

Sommaire

REMERCIEMENTS	2
RESUME.....	4
ABSTRACT.....	5
SOMMAIRE	6
LISTE DES FIGURES	8
LISTE DES ABBREVIATIONS.....	9
AVANT-PROPOS	11
 INTRODUCTION.....	 13
I PROGRESSION TUMORALE	13
<i>I.1 Données générales sur les cancers.....</i>	<i>13</i>
<i>I.2 Dissémination métastatique</i>	<i>15</i>
I.2.1 Intravasation	17
I.2.2 Survie dans la circulation sanguine.....	18
I.2.3 Extravasation	19
I.2.4 Colonisation métastatique	20
 II ANGIOGENESE: ETAPE CLEF DANS LA PROGRESSION TUMORALE.....	22
<i>II.1 Définition de l'angiogenèse</i>	<i>22</i>
<i>II.2 Angiogenèse tumorale.....</i>	<i>23</i>
II.2.1 « Switch » angiogénique	23
II.2.1.1 Activation de facteurs pro-angiogéniques	24
II.2.1.2 Inhibition de facteurs anti-angiogéniques.....	25
II.2.2 Mécanismes de formation des vaisseaux sanguins tumoraux	26
II.2.2.1 Bourgeonnement (sprouting)	26
II.2.2.2 Vasculogenèse (vasculogenesis).....	27
II.2.2.3 Cooptation.....	27
II.2.2.4 Invagination (intussusception)	27
II.2.2.5 Imitation de la vasculogenèse (vasculogenic mimicry)	28
II.2.2.6 Différenciation des cellules souches tumorales en CE.....	28
II.2.3 Description des vaisseaux tumoraux	28
<i>II.3 Thérapie anti-angiogénique</i>	<i>30</i>
II.3.1 Angiogenèse tumorale : une cible thérapeutique	30
II.3.2 Développement clinique de la thérapie anti-angiogénique	32
II.3.3 Défis de la thérapie anti-angiogénique	37
II.3.3.1 Résistance aux traitements anti-angiogéniques	38
II.3.3.2 Accélération de l'invasion et de la formation de métastases	42

III LA THROMBOSPONDINE 1	44
<i>III.1 Description et structure de la TSP1</i>	<i>44</i>
<i>III.2 Partenaires de la TSP1</i>	<i>47</i>
III.2.1 Ligands de la TSP1.....	47
III.2.2 Récepteurs de la TSP1.....	50
III.2.2.1 Intégrines et IAP/CD47.....	51
III.2.2.2 CD36 et récepteurs non-intégrines.....	51
III.3 REGULATION DE LA TSP1	52
III.3.1 Mutations génétiques.....	53
III.3.2 Contrôle épigénétique.....	53
III.3.3 Facteurs environnementaux et chimiokines.....	54
III.4 FONCTIONS DE LA TSP1.....	55
III.4.1 TSP1, UNE PROTEINE ANTI-TUMORALE	56
III.4.2 TSP1, UNE PROTEINE PRO-TUMORALE	60
 OBJECTIFS DE LA THESE	 64
 ARTICLE N°1 : ROLE DE LA TSP1 DANS LA PROGRESSION TUMORALE PROSTATIQUE.	 66
INTRODUCTION	67
PRINCIPALES OBSERVATIONS.....	90
DISCUSSION	90
 ARTICLE N°2 : ROLE DE LA TSP1 DANS LA PROGRESSION TUMORALE MAMMAIRE.....	 92
INTRODUCTION	93
PRINCIPALES OBSERVATIONS.....	110
DISCUSSION	110
 DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION	 111
RÉFÉRENCES.....	120

Liste des figures

<i>Figure 1: Principales caractéristiques de la cellule cancéreuse.....</i>	<i>14</i>
<i>Figure 2: Cascade métastatique.....</i>	<i>16</i>
<i>Figure 3: Présentation de la vasculogenèse et de l'angiogenèse.....</i>	<i>22</i>
<i>Figure 4: Switch angiogénique.....</i>	<i>24</i>
<i>Figure 5 : Différents mécanismes de recrutement des vaisseaux sanguins tumoraux</i>	<i>26</i>
<i>Figure 6 : Structure des vaisseaux sanguins tumoraux.....</i>	<i>29</i>
<i>Figure 7 : Augmentation de la pression interstitielle intratumorale</i>	<i>30</i>
<i>Figure 8 : Différents inhibiteurs pharmacologiques de l'angiogenèse développés en clinique</i>	<i>33</i>
<i>Figure 9 : Normalisation vasculaire en réponse à la thérapie anti-angiogénique</i>	<i>34</i>
<i>Figure 10 : Effets cliniques des thérapies anti-angiogéniques approuvées par la FDA</i>	<i>35</i>
<i>Figure 11 : Modalités de résistance aux traitements anti-angiogéniques</i>	<i>38</i>
<i>Figure 12 : Modifications phénotypiques obtenues par radiographie de la progression tumorale cérébrale chez un patient traité au Bevacizumab</i>	<i>41</i>
<i>Figure 13: Diagramme des différents domaines de la famille des thrombospondines.....</i>	<i>44</i>
<i>Figure 14: Représentation schématique de la structure moléculaire de la TSP-1 et les fonctions associées.....</i>	<i>46</i>
<i>Figure 15 : Représentation des principales interactions de la TSP1</i>	<i>48</i>
<i>Figure 16 : Modèle d'activation du TGFβ par la TSP1</i>	<i>49</i>
<i>Figure 17: Sites de liaison d'un monomère de la TSP1 avec ses différents récepteurs</i>	<i>50</i>
<i>Figure 18: Développement de peptides dérivés de la TSP1.....</i>	<i>59</i>
<i>Figure 19: Incidence et mortalité estimées des cancers en France métropolitaine chez l'homme en 2011.....</i>	<i>67</i>
<i>Figure 20 : Incidence et mortalité estimées des cancers en France métropolitaine chez la femme en 2011.....</i>	<i>93</i>
<i>Figure 21 : Notre modèle proposé sur les effets de la TSP1.....</i>	<i>119</i>

Liste des Abréviations

aa	acides amines
ADCaP	Carcinomes de la Prostate Androgéno-Dépendants
ADN	Acide Désoxyribonucléique
AGF	Angiogenic Growth Factor
AhR	Aryl Hydrocarbon Receptor
Ang-1	Angiopoeitin 1
ANGPTL4	Angiopoeitin Like 4
ARN	Acide Ribonucléique
α -SMA	Alpha Smooth Muscle Actin
CAIX	Carbonic anhydrase IX
CD36	Cluster of Differentiation 36
CD47	Cluster of Differentiation 47
CE	Cellules Endothéliales
COX-2	Cyclooxygénase-2
CRCaP	Carcinomes de la Prostate Résistants à la Castration
CTC	Cellules Tumorales Circulantes
CX3CL1	Chemokine (C-X3-C motif) ligand 1
CXCR4	C-X-C chemokine receptor type 4
DCIS	Ductal Carcinoma in situ
DLL4	Delta-Like Ligand 4
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EPC	Endothelial Progenitor Cells
EPCAM	Epithelial Cell Adhesion Molecule
FDA	Food and Drug Administration
FGF	Fibroblast Growth Factor
FGFR	Fibroblast Growth Factor Receptor
GBM	Glioblastoma Multiform
HCC	Hepatocellular Carcinoma
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HIF	Hypoxia-Inductible Factor
HRGP	Histidine-Rich Glycoprotein
HSPG	Heparan Sulfate Proteoglycan
IAP	Integrin Associated Protein
ID1,3	Inhibition of Differentiation 1 or 3
IFN- α	Interferon α
IL-4, 6, 8, 12, 18	Interleukine-4, 6, 8, 12 ou 18
KO	Knock-out
LDL	Low Density Lipoprotein
LOH	Loss Of Heterocycosity
LRP	LDL Receptor-Related Protein

MEC	Matrice Extracellulaire
MIF	Macrophage Migration Inhibitory Factor
MMP-1, 2, 9	Métalloprotéinases 1, 2 ou 9
MVD	Microvessel Density
NO	Monoxyde d'Azote
NSLC	Non-Small Cell Lung Carcinoma
OS	Overall Survival
PAF	Platelet-Activating Factor
PAI	Plasminogen Activator Inhibitor
PDAC	Pancreatic Ductal Adenocarcinoma
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PDGFR	Platelet-Derived Growth Factor Receptor
PF4	Platelet Factor 4
PFS	Progression-Free Survival
PIGF	Placenta Growth Factor
PKG	Protein Kinase G
PTEN	Phosphatase and TENsin homolog
RCC	Renal Cell Carcinoma
RR	Response Rate
SCC	Squamous Cell Sarcoma
SDF-1/CXCL-12	Stromal Derived Factor 1
SMAD 4	Mothers Against Decapentaplegic Homolog 4
TAF	Tumor Associated Fibroblast
TGF β	Transforming Growth Factor β
TIMP-1	Metallopeptidase Inhibitor 1
TNF- α	Tumor Necrosis Factor α
TrKB	Tyrosine kinase Receptor B
TRP	Transient Receptor Potential
TSG-6	TNF-stimulated gene 6
TSP	Thrombospondins
TSR	Trombospondin Type 1 Repeat
uPA	Urokinase-type Plasminogen Activator
uPAR	Urokinase-type Plasminogen Activator Receptor
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR 1,2	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1 or 2
VSMC	Vascular Smooth Muscle Cells

Avant-Propos

Une métastase se forme suite à la dissémination d'une cellule tumorale à partir d'un site primaire et à la formation d'une nouvelle tumeur dans un organe distant de celui d'origine. La formation des métastases est la principale cause de décès des patients ayant un cancer. En effet, la prise en charge des patients par des approches chirurgicales, chimiothérapeutiques ou radiothérapeutiques permet d'éliminer de nombreuses tumeurs primaires. Malheureusement, lorsque le cancer est détecté après la formation de métastases, les traitements sont très largement inefficaces (Chambers et al., 2002). Depuis 2004, une nouvelle classe de molécules, les inhibiteurs de l'angiogenèse, a permis une percée thérapeutique pour le traitement des patients atteints de cancers aux stades avancés, dont le cancer colorectal métastatique, le cancer du sein métastatique, le carcinome rénal, le cancer de poumons non à petites cellules, le carcinome hépatocellulaire, le glioblastome multiforme, les cancers gastro-intestinaux ou le cancer médullaire de la thyroïde (De Bock et al., 2011). De larges méta-analyses valident l'efficacité de ces traitements dans l'amélioration de la survie sans progression (PFS) dans nombreux types de cancers (Grothey and Ellis, 2008; Miles et al., 2011). Cependant, cette augmentation ne se traduit pas dans tous les types de cancers par une augmentation significative de la survie globale des patients (Escudier et al., 2010; Miller et al., 2007; Reck et al., 2010). De plus, une interruption ou une discontinuité du traitement ont été associées à la rechute des patients.

Récemment, des études précliniques ont réévalué la cause de cette résistance aux inhibiteurs pharmacologiques de l'angiogenèse (Ebos and Kerbel, 2011; Ebos et al., 2009; Paez-Ribes et al., 2009). De façon intéressante, ils démontrent que l'utilisation de ce type de traitement accélère l'occurrence des métastases *in vivo*. Ces résultats surprenants nous ont conduits à étudier si cet effet est spécifique d'une molécule ou d'une classe de molécule particulière ou s'il est intrinsèque à l'inhibition de l'angiogenèse, et provoqué par l'hypoxie générée. Nous avons également étudié les mécanismes par lesquels un inhibiteur de l'angiogenèse pourrait favoriser la progression tumorale.

Pour ce faire, mon projet de thèse a consisté à réévaluer le rôle d'une molécule anti-angiogénique endogène, la thrombospondine 1 (TSP1), dans la progression tumorale et la dissémination métastatique, dans des modèles précliniques de tumeurs prostatiques et mammaires. Malgré une littérature abondante sur les différentes fonctions de la TSP1, première protéine anti-angiogénique identifiée, son rôle dans la tumorigenèse et plus spécifiquement dans la dissémination métastatique est peu documenté. Notre laboratoire a démontré au cours d'une étude précédente que l'expression de la TSP1 est un facteur de mauvais pronostic chez les patientes atteintes de cancer du sein (Fontana et al., 2005). Il est donc intéressant de pouvoir déterminer l'implication directe de la TSP1 dans l'invasion locale et dans l'occurrence des métastases à distance et d'évaluer le mécanisme par lequel elle induit les effets observés.

Après avoir replacé ce travail dans son contexte bibliographique, en présentant l'état des connaissances actuelles sur la progression tumorale, l'angiogenèse tumorale, les thérapies anti-angiogéniques, les résistances qu'elles induisent, et la thrombospondine 1, nous présenterons les résultats obtenus au cours de la thèse et les perspectives qui en découlent.

Introduction

Les cancers demeurent la première cause de mortalité en France (29,6% des décès en 2004), suivis des maladies de l'appareil circulatoire (27,5%). Les localisations tumorales les plus fréquentes en termes de mortalité chez l'homme sont le poumon, la prostate puis le cancer côlon-rectum. Chez la femme, le cancer du sein demeure la localisation tumorale la plus fréquente, suivie par le côlon-rectum, le poumon et les hémopathies malignes (d'après Le Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire du 7 juin 2011).

I Progression tumorale

I.1 Données générales sur les cancers

La cancérogenèse est un processus multifactoriel et multiphasique. Elle correspond à une cascade d'évènements qui est le résultat d'un caractère évolutif depuis l'exposition aux premiers carcinogènes jusqu'à l'apparition de la tumeur (Hanahan and Weinberg, 2000). Bien qu'il soit toujours difficile de pouvoir préciser de façon exacte les facteurs responsables de l'altération de la cellule normale et sa transformation en cellule tumorale, Douglas Hanahan et Robert Weinberg définissent cette transformation comme étant la résultante de l'acquisition et de l'accumulation de 10 propriétés caractéristiques (Hanahan and Weinberg, 2011) : un maintien des signaux stimulant la prolifération cellulaire, une évvasion aux inhibiteurs de la prolifération, un échappement à la destruction par le système immunitaire, une activation de l'immortalité répllicative, une induction tumorale de l'inflammation, une accumulation d'instabilité et de mutations génomiques, une résistance à l'apoptose, une dérégulation du métabolisme énergétique de la cellule, une induction de l'angiogenèse et une activation de l'invasion et de la formation de métastases (Figure 1).

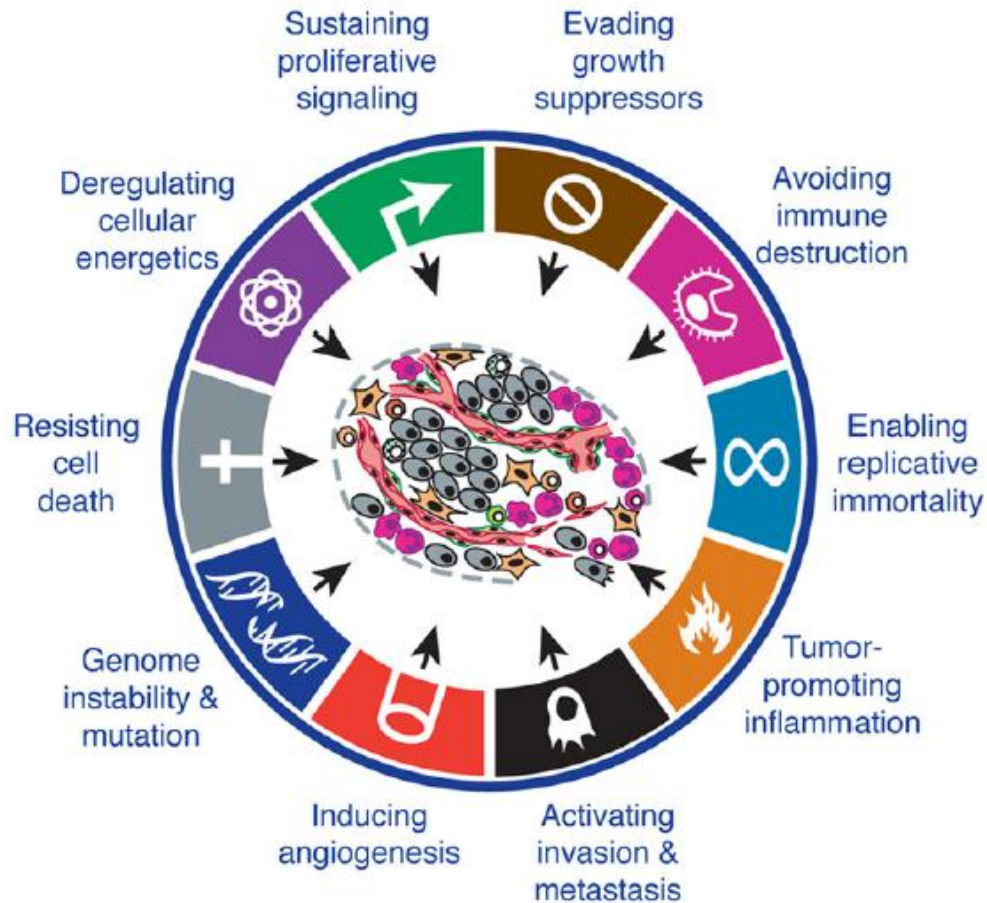


Figure 1: Principales caractéristiques de la cellule cancéreuse (Hanahan and Weinberg, 2000).

Le cancer est donc le résultat d'une accumulation d'altérations génétiques. De plus, à chaque cycle cellulaire une sélection clonale s'impose aux cellules tumorales suite à l'acquisition de compétence particulière, leur permettant ainsi de franchir toutes les barrières de protection de l'organisme pour donner naissance à une tumeur maligne (Evan and Vousden, 2001).

Les modèles expérimentaux ont permis d'établir la cancérogénèse comme un processus à 3 étapes : initiation, promotion et progression (Jakobisiak et al., 2003). L'initiation est déclenchée par des dommages de l'ADN spontanés ou activés par des substances cancérogènes qui, en l'absence de réparation, peuvent produire des mutations génétiques. Occasionnellement, certaines de ces mutations, telles que l'activation de proto-oncogènes

ou l'inhibition de gènes suppresseurs de tumeurs, créent les conditions favorables pour la prolifération cellulaire et l'inhibition de l'apoptose. La deuxième étape correspond à la promotion au cours de laquelle des clones cellulaires sont générés suite à l'acquisition d'une indépendance vis-à-vis des facteurs de croissance. On parle ainsi à ce stade de lésions précancéreuses. Mais ce n'est qu'à la dernière étape, dite de progression, que ces lésions deviennent malignes et correspondent à l'expression clinique du cancer. Cette dernière phase suppose l'acquisition d'anomalies génétiques irréversibles supplémentaires permettant la progression de la tumeur, son invasion et sa dissémination métastatique.

Cependant, la cellule tumorale n'est pas la seule responsable du processus de tumorigenèse, il est aussi largement admis que les cellules stromales et les interactions tumeur-stroma jouent un rôle primordial dans le développement tumoral (van den Hooff, 1988). Ce microenvironnement stromal comprend les cellules épithéliales, les fibroblastes, les myofibroblastes, les cellules endothéliales et les cellules inflammatoires. En effet, des études *in vitro* et *in vivo* montrent que les fibroblastes participent à la formation et à la croissance tumorale (Samoszuk et al., 2005). De façon intéressante, il a été aussi montré qu'une forte réaction stromale pouvait être corrélée avec une mauvaise réponse aux traitements chimiothérapeutiques dans le cancer du sein (Farmer et al., 2009). En revanche, l'infiltration des tumeurs par des macrophages augmente leur sensibilité à ces traitements (Andre et al., 2010). L'ensemble de ces résultats montre l'importance des interactions tumeur-stroma dans la survie et la progression tumorale.

