Spagnuolo, R., Corada, M., Orsenigo, F., Zanetta, L., Deuschle, U., Sandy, P., ... & Dejana, E. (2004). Gas1 is induced by VE-cadherin and vascular endothelial growth factor and inhibits endothelial cell apoptosis. *Blood*, 103 (8), 3005-3012.

van Roeyen, C. R., Zok, S., Pruessmeyer, J., Boor, P., Nagayama, Y., Fleckenstein, S., ... & Ludwig, A. (2013). Growth arrest-specific protein 1 is a novel endogenous inhibitor of glomerular cell activation and proliferation. *Kidney international*, 83 (2), 251-263.

Zhu, L. B., Zhao, S. T., Xu, T. Z., & Wang, H. (2014). Tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced a disintegrin and metalloprotease 10 increases apoptosis resistance in prostate cancer cells. *Oncology letters*, 7 (3), 897-901.

(2017). <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=GAS1>.

## **4. CHAPITRE 4 : DISCUSSION, CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

## 4.1 Discussion

Une grande proportion de la littérature scientifique actuelle sur *GAS1* attribue à ce gène un rôle de suppresseur de tumeurs et de métastases de par sa capacité à induire l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose empêchant ainsi une prolifération cellulaire anarchique (Schneider, C. et al., (1988)) (Zarco, N. et al., (2012)) (Domínguez-Monzón, G. et al., (2009)). Cependant, la fonction de la protéine GAS1 dans le CaP était peu connue. Les présents travaux démontrent que GAS1 pourrait jouer un rôle dit pro-oncogénique dans ce type de cancer et potentiellement dans d'autres cancers. Nous avons démontré, dans un modèle *in vivo*, que GAS1 peut promouvoir la croissance tumorale en stimulant indirectement l'angiogenèse et que l'expression du gène *GAS1* corrèle négativement avec la survie des patients atteints de cancer (données TCGA) (Thorvaldssdóttir, H., Robinson, J. T., & Mesirov, J. P. (2013)).

### 4.1.1 Controverse : les prémices d'une fonction pro-oncogénique de GAS1

Parmi les études réalisées sur *GAS1*, certaines se sont intéressées à l'implication de ce gène au niveau des caractéristiques cellulaires telles que le cycle cellulaire et l'apoptose. Plusieurs études ont démontré le rôle fondamental de *GAS1* dans la suppression tumorale (Del Sal, G., et al., (1995)) (Zarco, N. et al., (2012)) (Jiménez A., López-Ornelas, A. et al., (2014)). Par contre, d'autres études ont établi un lien important entre GAS1 et le ligand SHH (Allen, BL. et al., (2007)) (Allen, BL. et al., (2011)) (Jin, S. et al., (2015)), SHH étant un joueur essentiel de la voie Hedgehog. L'interaction entre ces deux acteurs mènerait à une modulation positive de cette voie importante pour l'embryogenèse (Martinelli, D.C. et al., (2007a)) et qui est considérée pro-oncogénique (Kelleher, F.C., et al., (2006)). L'implication de GAS1 dans la voie Hedgehog suggère un rôle pro-oncogénique pour cette protéine (Martinelli, D.C. et al., (2007 b)).

De par son rôle pléiotropique, il est essentiel de poursuivre les études sur l'impact et la fonction de GAS1 dans un contexte oncologique. Avec ce but en tête, nous avons exprimé de façon ectopique le gène *GAS1* dans les cellules PC-3 provenant d'un cancer de la

prostate à un stade métastatique (Figure supplémentaire 1 ; article). Notre laboratoire a démontré par le passé que ces cellules n'expriment pas *GAS1*. Plusieurs expériences ont été réalisées pour confirmer le statut de *GAS1* dans le CaP.

Les premières expériences avaient pour but d'évaluer *in vitro* l'effet de l'expression de *GAS1* sur la prolifération cellulaire et l'apoptose (voir matériels et méthodes) afin de déterminer si *GAS1* pouvait exercer un rôle de suppresseur de tumeur dans le CaP. Étonnamment, les résultats obtenus ont démontré que la surexpression de la protéine *GAS1* n'a aucune ascendance sur la prolifération et l'apoptose des cellules testées (Figure supplémentaire 2, article). Ceci peut signifier que *GAS1* nécessite un milieu et/ou un contexte propice ou encore que cette protéine a besoin d'un élément tiers pour exercer sa fonction antitumorale.

Par conséquent, nous avons procédé à un essai de tumorigenèse *in vivo*, c'est-à-dire l'essai CAM (section matériels et méthodes). Les résultats obtenus montrent que le poids des tumeurs formées par les cellules PC3/*GAS1* est environ deux fois plus élevé comparativement aux tumeurs contrôles PC3/luciférase (figure 1B ; article), et que l'angiogenèse a augmentée de façon significative (figure 1C et D ; article). Contrairement aux attentes, les cellules PC-3 exprimant la protéine *GAS1* se sont montrées, dans notre modèle de xénogreffe, plus agressives que celles n'exprimant pas *GAS1*. Ce résultat inattendu pourrait être dû au modèle animal utilisé, plus précisément au microenvironnement tissulaire/cellulaire dans lequel les cellules tumorales se sont retrouvées. Les embryons de poulet, lors de l'essai CAM, sont en phase de développement actif. Dans ces conditions, ces derniers sécrètent d'énormes quantités de SHH afin de se développer adéquatement (Johnson, RL, et al., (1994)). Il est donc possible qu'une synergie entre les cellules PC3/*GAS1* et SHH soit responsable de l'augmentation de la croissance des tumeurs PC3/*GAS1*. Cette hypothèse reste cependant à être démontrée. Une autre hypothèse serait qu'une forme soluble de la protéine *GAS1* augmente l'angiogenèse et la croissance tumorale.

#### 4.1.2 GAS1 soluble stimule indirectement l'angiogenèse

On retrouve GAS1 sous forme soluble dans le plasma de rats et de souris (Estudillo, E. et al., (2016)) (Ayala-Sarmiento, A.E. et al., (2014)). Les métalloprotéinases ADAM10 et ADAM17 participent au relargage de GAS1 à partir de la membrane cytoplasmique en clivant son ancre GPI (van Roeyen, CR. et al., (2013)). Fait intéressant, il a été démontré que ADAM17 a un effet pro-angiogénique dans les rétines de souris (Caolo, V. et al., (2015)). Pour notre part, nous avons démontré la présence d'une forme soluble de GAS1 chez plusieurs lignées cancéreuses dont les PC-3 (cancer de la prostate) (Figure 1A ; article), les C8161 (données non montrées), LOX/IMVI (données non montrées), les M21 (mélanome) (données non montrées) et les OVCAR-3 (cancer de l'ovaire) (figure 4A ; article). L'utilisation d'un inhibiteur contre ADAM10 et ADAM17, sur certaines de nos lignées cancéreuses, a diminué fortement le relargage de GAS1 et confirmé les résultats obtenus par van Roeyen (van Roeyen, CR. et al., (2013)).

