

Un modèle alternatif de progression tumorale

Stéphane Ansieau^{1,2,3} et Alain Puisieux^{1,2,3}

¹ Inserm UMR-S1052, Centre de Recherche en Cancérologie, 69008 Lyon, France

² CNRS UMR5286, Centre de Recherche en Cancérologie, 69008 Lyon, France

³ UNIV UMR1052, Centre de Recherche en Cancérologie, 69008 Lyon, France

Auteur correspondant : Stéphane Ansieau, ansieau@lyon.fnclcc.fr

Reçu le 30 septembre 2010

Résumé – Le développement d'une tumeur est généralement décrit comme la résultante de vagues successives d'altérations, génétiques ou épigénétiques, et de sélections darwiniennes permettant l'émergence progressive de cellules dotées d'avantages prolifératifs et de survie. Selon ce modèle de progression tumorale, l'acquisition de propriétés métastatiques est perçue comme une étape tardive induite en réponse à la détérioration des conditions environnementales dans la tumeur, en particulier le manque d'oxygène ou de nutriments. L'étude des conséquences, liées à la réactivation de programmes embryonnaires nous amène, dans certains types de cancers, à remettre en question la linéarité de ce modèle en montrant que la dissémination de cellules précancéreuses ou cancéreuses peut être initiée dès la conversion de lésions d'un stade pré-malin au stade malin. Nous proposons de revenir sur les principales étapes nous ayant conduits à de telles conclusions et de discuter quelles pourraient en être les conséquences.

Mots clés : Progression tumorale / métastases / transition épithélio-mésenchymateuse / protéines Twist

Abstract – An alternate model of tumoral progression.

Tumor development is usually described as the result of successive waves of genetic and epigenetic changes and of Darwinian selections that allow the progressive emergence of cells with proliferation and survival advantages. According to this model of tumoral progression, the acquisition of metastatic properties is perceived as a late stage-induced response to environmentally damaging conditions in the tumor, in particular oxygen and nutrient lack. Analyzing the consequences linked to the reactivation of embryonic programmes leads, for some cancer types, to question the linearity of this model, by showing that the dissemination of cancerous or precancerous cells may begin as early as the lesions convert from a premalignant to a malignant state. We propose to review the main findings that brought about these conclusions and to discuss what consequences they might have.

Key words: Tumoral progression / metastases / epithelio-mesenchymal transition / Twist proteins

La régulation de la prolifération cellulaire est la résultante de l'équilibre d'un grand nombre de voies de signalisation qui convergent en général vers des régulateurs clés du cycle cellulaire. L'activation constitutive de certaines de ces voies de signalisation contribue à accorder aux cellules cancéreuses un avantage prolifératif. Pour autant et de manière contre-intuitive, l'expression constitutive d'une protéine mitogénique dans une cellule normale ne lui confère aucun avantage prolifératif, déclenchant à l'inverse

soit la mort des cellules par apoptose, soit un arrêt définitif de la prolifération lié à un vieillissement prématuré des cellules (notion de sénescence) (Evan *et al.*, 1992; Serrano *et al.*, 1997). Ces mécanismes de sauvegarde constituent donc des obstacles importants à la transformation cellulaire. Ces cinq dernières années, un ensemble de travaux a clairement démontré que ces mécanismes sont effectivement induits dans les lésions pré-néoplasiques et constituent des barrières naturelles à l'émergence de cellules

à potentiel hyperprolifératif (Bartkova *et al.*, 2005, 2006; Braig *et al.*, 2005; Collado *et al.*, 2005). Les voies de signalisation de ces mécanismes de sauvegarde sont connues et impliquent les deux régulateurs majeurs que sont les protéines onco-suppressives p53 et Rb. L'inhibition de ces voies joue un rôle prépondérant dans la progression du stade bénin au stade malin, donnant une explication rationnelle aux coopérations observées entre des versions activées de protéines mitogéniques telle H-Ras^{G12V} et la perte de p53 dans la transformation de cellules *in vitro*. Le gène *TP53* est altéré dans 50 % des cancers humains, un pourcentage accru par l'existence de multiples processus d'inactivation dans les cancers restants, soulignant le rôle clé de ce gène dans les mécanismes de sauvegarde (pour une revue récente voir Juntila & Evan, 2009). Ces mécanismes peuvent être variés, affectant par exemple la stabilisation de la protéine (inactivation du locus *INK4A-ARF*), favorisant sa dégradation (amplification du gène *MDM2*), ou altérant l'activation de ses gènes cibles (en favorisant l'expression de certaines formes alternatives tronquées de p53 ou d'autres membres de la famille p63/p73 capables de moduler l'expression de p53). Notons par ailleurs l'existence de différentes altérations du gène *TP53* conduisant soit à la délétion complète des deux allèles du gène ou à l'expression de protéines mutées, les conséquences différant parce que l'effet de ces mutations est sans doute plus complexe qu'imaginé, associées tant à la perte qu'à un gain de fonctions (Brosh & Rotter, 2009).