I.2 Dissémination métastatique

La progression tumorale vers la formation de métastases est un processus à plusieurs étapes dans lequel les cellules malignes se propagent à partir de la tumeur d'origine pour coloniser des organes éloignés (Gupta and Massague, 2006). Cependant, malgré la similitude des étapes de base de la dissémination métastatique à partir de différents organes, les métastases émergent à un rythme différent, dépendant du contexte, et sont cliniquement soignées de façon différente. De plus, un autre point important à noter est la capacité de chaque type de tumeur à coloniser un organe ou un groupe de tissus

préférentiels (Fidler, 2003 ; Nguyen et al., 2009). C'est le cas des métastases des cancers de la prostate et du sein qui sont largement confinées dans l'os. Il en est de même pour les métastases du mélanome oculaire qui apparaissent exclusivement au niveau du foie, alors que les cellules du mélanome de la peau migrent préférentiellement vers les poumons, le cerveau, la peau et le foie.

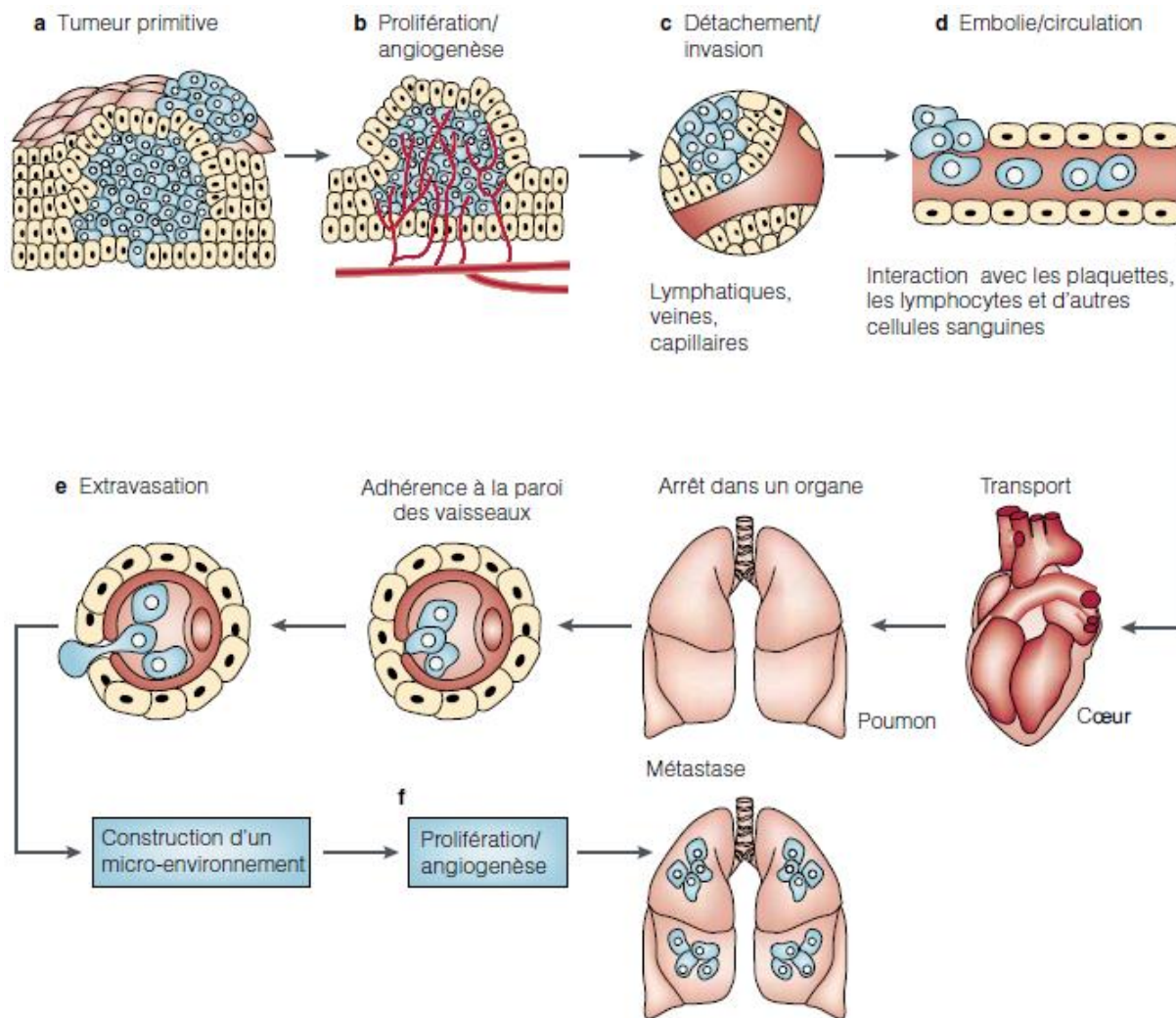


Figure 2: Cascade métastatique. Les différentes étapes se produisant successivement dans la tumeur primaire, dans la circulation et dans l'organe cible. L'angiogenèse est une étape indispensable non seulement à la croissance tumorale, mais également au développement de la métastase (Mejean and Lebret, 2008).

Une autre variable importante est l'évolution temporelle des métastases. En effet, les adénocarcinomes de sein et de poumon métastasent dans des organes similaires, y compris les os, les poumons, le foie et le cerveau. Cependant, leur cinétique de progression métastatique diffère. En effet, la rechute des patients, ayant subi une résection d'une tumeur primaire de poumon non à petites cellules, survient quelques mois après la chirurgie, alors qu'à la suite d'une mastectomie radicale, le cancer du sein peut rester dormant des années, voire des décennies avant de réapparaître (Feld et al., 1984; Karrison et al., 1999). Une simplification du processus métastatique permet d'identifier quatre étapes principales communes à tous les types de cancers : l'intravasation, la survie dans la circulation, l'extravasation et la colonisation (Figure 2).

I.2.1 Intravasation

Pour coloniser les organes à distance, les cellules tumorales doivent passer de leur site primaire vers le sang ou la lymphe. Ce passage nécessite la dégradation de la matrice extracellulaire (MEC) et la migration cellulaire. Cette dégradation est assurée par différentes protéases, notamment le système formé de l'urokinase (uPA), son récepteur (uPAR) et ses inhibiteurs (PAI) (Leupold et al., 2007). Les métalloprotéinases (MMP) et leurs inhibiteurs (TIMP) jouent également un rôle considérable dans la cascade protéolytique et l'invasion locale (Egeblad and Werb, 2002). Suite à l'activation de la MEC, un certain nombre de facteurs tels que le TGF β ou le VEGF sont sécrétés pour permettre le tropisme et le chimiotactisme des cellules tumorales (Finak et al., 2009). En effet, le TGF β augmente l'intravasation des cellules tumorales mammaires à travers la circulation sanguine par augmentation de l'invasion locale et de la migration cellulaire (Ramis-Conde et al., 2009). Ce phénomène de migration nécessite la perte de l'adhésion intercellulaire nécessaire à l'acquisition d'un phénotype motile (Ramis-Conde et al., 2009). La perte de fonction de la E-cadhérine est ainsi par exemple corrélée au potentiel métastatique dans nombreux types de cancers, notamment les cancers colorectaux et mammaires.

L'intravasation a été mise en évidence pour la première fois par des études de transplantation des cellules tumorales dans la membrane chorio-allantoïdienne d'embryon de poulet (Quigley and Armstrong, 1998), puis par des études de microscopie à

fluorescence intravital en suivant des cellules marquées par un fluorochrome (Condeelis and Segall, 2003; Li et al., 2000). Le mécanisme d'intravasation est très fortement influencé par les propriétés structurales et fonctionnelles de l'angiogenèse associées à la tumeur (Carmeliet and Jain, 2011b). Les mécanismes de l'angiogenèse tumorale seront abordés plus en détail dans le second chapitre de ce manuscrit. Cependant il est important de noter que la structure tortueuse et hyperperméable des vaisseaux tumoraux néoformés facilite l'intravasation des cellules tumorales. A l'appui de cette notion, la capacité de la COX-2, l'épiréguline, la MMP-1 et la MMP-2 de promouvoir l'intravasation est liée à leur capacité à stimuler la néoangiogenèse (Gupta et al., 2007). Néanmoins, la pénétration dans la circulation lymphatique est plus simple que dans la circulation sanguine du fait de la discontinuité de la lame basale et de l'absence de péricytes autour des vaisseaux lymphatiques (Wong and Hynes, 2006). Les métastases ganglionnaires représentent généralement un indicateur pronostic précoce de l'invasion tumorale et de la dissémination métastatique dans différents types de carcinomes et de mélanomes (Alitalo et al., 2005). Cependant, d'autres tumeurs malignes telles que les sarcomes, sont connues pour métastaser dans des organes périphériques sans aucune évidence de propagation locale dans des ganglions lymphatiques régionaux. A l'heure actuelle, il est largement admis que l'accès à tous les organes se fait principalement par voie sanguine.

I.2.2 Survie dans la circulation sanguine

L'entrée des cellules tumorales dans la lumière des vaisseaux marque le début d'une autre étape brève mais difficile à étudier : la circulation et la survie des cellules tumorales dans le sang. De façon générale, les cellules épithéliales ayant perdu les interactions avec leurs voisines et avec la MEC enclenchent un programme de mort cellulaire appelé anoïkis (Geiger and Peeper, 2009). Néanmoins, les cellules tumorales peuvent résister à cette mort cellulaire. En effet, la tyrosine kinase TrkB a été identifiée comme un suppresseur de l'anoïkis, et son expression est requise pour la progression métastatique des cellules épithéliales intestinales transformées (Geiger and Peeper, 2005). Pour pouvoir survivre, les cellules tumorales circulantes (CTC) doivent aussi être capables de résister aux contraintes physiques dues à la pression sanguine. Il apparait que celles qui sont facilement

déformables et qui jouissent d'un petit diamètre et d'une grande élasticité survivent mieux dans la circulation (Mehlen and Puisieux, 2006). De plus, les CTC doivent échapper au système immunitaire. Pour ce faire, elles cooptent des plaquettes sanguines, formant ainsi de larges embolus tumoraux (Nguyen et al., 2009). Depuis plus d'un siècle, il a été montré en clinique que les tumeurs malignes ont tendance à induire une hypercoagulation (Nash et al., 2002). Des analyses histopathologiques humaines de métastases hématogènes au stade précoce révèlent souvent la présence de thrombose associée à un dépôt de fibrine abondante (Ruiter et al., 2001). La détection des CTC a été associée à un mauvais pronostic dans différents types de cancers (Phillips et al., 2012). En effet, même si aucune métastase n'est encore développée, la présence des CTC dans la circulation serait le signe d'un risque de récurrence (Pantel and Brakenhoff, 2004). La détection de ces CTC dans le sang est en cours de développement par analyse de marqueurs épithéliaux comme EpCAM ou par un tri par la taille, les cellules tumorales épithéliales étant plus grandes que les cellules sanguines. Une étude a mis en évidence la capacité des CTC à recoloniser la tumeur primitive, ce qui pourrait expliquer la récurrence locale après chirurgie. Ce phénomène également appelé « self-seeding » met en jeu la sécrétion de facteurs tels que les MMP ou l'IL-6 (Kim et al., 2009).

I.2.3 Extravasation

L'extravasation a été considérée depuis longtemps comme une étape limitante dans le processus de la dissémination métastatique (Koop et al., 1996). Ceci est dû au fait que 0,1% des CTC seulement sont capables de survivre dans la circulation (Weiss, 2000). L'extravasation dépend de la structure des barrières vasculaires qui délimitent les organes hôtes (De Bock et al., 2011). Dans le cerveau par exemple, les CE, les péricytes, les cellules gliales et la membrane basale sont étroitement interconnectées formant ainsi une barrière hémato-encéphalique rigide et étanche, limitant l'extravasation des CTC. Par contre, l'endothélium de la moelle osseuse est dépourvu de membrane basale, et est donc plus apte à l'extravasation.

Le mécanisme d'arrêt des CTC à un site préférentiel reste controversé. L'arrêt des CTC peut se faire de manière totalement passive. C'est le cas par exemple des métastases cérébrales

qui se forment suite à un arrêt mécanique des cellules dans un capillaire de plus petit calibre du cerveau (Kienast et al., 2010). Ainsi le rapport du diamètre de la cellule tumorale sur celui du vaisseau doit être proche de 1. Par contre, de nombreuses autres études soutiennent l'hypothèse d'une extravasation active des CTC. Cette extravasation est la résultante des interactions entre les récepteurs présents à la surface des CTC et leurs ligands apparentés exprimés au niveau de l'organe hôte (Gupta and Massague, 2006). En effet, les intégrines $\alpha 3 \beta 1$ à la surface des CTC sont capables de lier la laminine-5 exprimée au niveau de la membrane basale des vaisseaux du poumon permettant ainsi leurs métastases (Wang et al., 2004). De même, l'expression de CXCR4 à la surface des cellules mammaires s'avère importante pour la colonisation des tissus riches en CXCL-12 tels que les poumons (Muller et al., 2001).

Afin de surmonter les barrières physiques, une perméabilité microvasculaire intrinsèque faible est nécessaire au niveau du site hôte pour permettre l'extravasation des CTC. Ainsi, les tumeurs primaires sécrètent des facteurs qui perturbent à distance le microenvironnement en induisant une hyperperméabilité vasculaire à son niveau. Une protéine sécrétée telle que l'ANGPTL4, ainsi que d'autres facteurs pléiotropiques tels que COX-2, MMP-1 et MMP-2, rompent par exemple les jonctions intercellulaires entre les CE, favorisant ainsi l'extravasation des cellules cancéreuses mammaires aux poumons (Gupta et al., 2007; Padua et al., 2008). De façon intéressante, la capacité de l'ANGPTL4 à favoriser l'extravasation des CTC préférentiellement aux poumons et non aux os met en évidence la dépendance des cellules tumorales pour l'environnement de ces organes secondaires, confirmant ainsi l'hypothèse du « seed and soil » émise par Stephen Paget en 1889 (Paget, 1989).

I.2.4 Colonisation métastatique

Les cellules tumorales ayant réussi à envahir un organe à distance et à former des micrométastases, peuvent rester des semaines, voire des années, en dormance sur le site secondaire avant de proliférer et de former des macrométastases. La colonisation est l'étape la plus critique du processus métastatique. En effet, après injection dans la circulation, 80% des cellules de mélanome survivent dans la circulation et sortent des

vaisseaux sanguins mais seulement 1/40 forment des micrométastases au 3ème jour et 1% seulement progresse pour former des métastases (Luzzi et al., 1998). Un grand nombre de cellules entre en apoptose très rapidement lorsqu'elles arrivent dans un nouvel organe (Wong et al., 2001), ou est éliminé par le système immunitaire (Boissonnas et al., 2007). Les cellules qui survivent et arrivent à s'implanter au site de métastases doivent proliférer pour former dans un premier temps des micrométastases, puis des macrométastases. Or, certaines tumeurs ne développent des métastases que des dizaines d'années plus tard (Karrison et al., 1999), alors que d'autres se développent très rapidement, en quelques mois (Hoffman et al., 2000). Entre le moment où elles envahissent un nouvel organe et le développement de la métastase, les cellules tumorales entrent en un état quiescent où elles ne font pas ou peu d'apoptose et de prolifération (Luzzi et al., 1998 ; Nguyen et al., 2009). L'angiogenèse permettrait la reprise de la prolifération et le développement des métastases. En effet, il a été décrit que l'utilisation d'inhibiteur de l'angiogenèse maintient les cellules en dormance (Kienast et al., 2010). Les cellules isolées doivent être capables de survivre à une longue période de latence mais également de réinitier la prolifération lorsque les conditions sont propices. L'expression de ID1 et ID3 (Inhibition of Differentiation) est nécessaire à la reprise de la prolifération des cellules du cancer du sein (Gupta et al., 2007).

II Angiogenèse: Etape clef dans la progression tumorale

II.1 Définition de l'angiogenèse

Au cours du développement embryonnaire, les vaisseaux sanguins se forment par vasculogenèse à partir de précurseurs hémangioblastiques qui se différencient en CE et s'assemblent dans un plexus vasculaire primitif (*Figure 3*). Cette étape est suivie par un processus d'angiogenèse qui permet au réseau vasculaire de se développer à partir de vaisseaux pré-existants (Carmeliet, 2000).

Cette néovascularisation est un processus critique conduisant à la formation d'un système vasculaire stable composé de CE, de cellules murales (péricytes) et de membrane basale (Wilting et al., 2003). A l'état normal, les CE constituent la couche la plus interne des parois vasculaires et sont en contact direct avec les péricytes. Une membrane basale se retrouve à l'interface entre l'épithélium et l'endothélium et recouvre presque toute la longueur des CE.

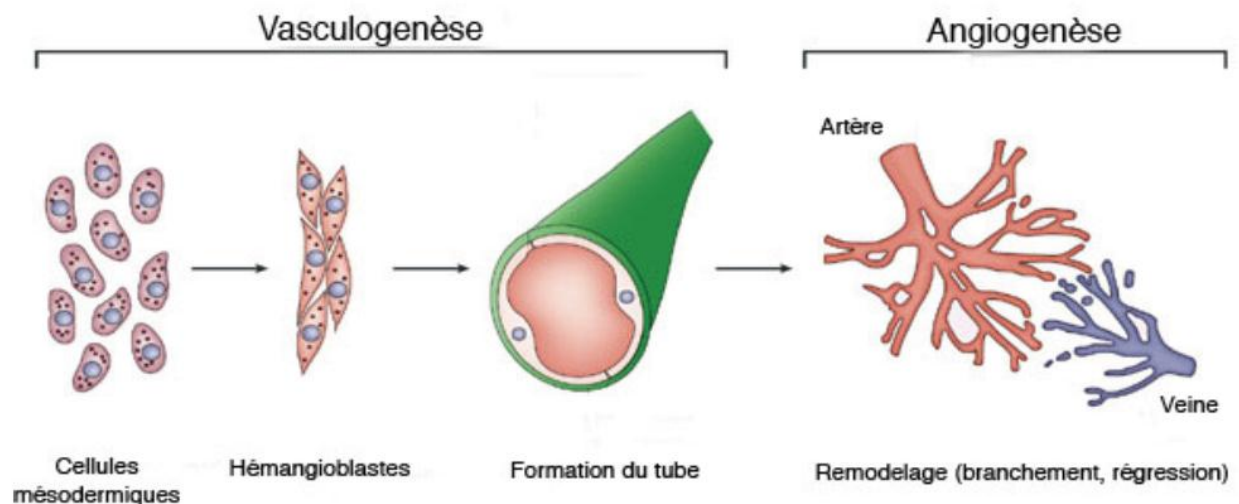


Figure 3: Présentation de la vasculogenèse et de l'angiogenèse. Les progéniteurs se différencient pour donner des cellules endothéliales qui forment, lors de la vasculogenèse, un labyrinthe vasculaire primaire d'artères et de veines. Lors de l'angiogenèse, le réseau vasculaire se développe, les cellules musculaires lisses et les péricytes viennent le stabiliser (Oliver, 2004).

Au cours de la vie adulte, la néovascularisation est principalement effectuée par angiogenèse. Cependant, des angioblastes identifiés dans la moelle osseuse et dans le sang périphérique chez l'adulte peuvent également participer à cette néovascularisation (Ferrara and Kerbel, 2005). Néanmoins, les CE demeurent pour leur immense majorité

dans un état quiescent : à un instant donné, seules 0,01% des CE de l'organisme se divisent (Hobson and Denekamp, 1984).

L'angiogenèse physiologique chez l'adulte n'est observée qu'au cours du cycle ovarien ou dans le placenta de la femme lors de la grossesse (Smith, 2001). En revanche, l'angiogenèse est un processus actif dans des conditions pathologiques tels que les processus de réparation tissulaire ou post-ischémique, la rétinopathie diabétique ainsi que dans la croissance tumorale (Carmeliet, 2005).