Pour étudier l'effet de GAS1 soluble sur l'angiogenèse, nous avons intégré le milieu conditionné PC3/GAS1 (contenant GAS1 soluble) dans des bouchons de collagène. Nous avons soumis ces derniers à l'essai CAM (voir matériel et méthodes) afin de nous assurer que le potentiel effet angiogénique des milieux conditionnés PC3/GAS1 est déclenché par GAS1 soluble, et non par un artefact découlant de la réintroduction de GAS1 dans les cellules PC3. La protéine purifiée GAS1 soluble a aussi été soumise au même essai CAM. La protéine humaine GAS1 possède une homologie élevée avec d'autres vertébrés (Lee, CS et Fan, M. (2001)). De plus, il a été démontré que les orthologues de la protéine GAS1 provenant de *C. elegans* et du poulet provoquent des effets similaires à la protéine humaine dans les cellules NIH 3T3 (Lee, CS and Fan, M. (2001)) (Agostoni, E. et al., (2002)). Cela supporte l'utilisation de la protéine GAS1 humaine dans le modèle CAM.

Notre étude démontre que de la forme soluble de GAS1 augmente le nombre de vaisseaux sanguins de façon significative dans les bouchons de collagène soumis à l'essai CAM (Figure 2A et B ; article). Ce n'est pas la première fois que GAS1 est associée à l'angiogenèse (López-Ornelas, A., P. Vergara, and J. Segovia, (2014)) (Jiménez, A., et al.,

(2014)). Par contre, l'association faite par ces groupes de recherche entre GAS1, sa forme soluble et l'angiogenèse est contraire à ce qui est montré par nos travaux. Selon Jiménez et al. (Jiménez, A., et al., (2014)), la forme soluble de GAS1 diminuerait la grosseur des tumeurs formées de cellules MDA MB 231 (cancer du sein) greffées sur des souris en plus de diminuer l'angiogenèse tumorale. Cependant, une autre étude a démontré, en accord avec nos résultats, que GAS1 aurait un effet positif sur l'angiogenèse. Ces travaux montrent que l'expression de GAS1 serait augmentée par des éléments pro-angiogéniques comme le VEGF et la VE-cadhérine et que l'expression de GAS1 diminue la mort des cellules endothéliales (Spagnuolo, R. et al., (2004)). Le mécanisme d'action régissant ce rôle de GAS1 dans les cellules endothéliales reste encore méconnu.

Afin de mieux caractériser le rôle pro-angiogénique de GAS1, nous avons par la suite débuté des études *in vitro* utilisant des modèles d'angiogenèse bien caractérisés. Nos résultats démontrent que GAS1 soluble n'a pas d'effet sur les cellules endothéliales et sur l'angiogenèse dans les modèles testés (Figure supplémentaire 7 ; article). Étant donné que GAS1 fut identifiée comme un amplificateur de l'inflammation dans le cancer (Atsumi, T et al., (2014)), nous avons donc émis l'hypothèse que GAS1 stimule indirectement l'angiogenèse via une réponse immunitaire. Des évidences montrent que l'angiogenèse et l'inflammation sont mutuellement dépendantes (Mueller, M. (2008)). Au cours des réactions inflammatoires, les cellules immunitaires synthétisent et sécrètent des facteurs pro-angiogéniques qui favorisent la vascularisation. D'autre part, l'apport vasculaire nouvellement formé contribue à la continuité de l'inflammation en favorisant la migration des cellules inflammatoires (les macrophages, les cellules polynucléées, les cellules NK) vers le site de l'inflammation (Mueller, M. (2008)). Il est bien établi que les cellules tumorales sont capables de sécréter des facteurs pro-angiogéniques ainsi que des médiateurs pour les cellules inflammatoires (Ribatti, D., & Vacca, A. (2008)). Ils produisent des cytokines angiogéniques, qui sont exportées à partir de cellules tumorales ou mobilisées à partir de la matrice extracellulaire. Il y a pour conséquence une infiltration de cellules inflammatoires. Ces cellules communiquent via un réseau complexe de voies de signalisation intercellulaires, médiées par des molécules d'adhésion de surface, des cytokines et leurs récepteurs (Ribatti, D. et al., (2006)). Les cellules immunitaires coopèrent

et agissent en synergie avec les cellules stromales ainsi qu'avec les cellules tumorales pour stimuler la prolifération des cellules endothéliales et la formation des vaisseaux sanguins. Ces synergies peuvent représenter des mécanismes importants pour le développement de la tumeur et des métastases en fournissant un apport vasculaire efficace et une voie d'évacuation facile. Pour cause, les cancers humains les plus agressifs sont associés à une forte augmentation de cellules immunitaires, en particulier des macrophages (Mueller, M. (2008)).

Pour étudier l'implication du système immunitaire dans l'angiogenèse induite par GAS1 soluble, nous avons utilisé des stratégies mises en place dans l'essai CAM par Zijlstra (Zijlstra, A. et al., (2006)) et Bekes (Bekes, E.M. et al., (2011)). Nous avons eu recours à 2 composés anti-inflammatoires soit l'ibuprofène et un anticorps contre l'interleukine-8 (IL-8). L'ibuprofène s'est montré efficace, et ce, même dans des essais CAM puisqu'on y a observé une diminution importante de l'infiltration des cellules inflammatoires (Witling, J. et al., (1991)). L'interleukine-8 (IL-8) est une cytokine chimio-attractante sécrétée par les cellules granulaires comme les macrophages/monocytes et les neutrophiles (Varney, M.L. et al., (2001)) (Bickel, M. (1993)). L'utilisation d'un anticorps contre IL-8 réduit le recrutement des cellules immunitaires cibles et conséquemment l'inflammation. Lorsque nous avons injecté de l'ibuprofène ou de l'anti-IL-8 aux œufs greffés avec des bouchons de collagène contenant du GAS1 soluble, nous avons observé une diminution significative du nombre de vaisseaux sanguins dans ces bouchons de collagène (Figure 2C ; article). Ces résultats suggèrent l'implication du système immunitaire dans l'angiogenèse induite par GAS1 soluble. Cependant, d'autres études plus approfondies devront être menées afin de prouver cette hypothèse.

#### 4.1.3 GAS1 soluble : un nouvel oncogène ?

L'effet pro-angiogénique de GAS1 soluble pourrait expliquer l'augmentation de la masse des tumeurs exprimant GAS1. En effet, l'angiogenèse est un processus crucial à la croissance des tumeurs pour leur apporter les nutriments et l'oxygène nécessaires

(Folkman, J. (2002)). De plus, la vascularisation des tumeurs est une étape fondamentale dans la progression tumorale et permet la dissémination métastatique (Folkman, J. (2003)) (Shahi, P.K. et al., (2008)). En ce sens, nos résultats démontrent que l'injection intraveineuse de GAS1 soluble purifié dans l'œuf augmente la croissance des xénogreffes composées de cellules PC-3 sauvages (Figure 1E ; article). Ce résultat illustre que GAS1 soluble peut stimuler la croissance des tumeurs n'exprimant pas GAS1. De plus, il suggère que l'environnement tumoral peut promouvoir la croissance tumorale en produisant du GAS1 soluble. En opposition à nos résultats, des publications montrent un rôle plutôt antitumoral à GAS1 soluble. En plus de l'étude de Jiménez sur les cellules MDA MB 231 (Jiménez, A., et al., (2014)), une autre étude a montré que GAS1 soluble est capable d'induire l'arrêt cellulaire et l'apoptose chez des cellules gliomales (López-Ornelas, A., P. Vergara, and J. Segovia, (2014)). Ces résultats démontrent que GAS1 soluble peut aussi inhiber la progression tumorale. Par contre, ces deux études ont été réalisées sur des modèles différents de ceux que nous avons utilisés, ce qui pourrait expliquer les différentes conclusions.