Le facteur de transcription embryonnaire Twist1 a été, à l'origine, identifié par le groupe de Weinberg comme une protéine dotée de propriétés pro-métastatiques de par sa capacité à induire une transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) (Yang *et al.*, 2004). Nous avons récemment démontré que les propriétés oncogéniques des protéines Twist résident également dans leur capacité à inhiber l'induction des mécanismes de sauvegarde en réponse à une activation mitogénique (Ansieau *et al.*, 2008b). Ces données mettent en exergue une dualité de fonctions de ces protéines dans les phases précoces et tardives de la progression tumorale, propriété vraisemblablement partagée par différents inducteurs d'EMT embryonnaires fréquemment réactivés dans les cancers humains.

Les protéines Twist sont dotées de propriétés pro-métastatiques

La délétion du gène ancestral *TWIST* (le gène *Twi*), chez la Drosophile, altère la mise en place du mésoderme au cours de la gastrulation et se traduit par une absence complète de viscères (Thisse *et al.*, 1987). Cette altération constitue la démonstration la

plus significative de l'importance des protéines Twist dans l'induction de l'EMT. L'EMT est un mécanisme de transdifférentiation permettant, à partir de cellules épithéliales polarisées et jointives, d'engendrer des cellules mésenchymateuses individualisées et motiles (Thiéry *et al.*, 2009). Outre la formation du mésoderme au cours de la gastrulation, l'EMT est impliquée pendant le développement embryonnaire dans la mise en place de différentes structures (crête neurale, valves cardiaques), ou l'occurrence de certains phénomènes (fusion du palais). L'analyse des mécanismes de régulation de ce processus embryonnaire a fait l'objet de multiples études, qui ont mis en évidence un réseau complexe de voies de signalisation convergeant vers un nombre restreint de facteurs de transcription, dont les protéines Twist (Peinado *et al.*, 2007). Ces différents facteurs permettent d'inhiber l'expression de protéines épithéliales impliquées dans les jonctions intercellulaires, comme l'E-Cadhérine et la polarisation des cellules, mais également dans l'induction d'un certain nombre de marqueurs mésenchymateux, comme la N-Cadhérine et la Vimentine. Bien que leur étude fonctionnelle soit complexe, en particulier en raison de leur capacité à s'inter-réguler, certains de ces facteurs semblent davantage initier la transition en inhibant ces marqueurs épithéliaux, tandis que d'autres interviendraient ultérieurement en favorisant la réorganisation du cytosquelette.

La comparaison du pouvoir tumorigène et métastatique de lignées mammaires murines isogéniques (dérivées d'une même tumeur et dotées d'un même fonds génétique) avait permis, à l'origine, de démontrer que l'expression aberrante de la protéine Twist1 était associée à l'acquisition de propriétés invasives, grâce à sa capacité à induire une EMT (Yang *et al.*, 2004). Cette observation suggérait que la réactivation du gène embryonnaire, dans les cancers du sein, constitue un facteur de risque important de développement des métastases, et que cette propriété résulte du détournement de ses fonctions embryonnaires. De même, d'autres inducteurs embryonnaires de l'EMT, telles les protéines en doigt de zinc de la famille Snail, les protéines FoxC2 et Zeb, ont depuis été associés à la dissémination métastatique et au problème des récives (Peinado *et al.*, 2007). L'ensemble de ces observations suggérait que la réactivation de ces programmes embryonnaires n'ait, pour conséquence, que de promouvoir la dissémination des cellules cancéreuses au cours des phases tardives de la progression tumorale.