II.2 Angiogenèse tumorale

En 1950, Algire et ses collaborateurs émettent pour la première fois l'idée que la croissance des tumeurs est dépendante d'un nouvel apport vasculaire (Algire et al., 1950). Mais il a fallu attendre jusqu'à l'année 1971, pour que le père fondateur des travaux sur l'angiogenèse tumorale, Judah Folkman, le confirme (Folkman, 1971). En 1979, Muthukkaruppan et Auerbach ont développé un modèle de cornée avasculaire très pertinent et très utilisé jusqu'à nos jours pour l'étude de la néo-vascularisation (Muthukkaruppan and Auerbach, 1979). En utilisant ce modèle, ils ont montré que l'implantation de fragments de tumeurs dans la cornée de la souris entraîne sa vascularisation. Depuis, le rôle de l'angiogenèse dans la progression tumorale a été très largement étudié. Il est actuellement admis qu'une tumeur au-delà de quelques millimètres de diamètre a besoin de néo-vaisseaux pour l'approvisionner en oxygène et en nutriments, éliminer ses déchets et acheminer les facteurs de croissance et les cytokines nécessaires à sa croissance continue (Hanahan and Weinberg, 2000).

II.2.1 « Switch » angiogénique

La progression tumorale nécessite le passage d'une phase prévasculaire vers une phase vasculaire. Ce passage a été dénommé « switch » angiogénique. Il est déclenché par de nombreux signaux tels que des stress métaboliques (hypoxie, acidose ou hypoglycémie) ou mécaniques (pression générée par des cellules en prolifération), une réponse immunitaire

ou inflammatoire (cellules immunitaires ou inflammatoires qui ont infiltré le tissu) ou encore des mutations génétiques (activation d'oncogènes et délétion de gènes suppresseurs de tumeurs) qui contrôlent la production de régulateurs de l'angiogenèse (Bergers and Benjamin, 2003; Carmeliet, 2000).

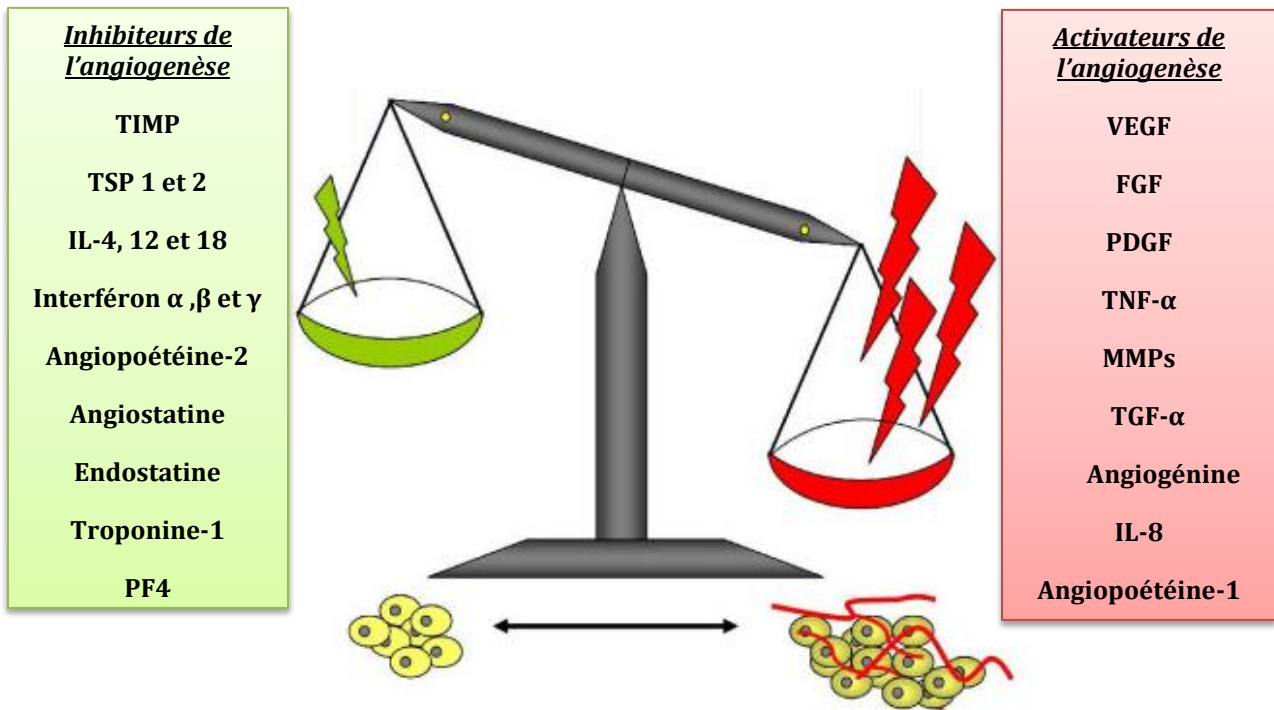


Figure 4: *Switch angiogénique (Yue et al., 2007).*

L'ensemble de ces modifications conduit à un déséquilibre de la balance angiogénique, ce qui se traduit par l'activation de facteurs pro-angiogéniques et l'inhibition de facteurs anti-angiogéniques (*Figure 4*).

II.2.1.1 Activation de facteurs pro-angiogéniques

Un groupe très hétérogène de facteurs pro-angiogéniques (AGF) a été montré comme étant surexprimé dans des conditions pathologiques. Ce groupe inclut différentes protéines de la famille des VEGF ou des FGF, le PIGF, le PDGF... Ces molécules induisent l'angiogenèse en

interagissant avec des récepteurs à Tyrosine Kinase exprimés à la surface des CE, mais également avec d'autres récepteurs comme les HSPGs ou les intégrines (Rusnati and Presta, 2006). Ces différentes interactions extracellulaires reflètent la complexité des voies de transduction stimulées par les facteurs pro-angiogéniques (Presta et al., 2005). Une fois stimulée, les CE acquièrent un phénotype angiogénique et sont donc capables d'effectuer les différentes étapes du processus angiogénique, y inclus la prolifération, la dégradation de la MEC, la modulation de l'expression de différentes molécules d'adhésion de surface dont les intégrines et les cadhérines, ainsi que la migration.

II.2.1.2 Inhibition de facteurs anti-angiogéniques

Différentes protéines, polysaccharides et glycosphingolipides retrouvés dans les fluides corporels et dans la MEC ont été décrits comme jouant un rôle important dans l'inhibition de l'angiogenèse. C'est en particulier le cas des thrombospondines 1 et 2, de l'endostatine, de l'angiostatine et des cytokines telles que l'interleukine-12 (Taraboletti et al., 2010). Ces facteurs ont la capacité de séquestrer ou de lier des AGFs dans la MEC, d'inhiber la production d'AGF par les cellules tumorales, de lier ou de masquer des récepteurs d'AGF à la surface des CE, de réduire la réponse de ces derniers aux AGFs, ou également d'inhiber des effecteurs de l'angiogenèse sécrétés par les CE comme les protéases qui sont requises pour la dégradation de la MEC (Rusnati et al., 2010). La diminution du niveau d'expression des molécules anti-angiogéniques endogènes et donc l'inhibition des fonctions qui y sont liées a été observée dans différents modèles de cancers, ce qui entraîne un déséquilibre de la balance angiogénique en faveur de l'expression des AGF et donc en faveur de l'angiogenèse tumorale.

Cette conversion angiogénique est un passage graduel, non continu et non homogène dans la tumeur d'un état à un autre. Cette hétérogénéité est facilement observable au sein des tumeurs où des régions hypervascularisées peuvent être visualisées à côté des zones très peu vascularisées et où certains vaisseaux tumoraux sont plus matures que d'autres selon la région et le stade de la tumeur (Jain, 2005).

II.2.2 Mécanismes de formation des vaisseaux sanguins tumoraux

Six mécanismes différents ont été décrits pour la formation des vaisseaux sanguins tumoraux. Le processus de bourgeonnement reste le plus largement étudié pour expliquer cette formation (Auguste et al., 2005; Jain and Carmeliet, 2012). Les cinq autres mécanismes ont été documentés dans certains types tumoraux mais leur rôle exact dans la cancérogenèse reste sujet à discussion, et les voies moléculaires impliquées ne sont pas encore élucidées (Figure 5). Ces mécanismes sont résumés ci-dessous :

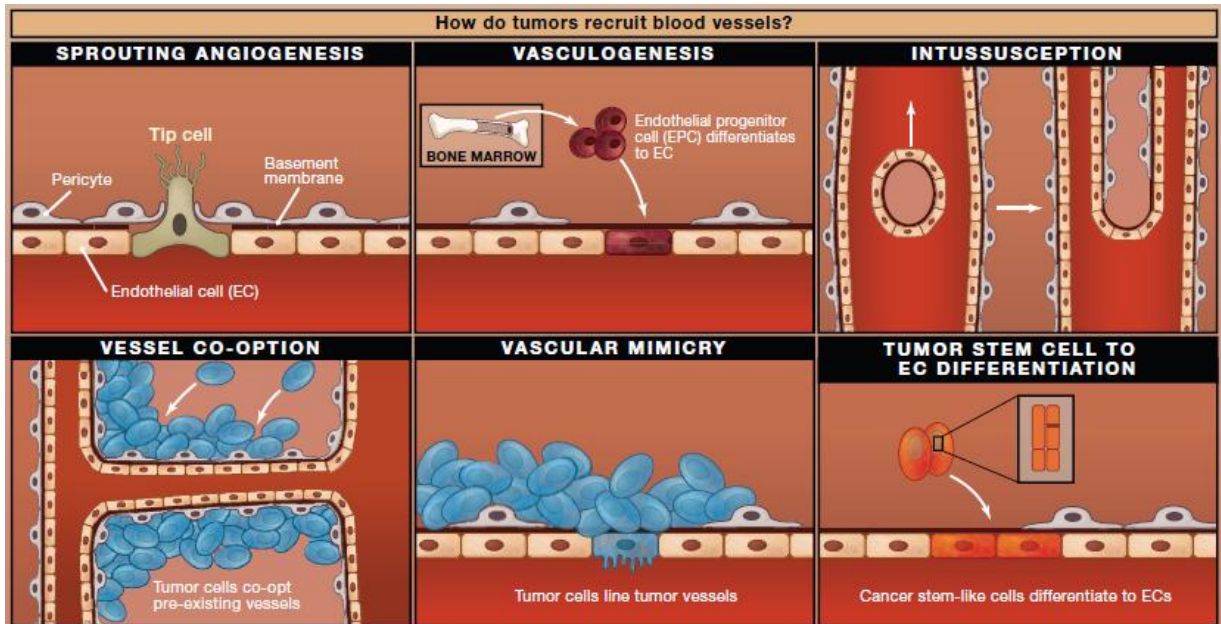


Figure 5 : Différents mécanismes de recrutement des vaisseaux sanguins tumoraux (Jain and Carmeliet, 2012).

II.2.2.1 Bourgeonnement (sprouting)

L'initiation de l'angiogenèse bourgeonnante se fait suite à un stimulus angiogénique local telle que l'hypoxie ou la surexpression du VEGF. Elle débute par une vasodilatation et une augmentation de la perméabilité des vaisseaux via la dissolution des jonctions d'adhésion. La dégradation de la membrane basale et de la matrice extracellulaire environnante permettent alors la migration et la prolifération des CE qui s'assemblent en tubes, formant ainsi des vaisseaux (Carmeliet and Jain, 2011a; Pepper, 2000) .

II.2.2.2 Vasculogénèse (vasculogenesis)

Les précurseurs des cellules endothéliales (EPC), issus de la moelle osseuse, sont mobilisés, transportés par voie sanguine et incorporés dans les vaisseaux sanguins en croissance. Les facteurs angiogéniques produits par la tumeur et par l'environnement tumoral (VEGF, PlGF et Ang-1) stimulent ce processus (Bergers and Benjamin, 2003; Lyden et al., 2001). Le pourcentage d'incorporation des EPC est variable, cette fluctuation est probablement dépendante du type de tumeur et du modèle utilisé. Mais, on ne connaît pas encore les mécanismes qui régulent la libération de ces précurseurs par la moelle hématopoïétique ni les signaux qui permettent de cibler ces cellules au site fortement angiogénique.

II.2.2.3 Cooptation

Les tumeurs peuvent aussi, dans un premier temps, coopter des vaisseaux existants qui régressent ensuite, entraînant ainsi une nécrose massive. La tumeur est par la suite vascularisée par néo-angiogenèse tumorale (Bergers and Benjamin, 2003; Holash et al., 1999). C'est le cas par exemple des astrocytomes qui assurent leurs besoins en oxygène et en nutriments en cooptant des vaisseaux sanguins normaux du cerceau sans initier le processus d'angiogenèse; ces tumeurs sont considérées comme étant non angiogéniques. Elles progressent tout le long des vaisseaux cooptés et peuvent devenir aussi invasives que d'autres tumeurs très angiogéniques entraînant une nécrose au sein des tumeurs (Holash et al., 1999). Toutefois, ces tumeurs finiraient par se revasculariser surtout aux stades avancés (Vajkoczy et al., 2002).

II.2.2.4 Invagination (intussusception)

Elle permet la génération de nouveaux vaisseaux par subdivision de vaisseaux pré-existants (Kurz et al., 2003; Risau, 1997). Burri et ses collègues ont décrit quatre étapes consécutives qui interviennent dans ce processus : 1- la création d'une zone de contact entre les parois des capillaires opposés ; 2- la réorganisation des jonctions intercellulaires de l'endothélium et la perforation centrale de la bicouche endothéliale; 3- la formation d'un noyau tubulaire interstitiel; 4- l'invasion du tubule par des extensions cytoplasmiques, des myofibroblastes, des péricytes, et des fibrilles de collagène (Caduff et al., 1986). Ce

mécanisme est plus rapide que le bourgeonnement et requiert moins de dépenses métaboliques (Ribatti and Djonov, 2012). En effet, aucune prolifération des CE n'est requise mais une augmentation du volume des CE qui deviennent plus fines est suffisante. Cette stratégie putative pourrait être un moyen rapide utilisé par les tumeurs pour s'adapter aux changements du milieu environnemental.

II.2.2.5 Imitation de la vasculogénèse (vasculogenic mimicry)

Dans certaines tumeurs très agressives, tels que les mélanomes ou les glioblastomes, les cellules tumorales peuvent s'assembler entre elles de façon à créer des pseudo-vaisseaux (El Hallani et al., 2010; Maniotis et al., 1999). Le néo-vaisseau ainsi formé peut être totalement bordé par ces cellules tumorales différenciées en cellules endothéliales ou être une mosaïque de ces cellules transdifférenciées et de cellules endothéliales normales (Chang et al., 2000; Soda et al., 2011).

II.2.2.6 Différenciation des cellules souches tumorales en CE

Des cellules souches de type endothélial, présentant des altérations génomiques semblables à celles retrouvées dans les tumeurs, ont été identifiées dans les glioblastomes (Ricci-Vitiani et al., 2010), les lymphomes (Streubel et al., 2004), les neuroblastomes (Pezzolo et al., 2007) et les cancers mammaires (Bussolati et al., 2009). Bien que l'activité angiogénique de ces cellules n'a pas été étudiée dans d'autres types de cancer, mais il est fort probable que ce soit un mécanisme plus général par lequel des cellules identiques aux CE, portant des modifications spécifiques de la tumeur, dérivent de cellules cancéreuses douées de capacités de plasticité relatives aux cellules souches tumorales.

II.2.3 Description des vaisseaux tumoraux

Ces différents mécanismes ont été plus ou moins décrits dans des modèles précliniques mais leur importance dans les cancers chez l'homme n'est pas encore connue. Cependant, indépendamment de l'origine des CE, ces dernières forment des vaisseaux tumoraux qui sont différents morphologiquement et structuralement des vaisseaux normaux. Ils sont

hétérogènes, irréguliers, dilatés, tortueux avec de nombreux branchements et des terminaisons aveugles (Figure 6).

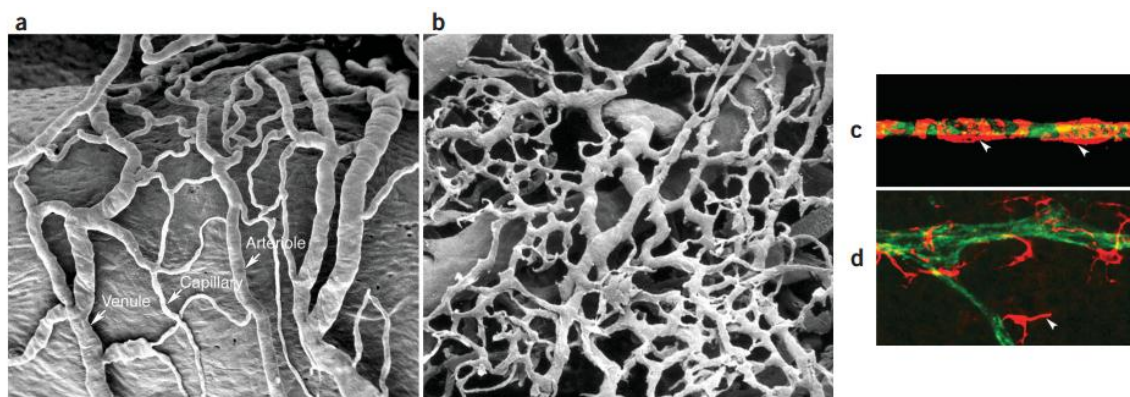


Figure 6 : Structure des vaisseaux sanguins tumoraux (McDonald and Choyke, 2003).

(a),(b). Les images de microscopie électronique à balayage montrent l'arrangement des vaisseaux normaux en artères, capillaires et veines en « a », alors que la hiérarchie vasculaire est perdue au niveau des vaisseaux tumoraux où des terminaisons aveugles apparaissent.

(c), (d). Les images de microscopie confocale montrent un co-marquage de péricytes (α -SMA+) en rouge et de CE (CD31+) en vert. La couverture péricytaire est incomplète et l'association péricytaire est faible au niveau des vaisseaux tumoraux en « d » par comparaison aux vaisseaux normaux en « c ».

Le flux sanguin tumoral est variable induisant ainsi des régions hypoxiques et acides au sein des tumeurs. Ces vaisseaux sont également anormaux: ils perdent leur couverture péricytaire, ce qui génère de nombreux pores trans-endothéliaux, de larges jonctions inter-endothéliales et une membrane basale discontinue ou absente. Les CE se chevauchent et occupent une partie du lumen. Toutes ces anomalies rendent les vaisseaux tumoraux très perméables (Konerding et al., 2001; McDonald and Choyke, 2003).

Le phénotype hyperperméable formé facilite l'extravasation des fluides intravasculaires et des protéines plasmatiques qui s'accumulent dans l'interstitium tumoral (Jain, 2005), et entraîne une augmentation de la pression oncotique extravasculaire (Stohrer et al., 2000). De plus, les vaisseaux lymphatiques intratumoraux sont souvent non fonctionnels. Cette caractéristique est le résultat de stress mécaniques générés par l'expansion des cellules tumorales en division dans un espace confiné, ce qui entraîne la compression des néo-vaisseaux lymphatiques et donc l'impossibilité de la clairance de ces fluides extravasculaires.