Un élément important en faveur du rôle pro-oncogénique de *GAS1* est l'étude que nous avons effectuée grâce à la banque de données TCGA. Cette banque contient de nombreuses données provenant de patients atteints de différents types de cancer (Thorvaldssdóttir, H., Robinson, J. T., & Mesirov, J. P. (2013)). Nos résultats démontrent, dans une cohorte pan-cancers de plus de 10 000 patients, que l'expression de *GAS1* corrèle négativement avec la survie des patients (Figure 3 ; article). Ce résultat, additionné à ceux démontrant fonctionnellement le rôle protumoral de *GAS1* dans un modèle animal, supporte fortement le potentiel oncogénique de *GAS1*.

## **4.2 Conclusion et perspectives**

L'ensemble des résultats présenté dans ce mémoire démontre que la protéine GAS1 peut stimuler l'angiogenèse et la tumorigenèse. Nous sommes les premiers à décrire ce rôle de GAS1. L'effet pro-angiogénique de GAS1 soluble est potentiellement responsable de

l'augmentation de la masse des tumeurs exprimant GAS1. Ces diverses observations vont à l'encontre de nombreuses publications sur le sujet et suggèrent que *GAS1* puisse, sous certaines circonstances, détenir un rôle pro-oncogénique. En ce sens, notre étude sur une grande cohorte de patients cancéreux du TCGA démontre que l'expression de *GAS1* corrèle négativement avec la survie supportant ainsi notre hypothèse. De plus, nos résultats ont établi que l'injection d'anticorps contre GAS1 réduit significativement la croissance des tumeurs constituées de cellules exprimant cette protéine (Figure 4B et C ; article). L'utilisation d'anticorps neutralisants, de petites molécules chimiques ou de peptides bloquant l'action de GAS1, pourrait un jour être exploitée comme traitement anticancéreux. Nos découvertes, en conjonction avec les données actuelles, établissent sans aucun doute l'importance de GAS1 au niveau du cancer. Notre travail ouvre un nouveau champ de recherche sur la fonction oncogénique de ce gène, et plus particulièrement sur le rôle de la forme soluble de la protéine GAS1 dans des processus angiogénique et tumorigénique.

De nombreuses questions restent en suspend quant aux mécanismes d'action liant GAS1 à l'angiogenèse et la tumorigenèse. Nos résultats établissent un lien indirect entre GAS1 soluble et le processus angiogénique. Nous avons montré, de façon sommaire, l'implication du système immunitaire dans cette réponse. Dans un futur rapproché, il sera important d'étudier plus en détail l'effet de GAS1 soluble sur le système immunitaire et ses composantes majeures. Dans un premier temps, des études pourraient se faire sur des systèmes cellulaires *in vitro*. Par exemple des monocytes/macrophages qui seraient stimulés avec GAS1 soluble et sur lesquels nous pourrions évaluer la sécrétion de facteurs pro-angiogéniques comme VEGF. Il faudra aussi éclaircir les mécanismes et les conditions menant au relargage de GAS1 de la membrane plasmique ce qui permettra de mieux comprendre les circonstances dans lesquelles GAS1 devient soluble et potentiellement pro-angiogénique et protumorale. De par le lien établi entre GAS1 et la voie Hedgehog, il faudra sous peu déterminer le niveau d'implication de cette voie dans l'action pro-angiogénique et protumorale de GAS1.

La caractérisation de *GAS1*, dans le processus oncologique, n'en est qu'à ses débuts et les expériences proposées ci-dessus ne représentent qu'une partie de la lourde tâche à

entreprendre. Cependant, le rôle important que joue *GAS1* au niveau du cancer justifie largement la mise en place de ces différentes études et mérite que la communauté scientifique s'intéresse plus attentivement à ce gène qui n'agit pas toujours selon les attentes.

### 4.3 Bibliographie

Agostoni, E., Gobessi, S., Petrini, E., Monte, M., & Schneider, C. (2002). Cloning and characterization of the *C. elegans* gas1 homolog: phas-1. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 1574 (1), 1-9.

Allen, B. L., Tenzen, T., & McMahon, A. P. (2007). The Hedgehog-binding proteins Gas1 and Cdo cooperate to positively regulate Shh signalling during mouse development. *Genes & development*, 21 (10), 1244-1257.

Allen BL, Song JY, Izzi L, Althaus IW, Kang JS, Charron F, Krauss RS, McMahon AP (2011) Overlapping roles and collective requirement for the coreceptors GAS1, CDO, and BOC in SHH pathway function. *Dev Cell* 20:775–787

Al-Tubuly, A. A. (2000). SDS-PAGE and western blotting. *Diagnostic and Therapeutic Antibodies*, 391-405.

Amaral, J. D., Xavier, J. M., Steer, C. J., & Rodrigues, C. M. (2010). The role of p53 in apoptosis. *Discovery medicine*, 9 (45), 145-152.

Anderson, R. G. (1993). Plasmalemmal caveolae and GPI-anchored membrane proteins. *Current opinion in cell biology*, 5 (4), 647-652.

Athar, M., Tang, X., Lee, J. L., Kopelovich, L., & Kim, A. L. (2006). Hedgehog signalling in skin development and cancer. *Experimental dermatology*, 15 (9), 667-677.

Atsumi, T., Singh, R., Sabharwal, L., Bando, H., Meng, J., Arima, Y., ... & Ogura, H. (2014). Inflammation amplifier, a new paradigm in cancer biology. *Cancer research*, 74 (1), 8-14.

Ayala-Sarmiento, A. E., Estudillo, E., Pérez-Sánchez, G., Sierra-Sánchez, A., González-Mariscal, L., Martínez-Fong, D., & Segovia, J. (2016). GAS1 is present in the cerebrospinal fluid and is expressed in the choroid plexus of the adult rat. *Histochemistry and cell biology*, 146 (3), 325-336.

Ayala-Sarmiento, A. E., Martinez-Fong, D., & Segovia, J. (2015). The internalization of neurotensin by the low-affinity neurotensin receptors (NTSR2 and vNTSR2) activates ERK 1/2 in glioma cells and allows neurotensin-polyplex transfection of tGAS1. *Cellular and molecular neurobiology*, 35 (6), 785-795.

Baker, M., et al., *Use of the mouse aortic ring assay to study angiogenesis*. *Nat Protoc*, 2012. 7 (1): p. 89-104.

Balmano, K., & Cook, S. J. (2009). Tumour cell survival signalling by the ERK1/2 pathway. *Cell death and differentiation*, 16 (3), 368.

Bekes, E. M., Schweighofer, B., Kupriyanova, T. A., Zajac, E., Ardi, V. C., Quigley, J. P., & Deryugina, E. I. (2011). Tumor-recruited neutrophils and neutrophil TIMP-free MMP-9 regulate coordinately the levels of tumor angiogenesis and efficiency of malignant cell intravasation. *The American journal of pathology*, 179 (3), 1455-1470.

Benitez, D. A., Pozo-Guisado, E., Alvarez-Barrientos, A., Fernandez-Salguero, P. M., & Castellón, E. A. (2007). Mechanisms Involved in Resveratrol-Induced Apoptosis and Cell Cycle Arrest in Prostate Cancer—Derived Cell Lines. *Journal of andrology*, 28 (2), 282-293.