Les protéines Twist sont dotées de propriétés oncogéniques

La recherche des mécanismes d'inactivation de la protéine p53, dans le cadre des neuroblastomes, est

à l'origine de nos travaux sur les protéines Twist. Ces tumeurs pédiatriques se résorbent spontanément, ou à l'inverse évoluent rapidement conduisant malheureusement trop souvent à la mort de l'enfant. Bien qu'ayant un taux de mutation de p53 très faible (<5 %), les formes agressives de neuroblastomes présentent invariablement une amplification du gène *N-MYC*, une protéine dotée de propriétés promitogéniques et pro-apoptotiques (Evan *et al.*, 1992; Hermeking & Eick, 1994). La prolifération et la survie de ces cellules suggèrent implicitement l'existence d'un mécanisme d'inactivation de la protéine p53. L'analyse comparée des profils d'expression génique de tumeurs de bon (absence d'amplification du gène *N-MYC*) et de mauvais pronostic nous avait permis d'identifier, parmi les gènes différemment exprimés, le gène embryonnaire *TWIST1* (Valesia-Wittmann *et al.*, 2004). Ce gène constituait un candidat privilégié du fait de son expression dans les crêtes neurales d'où ces tumeurs dérivent mais également de ses propriétés anti-apoptotiques, préalablement identifiées sur la base d'un criblage fonctionnel (Maestro *et al.*, 1999). Nos travaux ont non seulement permis de démontrer que l'inhibition de l'expression de Twist1, par ARN-interférence, est suffisante pour induire la mort de cellules de neuroblastome par apoptose, mais aussi de confirmer l'existence d'une coopération oncogénique entre protéines Twist1 et N-Myc dans la transformation cellulaire (Valesia-Wittmann *et al.*, 2004). Les propriétés anti-apoptotiques de Twist1 résident dans sa capacité à altérer l'induction du gène *ARF* par la protéine N-Myc et d'empêcher, par ce biais, la stabilisation résultante de la protéine p53 mais également d'altérer la capacité de la protéine p53 à induire l'expression de gènes cibles, en particulier l'inhibiteur de kinases dépendantes de cyclines p21^{CIP1/WAF1} (Valesia-Wittmann *et al.*, 2004). L'ensemble de ces résultats nous a ainsi permis de défendre le concept selon lequel la réactivation du gène embryonnaire *TWIST1* constitue à la fois le mécanisme d'inactivation récurrent de la protéine p53 dans les neuroblastomes, et le facteur de survie essentiel au développement de ce type de tumeurs.

Les gènes *TWIST1* et *TWIST2* se sont avérés depuis être fréquemment réactivés dans une grande variété de tumeurs humaines, incluant divers types de carcinomes (sein, rein, colon, oesophage) mais également des sarcomes, des mélanomes et d'autres tumeurs cérébrales comme les gliomes (Ansieau *et al.*, 2010). La poursuite de l'étude des propriétés oncogéniques de ces facteurs de transcription nous a permis de révéler qu'au-delà de leurs propriétés anti-apoptotiques, ces protéines sont capables d'inhiber la sénescence en réponse à différentes oncoprotéines mitogéniques et de coopérer avec ces dernières dans la transformation cellulaire (Ansieau *et al.*, 2008b).

L'analyse des mécanismes moléculaires sous-jacents montre que les protéines Twist fonctionnent comme des répresseurs transcriptionnels de multiples inhibiteurs de cyclines kinases, incluant p21^{CIP1/WAF1} ainsi que les protéines p16^{INK4A} et p15^{INK4B} (Ansieau *et al.*, 2008b et B. Gras, résultats non publiés).

En raison de leur capacité à inhiber les mécanismes de sauvegarde cellulaire, les protéines Twist sont *a priori* susceptibles de favoriser la transition maligne. L'analyse de l'expression de la protéine Twist1 (nous ne bénéficions malheureusement d'aucun anticorps dirigé contre la protéine Twist2) dans le modèle du mélanome confirme l'absence d'expression dans les grains de beauté ou nævi (forme bénigne) et sa détection dans un pourcentage élevé de mélanomes (forme maligne), expression inversement corrélée avec celle de marqueurs de sénescence (Ansieau *et al.*, 2008a). Ces données renforcent l'hypothèse selon laquelle la protéine Twist1 inhiberait la sénescence induite en réponse à une activation oncogénique, telles celles des protéines B-Raf ou N-Ras dans le modèle du mélanome. L'étude par immuno-histochimie de l'expression du facteur de transcription dans d'autres modèles de progression tumorale est en cours. Des premiers résultats indiquent que la protéine est exprimée de manière homogène dans des carcinomes mammaires à des stades non invasifs (tels les carcinomes ductaux *in situ*), renforçant l'hypothèse d'un rôle plus large qu'un simple effet sur la dissémination métastatique (Morel *et al.*, en préparation).