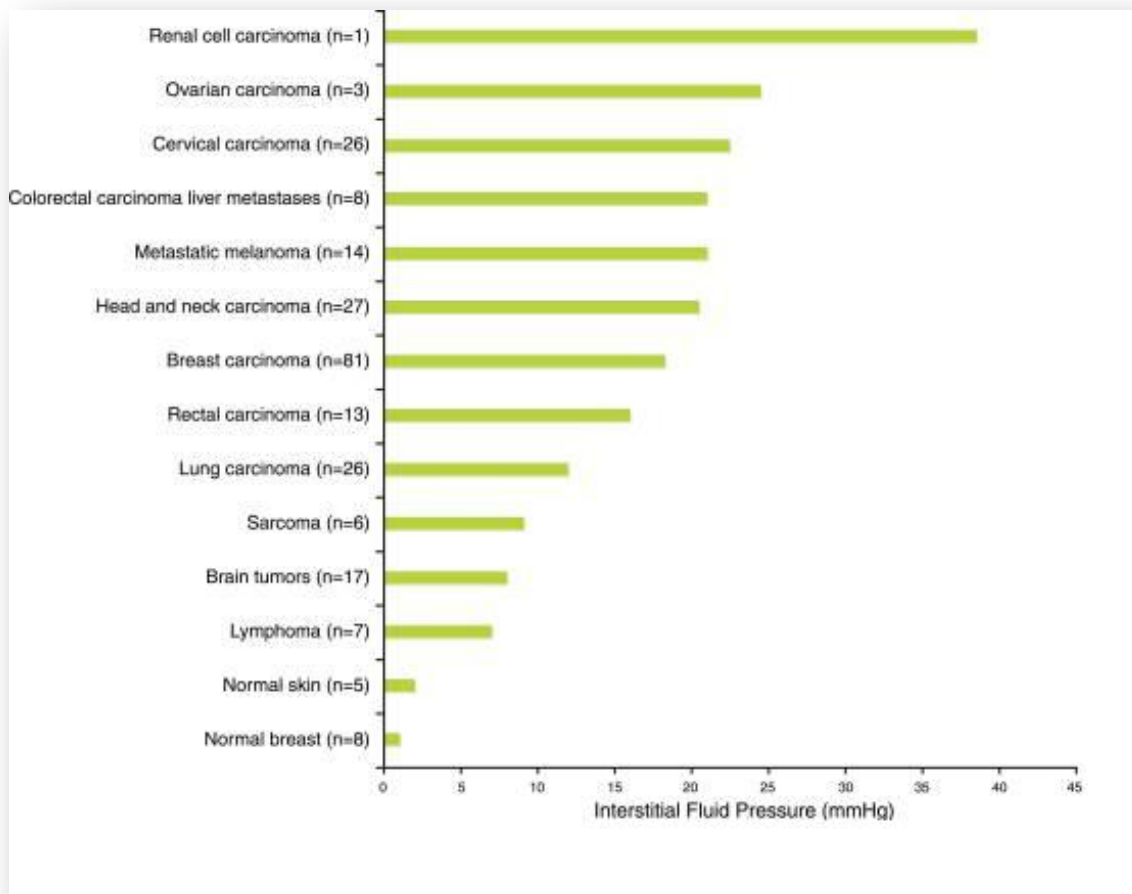


Figure 7 : Augmentation de la pression interstitielle intratumorale (Goel et al., 2011).

Par conséquent, une augmentation de la pression interstitielle a été documentée dans un grand nombre de modèles tumoraux murins et humains (Figure 7), notamment dans les cancers colorectaux, mammaires, cervicaux et également dans les mélanomes et les glioblastomes (Goel et al., 2011).

II.3 Thérapie anti-angiogénique

II.3.1 Angiogenèse tumorale : une cible thérapeutique

Judah Folkman a été le premier à proposer l'inhibition de l'angiogenèse comme stratégie thérapeutique potentielle pour le traitement des cancers (Folkman, 1971). Théoriquement,

l'idée de cibler les CE offre de nombreux avantages par rapport aux traitements ciblant directement les cellules tumorales (Feron, 2004; Kerbel, 1991; Wu and Staton, 2012) :

- Les CE de l'organisme adulte étant en majorité dans un état quiescent, une thérapie anti-angiogénique ciblant principalement les CE tumorales en prolifération ne devrait avoir que peu d'effets toxiques sur le reste de l'organisme.
- Les CE étant génétiquement stables, contrairement aux cellules tumorales qui sont souvent sujettes à des mutations, une approche anti-angiogénique devrait induire moins de mécanismes de résistance et devrait donc permettre un traitement prolongé sans rechute.
- Les CE étant en contact direct avec la circulation sanguine, elles seraient facilement accessibles par les drogues anti-angiogéniques sans la nécessité de pénétrer dans les tumeurs.
- Ce concept anti-angiogénique posséderait forcément un large champ d'application car la plupart des tumeurs solides sont dépendantes de l'angiogenèse pour leur survie et leur progression. Il permettrait aussi de cibler non seulement la tumeur primaire, mais aussi les métastases qui se forment à distance et qui sont également dépendantes de l'angiogenèse pour leur ancrage et leur adhésion au niveau de l'organe hôte.

Depuis l'hypothèse de Folkman en 1971, des avancées importantes dans ce domaine ont été réalisées grâce à une meilleure compréhension de la régulation de l'angiogenèse. Plusieurs molécules effectrices de la balance angiogénique ont été isolées et les propriétés thérapeutiques qui y sont associées ont été validées dans plusieurs études précliniques et cliniques. En particulier, les voies de transduction du VEGF ont constitué une première cible thérapeutique à cause de leur implication majeure dans l'angiogenèse tumorale. En effet, le VEGF a été montré comme étant surexprimé dans un grand nombre de tumeurs solides (Jacobsen et al., 2006; Tseng et al., 2008; Yuan et al., 2011). Des études ont également montré que les récepteurs du VEGF, le VEGFR1 et le VEGFR2, pourraient médier des signaux chimiotactiques pour certaines cellules tumorales et augmenter ainsi leurs capacités invasives (Liu et al., 2011; Rodriguez-Antona et al., 2010; Yakes et al., 2011).

En 1993, Kim et ses collègues étaient les premiers à démontrer que l'inhibition du VEGF était capable de réduire la croissance tumorale *in vivo* (Kim et al., 1993). Dans cette étude, des cellules de rhabdomyosarcomes, de glioblastomes multiformes et de leiomyosarcomes ont été injectées chez des souris nudes. Ces souris ont été traitées par un anticorps monoclonal dirigé contre le VEGF. Ce traitement anti-angiogénique a entraîné une diminution de la croissance tumorale de 50 à 70% associée à une diminution de la densité vasculaire. Ces résultats ont été confirmés dans des modèles *in vivo* de cancer colorectal : un traitement anti-VEGF a ralenti la croissance de xénogreffes sous-cutanées et a réduit la formation de métastases (Warren et al., 1995). L'ensemble de ces données précliniques encourageantes ainsi que d'autres obtenues *in vivo* ont permis le développement et l'optimisation de drogues anti-angiogéniques pour être utilisées à des fins thérapeutiques.

II.3.2 Développement clinique de la thérapie anti-angiogénique

En 2004, la FDA a approuvé l'utilisation du Bevacizumab, un anticorps monoclonal humanisé dirigé contre le VEGF, pour le traitement du cancer colorectal (Hurwitz et al., 2004), et plus tard, pour le traitement du cancer de poumons non à petites cellules (Sandler et al., 2006) ou le cancer de sein métastatique (Miller et al., 2007). Depuis, plusieurs autres inhibiteurs du VEGF ou de ses voies de transduction via les récepteurs à Tyrosine kinase ont été développés en clinique (Figure 8). Citons par exemple le Sunitinib pour le traitement des RCC et des tumeurs pancréatiques neuroendocrines, le Pazopanib pour les RCC, le Sorafenib pour les RCC et les HCC, et le Vandetanib pour le cancer médullaire de la thyroïde (Potente et al., 2011a).

Il est important de noter qu'actuellement l'utilisation des anti-angiogéniques pharmacologiques en monothérapie, tel que le Bevacizumab, est restreinte au traitement des RCC (Wu and Staton, 2012). Alors que dans d'autres types de cancers tels que les cancers colorectaux (Giantonio et al., 2007), ou les cancers de sein métastatiques (Cobleigh et al., 2003), les résultats cliniques des monothérapies d'Anti-VEGFs étaient décevants et ne correspondaient pas à ceux observés dans les études précliniques; ceci est probablement la conséquence d'une régression vasculaire insuffisante en réponse au traitement. En effet, il a été suggéré que les tumeurs, une fois devenues métastatiques et hautement vascularisées,

elles développeraient des mécanismes de survie indépendante du VEGF. A cette étape, l'inhibition du VEGF, à lui seul, est insuffisante pour faire réduire ces tumeurs (Griffioen and Molema, 2000).

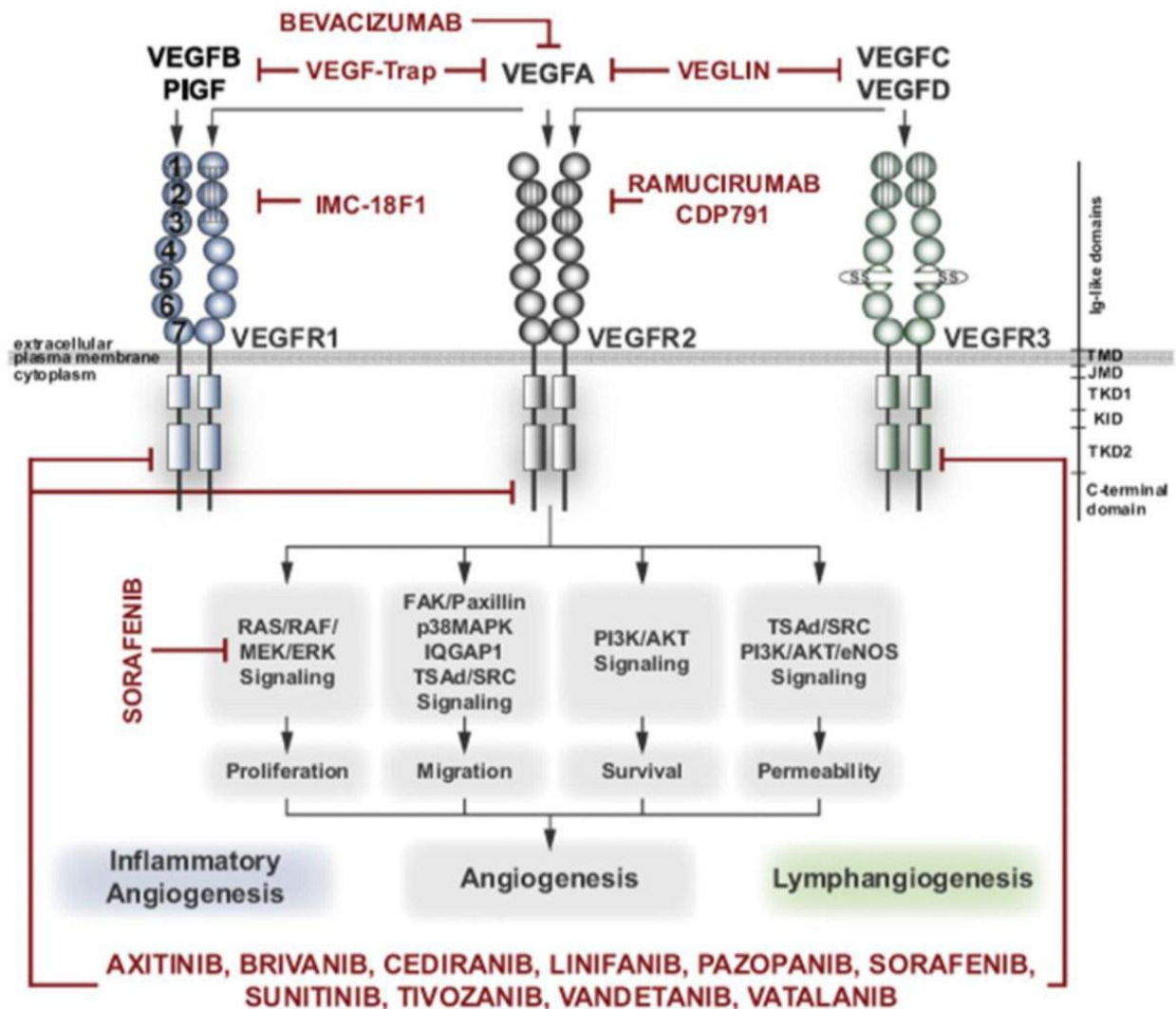


Figure 8 : Différents inhibiteurs pharmacologiques de l'angiogenèse développés en clinique (Backer and Backer, 2012).

Ces inhibiteurs sont capables de cibler soit le VEGF directement soit les différentes voies de transduction qu'il médie, permettant ainsi de bloquer les différentes fonctions qui leur sont associées. En effet, le VEGFR1 joue un rôle important dans l'angiogenèse inflammatoire et le VEGFR3 dans la lymphangiogenèse. Le VEGFR2 transduit différents signaux liés à la prolifération, la migration, la survie cellulaire et la perméabilité vasculaire.

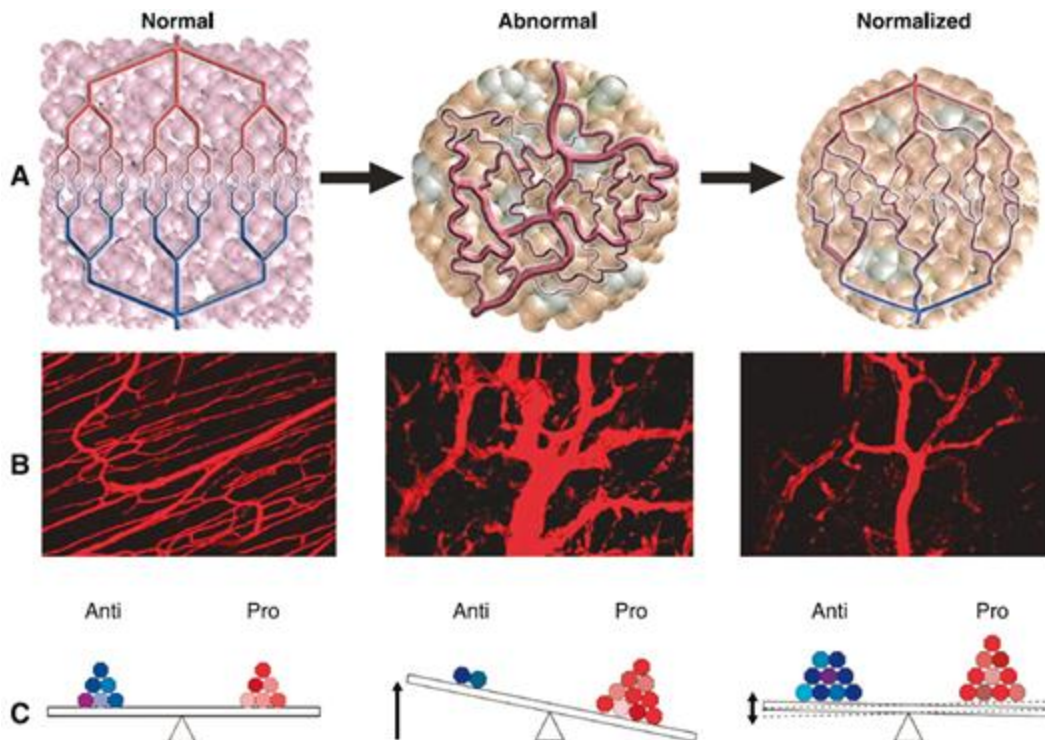


Figure 9 : Normalisation vasculaire en réponse à la thérapie anti-angiogénique (Goel et al., 2011).

- (A) La vascularisation tumorale est structurellement et fonctionnellement anormale. Il a été proposé que les inhibiteurs de l'angiogenèse soient capables de normaliser les néo-vaisseaux formés.
- (B) La dynamique de la normalisation vasculaire est obtenue à la suite de l'inhibition du VEGFR2. La vascularisation du muscle squelettique normal est montrée dans la première figure à gauche. Les 2 autres figures correspondent aux modifications de la structure vasculaire au niveau des tumeurs issues de souris développant des carcinomes de colon au jour 0 et 3 qui suivent l'administration d'un Anti-VEGFR2.
- (C) Les modifications phénotypiques au niveau des vaisseaux reflètent les fluctuations au niveau de la balance angiogénique qui s'établit entre les facteurs anti-angiogéniques (Anti) et les pro-angiogéniques (Pro).

Cependant, une thérapie combinée d'agents anti-angiogéniques avec des agents cytotoxiques conventionnels ou une radiothérapie augmenterait l'effet antitumoral global. Teicher a expliqué cet effet synergique des traitements combinés par leurs capacités additives à détruire les CE et les cellules tumorales en même temps (Teicher, 1996). Jain a proposé une autre théorie, celle de la « normalisation vasculaire », selon laquelle une thérapie anti-angiogénique est capable de corriger transitoirement les anormalités structurales et fonctionnelles des vaisseaux sanguins (Figure 9), facilitant ainsi la pénétration des agents chimiothérapeutiques (Goel et al., 2011; Jain, 2005).

Drug	Approved indication	Improvement in RR (%)	Improvement in PFS (months)	Improvement in OS (months)
Bevacizumab	Metastatic colorectal cancer (with chemotherapy)	10	4.4	4.7*
		0	1.4	1.4*
		7.8	2.8	2.5*
		14.1	2.6	2.1†
	Metastatic non-squamous NSCLC (with chemotherapy)	20	1.7	2.0*
		10.3–14.0	0.4–0.6	NR*
	Metastatic breast cancer (with chemotherapy)‡	15.7	5.9	NS*
		9–18	0.8–1.9	NS*
		11.8–13.4	1.2–2.9	NS*
		9.9	2.1	NS†
	Recurrent GBM (monotherapy)	Currently only phase II data reported		
Sunitinib	Metastatic RCC	18	4.8	NS*
		12.4	3.3	NS*
Sorafenib	Metastatic RCC	8	2.7	NS†
	Unresectable HCC	1	NS	2.8*
		2	1.4	2.3*
Pazopanib	Metastatic RCC	27	5.0	NR*†

Figure 10 : Effets cliniques des thérapies anti-angiogéniques approuvées par la FDA (Carmeliet and Jain, 2011a).

Le tableau montre les résultats de plusieurs essais cliniques sur les anti-angiogéniques utilisés seuls ou en combinaison avec de la chimiothérapie pour le cancer colorectal, le carcinome pulmonaire non à petites cellules (NSCLC), le glioblastome multiforme (GBM) et le carcinome rénal (RCC). Les paramètres étudiés sont le taux de réponse (RR), la survie sans progression (PFS) et la survie globale (OS).

En accord avec ce concept, une diminution de la pression interstitielle et de la densité microvasculaire ainsi qu'une amélioration de la couverture péricytaire ont été observées dans des biopsies de patientes atteintes de cancer de sein ou de patients atteints de cancer colorectal traités au Bevacizumab (Wedam et al., 2006; Willett et al., 2004).

Ces effets bénéfiques des traitements anti-angiogéniques se manifestent par une amélioration de l'état général des patients au début du traitement, ce qui se traduit par une

amélioration de la survie sans progression (PFS) dans un grand nombre d'études cliniques (*Figure 10*). Dans le cancer colorectal métastatique par exemple, la combinaison du Bevacizumab avec des agents chimiothérapeutiques conventionnels (Irinotecan, Fluorouracil, Leucovorin) améliore la survie sans progression (PFS) des patients (Hurwitz et al., 2004). Des résultats similaires ont été obtenus avec la combinaison du Paclitaxel, du Carboplatine, et du Bevacizumab dans le cancer des poumons non à petites cellules (Sandler et al., 2006), ou avec la combinaison de l'Interféron-alpha et du Sunitinib dans les RCC (Motzer et al., 2009).

Cependant, les anti-angiogéniques pharmacologiques ont un effet positif modeste sur la survie globale des patients dans certains modèles tumoraux (cancer colorectal, RCC), voire inexistant dans plusieurs autres modèles (Gressett and Shah, 2009; Iwamoto et al., 2009). Ces résultats inattendus des thérapies anti-angiogéniques sont la conséquence du développement de résistance à ces traitements. Les mécanismes de résistance seront évoqués dans la partie suivante du manuscrit.