Benitez, J. A., Arregui, L., Vergara, P., & Segovia, J. (2007). Targeted-simultaneous expression of Gas1 and p53 using a bicistronic adenoviral vector in gliomas. *Cancer gene therapy*, 14 (10), 836.

Berman, D. M., Karhadkar, S. S., Hallahan, A. R., Pritchard, J. I., Eberhart, C. G., Watkins, D. N., ... & Beachy, P. A. (2002). Medulloblastoma growth inhibition by hedgehog pathway blockade. *Science*, 297 (5586), 1559-1561.

Bickel, M., *The role of interleukin-8 in inflammation and mechanisms of regulation*. *Journal of periodontology*, 1993. **64** (5 Suppl): p. 456-460.

BIESECKER, L. G. (2004). 20'GLI3 and the Pallister-Hall and Greig Cephalopolysyndactyly Syndromes. *Inborn Errors of Development: The Molecular Basis of Clinical Disorders of Morphogenesis*, (49), 257.

Bolcun-Filas, E., *Expression and functional analysis of the testis expressed genes*. 2004  
Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. *Analytical biochemistry*, 1976. **72** (1-2): p. 248-254.

Bregman, M. D., & Meyskens, F. L. (1983). In vitro modulation of human and murine melanoma growth by prostanoid analogues. *Prostaglandins*, 26 (3), 449-456.

Brown, T. (2001). Dot and slot blotting of DNA. *Current protocols in molecular biology*, 2-9.

Buj-Bello, A., Adu, J., Pinon, L. G., & Horton, A. (1997). Neurturin responsiveness requires a GPI-linked receptor and the Ret receptor tyrosine kinase. *Nature*, 387 (6634), 721.

Cabrera, J. R., Sanchez-Pulido, L., Rojas, A. M., Valencia, A., Mañes, S., Naranjo, J. R., & Mellström, B. (2006). Gas1 is related to the glial cell-derived neurotrophic factor family receptors  $\alpha$  and regulates Ret signalling. *Journal of Biological Chemistry*, 281 (20), 14330-14339.

Caolo, V., Swennen, G., Chalaris, A., Wagenaar, A., Verbruggen, S., Rose-John, S., ... & Post, M. J. (2015). ADAM10 and ADAM17 have opposite roles during sprouting angiogenesis. *Angiogenesis*, *18* (1), 13-22.

Chang DT, Lopez A, von Kessler DP, Chiang C, Simandl BK, Zhao R, et al. (1994) Products, genetic linkage and limb patterning activity of a murine hedgehog gene. *Development*;120: 3339-53.

Chapuis, J., Vingtdoux, V., Campagne, F., Davies, P., & Marambaud, P. (2011). Growth arrest-specific 1 binds to and controls the maturation and processing of the amyloid- $\beta$  precursor protein. *Human molecular genetics*, *20* (10), 2026-2036.

Chen-Cleland, T. A., Boffa, L. C., Carpaneto, E. M., Mariani, M. R., Valentin, E., Mendez, E., & Allfrey, V. G. (1993). Recovery of transcriptionally active chromatin restriction fragments by binding to organomercurial-agarose magnetic beads. A rapid and sensitive method for monitoring changes in higher order chromatin structure during gene activation and repression. *Journal of Biological Chemistry*, *268* (31), 23409-23416.

Cobourne, M. T., Miletich, I., & Sharpe, P. T. (2004). Restriction of sonic hedgehog signalling during early tooth development. *Development*, *131* (12), 2875-2885.

Cohen Jr, M. M. (2010). Hedgehog signalling update. *American Journal of Medical Genetics Part A*, *152* (8), 1875-1914.

Collins, K., Jacks, T., & Pavletich, N. P. (1997). The cell cycle and cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *94* (7), 2776-2778.

Culyba, E. K., Price, J. L., Hanson, S. R., Dhar, A., Wong, C. H., Gruebele, M., ... & Kelly, J. W. (2011). Protein native-state stabilization by placing aromatic side chains in N-glycosylated reverse turns. *Science*, *331* (6017), 571-575.

Del Sal, G., et al., *Structure, function, and chromosome mapping of the*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91** (5): p. 1848-52.

Del Sal, G., et al., *Gas1-induced growth suppression requires a transactivation-independent p53 function*. Mol Cell Biol, 1995. **15** (12): p. 7152-60.

Derry, W. B., Bierings, R., Van Iersel, M., Satkunendran, T., Reinke, V., & Rothman, J. H. (2007). Regulation of developmental rate and germ cell proliferation in *Caenorhabditis elegans* by the p53 gene network. *Cell Death & Differentiation*, *14* (4), 662-670.

Dessaud E, McMahon AP, Briscoe J (2008) Pattern formation in the vertebrate neural tube: a sonic hedgehog morphogen-regulated transcriptional network. *Development*;135: 2489-503.

Dierks, C., Beigi, R., Guo, G. R., Zirlik, K., Stegert, M. R., Manley, P., ... & Warmuth, M. (2008). Expansion of Bcr-Abl-positive leukemic stem cells is dependent on Hedgehog pathway activation. *Cancer cell*, *14* (3), 238-249.

Domínguez-Monzón, G., Benítez, J. A., Vergara, P., Lorenzana, R., & Segovia, J. (2009). Gas1 inhibits cell proliferation and induces apoptosis of human primary gliomas in the absence of Shh. *International Journal of Developmental Neuroscience*, *27* (4), 305-313.

Dominguez-Monzon, G., González-Ramírez, R., & Segovia, J. (2011). Molecular mechanisms of action of Gas1 and its possible therapeutic applications. *Current Signal Transduction Therapy*, *6* (1), 106-112.

Dowling, P., & Clynes, M. (2011). Conditioned media from cell lines: A complementary model to clinical specimens for the discovery of disease-specific biomarkers. *Proteomics*, *11* (4), 794-804.

Durupt, F., Koppers-Lalic, D., Balme, B., Budel, L., Terrier, O., Lina, B., ... & Rosa-Calatrava, M. (2012). The chicken chorioallantoic membrane tumor assay as model for qualitative testing of oncolytic adenoviruses. *Cancer gene therapy*, *19* (1), 58

Dvorak, H. F., Nagy, J. A., Dvorak, J. T., & Dvorak, A. M. (1988). Identification and characterization of the blood vessels of solid tumors that are leaky to circulating macromolecules. *The American journal of pathology*, *133* (1), 95.

Eberle, J., & Hossini, A. M. (2008). Expression and function of bcl-2 proteins in melanoma. *Current genomics*, *9* (6), 409-419.

Edwards, D. R., Handsley, M. M., & Pennington, C. J. (2008). The ADAM metalloproteinases. *Molecular aspects of medicine*, *29* (5), 258-289.

Estudillo E, Zavala P, Perez-Sanchez G, Ayala-Sarmiento AE, Segovia J (2016) Gas1 is present in germinal niches of developing dentate gyrus and cortex. *Cell Tissue Res* 364:369–384

Evan, G., & Littlewood, T. (1998). A matter of life and cell death. *Science*, *281* (5381), 1317-1322.

Evdokiou, A. and P.A. Cowled, *Tumor-suppressive activity of the growth arrest-specific gene GAS1 in human tumor cell lines*. *International journal of cancer*, 1998. **75** (4): p. 568-577.

Felding-Habermann, B., Mueller, B., Romerdahl, C. A., & Cheresch, D. A. (1992). Involvement of integrin alpha V gene expression in human melanoma tumorigenicity. *Journal of Clinical Investigation*, *89* (6), 2018.