L'implication d'inducteurs embryonnaires dans le développement de tumeurs primaires n'est pas restreinte aux protéines Twist. Ainsi, les facteurs de transcription Zeb sont récemment apparus comme susceptibles d'abolir l'induction de la sénescence, en réponse à l'activation du récepteur de l'EGF dans les cellules épithéliales de l'oesophage. De nouveau, cette inhibition résulte de l'altération de l'induction d'inhibiteurs des kinases dépendantes des cyclines, en l'occurrence des protéines p16^{INK4A} et p15^{INK4B} (Ohashi *et al.*, 2010).

Dissémination précoce de cellules cancéreuses

En opérant des tests de coopération oncogénique dans les cellules épithéliales mammaires, nos résultats ont permis de démontrer que ces protéines étaient non seulement capables d'inhiber la sénescence induite en réponse à des activations mitogéniques, mais également de coopérer avec ces dernières pour induire une EMT complète et conférer aux cellules des propriétés invasives (Ansieau *et al.*, 2008a). La concomitance de ces deux événements suppose évidemment que l'échappement associé à la réactivation de

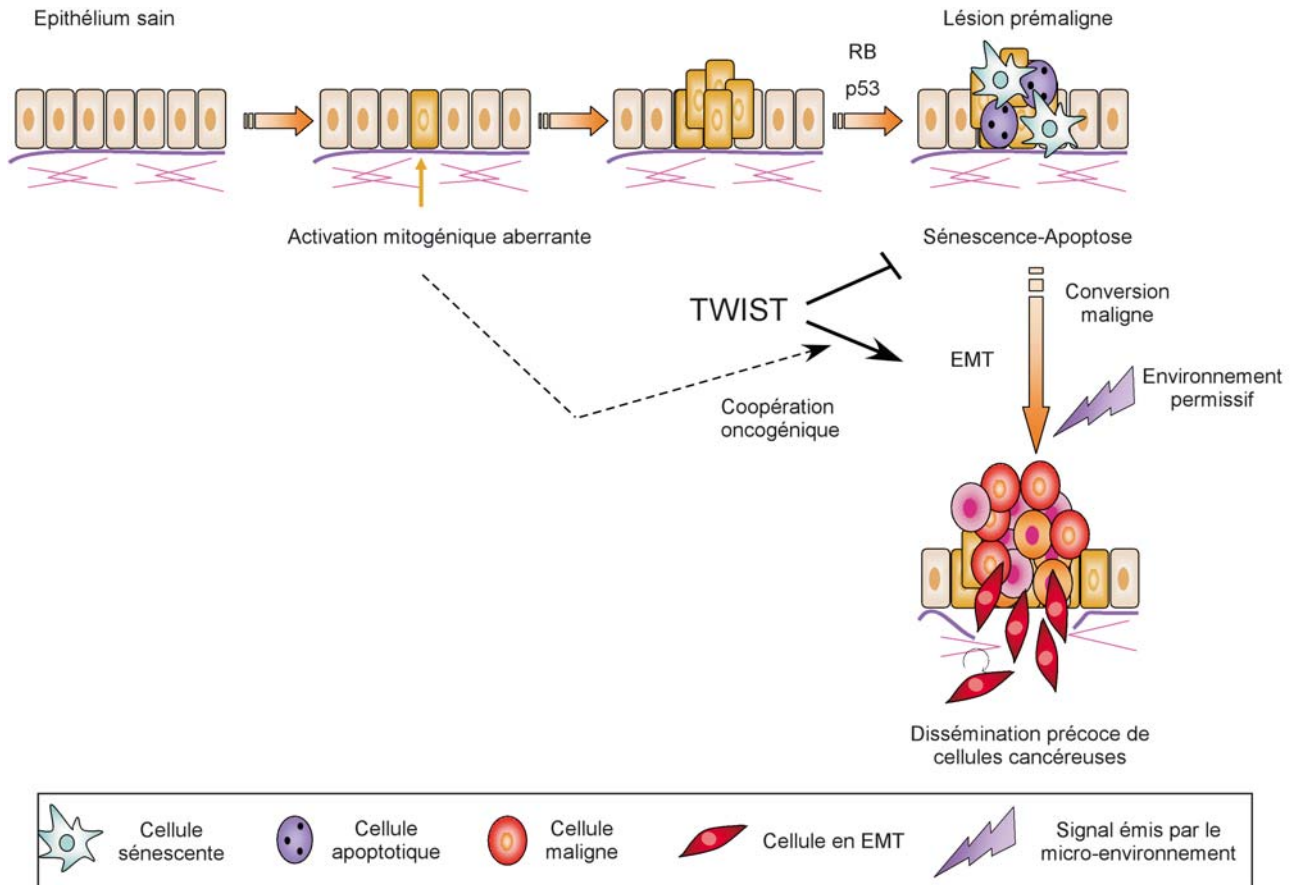


Fig. 1. La réactivation aberrante des gènes embryonnaires permet d'inhiber l'induction des mécanismes de sauvegarde en réponse à une activation mitogénique constitutive et de promouvoir la transition du stade pré-malin au stade malin. Dans des conditions environnementales permissives, Twist et protéines mitogéniques coopèrent dans l'induction d'une transition épithélio-mésenchymateuse (EMT), favorisant la dissémination précoce de cellules cancéreuses.

gènes embryonnaires puisse s'accompagner d'une dissémination précoce de cellules précancéreuses ou cancéreuses (voir figure 1). La caractérisation, dans la moelle osseuse de patientes atteintes de cancers du sein, de cellules épithéliales présentant très peu d'anomalies chromosomiques suggère effectivement que certaines cellules se soient disséminées précocement, avant même que la crise télomérique n'ait eu lieu (Schardt *et al.