Il est très important de rappeler qu'à l'heure actuelle, seules les thérapies ciblant les voies de transduction du VEGF sont validées en clinique. D'autres thérapies basées sur l'utilisation des protéines recombinantes ou des peptides mimant des anti-angiogéniques endogènes ont échoué dans plusieurs études précliniques et cliniques. C'est le cas par exemple de rhEndostatin (endostatine humaine recombinante) (Kulke MH et al., 2006), ou de l'ABT-510, peptide dérivé de la thrombospondine-1 et conservant ses propriétés antiangiogéniques, qui n'ont provoqué aucune toxicité dans des études cliniques de phase I mais qui n'ont pas montré d'efficacité thérapeutique en phase II (Baker et al., 2008; Kulke MH et al., 2006; Markovic et al., 2007). Toutefois, les hypothèses restent controversées par rapport à l'échec de ces molécules en clinique. Certaines études démontrent le manque d'activité anti-tumorale associée à ces molécules (Jouanneau et al., 2001; Karamouzis and Moschos, 2009), alors que d'autres suggèrent une mauvaise formulation de ces médicaments en termes de stabilité et de conformation, et soutiennent l'hypothèse qu'une thérapie basée sur l'utilisation de petites molécules (peptides et protéines recombinantes) constituerait la nouvelle innovation thérapeutique des années à venir (Henkin and Volpert, 2011; Rosca et al., 2011; Song et al., 2005). Il est important de mentionner que depuis 2005, seul le gouvernement chinois a autorisé l'utilisation de l'Endostar, une endostatine

recombinante modifiée par addition de 9 aminoacides dans la région N-terminale et 6 Tag-Histidine conférant ainsi à la molécule une meilleure stabilité, pour le traitement du cancer de poumons non à petites cellules (You et al., 2010).

À côté de ces agents anti-angiogéniques, il existe des stratégies anti-vasculaires qui ciblent les CE par la perturbation de l'organisation de leur cytosquelette ou de leurs jonctions intercellulaires (Neri and Bicknell, 2005). Ces nouveaux agents vasculoclastiques ont une action sur les vaisseaux préexistants : ils peuvent les cibler directement ou indirectement par l'intermédiaire de radioligands ou de toxines diverses entraînant une interruption de la vascularisation tumorale et donc une nécrose rapide en quelques heures par ischémie. Toutefois, ces agents sont relativement inefficaces en monothérapie dans des modèles précliniques car ils sont actifs essentiellement sur les parties peu perfusées d'une tumeur mais laissent la partie périphérique de la tumeur viable, ce qui n'empêche pas sa recroissance rapide (Gridelli et al., 2009). Leur association aux agents anticancéreux classiques ou aux anti-angiogéniques pourrait s'avérer prometteuse, mais les données expérimentales et cliniques ne sont pas encore suffisantes pour montrer leur efficacité (Siemann, 2011).

II.3.3 Défis de la thérapie anti-angiogénique

La découverte de la thérapie anti-angiogénique a été considérée comme une percée thérapeutique, et a été classée par la FDA comme étant la quatrième modalité de traitement de cancers après la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie (Folkman, 2006). Depuis 2007, des millions de femmes dans le monde atteintes de cancer du sein métastatique ont été traitées par le Bevacizumab. Cependant, en novembre 2011, la FDA a retiré l'autorisation du Bevacizumab en combinaison avec le Paclitaxel pour le traitement des cancers du sein, du fait des toxicités constatées et du manque d'efficacité thérapeutique (Wu and Staton, 2012). Ces résultats ainsi que l'absence, dans la majorité des cas, d'effet bénéfique sur la survie globale des patients traités par des anti-angiogéniques conduisent à réévaluer les modalités d'administration et l'usage de ces traitements. Les thérapies anti-angiogéniques font face aujourd'hui à trois défis majeurs. Le premier est la maîtrise des nombreux effets secondaires observés chez les patients traités aux anti-VEGFs. Parmi ces

effets indésirables, on note en particulier des cardiomyopathies, des hypertension, des protéinuries, des hémorragies, des thrombo-embolismes, des complications dans la réparation des blessures, des perforations gastro-intestinales et des syndromes réversibles de leucoencéphalopathie postérieure (Chen and Cleck, 2009). Les deux autres défis majeurs, détaillés dans les paragraphes suivants, concernent le développement de résistance tumorale et l'induction de l'invasion et de la dissémination métastatique.

II.3.3.1 Résistance aux traitements anti-angiogéniques

L'hypothèse initiale émise en 1991 quant à l'absence de résistance aux traitements antiangiogéniques (Kerbel, 2008) est contredite par les données cliniques et expérimentales. En 2008, Kerbel suggère que l'inhibition du VEGF entraîne une sélection des cellules cancéreuses les plus invasives et les plus métastatiques qui seraient, elles, responsables de la diminution de la réponse à ces traitements. Dans la même année, Bergers and Hanahan proposent deux modalités de résistance aux inhibiteurs de l'angiogenèse (figure 11) : soit une non-réponse intrinsèque soit une réponse adaptative aux traitements (Bergers and Hanahan, 2008).

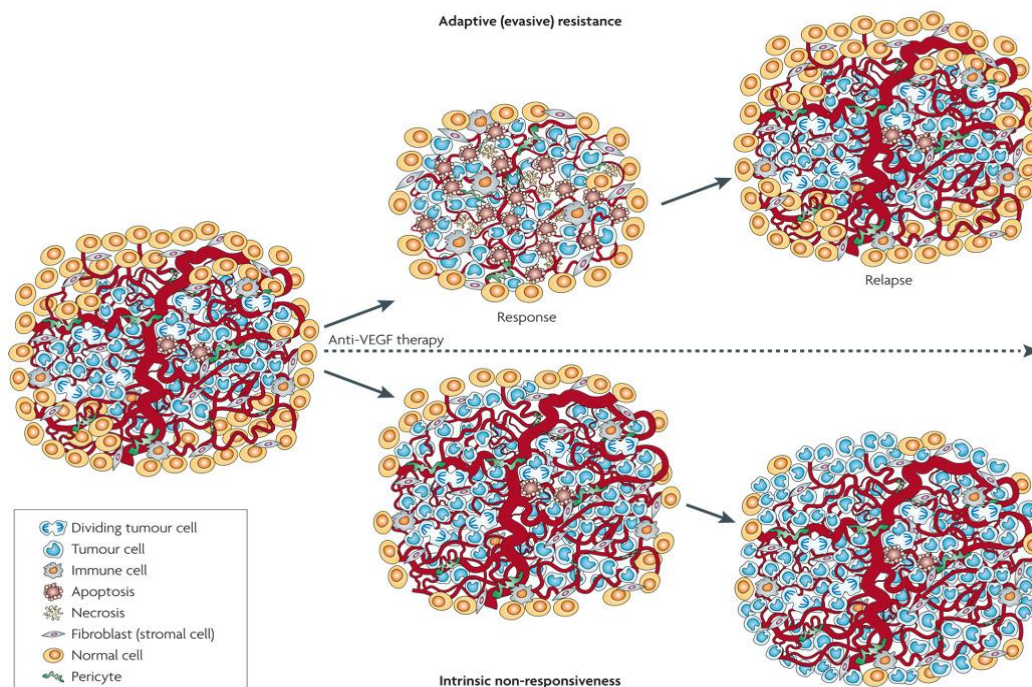


Figure 11 : Modalités de résistance aux traitements anti-angiogéniques (Bergers and Hanahan, 2008).

- **Première modalité : indifférence vis-à-vis de la thérapie anti-angiogénique**

La non-réponse aux thérapies anti-angiogéniques a été mise en évidence dans des modèles précliniques d'adénocarcinome canalaire pancréatique (PDAC) traités au Sunitinib (Olson et al., 2011). Ces adénocarcinomes sont connus pour être hypovascularisés et donc capables de survivre et de progresser dans un microenvironnement très hypoxique indépendamment de l'angiogenèse. En clinique, une preuve de non-réponse et d'inefficacité thérapeutique a été observée dans une étude de phase III combinant le Bevacizumab et le Gemcitabine pour le traitement des PDACs avancés (Kindler et al., 2010).

Outre le caractère hypovasculaire de certaines tumeurs, cette indifférence vis-à-vis des inhibiteurs de l'angiogenèse peut être due à la redondance des facteurs pro-angiogéniques, à l'infiltration de cellules inflammatoires qui expriment un grand nombre de facteurs angiogéniques, ou à l'adoption par la tumeur d'autres voies que le bourgeonnement pour la formation de ses vaisseaux, telles que l'intussusception ou l'imitation de la vasculogenèse (Azam et al., 2010; Bergers and Hanahan, 2008).

Cependant, les études cliniques ne sont pas typiquement conceptualisées pour étudier ce mode de résistance aux traitements. Mais les tumeurs continuant à croître sous traitement, sont considérées comme intrinsèquement résistantes.

- **Deuxième modalité : réponse adaptative aux traitements anti-angiogéniques**

Les cellules tumorales et stromales participent ensemble à l'échappement tumoral vis-à-vis des thérapies ciblant l'angiogenèse (Shojaei, 2012). Cette évasion se produit par une contribution directe de ces cellules à la formation des vaisseaux sanguins ou bien encore par la sécrétion de facteurs angiogéniques compensant ceux qui ont été ciblés par la thérapie.

Les tumeurs constituent une source de facteurs angiogéniques alternatifs en cas d'inhibition du VEGF. Cette hypothèse a été confirmée par exemple dans un modèle de souris transgéniques RIP-Tag traitées par un inhibiteur du VEGFR2 (Casanovas et al., 2005). Ce modèle d'insulinome a été obtenu par surexpression de l'antigène T du virus SV40 sous le contrôle du promoteur RIP de l'insuline. Une phase de réponse transitoire, caractérisée par une réduction de la densité vasculaire tumorale, est observée au début du

traitement (10-14 jours), mais une surexpression compensatoire de plusieurs facteurs angiogéniques dont le FGF2 et l'angiopoïétine 1 entraîne une revascularisation des tumeurs après un mois de traitement continu (Casanovas et al., 2005). De plus, les cellules souches tumorales ont la capacité de se différencier en CE et pourraient aussi médier une résistance aux traitements anti-angiogéniques. C'est le cas par exemple des cellules souches de glioblastome CD133+ qui se différencient en CE préférentiellement via la voie Notch et indépendamment du VEGF (Wang et al., 2010).

Plusieurs populations du compartiment stromal participent également à la résistance aux thérapies anti-angiogéniques. Citons par exemple les fibroblastes associés aux tumeurs (TAF) (Crawford et al., 2009), les cellules dérivées de la moelle osseuse (Shojaei et al., 2007a; Shojaei et al., 2007b) et les péricytes (Helfrich and Schadendorf, 2011). A la suite d'une thérapie anti-angiogénique, en réponse à l'hypoxie générée, ces différents composants du stroma sécrètent un grand nombre de facteurs angiogéniques tels que le VEGF, la MMP9, le b-FGF, le HGF, l'angiopoïétine 1 et des cytokines (Nozawa et al., 2006; Shojaei et al., 2010; Shojaei et al., 2007a).

Il a même été montré dans des modèles in vivo d'adénocarcinome humain pulmonaire une surexpression de l'EGFR et du FGFR dans le stroma et non pas dans les cellules tumorales (Cascone et al., 2011). L'inhibition du VEGF humain seul s'avère donc insuffisante pour inhiber la croissance tumorale. Une combinaison du Bevacizumab et d'un inhibiteur de l'EGFR limiterait dans ce cas la résistance au traitement et augmenterait la survie sans progression.

L'hypoxie joue un rôle majeur dans la résistance aux anti-angiogéniques. Dans les astrocytomes malins par exemple, une augmentation de l'expression de CAIX et de HIF-2 α est associée à un mauvais pronostic et elle est inversement corrélée à la réponse au Bevacizumab combiné à l'Irinotecan (Sathornsumetee et al., 2008). De plus, l'hypoxie engendre le recrutement des cellules dérivées de la moelle osseuse, des cellules myéloïdes, des EPC et des péricytes, qui participent à la stabilisation de l'endothélium tumoral, ne répondant donc plus à une thérapie le ciblant (Zulato et al., 2012).

La résistance adaptative a été aussi démontrée en clinique. En effet, chez des patients atteints de glioblastomes, les taux plasmatiques de FGF-2 et de SDF-1 augmentent à la suite de l'administration de AZD2171, un inhibiteur pharmacologique des récepteurs à tyrosine kinase du VEGF (Batchelor et al., 2007). Une augmentation de l'expression du PlGF et du VEGF est également observée chez des patients atteints de cancer colorectal ou rénal et traités aux anti-VEGF(R) (Motzer et al., 2006; Willett et al., 2005).

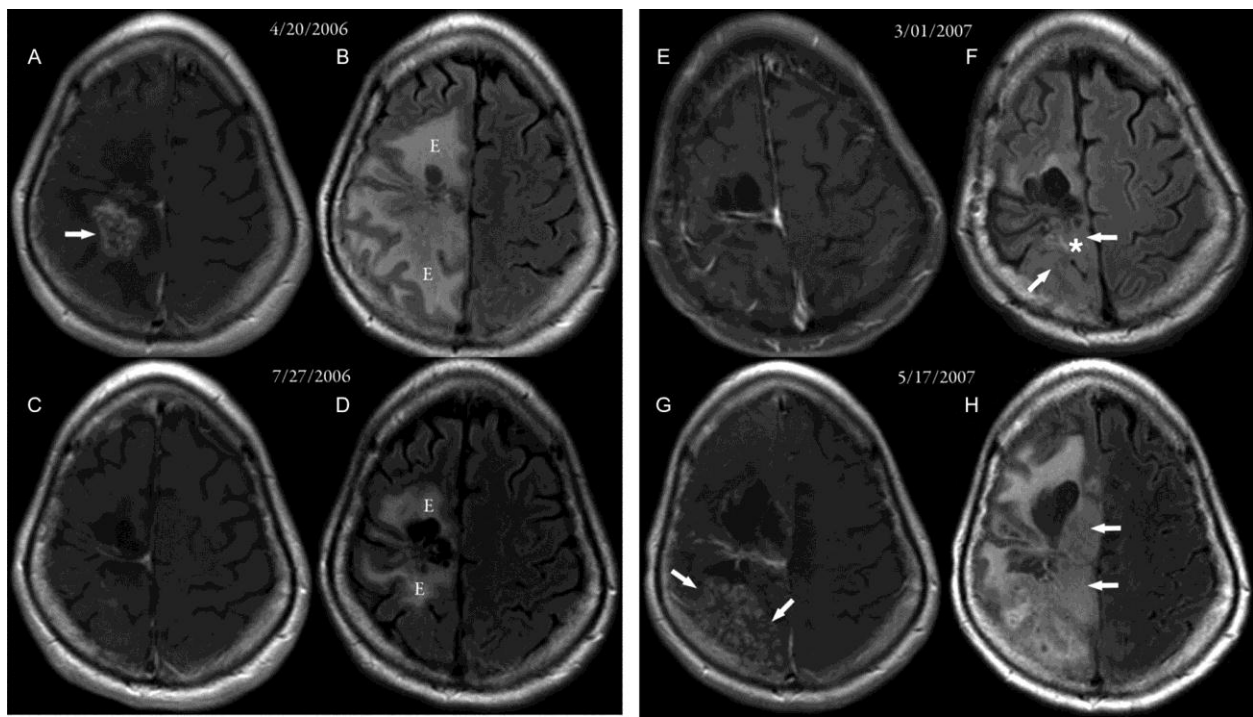


Figure 12: Modifications phénotypiques obtenues par radiographie de la progression tumorale cérébrale chez un patient traité au Bevacizumab (de Groot et al., 2010).

"A" et "B" correspondent aux images de glioblastome récurrent 18 mois après 2 chirurgies, une radiothérapie et une chimiothérapie. Une zone non homogène de nécrose (flèche A) est observée au niveau de la cavité du lobe frontal droit où avait lieu la chirurgie. Cette zone est entourée d'une large surface d'œdème ("E" dans B).

"C" et "D" correspondent aux images prises 3 mois après le début de la thérapie au Bevacizumab. Une diminution significative de la surface de l'œdème est notée ("E" dans D).

"E" et "F" correspondent aux images prises 8 mois après la thérapie anti-angiogénique. La séquence FLAIR met en évidence l'absence de progression de la tumeur.

"G" et "H" correspondent aux images prises 2 mois après l'arrêt du Bevacizumab. Une progression significative de la tumeur est observée (flèches G et H). La biopsie a été réalisée approximativement au niveau de l'astérisque blanc.

II.3.3.2 Accélération de l'invasion et de la formation de métastases

L'utilisation des agents anti-angiogéniques, est non seulement confrontée à des mécanismes de résistance, mais certaines études cliniques et précliniques montrent qu'ils pourraient même accélérer le processus de l'invasion tumorale et de la formation de métastases (de Groot et al., 2010; Norden et al., 2008; Thompson et al., 2011; Wick et al., 2011; Ebos and Kerbel, 2011). Un traitement Anti-VEGFR2, par exemple, est capable d'augmenter l'invasion des cellules de glioblastomes injectées en orthoptique, probablement par un mécanisme compensatoire dû à la cooptation de la vascularisation de l'hôte (Kunkel et al., 2001; Lamszus et al., 2003). Des études récentes montrent que l'inhibition des voies de transduction du VEGF augmente l'incidence de l'invasion ou de la formation de métastases dans des modèles in vivo de glioblastome, de carcinome pancréatique neuroendocrine et de cancer mammaire (Ebos et al., 2009; Paez-Ribes et al., 2009). L'hypoxie et les réponses inflammatoires s'avèrent être les causes majeures de ce phénotype invasif et métastatique engendré par la thérapie (Rapisarda and Melillo, 2012). En effet, les thérapies anti-angiogéniques induisent la formation d'un microenvironnement hypoxique et donc la sélection de clones de cellules tumorales dotés de capacités importantes de survie et de croissance dans un environnement à faible taux d'oxygène. De plus, en réponse aux traitements, les cellules de l'hôte peuvent sécréter des facteurs inflammatoires permettant la formation de niches pré-métastatiques pour le « seed » des cellules cancéreuses. Surtout, faut-il ne pas oublier que des inhibiteurs tel que le Sunitinib qui cible les péricytes via le ciblage du PDGFR augmente potentiellement l'occurrence des métastases (Xian et al., 2006).

Il est important de mentionner qu'aujourd'hui, ces observations sont débattues surtout qu'il y'a des études et des larges méta-analyses qui notent aucune augmentation de l'invasion et de l'agressivité tumorale à la suite de la thérapie (Miles et al., 2011). De plus, l'association entre les thérapies anti-angiogéniques et la formation de métastases a été démontrée uniquement dans des modèles précliniques. La seule exception observée en clinique est chez patients atteints de glioblastomes où l'Avastin stimule la rechute et l'invasion de la tumeur primaire (*Figure 12*), et il n'est pratiquement plus utilisé qu'en toute fin de vie (Norden et al., 2009). Dans les autres types de tumeurs cliniques, cet effet

pro-invasif ou pro-métastatique n'est pas retrouvé (Miles et al., 2011). Cependant, le moment où ces traitements sont donnés, chez des patients le plus souvent déjà métastatiques ou avec des tumeurs avancées, ne permet peut être pas de mettre en évidence facilement une augmentation du phénotype invasif ou métastatique.

L'ensemble de ces données et l'absence de marqueurs de réponse aux traitements augmentent les risques de rechute des patients, et nécessitent donc une exploitation beaucoup plus large et urgente pour contourner les défis liés à la thérapie anti-angiogénique. Par conséquent, il est essentiel aujourd'hui d'établir par quels mécanismes les anti-angiogéniques pourraient stimuler cette dissémination, ceci étant le pré-requis indispensable pour pouvoir limiter ces effets indésirables et par conséquent améliorer l'efficacité des anti-angiogéniques.