Ferguson, M. A., Duszenko, M., Lamont, G. S., Overath, P., & Cross, G. A. (1986). Biosynthesis of *Trypanosoma brucei* variant surface glycoproteins. N-glycosylation and

addition of a phosphatidylinositol membrane anchor. *Journal of Biological Chemistry*, 261 (1), 356-362.

Ferguson, M. A. (1999). The structure, biosynthesis and functions of glycosylphosphatidylinositol anchors, and the contributions of trypanosome research. *J Cell Sci*, 112 (17), 2799-2809.

Freshney, R. I., & Freshney, M. G. (Eds.). (2004). *Culture of epithelial cells* (Vol. 10). John Wiley & Sons.

Folkman, J. (1985). Tumor angiogenesis. *Advances in cancer research*, 43, 175-203.

Folkman, J. (2002, December). Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. In *Seminars in oncology* (Vol. 29, No. 6, pp. 15-18). Elsevier.

Folkman, J. (2003). Fundamental concepts of the angiogenic process. *Current molecular medicine*, 3 (7), 643-651.

Fodstad, Ø., Aamdal, S., McMenamin, M., Nesland, J. M., & Pihl, A. (1988). A new experimental metastasis model in athymic nude mice, the human malignant melanoma LOX. *International journal of cancer*, 41 (3), 442-449.

Garbers, C., et al., *Species specificity of ADAM10 and ADAM17 proteins in interleukin-6 (IL-6) trans-signalling and novel role of ADAM10 in inducible IL-6 receptor shedding*. *Journal of Biological Chemistry*, 2011. **286** (17): p. 14804-14811.

Gobeil, S., et al., A genome-wide shRNA screen identifies GAS1 as a novel melanoma metastasis suppressor gene. *Genes Dev*, 2008. 22 (21): p. 2932-40.

Gu, Z., Noss, E. H., Hsu, V. W., & Brenner, M. B. (2011). Integrins traffic rapidly via circular dorsal ruffles and macropinocytosis during stimulated cell migration. *The Journal of cell biology*, 193 (1), 61-70.

Guo, Z., & Wang, Z. (2009). The glypican Dally is required in the niche for the maintenance of germline stem cells and short-range BMP signalling in the Drosophila ovary. *Development*, 136 (21), 3627-3635.

Hätinen, T., Holm, L., & Airaksinen, M. S. (2007). Loss of neurturin in frog—comparative genomics study of GDNF family ligand-receptor pairs. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 34 (2), 155-167.

Harfe, B. D., Scherz, P. J., Nissim, S., Tian, H., McMahon, A. P., & Tabin, C. J. (2004). Evidence for an expansion-based temporal Shh gradient in specifying vertebrate digit identities. *Cell*, 118 (4), 517-528.

Hayashi, S., Nagareda, T., Kanzawa, Y., & Yamamoto, K. (1993). Photoluminescence of Si-rich SiO<sub>2</sub> films: Si clusters as luminescent centers. *Japanese journal of applied physics*, 32 (9R), 3840.

Imperiali, B., & O'Connor, S. E. (1999). Effect of N-linked glycosylation on glycopeptide and glycoprotein structure. *Current opinion in chemical biology*, 3 (6), 643-649.

Ingham, P.W. and A.P. McMahon, *Hedgehog signalling in animal development: paradigms and principles*. Genes & development, 2001. **15** (23): p. 3059-3087.

Izzi, L., et al., *Boc and Gas1 each form distinct Shh receptor complexes with Ptch1 and are required for Shh-mediated cell proliferation*. Developmental cell, 2011. **20** (6): p. 788-801.

Jaffe, E. A., Nachman, R. L., Becker, C. G., & Minick, C. R. (1973). Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *Journal of Clinical Investigation*, 52 (11), 2745.

Jiang, J., & Hui, C. C. (2008). Hedgehog signaling in development and cancer. *Developmental cell*, 15 (6), 801-812.

Jin, S., Martinelli, D. C., Zheng, X., Tessier-Lavigne, M., & Fan, C. M. (2015). Gas1 is a receptor for sonic hedgehog to repel enteric axons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112 (1), E73-E80.

Jeschke, B., Meyer, J., Jonczyk, A., Kessler, H., Adamietz, P., Meenen, N. M., ... & Nies, B. (2002). RGD-peptides for tissue engineering of articular cartilage. *Biomaterials*, 23 (16), 3455-3463.

Jiménez, A., López-Ornelas, A., Estudillo, E., González-Mariscal, L., González, R. O., & Segovia, J. (2014). A soluble form of GAS1 inhibits tumor growth and angiogenesis in a triple negative breast cancer model. *Experimental cell research*, 327 (2), 307-317.

Johnson RL, Riddle RD, Laufer E, Tabin C (1994) Sonic hedgehog: a key mediator of anterior-posterior patterning of the limb and dorso-ventral patterning of axial embryonic structures. *Biochem Soc Trans*;22: 569-74.

Kaighn, M. E., Narayan, K. S., Ohnuki, Y., Lechner, J. F., & Jones, L. W. (1979). Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Investigative urology*, 17 (1), 16-23.

Kamb, A., Gruis, N. A., Weaver-Feldhaus, J., Liu, Q., Harshman, K., Tavitigian, S. V., ... & Skolnick, M. H. (1994). A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science*, 264 (5157), 436-441.

Kang, J. S., Zhang, W., & Krauss, R. S. (2007). Hedgehog signalling: cooking with Gas1. *Sci STKE*, 403, pe50.

Kann, M., Bae, E., Lenz, M. O., Li, L., Trannguyen, B., Schumacher, V. A., ... & Schermer, B. (2015). WT1 targets Gas1 to maintain nephron progenitor cells by modulating FGF signals. *Development*, 142 (7), 1254-1266.

Kelleher, F. C., Fennelly, D., & Rafferty, M. (2006). Common critical pathways in embryogenesis and cancer. *Acta oncologica*, 45 (4), 375-388.

Klein, R. D., Borchers, A. H., Sundareshan, P., Bougelet, C., Berkman, M. R., Nagle, R. B., & Bowden, G. T. (1997). Interleukin-1 $\beta$  secreted from monocytic cells induces the expression of matrilysin in the prostatic cell line LNCaP. *Journal of Biological Chemistry*, 272 (22), 14188-14192.

Kubo, M., Nakamura, M., Tasaki, A., Yamanaka, N., Nakashima, H., Nomura, M., ... & Katano, M. (2004). Hedgehog signalling pathway is a new therapeutic target for patients with breast cancer. *Cancer research*, 64 (17), 6071-6074.

Lawley, T. J., & Kubota, Y. (1989). Induction of morphologic differentiation of endothelial cells in culture. *Journal of Investigative Dermatology*, 93.

Lee, C.S. and C.-M. Fan, *Embryonic expression patterns of the mouse and chick Gas1 genes*. Mechanisms of development, 2001. **101** (1): p. 293-297.

Lee, C.S., L. Buttitta, and C.-M. Fan, *Evidence that the WNT-inducible growth arrest-specific gene 1 encodes an antagonist of sonic hedgehog signalling in the somite*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2001. **98** (20): p. 11347-11352.

Leem, Y.-E., et al., *Gas1 cooperates with Cdo and promotes myogenic differentiation via activation of p38MAPK*. Cellular signalling, 2011. **23** (12): p. 2021-2029.