*, 2005). Sur la base d'un modèle de progression tumorale mammaire murin, le laboratoire de Klein a récemment et de manière très élégante démontré que la dissémination de cellules est effectivement initiée dès le stade d'hyperplasie atypique coïncidant avec la réactivation du gène *Twist1* (Husemann *et al.*, 2008). L'ensemble de ces résultats suggère, tout au moins dans certains modèles tumoraux (données limitées à ce jour aux cancers du sein et de l'œsophage), que la dissémination métastatique puisse s'opérer bien plus précocement qu'initialement supposé (Ansieau *et al.*, 2008b; Klein, 2008). En ce

sens, la dissémination métastatique ne peut plus être perçue comme l'étape ultime de la sélection darwinienne opérant dans les tumeurs.

Conclusions et perspectives

Au-delà de leur intérêt fondamental, ces observations pourraient avoir des retombées importantes en termes de thérapeutique. L'échappement précoce de cellules précancéreuses suggère qu'elles puissent évoluer indépendamment de la tumeur primaire, présenter un historique moléculaire distinct et une susceptibilité différente aux traitements thérapeutiques. Ainsi, dans le cas du cancer de l'œsophage, à l'inverse de la tumeur primaire, les cellules disséminées sont addictives à la protéine mitogénique *ErbB2*. Les patients atteints de cancers de l'œsophage, présentant une dissémination précoce de cellules cancéreuses avec une addiction à *ErbB2*, pourraient ainsi tirer bénéfice de traitements

adjuvants avec de la trastuzumab, un inhibiteur de cette tyrosine-kinase communément utilisée dans les traitements des cancers du sein (Stoecklein *et al.*, 2008).

En plus d'avoir mis en exergue la dissémination métastatique, nos travaux, comme ceux des laboratoires de Weinberg et de Raman, ont récemment démontré que l'EMT est également associée à l'acquisition d'un certain nombre de propriétés de cellules souches, en particulier d'auto-renouvellement, propriété indispensable à la colonisation de sites à distance (Morel *et al.*, 2008; Mani *et al.*, 2008; Vesuna *et al.*, 2009). Cette plasticité conférée par l'EMT pourrait également prendre directement part à la transformation cellulaire, une possibilité que nous évaluons actuellement.