III La Thrombospondine 1

Les Thrombospondines (TSP) forment une famille de glycoprotéines à multidomaines présentes chez les protostomiens (*Drosophila melanogaster*, *Anopheles gambiae*) et les deutérostomiens (vertébrés) (Hynes and Zhao, 2000). Cinq TSPs sont codés par le génome humain. Ces TSPs se divisent en deux sous-groupes sur la base de leur architecture moléculaire et de leur oligomérisation. Le sous-groupe A comprend les TSP1 et 2 qui s'organisent sous la forme d'un homo-trimère de 450KDa, et le sous-groupe B comprend les TSP3, 4 et 5 qui forment des pentamères (Carlson et al., 2008). Le sous-groupe B ne possède pas de répétitions de type 1 et de région d'homologie avec le procollagène, mais contient une répétition de type 2 supplémentaire. Contrairement aux TSP1 et TSP2 qui ont une expression plus ou moins ubiquitaire (Iruela-Arispe et al., 1993; Wight et al., 1985), les TSP3-4 et 5 ont une distribution tissulaire spécifique. La TSP3 est fortement exprimée dans les poumons et la peau (Vos et al., 1992) ; la TSP4 dans les muscles squelettiques et cardiaques (Lawler et al., 1993) ; et la TSP5 dans les cartilages et les tendons (DiCesare et al., 1994). Cependant, la TSP1 reste de loin la protéine la plus documentée dans la littérature.

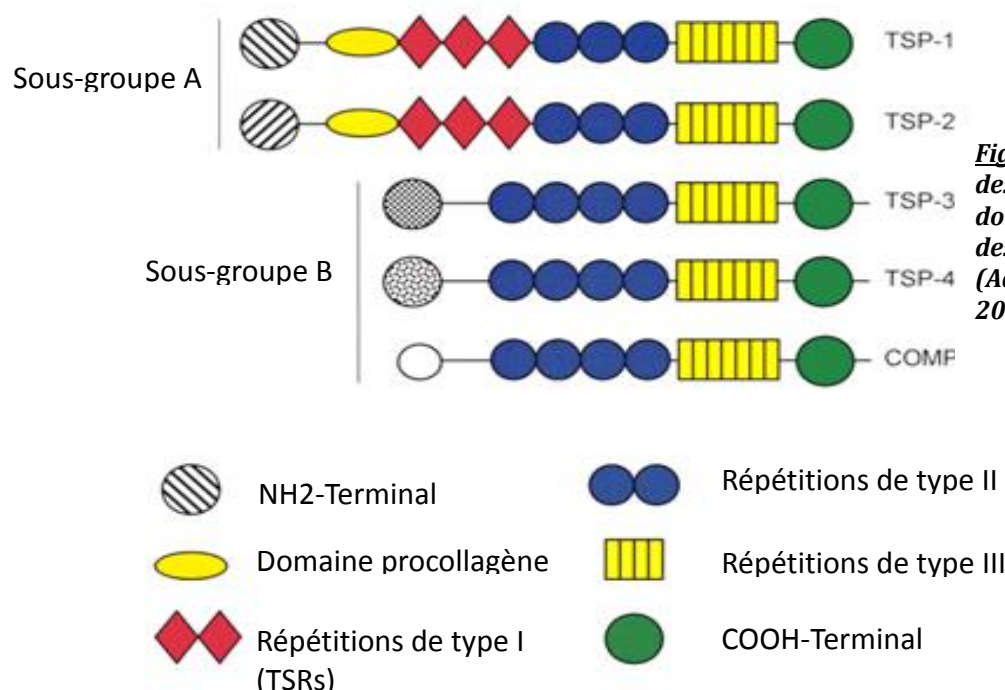


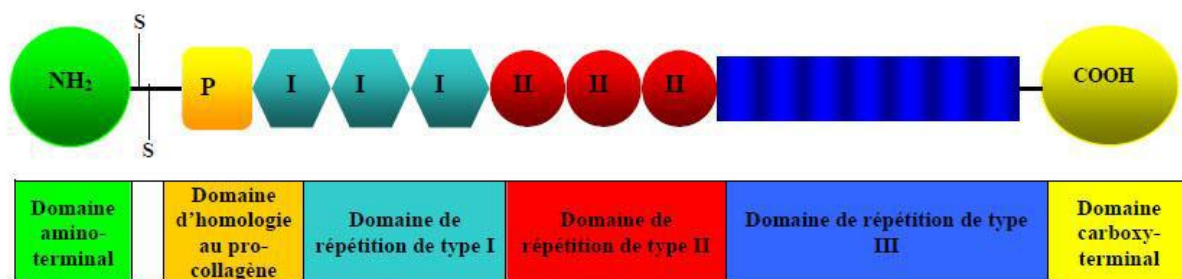
Figure 13: Diagramme des différents domaines de la famille des thrombospondines (Adams and Tucker, 2000).

La TSP1 a été identifiée par l'équipe de Baenziger au début des années 70 (Baenziger et al., 1971). Cette glycoprotéine, associée à la surface des plaquettes activées par la thrombine, a tout d'abord été désignée par le terme de « protéine sensible à la thrombine ». Par la suite, il est devenu évident que cette protéine est le constituant majeur des granules α des plaquettes et qu'elle est sécrétée après activation de ces dernières (Lawler et al., 1978). Suite à ces observations, le nom de Thrombospondine a été proposé et son rôle dans l'agrégation plaquettaire et la formation de caillot sanguin a été démontré (Lawler, 1986). Depuis, de nombreuses études ont permis de mieux comprendre la biologie de cette protéine et de lui assigner d'importantes fonctions dans l'angiogenèse, la réparation tissulaire ainsi que dans la progression tumorale.

La TSP1 humaine est synthétisée sous forme d'un précurseur de 1170 acides aminés (aa) (Armstrong and Bornstein, 2003; Lawler and Hynes, 1986). Elle est formée d'un peptide signal de 18 aa et d'une région mature de 1152 aa. Elle partage 95% et 97% d'identité de séquence en aa avec la souris et le chien respectivement. Chaque monomère de TSP1 (150 KDa) comprend dans l'ordre les domaines suivants (Adams and Tucker, 2000; Annis et al., 2007; Armstrong and Bornstein, 2003) :

- une région globulaire N-terminale
- un court segment riche en cystéine qui génère les ponts disulfure nécessaires à la trimérisation de la TSP1
- un domaine de type procollagène
- trois répétitions de type I ou TSR ou de type properdine
- trois domaines de type II ou de type EGF
- sept répétitions de type III riches en aspartate et fixant le calcium
- une région globulaire C-terminale dont la structure varie en fonction de la disponibilité du calcium.

Ces différents domaines confèrent à la TSP1 des fonctions diverses en fonction de leur interaction avec des récepteurs, d'autres constituants matriciels, des cytokines ou des facteurs de croissance.



Domaine de TSP-1	Séquences	Récepteurs et ligands	Fonctions
Domaine amino-terminal	QNV	Intégrine $\alpha 3 \beta 1$	Adhésion cellulaire Hémostase
	RKGSRR/KKTR	HSPG – LRP – gp330 Syndécanne glycolipides sulfatés	Endocytose
	MKKTRG	Décorine	Inhibition de l'adhésion cellulaire
	BBXB	Héparine	Adhésion cellulaire
	LDVP	Intégrine $\alpha 4 \beta 1$ Intégrine $\alpha 5 \beta 1$	Adhésion cellulaire Chimiotactisme
	25 kDa peptide	?	Stimulation de synthèse de MMPs Stimulation de l'angiogenèse
Domaine d'oligomérisation			Multimérisation
Domaine d'homologie au pro-collagène	NGVQYRN		Inhibition de l'angiogenèse Inhibition du chimiotactisme
Domaine de répétition de type I	RFK	LTGF β	Activation du TGF β latent
	WSHWSPW	Protéine glycosaminoglycane	Activation du TGF β latent
	GGWSHW	Fibronectine	Adhésion cellulaire
	CSVTCG	CD36 HIV gp 120 HSPG	Anti-angiogénique Adhésion cellulaire
Domaine de répétition de type II			
Domaine de répétition de type III	RGD	Intégrine $\alpha v \beta 3$ Intégrine $\alpha IIb \beta 3$	Adhésion cellulaire
	NCPFHYNP NCQYVYNV	Cathepsine G, élastase Elastase	Liaison du calcium
	RFYVVM IRVVM	CD47	Chimiotactisme Prolifération cellulaire
Domaine carboxy-terminal			

Figure 14 : Représentation schématique de la structure moléculaire de la TSP-1 et les fonctions associées (Sid et al., 2004).

Le tableau indique les séquences peptidiques reconnues par différents récepteurs ou ligands, ainsi que les activités biologiques associées.

III.2 Partenaires de la TSP1

La TSP1 a été considérée pendant longtemps comme un produit spécifique de l'activation plaquettaire. Cependant, en 1981, McPherson et al. ont démontré que la TSP1 est sécrétée et synthétisée par les cellules aortiques bovines. Depuis, la sécrétion de la TSP1 par de nombreux types cellulaires incluant les CE (Armstrong and Bornstein, 2003), les cellules musculaires lisses (Raman et al., 2007), les astrocytes immatures (Christopherson et al., 2005), les fibroblastes (Moodley et al., 2003) et les cellules dendritiques (Doyen et al., 2003) a été mise en évidence.

Selon les tissus ou compartiments dans lesquels la TSP1 est exprimée, les ligands et les récepteurs auxquels elle est susceptible de se lier sont donc extrêmement variables. En effet, la TSP1 interagit avec des macromolécules de structure (collagène, fibronectine...), des récepteurs cellulaires (intégrines, CD36, CD47...), des enzymes (élastase, plasmine, MMPs...) et également des cytokines (TGF β , b-FGF, VEGF ...). Ces différentes interactions sont à l'origine de la multiplicité de ses fonctions, qui vont du contrôle de la migration cellulaire lors de l'embryogenèse, à l'agrégation plaquettaire et à la régulation de l'angiogenèse. La figure 14 situe les sites d'interactions de la TSP1 avec ses différents ligands et récepteurs.

III.2.1 Ligands de la TSP1

La TSP1 est capable d'interagir avec de nombreuses protéines de la MEC tels que le collagène et la laminine (Figure 15), participant ainsi à la structure matricielle (Mumby et al., 1984). D'autres interactions peuvent aussi se produire entre la TSP1 et le fibrinogène/fibrine (Bale et al., 1985; Leung and Nachman, 1982), la fibronectine (Lahav et al., 1984), et les HRGPs (Leung et al., 1984) lors du processus de la coagulation sanguine ou de l'agrégation plaquettaire. La TSP1 peut également, suite à son interaction avec ces différents partenaires, moduler leur activité. En effet, il a été démontré que la TSP1, via sa liaison à la calréticuline, contrôle directement l'expression du collagène pendant la réparation tissulaire (Sweetwyne et al., 2010).

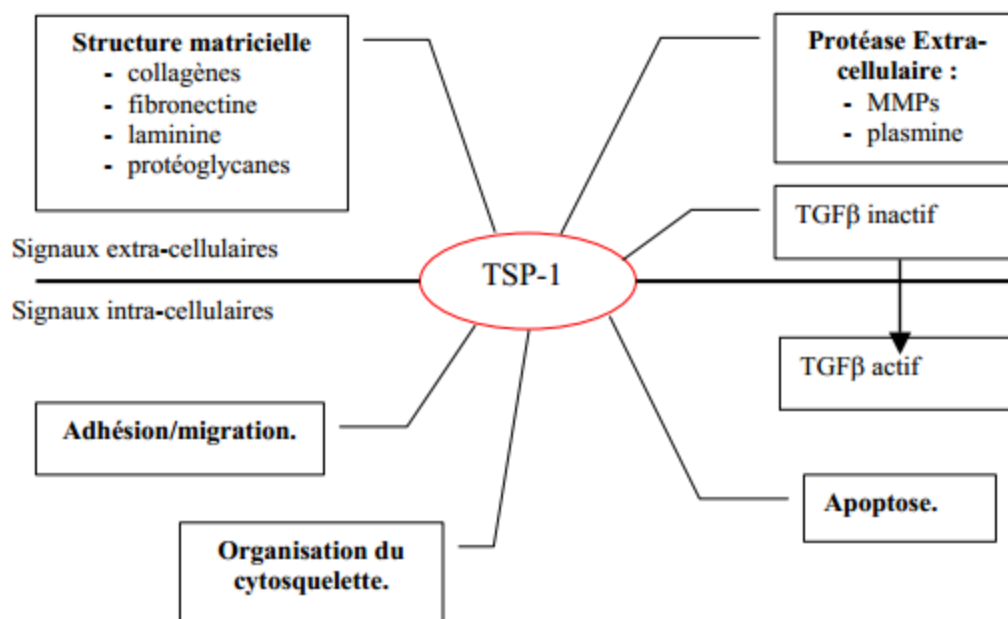


Figure 15 : Représentation des principales interactions de la TSP1 (Lawler, 2002).

La TSP1 est aussi capable d'interagir avec différentes classes de protéases de la MEC comme l'élastase et la cathepsine D, deux enzymes qui sont impliquées dans la destruction tissulaire et l'activation des neutrophiles lors du processus inflammatoire (Hogg et al., 1994). La TSP1 inhibe leur activité enzymatique via ses domaines répétés de type 3. Bein et ses collaborateurs ont également montré, par la technique du double hybride, l'interaction de TSP1-via les TSR- avec les MMP2 et les MMP9 (Bein and Simons, 2000). La TSP1, se lie au niveau de leur site catalytique, bloquant ainsi, non seulement leur activité protéasique mais aussi leur activation. Dans des contextes pathologiques tel que le cancer, la TSP1 semble augmenter la production des MMP9, mais aussi des inhibiteurs des MMPs tel que TIMP-1 (John et al., 2009; Qian et al., 2001). L'ensemble de ces données montre que la TSP1, non seulement interagit avec différentes protéases de la MEC, mais aussi module différents processus biologiques associés au remodelage de cette MEC associé à l'inflammation, à la réparation tissulaire ou à la cancérogénèse.

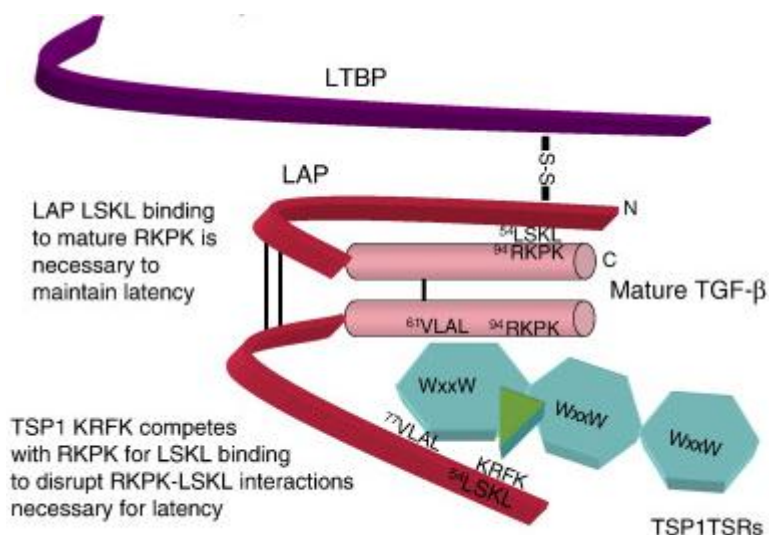


Figure 16 : Modèle d'activation du TGFβ par la TSP1 (Sweetwyne and Murphy-Ullrich, 2012).

En plus de ses liaisons avec de nombreuses protéines et protéases de la MEC, la TSP1 est capable de moduler l'activité de certaines cytokines. En effet, la TSP1 interagit avec les trois isoformes du TGFβ latent et les active (Sweetwyne and Murphy-Ullrich, 2012). Le TGFβ est sécrété par les cellules sous la forme d'un propeptide, le pro-TGFβ, constitué d'un peptide LAP (Latency Associated Peptide) qui contient une séquence LSKL, associé de manière non covalente via une séquence VLAL au peptide contenant le domaine actif du TGFβ (Figure 16). Cette association maintient le TGFβ sous une forme latente, incapable d'interagir avec ses récepteurs (Young and Murphy-Ullrich, 2004). Deux séquences localisées dans les répétitions de type I de la TSP1, interviennent dans le processus d'activation du TGFβ latent : KRFK et WxxW. Cette dernière séquence riche en Trytophane (WxxW) se lie au motif VLAL du domaine actif. Cette interaction est nécessaire mais insuffisante pour l'activation du TGFβ latent (Walton et al., 2010). La séquence KRFK de la TSP1, localisée dans la deuxième répétition TSR du côté de la région N-terminale reconnaît la séquence LSKL du LAP. KRFK de la TSP1 rompt la liaison LSKL-RKPK du LAP par compétition, déplaçant ce dernier du domaine mature, facilitant son accès à son récepteur et induisant ainsi l'activation du TGFβ. Cette séquence KRFK n'est pas présente dans la TSP2.

Les premières données in vivo montrant un rôle important de la TSP1 dans l'activation du TGFβ ont été mises en évidence par la capacité d'un peptide KRFK, administré en période périnatale, à restituer partiellement le phénotype anormal de la souris invalidée pour la

TSP1 (KO-TSP1), en particulier dans le pancréas et les poumons (Crawford et al., 1998). Il est d'ailleurs possible d'induire l'apparition du phénotype muté au niveau des poumons ou du pancréas, observés chez les animaux $TGF\beta^{-/-}$, en traitant les embryons sauvages avec un peptide bloquant l'activation du $TGF\beta$ par la TSP1. Cependant, il est fort probable que la modulation de l'activité du $TGF\beta$ par la TSP1 se déroule en cas de blessures, de stress ou d'autres conditions pathologiques plutôt qu'aux stades du développement (Sweetwyne and Murphy-Ullrich, 2012). D'autres protéines que la TSP1 sont aussi capables d'activer le $TGF\beta$ latent notamment la plasmine, les MMPs et les intégrines (Shi et al., 2011; Yu and Stamenkovic, 2000).

III.2.2 Récepteurs de la TSP1

L'expression différentielle et l'activation de différents récepteurs pour la TSP1, y compris les intégrines, le CD36, le CD47, les LRP, les protéoglycanes, et la calcécitrine peuvent dicter les réponses spécifiques de chaque type cellulaire à la TSP1. Les principaux récepteurs de la TSP1 sont représentés sur la *Figure 17*.

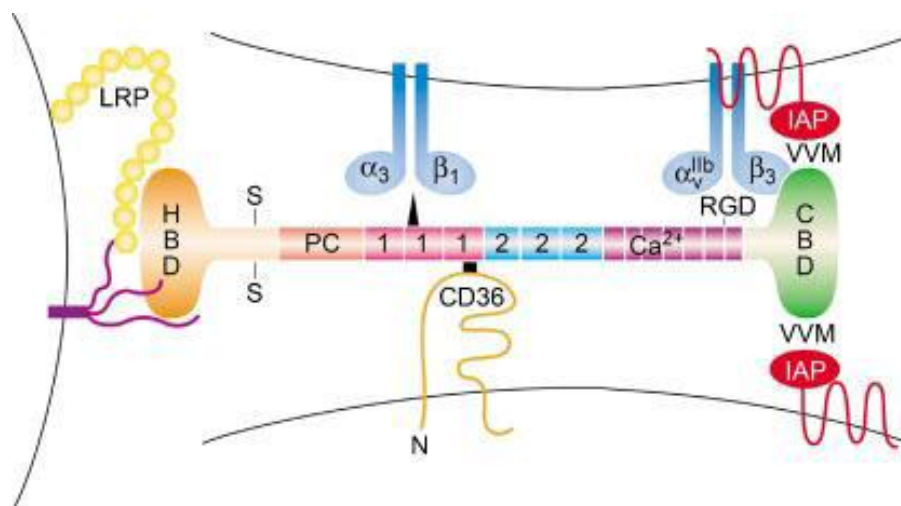


Figure 17: Sites de liaison d'un monomère de la TSP1 avec ses différents récepteurs (Bornstein, 2009).