Lewis, P. M., Gritli-Linde, A., Smeyne, R., Kottmann, A., & McMahon, A. P. (2004). Sonic hedgehog signalling is required for expansion of granule neuron precursors and patterning of the mouse cerebellum. *Developmental biology*, 270 (2), 393-410.

Liang, C. C., Park, A. Y., & Guan, J. L. (2007). In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nature protocols*, 2 (2), 329.

Linja, M. and L.A. Garraway, *Stepping on the GAS: a brake pedal for melanoma metastasis?* Pigment cell & melanoma research, 2009. **22** (1): p. 8-9.

Li, Q., Qin, Y., Wei, P., Lian, P., Li, Y., Xu, Y., ... & Cai, S. (2016). Gas1 Inhibits Metastatic and Metabolic Phenotypes in Colorectal Carcinoma. *Molecular Cancer Research*, 14 (9), 830-840.

Liu, W., Li, G., Chien, J. S., Raft, S., Zhang, H., Chiang, C., & Frenz, D. A. (2002). Sonic hedgehog regulates otic capsule chondrogenesis and inner ear development in the mouse embryo. *Developmental biology*, 248 (2), 240-250.

Liu, Y., May, N. R., & Fan, C. M. (2001). Growth arrest specific gene 1 is a positive growth regulator for the cerebellum. *Developmental biology*, 236 (1), 30-45.

Lokman, N. A., Elder, A. S., Ricciardelli, C., & Oehler, M. K. (2012). Chick chorioallantoic membrane (CAM) assay as an in vivo model to study the effect of newly identified molecules on ovarian cancer invasion and metastasis. *International journal of molecular sciences*, 13 (8), 9959-9970.

López-Ornelas, A., Vergara, P., & Segovia, J. (2014). Neural stem cells producing an inducible and soluble form of Gas1 target and inhibit intracranial glioma growth. *Cytotherapy*, 16 (7), 1011-1023.

López-Ramírez, M. A., Domínguez-Monzón, G., Vergara, P., & Segovia, J. (2008). Gas1 reduces Ret tyrosine 1062 phosphorylation and alters GDNF-mediated intracellular signalling. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 26 (5), 497-503.

Low, M. G. (1989). The glycosyl-phosphatidylinositol anchor of membrane proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) -Reviews on Biomembranes*, 988 (3), 427-454.

Low, M. G., & Huang, K. S. (1991). Factors affecting the ability of glycosylphosphatidylinositol-specific phospholipase D to degrade the membrane anchors of cell surface proteins. *Biochemical Journal*, 279 (2), 483-493.

Marchetti, M., Vignoli, A., Russo, L., Balducci, D., Pagnoncelli, M., Barbui, T., & Falanga, A. (2008). Endothelial capillary tube formation and cell proliferation induced by tumor cells are affected by low molecular weight heparins and unfractionated heparin. *Thrombosis research*, 121 (5), 637-645.

Martinelli, D.C. and C.M. Fan, *The role of Gas1 in embryonic development and its implications for human disease*. *Cell Cycle*, 2007. 6 (21): p. 2650-5.

Martinelli, D.C. and C.-M. Fan, *Gas1 extends the range of Hedgehog action by facilitating its signalling*. *Genes & development*, 2007. 21 (10): p. 1231-1243.

Martinelli, D. C., & Fan, C. M. (2009). A sonic hedgehog missense mutation associated with holoprosencephaly causes defective binding to GAS1. *Journal of Biological Chemistry*, 284 (29), 19169-19172.

Mathew, E., et al., *Dosage-dependent regulation of pancreatic cancer growth and angiogenesis by hedgehog signalling*. *Cell reports*, 2014. 9 (2): p. 484-494.

Mayor, S., & Riezman, H. (2004). Sorting GPI-anchored proteins. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 5 (2), 110.

- McNeal, J. E., Redwine, E. A., Freiha, F. S., & Stamey, T. A. (1988). Zonal distribution of prostatic adenocarcinoma. Correlation with histologic pattern and direction of spread. *The American journal of surgical pathology*, *12* (12), 897-906.
- Mellström, B., Ceña, V., Lamas, M., Perales, C., Gonzalez, C., & Naranjo, J. R. (2002). Gas1 is induced during and participates in excitotoxic neuronal death. *Molecular and Cellular Neuroscience*, *19* (3), 417-429.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, *65* (1-2), 55-63.
- Mueller, M. (2008). Inflammation and angiogenesis: innate immune cells as modulators of tumor vascularization. In *Tumor angiogenesis* (pp. 351-362). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Murata, D., Nomura, K. H., Dejima, K., Mizuguchi, S., Kawasaki, N., Matsuishi-Nakajima, Y., ... & Nomura, K. (2012). GPI-anchor synthesis is indispensable for the germline development of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Molecular biology of the cell*, *23* (6), 982-995.
- Nieuwenhuis, E., & Hui, C. C. (2005). Hedgehog signalling and congenital malformations. *Clinical genetics*, *67* (3), 193-208.
- NOSJEAN, O., KOYAMA, I., GOSEKI, M., Bernard, R. O. U. X., & KOMODA, T. (1997). Human tissue non-specific alkaline phosphatases: sugar-moiety-induced enzymic and antigenic modulations and genetic aspects. *Biochemical Journal*, *321* (2), 297-303.
- Ortega, N., Jonca, F., Vincent, S., Favard, C., Ruchoux, M. M., & Plouet, J. (1997). Systemic activation of the vascular endothelial growth factor receptor KDR/flk-1 selectively triggers endothelial cells with an angiogenic phenotype. *The American journal of pathology*, *151* (5), 1215.
- Pasikowska, M., Palamarczyk, G., & Lehle, L. (2012). The essential endoplasmic reticulum chaperone Rot1 is required for protein N- and O-glycosylation in yeast. *Glycobiology*, *22* (7), 939-947.
- Patel, D., & Witt, S. N. (2017). Ethanolamine and Phosphatidylethanolamine: Partners in Health and Disease. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2017.
- Patterson, M. C. (2005, September). Metabolic mimics: the disorders of N-linked glycosylation. In *Seminars in pediatric neurology* (Vol. 12, No. 3, pp. 144-151). WB Saunders.
- Pineda-Alvarez, D. E., Roessler, E., Hu, P., Srivastava, K., Solomon, B. D., Siple, C. E., ... & Muenke, M. (2012). Missense substitutions in the GAS1 protein present in holoprosencephaly patients reduce the affinity for its ligand, SHH. *Human genetics*, *131* (2), 301-310.