L'EMT donne par ailleurs aux cellules une résistance accrue aux drogues génotoxiques et cytotoxiques, l'associant de fait au problème des récives. Les traitements chimiothérapeutiques conduisent malheureusement le plus souvent à la sélection de sous-populations de cellules circulantes exprimant ces facteurs embryonnaires et des marqueurs d'EMT (Creighton *et al.*, 2009). L'éradication de ces cellules à haut risque constitue évidemment un enjeu médical majeur pour les années à venir. Différentes approches sont actuellement développées. Des criblages de drogues permettant de cibler spécifiquement ces cellules ont pu dégager l'importance des canaux potassiques dans leur survie, ouvrant une première brèche (Gupta *et al.*, 2009). La capacité de ces cellules à s'engager dans divers programmes de différenciation pourrait apporter des alternatives intéressantes (Battula *et al.*, 2010). D'autres approches visant à inhiber cette fois l'expression de miRNA capables de réguler l'expression de plusieurs inducteurs d'EMT devraient bientôt voir le jour (Wang *et al.*, 2010). Ces différents axes de recherche devraient permettre dans un avenir proche d'élaborer de nouveaux outils pour s'affranchir des problèmes de dissémination métastatique et de récive.

Références

- Ansieau S., Bastid J., Doreau A., Morel A.P., Bouchet B.P., Thomas C., Fauvet F., Puisieux I., Doglioni C., Piccinin S., Maestro R., Voeltzel T., Selmi A., Valsesia-Wittmann S., Caron de F.C., Puisieux A., Induction of EMT by twist proteins as a collateral effect of tumor-promoting inactivation of premature senescence. *Cancer Cell*, 2008a, 14, 79–89.
- Ansieau S., Hinkal G., Thomas C., Bastid J., Puisieux A., Early origin of cancer metastases: dissemination and evolution of premalignant cells. *Cell Cycle*, 2008b, 7, 3659–3663.
- Ansieau S., Morel A.P., Hinkal G., Bastid J., Puisieux A., TWISTing an embryonic transcription factor into an oncoprotein. *Oncogene*, 2010, 29, 3173–3184.
- Bartkova J., Horejsi Z., Koed K., Kramer A., Tort F., Zieger K., Guldborg P., Sehested M., Nesland J.M., Lukas C., Orntoft T., Lukas J., Bartek J., DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature*, 2005, 434, 864–870.
- Bartkova J., Rezaei N., Lontos M., Karakaidos P., Kletsas D., Issaeva N., Vassiliou L.V., Kolettas E., Niforou K., Zoumpourlis V.C., Takaoka M., Nakagawa H., Tort F., Fugger K., Johansson F., Sehested M., Andersen C.L., Dyrskjot L., Orntoft T., Lukas J., Kittas C., Helleday T., Halazonetis T.D., Bartek J., Gorgoulis V.G., Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature*, 2006, 444, 633–637.
- Battula V.L., Evans K.W., Hollier B.G., Shi Y., Marini F.C., Ayyanan A., Wang R.Y., Brisken C., Guerra R., Andreeff M., Mani S.A., Epithelial-mesenchymal transition-derived cells exhibit multilineage differentiation potential similar to mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 2010, 28, 1435–1445.
- Braig M., Lee S., Loddenkemper C., Rudolph C., Peters A.H., Schlegelberger B., Stein H., Dorken B., Jenuwein T., Schmitt C.A., Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development. *Nature*, 2005, 436, 660–665.
- Brosh R., Rotter V., When mutants gain new powers: news from the mutant p53 field. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9, 701–713.
- Collado M., Gil J., Efeyan A., Guerra C., Schumacher A.J., Barradas M., Benguria A., Zaballos A., Flores J.M., Barbacid M., Beach D., Serrano M., Tumour biology: senescence in premalignant tumours. *Nature*, 2005, 436, 642.
- Creighton C.J., Li X., Landis M., Dixon J.M., Neumeister V.M., Sjolund A., Rimm D.L., Wong H., Rodriguez A., Herschkowitz J.I., Fan C., Zhang X., He X., Pavlick A., Gutierrez M.C., Renshaw L., Larionov A.A., Faratian D., Hilsenbeck S.G., Perou C.M., Lewis M.T., Rosen J.M., Chang J.C., Residual breast cancers after conventional therapy display mesenchymal as well as tumor-initiating features. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106, 13820–13825.
- Evan G.I., Wyllie A.H., Gilbert C.S., Littlewood T.D., Land H., Brooks M., Waters C.M., Penn L.Z., Hancock D.C., Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell*, 1992, 69, 119–128.
- Gupta P.B., Onder T.T., Jiang G., Tao K., Kuperwasser C., Weinberg R.A., Lander E.S., Identification of selective inhibitors of cancer stem cells by high-throughput screening. *Cell*, 2009, 138, 645–659.
- Hermeking H., Eick D., Mediation of c-Myc-induced apoptosis by p53. *Science*, 1994, 265, 2091–2093.
- Husemann Y., Geigl J.B., Schubert F., Musiani P., Meyer M., Burghart E., Forni G., Eils R., Fehm T.,