III.2.2.1 Intégrines et IAP/CD47

La TSP1 interagit avec plusieurs récepteurs d'adhésion de type intégrine. Le motif RGD (Arg-Gly-Asp), localisé au niveau de la dernière répétition de type III de la TSP1, représente la séquence classique de liaison à ces molécules d'adhésion. Elle permet la fixation aux intégrines $\alpha V\beta 3$ et $\alpha IIb\beta 3$ (Lawler et al., 1988). La TSP1 est également capable de se lier à d'autres intégrines ($\alpha 3\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$ et $\alpha 9\beta 1$) via d'autres motifs (NVR, LDVP...) indépendamment du RGD (Bornstein, 2009; Calzada et al., 2004a; Staniszewska et al., 2007). Suivant les récepteurs présents à la surface des cellules, la TSP1 peut réguler de nombreux processus biologiques telles que l'adhésion, la migration cellulaire, l'agrégation plaquettaire ainsi que l'angiogenèse.

De plus, la TSP1, par ses deux motifs VVM au niveau du domaine C-terminal, fixe un récepteur de 52 KDa, identifié comme étant une protéine associée aux intégrines (IAP) : le CD47 (Gao et al., 1996). Le complexe TSP1-CD47, à son tour, s'associe aux intégrines et module leur activité (Sipes et al., 1999; Wang and Frazier, 1998). Ce complexe bloque la voie de transduction du monoxyde d'azote (NO), minimisant ainsi la réponse des CE au NO et induisant une diminution du flux sanguin tissulaire (Isenberg et al., 2007; Maxhimer et al., 2009a).

III.2.2.2 CD36 et récepteurs non-intégrines

Outre les intégrines, la TSP1 lie également le récepteur CD36, exprimé à la surface des plaquettes, des CE et des macrophages (Asch et al., 1987). Le CD36 a été identifié comme étant un récepteur « scavenger » qui reconnaît les lipoprotéines de faible densité (LDL) oxydées et les internalise par endocytose, jouant ainsi un rôle important dans l'athérosclérose (Dawson et al., 1997). Il a été également décrit comme étant le médiateur majeur de l'effet anti-angiogénique de la TSP1. L'interaction entre la TSP1 et le CD36 a lieu au niveau de la séquence CSVTCG située dans la seconde et la troisième TSR de la TSP1. Cette interaction inhibe *in vitro* la prolifération, la migration, et la formation de structures en tubes des CE, induisant leur apoptose (Dawson et al., 1997; Jimenez et al., 2000). Des expériences d'inhibition génétique (KO) ou pharmacologique ont permis d'identifier différents effecteurs impliqués dans la cascade de transduction médiée par le CD36, y

compris les protéines kinases activées par des mitogènes (MAPKs), p38 et c-jun N-terminal (JNK), ainsi que la capase-3 (Jimenez et al., 2000). D'autres études montrent aussi l'implication de certains effecteurs apoptotiques tel que Fas Ligand et TNF- α dans la transduction du signal (Rege et al., 2009; Volpert et al., 2002). L'ensemble de ces données ont permis d'assigner au CD36, interagissant avec la TSP1, la fonction de régulateur négatif de l'angiogenèse, jouant ainsi un rôle important dans la croissance tumorale, l'inflammation, la réparation des blessures et aussi dans d'autres processus pathologiques impliquant la néovascularisation (Silverstein and Febbraio, 2009).

Outre le CD36, la TSP1 est également capable de lier d'autres récepteurs non-intégrines qui ne seront pas détaillés dans ce manuscrit, dont les sulfatides, la calréticuline, le LRP1, et les HSPG (protéoglycanes de type héparane sulfate) (Adams, 2001; Clezardin et al., 1997).

III.3 Régulation de la TSP1

La diversité du patron d'expression de la TSP1 montre que cette molécule a une diversité de fonctions. La TSP1 est exprimée dans divers tissus. Son expression subit des modifications importantes dans diverses conditions physiopathologiques. La TSP1 est rapidement et transitoirement libérée à des concentrations élevées en réponse à des lésions tissulaires (Agah et al., 2002; Raugi et al., 1987). La TSP1 est sécrétée dans le cas de l'athérosclérose et de l'hyperplasie intimale artérielle, mais aussi dans le cas de réparation des blessures de la peau, du squelette, des muscles (Moller et al., 1996; Raugi et al., 1990; Roth et al., 1998; Watkins et al., 1990). L'expression de la TSP1 est également élevée dans certaines maladies chroniques des artères coronaires et dans des fibroblastes de la cornée et de l'iris suite au syndrome de glaucome pseudo-exfoliatif (Hiscott et al., 1996; Stenina et al., 2004). Elle est également abondante en cas de polyarthrite rhumatoïde (Gotis-Graham et al., 1997). Suivant les types de tumeurs, ainsi que le stade de développement de ces tumeurs, l'expression de la TSP1 est décrite comme perdue (Henkin and Volpert, 2011) ou au contraire surexprimée (Kawataki et al., 2000a; Lin et al., 2012a; Lin et al., 2012b; Nathan et al., 1994; Ohtani et al., 1999; Yamashita et al., 1998).

Il est donc essentiel de comprendre les mécanismes qui contrôlent la production et les fonctions de la TSP1 dans des conditions anormales, surtout le cancer, pour pouvoir interpréter son expression différentielle qui varie selon les études et les modèles.

III.3.1 Mutations génétiques

Certaines études ont reporté une perte d'hétérozygotie (LOH) au locus codant pour la TSP1, montrant ainsi son rôle de gène suppresseur de tumeur. En effet, un fragment du chromosome 15 contenant le gène THBS1 est perdu dans les kératinocytes transformés et dans 30% des carcinomes à cellules squameuses (SCC) (Bleuel et al., 1999; Fusenig and Boukamp, 1998). Cependant, ces événements sont rares et sont souvent le résultat des dérégulations au niveau d'autres gènes suppresseurs de tumeurs. Dans des fibroblastes isolés de patients présentant la maladie de Li-Fraumeni par exemple, il a été montré que la présence d'un allèle sauvage et d'un allèle muté de la P53 inhibe l'expression de la TSP1 (Dameron et al., 1994). La réexpression de la P53 dans ces cellules se traduit par une induction de la TSP1. Le niveau d'expression de la TSP1 est aussi influencé par d'autres gènes suppresseurs de tumeurs tels que SMAD4 dans le cancer du côlon, ou aussi PTEN dans le glioblastome (Schwarte-Waldhoff et al., 2000; Wen et al., 2001). En revanche, des oncogènes tel que K-ras, c-Myc, c-Jun et c-Met répriment l'expression de la TSP1 (Henkin and Volpert, 2011).

III.3.2 Contrôle épigénétique

Une hyperméthylation de régions du promoteur de la TSP1 a été observée dans les tumeurs des patients atteints de glioblastome et a été corrélée à une diminution de la survie globale (Liu et al., 2010). De la même façon, une hyperméthylation induisant la diminution de l'expression de la TSP1 a été démontrée dans des lignées cellulaires de carcinome gastrique, prostatique et de neuroblastome (Galvez et al., 2011; Guo et al., 2010; Yang et al., 2010). De plus, une ischémie prolongée augmente la méthylation du promoteur de la TSP1 et diminue son expression dans des CE du cerveau de la souris (Hu et al., 2006). Il est ainsi fort probable que l'hyperméthylation du promoteur de la TSP1, dans des tumeurs en hypoxie, facilite leur néovascularisation.

De façon intéressante, le promoteur de la TSP1 est hyperméthylé dans les cellules de carcinome prostatique androgéno-dépendant LNCaP, mais déméthylé dans les cellules C4-2, dérivées des premières et devenues résistantes à la castration (Li et al., 1999; Trojan et al., 2005).

III.3.3 Facteurs environnementaux et chimiokines

L'expression de la TSP1 est également régulée par la présence ou l'absence d'oxygène, de glucose, de calcium et de chimiokines.

L'hypoxie joue un rôle important dans la régulation de l'expression de la TSP1. Des études montrent une diminution de la TSP1 en hypoxie notamment dans les glioblastomes (Tenan et al., 2000). Des résultats similaires ont été obtenus *in vitro* dans des cultures de fibroblastes de rat et de souris, ainsi que dans des cultures de cellules humaines tumorales ou non (Laderoute et al., 2000). Dans cette étude, la diminution de la TSP1 en hypoxie n'est pas transcriptionnelle, les auteurs suggèrent une régulation post-transcriptionnelle de la TSP1. Cependant, des résultats opposés montrent la surexpression de la TSP1 dans des CE en hypoxie, due à une régulation au niveau transcriptionnel, via un mécanisme HIF-1 α dépendant, ce qui favorise le recrutement de cellules musculaires lisses (VSMC). Il en est de même dans des prélèvements de tissus de muscles humains en ischémie. En effet, l'expression de la TSP1 est augmentée dans ces prélèvements principalement au niveau des CE et des macrophages, et cette expression est corrélée avec une MVD plus faible (Favier et al., 2005). La TSP1 augmente également dans des modèles d'ischémie cérébrale de rat et de souris, ainsi que dans des modèles d'infarctus du myocarde chez le rat (Hayashi et al., 2003; Lin et al., 2003; Sezaki et al., 2005).

Dans les VSMC et les CE, les taux de TSP1 sont augmentés par la présence de glucose, via la transcription du récepteur des hydrocarbures polycycliques aromatiques (AhR) (Raman et al., 2011). La sécrétion de la TSP1 par les adipocytes est également augmentée par le glucose, mais cette fois-ci via une régulation post-transcriptionnelle. Dans les cellules mésangiales, des fortes concentrations de glucose bloquent la protéine kinase G (PKG), atténuant ainsi la répression transcriptionnelle de la TSP1 (Zhou et al., 2009). Par contre, une inhibition de l'expression de la TSP1 est associée à une augmentation du glucose dans

la rétinopathie diabétique, suggérant que la régulation de la TSP1 par le glucose est dépendante du contexte (Sheibani et al., 2000).

La partie C-terminale de la TSP1 possède plus de trente sites de fixation pour le calcium qui modulent sa conformation tridimensionnelle ainsi que ses propriétés (Carlson et al., 2008). En effet, l'absence de calcium modifie la conformation de la TSP1, lui permettant de réguler l'exposition de ses sites de liaison à différents partenaires (Calzada et al., 2008). L'absence de calcium augmente la liaison de la TSP1 au collagène de type V (Galvin et al., 1987), alors que sa présence induit des altérations au niveau des interactions entre la TSP1 et trois ligands se fixant à son extrémité N-terminale : l'intégrine $\alpha 3 \beta 1$ (Rodrigues et al., 2001), le TSG-6 (Kuznetsova et al., 2005) et le versican (Kuznetsova et al., 2006). Un polymorphisme au niveau d'un seul nucléotide du premier site de liaison au calcium de la TSP1 est corrélé avec l'apparition d'une maladie artérielle coronaire prématurée (Hannah et al., 2003; Topol et al., 2001). Ce résultat confirme l'implication du calcium dans la régulation des fonctions physiologiques et pathologiques liées à la TSP1. De plus, une étude publiée sur les cancers du rein, montre qu'une diminution du calcium intracellulaire, résultant de la diminution de l'expression d'un canal calcique voltage-indépendant (TRPC4), inhibe la sécrétion et la maturation de la TSP1 déclenchant ainsi un switch angiogénique (Veliceasa et al., 2007).

La TSP1 peut être surexprimée suite à la présence de chimiokines, en particulier CX3CL1 dans les macrophages humains et murins (Lu et al., 2008). En revanche, IL-8 et MIF-1 réduisent la production de la TSP1 dans le carcinome mammaire et le mélanome (Culp et al., 2007). IL-6 et TNF- α inhibent la TSP1 dans les CE via une régulation post-transcriptionnelle (Morandi et al., 1994). De même, PAF (Platelet Activating Factor) atténue l'expression de la TSP1 sécrétée par des myofibroblastes isolés de la cornée, suggérant ainsi un rôle potentiel de ces sécrétions dans le processus de néovascularisation de la cornée (He et al., 2010).

III.4 Fonctions de la TSP1

Différents modèles murins et humains mettent en évidence des rôles dépendant du contexte de la TSP1 in vivo. Le KO de la TSP1 a été décrit en 1998 (Lawler et al., 1998). Les souris déficientes en TSP1 sont fertiles et se développent normalement. Bien que la

viabilité des embryons soit réduite, l'étude ne note pas d'anomalies majeures au niveau du cerveau, du cœur, des reins, de la rate, de l'estomac, des intestins, de l'aorte et du foie. Cependant, le phénotype observé est l'apparition d'une pneumonie (à partir de l'âge de 1 mois), des lordoses légères et variables, et l'augmentation du nombre de monocytes circulants. La pneumonie mais aussi l'inflammation anormale dans les poumons et le pancréas des souris KO-TSP1 présentent de nombreuses similitudes phénotypiques avec celles des souris KO-TGF β 1 (Shull et al., 1992). Elles sont la conséquence de la diminution de l'activation spécifique de TGF β 1 par la TSP1. Malgré le fait que la TSP1 n'est pas la seule activatrice du TGF β 1 latent, il apparaît qu'elle joue un rôle majeur dans son activation, notamment au niveau des poumons et du pancréas. Cette activation est nécessaire pour une homéostasie épithéliale normale et pour le contrôle de la réponse immunitaire (Crawford et al., 1998). Cependant, d'autres fonctions de la TSP1 ont été révélées grâce à des modèles expérimentaux créant des conditions de stress spécifiques. Plusieurs études montrent que la TSP1 régule positivement ou négativement des fonctions cellulaires comme l'adhésion, l'organisation du cytosquelette, la motilité, la migration, la prolifération, la survie et l'apoptose cellulaires (Roberts, 2008). L'intégration de toutes ces fonctions par une seule protéine, telle que la TSP1, implique des effets très complexes, parfois contradictoires au cours de la progression tumorale. La TSP1 peut-être pro-tumorale ou anti-tumorale selon le contexte, les partenaires présents et les récepteurs exprimés.

III.4.1 TSP1, une protéine anti-tumorale

L'effet anti-tumoral de la TSP1 a souvent été associé avec son rôle inhibiteur de l'angiogenèse. La TSP1 exerce cette fonction par des mécanismes directs et indirects (Kazerounian et al., 2008). Les effets directs de la TSP1 passent via son interaction avec des récepteurs spécifiques présents à la surface des CE (le CD36, le CD47, les intégrines, les HSPGs et les LRP), induisant ainsi une répression de la mobilité, une inhibition de la chimotaxie induite par des cytokines, un arrêt du cycle cellulaire ainsi qu'une induction de l'apoptose (Henkin and Volpert, 2011). Outre les CE, la TSP1 est capable d'interagir aussi avec ses récepteurs exprimés à la surface des cellules musculaires lisses, des monocytes/des macrophages et des cellules T (Taraboletti et al., 2010). La TSP1 agit

directement sur les cellules endothéliales circulantes et les cellules endothéliales progénitrices (EPC) en réduisant leur mobilisation (Shaked et al., 2005). Les effets indirects incluent la liaison de la TSP1 à différents modulateurs de l'angiogenèse, tels que des facteurs angiogéniques, des cytokines et des protéases, et la modulation de leur activité et de leur biodisponibilité cellulaires (Henkin and Volpert, 2011). Parmi ceux-ci, citons par exemple le FGF-2, le VEGF, le HGF et le PDGF. En effet, la TSP1 est capable de séquestrer le bFGF et le VEGF qui sont sécrétés par les cellules non endothéliales, et qui sont indispensables pour la survie et la migration des CE (Gupta et al., 1999; Margosio et al., 2003). La TSP1 est également capable de promouvoir l'internalisation du VEGF via les LRP, réduisant ainsi les niveaux du VEGF (Greenaway et al., 2007). De plus, la TSP1 augmente le recrutement des VSCM nécessaire à la stabilisation du remodelage des capillaires et à la quiescence vasculaire (Isenberg et al., 2005). Enfin, la TSP1 induit l'apoptose des macrophages activés, réduisant ainsi le niveau de cytokines inflammatoires qui sont sécrétées et qui interviennent dans le processus angiogénique (Johansson et al., 2004).

La TSP1 a donc été le premier agent anti-angiogénique identifié, qui favorise la prolifération et l'apoptose de différents types cellulaires (Good et al., 1990; Taraboletti et al., 1990). L'effet de la TSP1 sur la prolifération est dépendant du type cellulaire. La TSP1 synergise avec l'EGF et le PDGF pour promouvoir la prolifération des cellules musculaires lisses (Majack et al., 1988), alors qu'elle inhibe la prolifération des CE et induit leur apoptose (Bagavandoss and Wilks, 1990; Guo et al., 1997). L'activité anti-angiogénique de la TSP1 mesurée dans la cornée de souris est perdue chez les souris KO pour le CD36, suggérant que ce récepteur soit celui qui médie l'essentiel des activités anti-angiogéniques de la TSP1 (Ambati et al., 2006; Jimenez et al., 2000). Cependant une autre étude montre que l'angiogenèse est affectée par la présence de la TSP1, indépendamment de la présence du CD36, dans un extrait de muscles de souris (Isenberg et al., 2007). Ce résultat confirme que des récepteurs de la TSP1, autre que le CD36, sont aussi impliqués dans l'effet angiostatique qui lui est associé. La TSP1 peut se lier par exemple aux intégrines $\beta 1$ et stimuler ainsi la migration des CE (Calzada et al., 2004a; Calzada et al., 2004b). Elle peut également, via le CD47, inhiber l'activation du VEGFR2 par rupture de l'association

constitutive entre le VEGFR2 et le CD47 à la surface membranaire (Maxhimer et al., 2009a; Maxhimer et al., 2009b).

Le rôle de la TSP1 dans l'inhibition de l'angiogenèse dans les tumeurs primaires est très largement documenté dans la littérature. Une perte d'expression de la TSP1, associée à une augmentation de l'angiogenèse, est souvent observée dans différents types de cancers surtout aux stades précoces du développement tumoral. Des observations cliniques ont notées cette diminution de la TSP1, que ce soit dans les carcinomes localisés de la prostate (Colombel et al., 2005; Shafer et al., 2007), ou dans les carcinomes lobulaires ou canauxaires in situ du sein (Cleazardin et al., 1993; Fontana et al., 2005).

De ce fait, différentes approches thérapeutiques ont été proposées pour exploiter les propriétés anti-angiogéniques de la TSP1. Des approches expérimentales de thérapie génique, induisant l'augmentation des niveaux d'expression de la TSP1, ont montré l'efficacité d'une production constante de la TSP1 sur le contrôle de l'angiogenèse et de la croissance des tumeurs primaires (Streit et al., 2002; Zhang et al., 2007). Cependant, l'utilisation de ce type d'approches en clinique est encore très limitée. Alternativement, des propriétés anti-angiogéniques ont été associées à différentes molécules thérapeutiques, capables de stimuler la production de la TSP1, dont le fénofibrate, la trichostatin-A ou les inhibiteurs des ADN méthyltransférases ou des histones déacétylases [pour revue (Rusnati et al., 2010)]. De plus, les études de Robert Kerbel proposent que la surexpression de la TSP1 soit un indicateur de l'efficacité de la chimiothérapie métronomique basée sur l'administration fréquente de drogues chimiothérapeutiques à faibles doses et sans période de repos prolongé (Bocci et al., 2003; Yap et al., 2005). Toutefois, l'ensemble de ces données ne permettent pas de prédire si la surexpression non-sélective de la TSP1 est indirectement responsable des effets positifs observés ou si elle est juste un des facteurs, parmi beaucoup d'autres, qui y sont impliqués.

Trois séquences de la TSP1 sont impliquées dans le rôle direct anti-angiogénique de la TSP1, l'une dans la région procollagène et les deux autres dans la seconde (TSR2) et la troisième (TSR3) répétition de type I de la TSP1 (Dawson et al., 1999; Iruela-Arispe et al.,

1999; Tolsma et al., 1993). Sur la base de ce constat, trois peptides anti-angiogéniques dérivées des TSR2 et des TSR3 ont été développées par les laboratoires de la société Abbott (Figure 18): ABT-510, ABT-526 et ABT-898 pour mimer l'activité anti-tumorale de la molécule complète de la TSP1 (Henkin and Volpert, 2011; Rosca et al., 2011). Ces peptides diffèrent par leur capacité de clairance de l'organisme et leur efficacité.