- Rai, N. K., Tripathi, K., Sharma, D., & Shukla, V. K. (2005). Apoptosis: a basic physiologic process in wound healing. *The international journal of lower extremity wounds*, 4 (3), 138-144.
- Rees, W. D., Hay, S. M., Fontanier-Razzaq, N. C., Antipatis, C., & Harries, D. N. (1999). Expression of the growth arrest genes (GAS and GADD) changes during organogenesis in the rat fetus. *The Journal of nutrition*, 129 (8), 1532-1536.
- Ribatti, D., & Vacca, A. (2008). Overview of angiogenesis during tumor growth. In *Angiogenesis* (pp. 161-168). Springer, Boston, MA.
- Ribatti, D., Nico, B., & Vacca, A. (2006). Importance of the bone marrow microenvironment in inducing the angiogenic response in multiple myeloma. *Oncogene*, 25 (31), 4257.
- Ribeiro, L. A., Queizi, R. G., Nascimento, A., Bertolacini, C. P., & Richieri-Costa, A. (2010). Holoprosencephaly and holoprosencephaly-like phenotype and GAS1 DNA sequence changes: Report of four Brazilian patients. *American journal of medical genetics Part A*, 152 (7), 1688-1694.
- Richardson, M., & Singh, G. (2003). Observations on the use of the avian chorioallantoic membrane (CAM) model in investigations into angiogenesis. *Current Drug Targets-Cardiovascular & Hematological Disorders*, 3 (2), 155-185.
- Roberts, W. L., Myher, J. J., Kuksis, A., Low, M. G., & Rosenberry, T. L. (1988). Lipid analysis of the glycoinositol phospholipid membrane anchor of human erythrocyte acetylcholinesterase. Palmitoylation of inositol results in resistance to phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *Journal of Biological Chemistry*, 263 (35), 18766-18775.
- Rosti, K., Goldman, A., & Kajander, T. (2015). Solution structure and biophysical characterization of the multifaceted signalling effector protein growth arrest specific-1. *BMC biochemistry*, 16 (1), 8.
- Romanoff, A. L. (1960). The avian embryo. Structural and functional development. *The avian embryo. Structural and functional development*.
- Ruaro, E. M., Collavin, L., Del Sal, G., Haffner, R., Oren, M., Levine, A. J., & Schneider, C. (1997). A proline-rich motif in p53 is required for transactivation-independent growth arrest as induced by Gas1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94 (9), 4675-4680.
- Ruaro, M. E., Stebel, M., Vatta, P., Marzinotto, S., & Schneider, C. (2000). Analysis of the domain requirement in Gas1 growth suppressing activity. *FEBS letters*, 481 (2), 159-163.
- Ruoslahti, E., & Pierschbacher, M. D. (1986). Arg-Gly-Asp : a versatile cell recognition signal. *Cell*, 44 (4), 517-518.

Sanchez, P., Hernández, A. M., Stecca, B., Kahler, A. J., DeGueme, A. M., Barrett, A., ... & Altaba, A. R. (2004). Inhibition of prostate cancer proliferation by interference with SONIC HEDGEHOG-GLI1 signalling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101* (34), 12561-12566.

Sanyal, S. (2006). In Vitro Models for Studying Angiogenesis. Website [www.display\\_product.htangiogenesismodel.htm](http://www.display_product.htangiogenesismodel.htm) (Accessed 16.10.06).

Saunders, N. R., Daneman, R., Dziegielewska, K. M., & Liddelow, S. A. (2013). Transporters of the blood-brain and blood-CSF interfaces in development and in the adult. *Molecular aspects of medicine*, *34* (2), 742-752.

Schneider, C., R.M. King, and L. Philipson, Genes specifically expressed at growth arrest of mammalian cells. *Cell*, 1988. *54* (6): p. 787-793.

Schueler-Furman, O., Glick, E., Segovia, J., & Linial, M. (2006). Is GAS1 a co-receptor for the GDNF family of ligands?. *Trends in pharmacological sciences*, *27* (2), 72-77.

Seppala, M., Depew, M. J., Martinelli, D. C., Fan, C. M., Sharpe, P. T., & Cobourne, M. T. (2007). Gas1 is a modifier for holoprosencephaly and genetically interacts with sonic hedgehog. *Journal of Clinical Investigation*, *117* (6), 1575.

Shahi, P. K., & Pineda, I. F. (2008). Tumoral angiogenesis: review of the literature. *Cancer investigation*, *26* (1), 104-108.

Shugart, E. C., Levenson, A. S., Constance, C. M., & Umek, R. M. (1995). Differential expression of gas and gadd genes at distinct growth arrest points during adipocyte development. *Cell growth and differentiation*, *6*, 1541-1547.

Slynko, V., Schubert, M., Numao, S., Kowarik, M., Aebi, M., & Allain, F. H. T. (2009). NMR structure determination of a segmentally labeled glycoprotein using in vitro glycosylation. *Journal of the American Chemical Society*, *131* (3), 1274-1281.

Spagnuolo, R., et al., *Gas1 is induced by VE-cadherin and vascular endothelial growth factor and inhibits endothelial cell apoptosis*. *Blood*, 2004. **103** (8): p. 3005-12.

Štifter, S., & Đorđević, G. (2014). Prostate Cancer and New Insights in Angiogenesis. *Frontiers in Oncology*, *4*, 243. <http://doi.org/10.3389/fonc.2014.00243>

Stebel, M., Vatta, P., Ruaro, M. E., Del Sal, G., Parton, R. G., & Schneider, C. (2000). The growth suppressing gas1 product is a GPI-linked protein. *FEBS letters*, *481* (2), 152-158.

Sturge, J., Caley, M. P., & Waxman, J. (2011). Bone metastasis in prostate cancer: emerging therapeutic strategies. *Nature reviews Clinical oncology*, *8* (6), 357-368.

Sugimoto, H., Mundel, T. M., Kieran, M. W., & Kalluri, R. (2006). Identification of fibroblast heterogeneity in the tumor microenvironment. *Cancer biology & therapy*, 5 (12), 1640-1646.

Sun, X. L., Chen, B. Y., Zhao, H. K., Cheng, Y. Y., Zheng, M. H., Duan, L., ... & Chen, L. W. (2016). Gas1 up-regulation is inducible and contributes to cell apoptosis in reactive astrocytes in the substantia nigra of LPS and MPTP models. *Journal of neuroinflammation*, 13 (1), 180.

Tan, M., Peng, C., Anderson, K. A., Chhoy, P., Xie, Z., Dai, L., ... & Ro, J. (2014). Lysine glutarylation is a protein posttranslational modification regulated by SIRT5. *Cell metabolism*, 19 (4), 605-617.

Taylor, D. R., & Hooper, N. M. (2006). The prion protein and lipid rafts. *Molecular membrane biology*, 23 (1), 89-99.

Thayer, S. P., di Magliano, M. P., Heiser, P. W., Nielsen, C. M., Roberts, D. J., Lauwers, G. Y., ... & Antoniu, B. (2003). Hedgehog is an early and late mediator of pancreatic cancer tumorigenesis. *Nature*, 425 (6960), 851-856.

Thorvaldsdóttir, H., Robinson, J. T., & Mesirov, J. P. (2013). Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. *Briefings in bioinformatics*, 14 (2), 178-192.

Tojo, M., Kiyosawa, H., Iwatsuki, K., & Kaneko, F. (2002). Expression of a sonic hedgehog signal transducer, hedgehog-interacting protein, by human basal cell carcinoma. *British Journal of Dermatology*, 146 (1), 69-73.

Tsukaya, H., & Beemster, G. T. (2006). Genetics, cell cycle and cell expansion in organogenesis in plants. *Journal of plant research*, 119 (1), 1-4.

Vailhé, B., Vittet, D., & Feige, J. J. (2001). In vitro models of vasculogenesis and angiogenesis. *Laboratory investigation*, 81 (4), 439.

Valdes, T. I., Kreutzer, D., & Moussy, F. (2002). The chick chorioallantoic membrane as a novel in vivo model for the testing of biomaterials. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 62 (2), 273-282.

van Roeyen, C.R., et al., *Growth arrest-specific protein 1 is a novel endogenous inhibitor of glomerular cell activation and proliferation*. *Kidney international*, 2013. **83** (2): p. 251-263.