- Riethmuller G., Klein C.A., Systemic spread is an early step in breast cancer. *Cancer Cell*, 2008, 13, 58–68.
- Junttila M.R., Evan G.I., p53—a Jack of all trades but master of none. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9, 821–829.
- Klein C.A., Cancer. The metastasis cascade. *Science*, 2008, 321, 1785–1787.
- Maestro R., Dei Tos A.P., Hamamori Y., Krasnokutsky S., Sartorelli V., Kedes L., Doglioni C., Beach D.H., Hannon G.J., Twist is a potential oncogene that inhibits apoptosis. *Genes Dev*, 1999, 13, 2207–2217.
- Mani S.A., Guo W., Liao M.J., Eaton E.N., Ayyanan A., Zhou A.Y., Brooks M., Reinhard F., Zhang C.C., Shipitsin M., Campbell L.L., Polyak K., Briskin C., Yang J., Weinberg R.A., The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*, 2008, 133, 704–715.
- Morel A.P., Lièvre M., Thomas C., Hinkal G., Ansieau S., Puisieux A., Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition. *PLoS One*, 2008, 3, e2888.
- Ohashi S., Natsuzaka M., Wong G.S., Michaylira C.Z., Grugan K.D., Stairs D.B., Kalabis J., Vega M.E., Kalman R.A., Nakagawa M., Klein-Szanto A.J., Herlyn M., Diehl J.A., Rustgi A.K., Nakagawa H., Epidermal growth factor receptor and mutant p53 expand an esophageal cellular subpopulation capable of epithelial-to-mesenchymal transition through ZEB transcription factors. *Cancer Res*, 2010, 70, 4174–4184.
- Peinado H., Olmeda D., Cano A., Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer*, 2008, 7, 415–428.
- Schardt J.A., Meyer M., Hartmann C.H., Schubert F., Schmidt-Kittler O., Fuhrmann C., Polzer B., Petronio M., Eils R., Klein C.A., Genomic analysis of single cytokeratin-positive cells from bone marrow reveals early mutational events in breast cancer. *Cancer Cell*, 2005, 8, 227–239.
- Serrano M., Lin A.W., McCurrach M.E., Beach D., Lowe S.W., Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell*, 1997, 88, 593–602.
- Stoecklein N.H., Hosch S.B., Bezler M., Stern F., Hartmann C.H., Vay C., Siegmund A., Scheunemann P., Schurr P., Knoefel W.T., Verde P.E., Reichelt U., Erbersdobler A., Grau R., Ullrich A., Izbicki J.R., Klein C.A., Direct genetic analysis of single disseminated cancer cells for prediction of outcome and therapy selection in esophageal cancer. *Cancer Cell*, 2008, 13, 441–453.
- Thiéry J.P., Acloque H., Huang R.Y., Nieto M.A., Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*, 2009, 139, 871–890.
- Thisse B., el Messal M., Perrin-Schmitt F., The twist gene: isolation of a *Drosophila* zygotic gene necessary for the establishment of dorsoventral pattern. *Nucleic Acids Res*, 1987, 15, 3439–3453.
- Valsesia-Wittmann S., Magdeleine M., Dupasquier S., Garin E., Jallas A.C., Combaret V., Krause A., Leissner P., Puisieux A., Oncogenic cooperation between H-Twist and N-Myc overrides failsafe programs in cancer cells. *Cancer Cell*, 2004, 6, 625–630.
- Vesuna F., Lisok A., Kimble B., Raman V., Twist modulates breast cancer stem cells by transcriptional regulation of CD24 expression. *Neoplasia*, 2009, 11, 1318–1328.
- Wang Z., Li Y., Ahmad A., Azmi A.S., Kong D., Banerjee S., Sarkar F.H., Targeting miRNAs involved in cancer stem cell and EMT regulation: An emerging concept in overcoming drug resistance. *Drug Resist Update*, 2010, In press.
- Yang J., Mani S.A., Donaher J.L., Ramaswamy S., Itzykson R.A., Come C., Savagner P., Gitelman I., Richardson A., Weinberg R.A., Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell*, 2004, 117, 927–939.