Varki, A., & Lowe, J. B. (2009). Biological roles of glycans.

Varjosalo, M., & Taipale, J. (2008). Hedgehog : functions and mechanisms. *Genes & development*, 22 (18), 2454-2472.

Varney, M.L., et al., *Monocyte/macrophage recruitment, activation and differentiation modulate interleukin-8 production: a paracrine role of tumor-associated macrophages in tumor angiogenesis*. *In vivo* (Athens, Greece), 2001. **16** (6): p. 471-477.

Wang, B., Xiao, Y., Ding, B. B., Zhang, N., Yuan, X. B., Gui, L., ... & Geng, J. G. (2003). Induction of tumor angiogenesis by Slit-Robo signalling and inhibition of cancer growth by blocking Robo activity. *Cancer cell*, *4* (1), 19-29..

Wang, H., Zhou, X., Zhang, Y., Zhu, H., Zhao, L., Fan, L., ... & Fan, D. (2012). Growth arrest-specific gene 1 is downregulated and inhibits tumor growth in gastric cancer. *The FEBS journal*, *279* (19), 3652-3664.

Watkins, D. N., Berman, D. M., Burkholder, S. G., Wang, B., Beachy, P. A., & Baylin, S. B. (2003). Hedgehog signalling within airway epithelial progenitors and in small-cell lung cancer. *Nature*, *422* (6929), 313-317.

White, J., & Dalton, S. (2005). Cell cycle control of embryonic stem cells. *Stem cell reviews*, *1* (2), 131-138.

Wilting, J., B. Christ, and M. Bokeloh, *A modified chorioallantoic membrane (CAM) assay for qualitative and quantitative study of growth factors*. *Anatomy and embryology*, 1991. **183** (3): p. 259-271.

Xie, L., Hoffmann, A. D., Burnicka-Turek, O., Friedland-Little, J. M., Zhang, K., & Moskowitz, I. P. (2012). Tbx5-hedgehog molecular networks are essential in the second heart field for atrial septation. *Developmental cell*, *23* (2), 280-291.

Yauch, R. L., Gould, S. E., Scales, S. J., Tang, T., Tian, H., Ahn, C. P., ... & Nannini-Pepe, M. (2008). A paracrine requirement for hedgehog signalling in cancer. *Nature*, *455* (7211), 406.

Yates, A., Akanni, W., Amode, M. R., Barrell, D., Billis, K., Carvalho-Silva, D., ... & Girón, C. G. (2015). Ensembl 2016. *Nucleic acids research*, *44* (D1), D710-D716.

Zamorano, A., et al., *Transcriptionally mediated gene targeting of gas1 to glioma cells elicits growth arrest and apoptosis*. *Journal of neuroscience research*, 2003. **71** (2): p. 256-263.

Zamorano, A., Mellström, B., Vergara, P., Naranjo, J. R., & Segovia, J. (2004). Glial-specific retrovirally mediated gas1 gene expression induces glioma cell apoptosis and inhibits tumor growth in vivo. *Neurobiology of disease*, *15* (3), 483-491.

Zarco, N., et al., *GAS1 induces cell death through an intrinsic apoptotic pathway*. *Apoptosis*, 2012. **17** (6): p. 627-635.

Zheng, X., Vittar, N. B. R., Gai, X., Fernandez-Barrena, M. G., Moser, C. D., Hu, C., ... & Shire, A. M. (2012). The transcription factor GLI1 mediates TGF $\beta$ 1 driven EMT in hepatocellular carcinoma via a SNAI1-dependent mechanism. *PloS one*, 7 (11), e49581.

Zhou, Q., Qi, C. L., Li, Y., He, X. D., Li, J. C., Zhang, Q. Q., ... & Yang, X. (2013). A novel four-step system for screening angiogenesis inhibitors. *Molecular medicine reports*, 8 (6), 1734-1740.

Zijlstra, A., Seandel, M., Kupriyanova, T. A., Partridge, J. J., Madsen, M. A., Hahn-Dantona, E. A., ... & Deryugina, E. I. (2006). Proangiogenic role of neutrophil-like inflammatory heterophils during neovascularization induced by growth factors and human tumor cells. *Blood*, 107 (1), 317-327.

## **5. CHAPITRE 5 : LES ANNEXES**

## 5.1 Annexe 1

*Three-Dimensional Culture Assay to Explore Cancer Cell Invasiveness and Satellite Tumor Formation* is <http://www.jove.com/video/54322>.

## 5.2 Annexe 2

**Tableau 2 :** Liste des produits et matériels utilisés.

<b>Produit</b>	<b>Compagnie</b>	<b># Catalogue</b>
DMEM	Sigma-aldrich	D5648
FBS	Sigma-aldrich	F6178
RPMI 1640	Gibco	11875119
Hepes	Sigma-aldrich	H4034
Opti-MEM	Fisher Scientific	31985070
L- glutamine	Sigma-aldrich	G3126
Pénicilline/Streptomycine	Sigma-aldrich	P4333
Pétri de 100 mm	Fisher Scientific	12556002
Pétri de 150 mm	Fisher Scientific	12556003
Formaldéhyde	Sigma-Aldrich	F8775
Glycine	Sigma-Aldrich	G8898
NaCl	Sigma-Aldrich	S7653
Tris	Fisher Scientific	BP152-1
HCl	J.T.Baker	9535-02-01
EDTA	Sigma-Aldrich	E4884
Triton X-100	ICN Biomedicals Inc.	807426
Sonicateur Sonic Dismembrator	Fisher Scientific	Modèle 60
Sonde 1/8	Fisher Scientific	15338253
Tube 15 mL (Falcon®)	STEMCELL technologies	38009
Tube 50 mL (Falcon®)	STEMCELL technologies	38010
Plaque 6 puits (Falcon®)	STEMCELL technologies	38016
Plaque 24 puits (Costar®)	STEMCELL technologies	38017
Pipette 5 mL (Falcon®)	STEMCELL technologies	38003
Pipette 10 mL (Falcon®)	STEMCELL technologies	38004
Pipette 25 mL (Falcon®)	STEMCELL technologies	38005
DMSO	Finnzymes	F-515
BSA	New England Biolabs	B9001S
Glycérol	Fisher Scientific	BP229-4
Seringues	Sigma-Aldrich	G8917
DNAzol	Invitrogen	10503-027
NaOH	Fisher Scientific	S318-1
Bisulfite de sodium	Zymo Research	D5001-1
Acétate de sodium	Matlab	Sr-0190
PEI	Polysciences	23966-2
Puromycine	VWR	CA80503-312
SDS	Fisher Scientific	BP166-500
Bleu de bromophénol	Alfa Aesar	115-39-9
β-mercaptoéthanol	Sigma-Aldrich	M7522

Plaque blanche 96 puits	BD Biosciences	353296
Bradford	BIO-RAD	500-0114
Membrane de nitrocellulose	Life Sciences	P/N 66485
Solution d'ECL	GE Healthcare	W398390
Tampon de lyse passif	Promega	E1941
Solution de luciférase et de renilla	Promega	E1910
MTT	Sigma	11 465 007 001
EnzChek® Caspase-3 Assay Kit #1	Fisher Scientific	E-13183 E
Sulforhodamine B	Sigma-Aldrich	S1402

❖ Voir l'article pour les éléments manquants.