SPWdIASVTAG - GV	Q	KR	SK	TSR3
SPWdIASVTCGDGV	I	TR	IR	TSR2
SPWdIASVTCGDGV	- d-Ile	- TR	IR	dl-TSP
NAc-Sar-GV	- d-Ile	- TNvalRP-NHEt		ABT-526
NAc-Sar-GV-d-allolle-TNvalRP-NHEt				ABT-510
NAc-GV-d-allolle-S	Q	IRP-NHEt		ABT-898

Figure 18: Développement de peptides dérivés de la TSP1 (Henkin and Volpert, 2011).

Le bénéfice thérapeutique de ces peptides a été très encourageant dans différentes études précliniques. En effet, dans des modèles murins de glioblastomes, de cancers ovarien et prostatique, l'utilisation de l'ABT-510 réduit la croissance des tumeurs primaires et la MVD qui leur est associée (Anderson et al., 2007; Greenaway et al., 2009).

Cependant, des travaux non publiés du laboratoire, réalisés pour le compte de la société Abbott, montrent que si la croissance des tumeurs prostatiques xénogreffées est inhibée dans un premier temps par la TSP1, comme par le peptide ABT-510, cet effet n'est que transitoire dans les deux cas. De plus, l'utilisation de l'ABT-510 dans des études cliniques de phase II n'ont pas fait preuve d'efficacité thérapeutique suffisante chez des patients atteints de mélanomes ou de sarcomes de tissus mous (Baker et al., 2008; Markovic et al., 2007). Malgré une absence de toxicité, une réponse modeste, une stabilisation de la maladie dans certains cas et les observations prometteuses des études précliniques réalisées chez le chien, ces thérapies basées sur l'imitation des effets anti-angiogéniques de la TSP1 n'ont pas réussi à être utilisées pour des fins thérapeutiques en clinique (Henkin and Volpert, 2011; Sahora et al., 2012). Ces études montrent que l'utilisation de la TSP1 ou de peptides dérivées de la TSP1 n'a pas les effets escomptés sur les tumeurs. Ce cas de figure a été aussi observé avec des inhibiteurs pharmacologiques de l'angiogenèse tel que

l'Avastin ou le Sunitinib. Comme décrit ci-dessus, ces molécules se sont montrées peu efficaces en clinique suite au développement de mécanismes de résistance et à l'accélération du phénotype agressif de la tumeur. L'ensemble de ces résultats remettent en cause les vrais rôles associés aux inhibiteurs de l'angiogenèse, qu'ils soient naturels ou pharmacologiques, et surtout leur implication directe dans la progression tumorale et la dissémination métastatique.

III.4.2 TSP1, une protéine pro-tumorale

Un nombre important d'études classe la TSP1 comme étant un gène suppresseur de tumeurs du fait de sa capacité à inhiber l'angiogenèse. Cependant, des études rapportent des effets complètement contradictoires. Ces résultats paradoxaux sont probablement dus aux effets souvent opposés exercés par la TSP1 sur la tumeur primaire d'une part, et sur les métastases d'autre part. En effet, une étude basée sur le croisement de souris KO-TSP1 et de souris développant spontanément des tumeurs mammaires a montré que les tumeurs primaires sont plus petites chez les souris exprimant la TSP1 que celles invalidées pour la TSP1 (Yee et al., 2009). Cet effet observé est le résultat de l'inhibition de la MVD associée à la présence de la TSP1. Cependant, on observe une diminution des métastases chez les souris KO-TSP1. Ce duel de fonctions a été aussi observé en clinique où la surexpression de la TSP1 est associée à une diminution de la MVD et de la croissance des tumeurs primaires de cholangiocarcinome hépatique, mais aussi avec une augmentation de l'occurrence des métastases hépatiques (Tang et al., 2006). Un certain nombre d'études montrent une surexpression de la TSP1 dans différents types de cancers chez l'Homme (Albo et al., 1997; Byrne et al., 2007; Clezardin et al., 1993; Firlej et al., 2011; Fontana et al., 2005; Ohtani et al., 1999; Pectasides et al., 2012; Pratt et al., 1989; Roh et al., 2009; Suh et al., 2011; Tuszynski et al., 1992; Wang-Rodriguez et al., 2003; Wang et al., 1996; Wong et al., 1992). Citons par exemple que 74,5% (29/39) des tumeurs de patients atteints de cancer de la vésicule biliaire de stade T2 ou T3 (classification TNM) expriment la TSP1, alors qu'aucune (0/14) des tumeurs de stade 1 ne l'exprime (Ohtani et al., 1999). Des taux élevés de TSP1 plasmatiques ont été également corrélés avec l'augmentation de l'invasion du carcinome colorectal (Yamashita et al., 1998), du cancer du sein (Byrne et al., 2007), et des cancers

gynécologiques (Nathan et al., 1994). Okada et al. ont proposé que la TSP1 pourrait être un marqueur pronostic d'invasion des néoplasmes mucineux papillaires intracanalaires du pancréas (Okada et al., 2010). Dans les glioblastomes, on observe une augmentation simultanée au cours de la progression tumorale de l'expression de la TSP1 et de différentes isoformes du TGF β (Kawataki et al., 2000b).

Cette association entre l'expression de la TSP1 et l'augmentation de l'invasion et de la formation de métastases est liée aux différentes fonctions médiées par la TSP1, dont l'attachement, l'adhérence et la migration cellulaire. Divers travaux ont décrit des propriétés adhésives et anti-adhésives de la TSP1 sur les plaquettes, les fibroblastes, les CE, les cellules musculaires ainsi que de nombreuses lignées tumorales, tels que les modèles cellulaires d'ostéosarcome, de mélanome ou de carcinome mammaire (Adams, 1995; McClenic et al., 1989; Murphy-Ullrich and Hook, 1989); (Decker et al., 2002); (Wang et al., 1996). Cette régulation de l'adhésion cellulaire peut être médiée via la régulation de l'expression des protéines d'adhérence telles que les intégrines (Adams and Lawler, 1993; Staniszewska et al., 2007). En effet, la TSP1 augmente l'expression de l'intégrine $\alpha 6$ au niveau des kératinocytes humains et également au niveau des cellules cancéreuses mammaires, permettant ainsi leur adhésion à la MEC (John et al., 2010). De façon intéressante, l'expression de l'intégrine $\alpha 6$ est requise pour la croissance et la survie d'une sous-population de cellules tumorales souches mammaires (Cariati et al., 2008). Ces propriétés d'attachement liées à la TSP1 facilitent la migration et l'invasion à travers la MEC qui sont cruciales pour la progression tumorale. De plus, la TSP1 est capable de moduler l'activité protéolytique à l'intérieur de la MEC. Elle peut réguler l'expression de la protéine uPAR qui est augmentée d'un facteur de 2, et l'invasion des cellules tumorales mammaires qui est augmentée d'un facteur de 7 à 8 (Albo et al., 1999; Albo et al., 1997). En parallèle, la TSP-1 peut interagir avec les MMPs (Bein and Simons, 2000). Toutefois, une même molécule de TSP-1 représente à elle seule une source d'activation et d'inhibition de la MMP2 dans la mesure où le fragment de liaison à l'héparine de 25 kDa de la TSP1 stimule la synthèse et l'activation de la MMP2 et inhibe l'expression de TIMP2, alors que le fragment C-terminal de 140 kDa agit de façon opposée (Taraboletti et al., 2000). En résumé, la TSP1 peut soit augmenter la protéolyse matricielle permettant aux cellules tumorales de

migrer, soit inhiber une dégradation excessive de la MEC pour préserver un attachement minimal cellules/MEC nécessaires à l'invasion tumorale. De ce fait, plusieurs études ont décrit la capacité de la TSP1 à favoriser la migration et l'invasion de nombreuses lignées cellulaires normales et tumorales (Sargiannidou et al., 2001). Il a même été montré que tous les fragments de la TSP1, pris séparément, étaient capables de favoriser la migration des cellules musculaires lisses (Seymour et al., 2011). Ce résultat suggère que l'effet pro-tumoral de la TSP1 n'est pas lié à un domaine unique. L'intégralité de la protéine TSP1 peut jouer le rôle d'un promoteur tumoral et métastatique.

Il s'ensuit donc que des mécanismes de résistance aux effets anti-angiogéniques de la TSP1 sont capables d'apparaître, de façon similaire à ceux développés à la suite de l'utilisation des anti-angiogéniques pharmacologiques. En effet, la comparaison de l'expression de la TSP1 dans les cellules tumorales et dans le stroma montre que dans les stades précoces des carcinomes mammaires, le niveau de la TSP1 est suffisant pour inhiber la néovascularisation (Fontana et al., 2005). Cependant une exposition prolongée à la TSP1 n'induit plus une diminution de la croissance tumorale. De plus, cette étude montre qu'une forte expression de la TSP1 est facteur de mauvais pronostic sur la survie des patientes. Ce mécanisme de résistance a également été démontré dans des modèles de glioblastomes et de fibrosarcomes (Filleur et al., 2001). En effet, l'expression de TSP1 dans ces modèles retarde dans un premier temps la croissance tumorale. Cependant une exposition prolongée à la TSP1 n'a plus aucun effet sur les tumeurs. De plus, la TSP1 ne diminue plus la formation de métastases pulmonaires sur les cellules isolées de tumeurs résistantes à la TSP1.

Non seulement les tumeurs résistent à l'effet anti-tumoral de la TSP1 mais elles peuvent également devenir plus agressives suite à une administration continue de la TSP1, de façon similaire à une exposition prolongée à l'Avastin ou au Sunitinib. En effet, des tumeurs de glioblastomes in vivo traitées au peptide TSP1-ang - peptide contenant les deux cystéines impliquées dans la trimérisation, le domaine procollagène et les répétitions de types I - deviennent plus invasives et plus agressives que les contrôles (de Fraipont et al., 2004). De plus, le prétraitement des souris par de la TSP1 humaine suivi d'une injection de cellules de sarcomes en intraveineux potentialise leurs capacités de se coloniser au niveau des

poumons (Tuszynski et al., 1987). Ces phénomènes de résistance et d'augmentation d'agressivité tumorale liés à l'inhibition de l'angiogenèse nécessitent donc une réévaluation des propriétés des inhibiteurs de l'angiogenèse, et en particulier la TSP1, dans la progression tumorale et la dissémination métastatique.

Objectifs de la thèse

Il a fallu plus d'une trentaine d'années avant que les premiers anti-angiogéniques pharmacologiques ne soient développés en clinique pour cibler la néo-vascularisation tumorale et «asphyxier» ainsi la tumeur. Cependant, ces médicaments ont fini par décevoir, ne permettant pas toujours l'augmentation de la survie espérée, en particulier, dans le cancer de la prostate chez l'homme et dans le cancer du sein chez la femme (Kelly et al., 2012; Stevenson et al., 2012; Wu and Staton, 2012). En effet, alors qu'à l'heure actuelle, aucun médicament anti-angiogénique n'a prouvé son efficacité et n'a été utilisé en clinique pour le traitement du cancer de la prostate, l'utilisation de l'Avastin a été interdite par la FDA en novembre 2011 pour le traitement du cancer du sein métastatique. L'échec de ces thérapies anti-angiogéniques est dû au développement de mécanismes de résistance en réponse à ces traitements (Bergers and Hanahan, 2008; Ebos et al., 2009; Paez-Ribes et al., 2009). Ces résultats nous ont incités à réévaluer le rôle de la TSP1 dans la progression tumorale prostatique et mammaire. Des travaux publiés précédemment au laboratoire ont montré que la MVD est inversement corrélée avec l'expression de la TSP1 dans les stades précoces de ces 2 types de carcinomes (Colombel et al., 2005; Fontana et al., 2005). Cependant, cette corrélation ne perdure pas aux stades avancés, que ce soit dans les tumeurs de prostate hormono-réfractaires ou dans les métastases ganglionnaires mammaires. De plus, la forte expression de TSP1 a été corrélée avec un mauvais pronostic sur la survie sans rechute des patientes (Fontana et al., 2005). Au début de ma thèse, j'ai participé à l'étude du rôle de la TSP1 dans les carcinomes prostatiques. Ma contribution à ce papier a été de démontrer que le rôle pro-tumoral de la TSP1 observé *in vivo* était associé à la diminution de l'expression des ARNm de trois marqueurs d'hypoxie : VEGF, CAIX et Glut1. J'ai également montré que l'expression de la TSP1 était régulée par le calcium puisque l'inhibition de l'expression d'un canal calcique, le TRPV3, *in vitro* dans des modèles cellulaires de carcinomes prostatiques entraîne une diminution de l'expression protéique de la TSP1. Ces études ont fait l'objet d'un article publié dans « Cancer Research ». En parallèle, j'ai monté un modèle préclinique de cancer mammaire métastatique afin de déterminer l'implication de la TSP1 dans différentes étapes de la

dissémination des cellules tumorales à distance. Ces études ont fait l'objet d'un deuxième article en 1^{er} auteur qui est en voie de soumission.

**Article N°1 : Rôle de la TSP1 dans la progression tumorale
prostatique.**

Introduction

Avec plus de 71 000 nouveaux cas estimés en France en 2011, le cancer de la prostate se situe au premier rang des cancers incidents chez l'homme (Figure 19), nettement devant le cancer du poumon (27 500 cas) et le cancer colorectal (21 500 cas). Au niveau épidémiologique, le carcinome de la prostate représente ainsi 34% de l'ensemble des cancers incidents masculins en 2011.

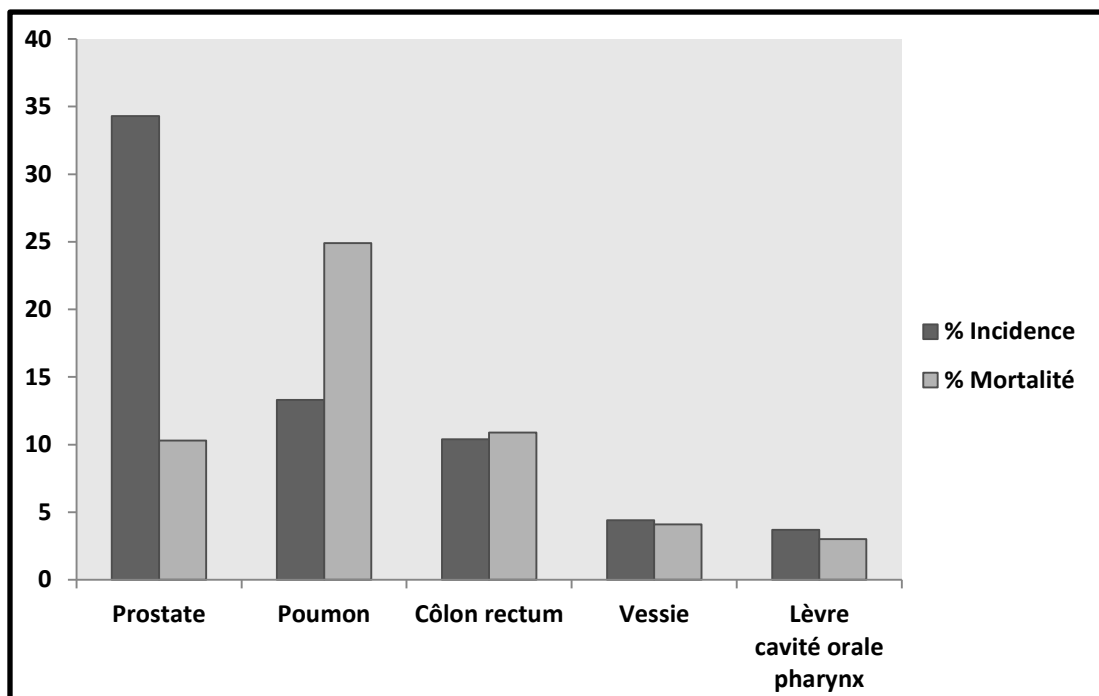


Figure 19 : Incidence et mortalité estimées des cancers en France métropolitaine chez l'homme en 2011
(d'après l'Institut National du Cancer).

Au niveau biologique, la croissance des tumeurs prostatiques est initialement dépendante des androgènes qui régulent la prolifération, la survie, l'angiogenèse et la migration des cellules épithéliales de la prostate. Ainsi, dans les premiers stades de ces cancers, une ablation androgénique est effectuée en routine pour inhiber la croissance tumorale. Cependant, ces tumeurs développent une résistance à la castration et récidivent avec un mauvais pronostic.

La TSP1 joue un rôle important dans l'homéostasie prostatique. Son expression est réprimée en présence d'androgènes (Colombel et al., 2005). Chez les souris invalidés pour la TSP1, on observe une hyperplasie prostatique caractérisée par une augmentation de l'angiogenèse et de la prolifération des cellules épithéliales (Fitchet et al., 2010). Ces régulations semblent être maintenues aux premiers stades du développement tumoral. En effet, dans les carcinomes de la prostate androgéno-dépendants (ADCaP), l'expression de la TSP1 est réprimée, et la MVD est inversement corrélée avec cette expression (Colombel et al., 2005; Kwak et al., 2002). La castration androgénique provoque sa ré-expression. Cependant, cette corrélation n'est plus retrouvée dans les stades avancés résistants à la castration (CRCaP) où la TSP1 est fortement exprimée malgré la présence d'une forte MVD (Colombel et al., 2005; Kaygusuz et al., 2007). Nous nous sommes donc intéressés au rôle et aux mécanismes de régulation de la TSP1 dans les CRCaP, notamment via l'homéostasie calcique et l'hypoxie.

La TSP1 est un puissant chélateur du calcium au niveau de son domaine C-terminal (Carlson et al., 2008). Des études montrent que la concentration intracellulaire calcique régule la sécrétion et la synthèse de la TSP1 (Veliceasa et al., 2007). A l'heure actuelle, il est largement admis que le flux de calcium à travers la membrane plasmique régule des processus cellulaires importants en rapport avec la progression tumorale, incluant la prolifération, la migration et l'apoptose (Monteith et al., 2012). La signalisation du calcium à travers les canaux calciques voltages-indépendants (TRP), est cependant la plus largement documentée dans la littérature (Lehen'kyi and Prevarskaya, 2011). C'est le cas par exemple des canaux TRPV6, TRPM8 et TRPV2 qui ont été montrés comme étant surexprimés dans les carcinomes prostatiques (Lehen'kyi et al., 2007; Monet et al., 2009; Tsavaler et al., 2001). La concentration intracellulaire calcique étant fortement augmentée par l'hypoxie, nous avons donc étudié la relation entre l'hypoxie, l'homéostasie calcique et la TSP1 dans la progression tumorale prostatique, et en particulier, nous avons exploité le rôle de plusieurs canaux calciques de la famille des TRP dans ce mécanisme.

La TSP1 joue un rôle majeur dans l'inhibition de l'angiogenèse en interagissant avec différents récepteurs et ligands, notamment le CD36 exprimé à la surface des CE (Good et al., 1990; Henkin and Volpert, 2011; Jimenez et al., 2000). Cette fonction a permis

d'assigner à la TSP1 un rôle anti-tumoral. Cependant, d'autres études montrent que ses effets anti-angiogéniques peuvent être perdus ou contournés par la sécrétion de facteurs angiogéniques tel que le VEGF (Filleur et al., 2001). De plus, certaines études démontrent une surexpression de la TSP1 dans différents types de cancers, suggérant un rôle plutôt pro-tumoral associé à cette protéine (Albo and Tuszynski, 2004; John et al., 2009; Lin et al., 2012a). De façon intéressante, l'expression du CD36 n'est pas exclusive aux CE, du fait que les cellules tumorales prostatiques l'expriment aussi à leur surface (Colombel et al., 2005). L'ensemble de ces données nous a incités à réévaluer l'effet de la TSP1 au niveau des tumeurs prostatiques et à analyser si cet effet est médié par le CD36 ou par un autre type de récepteurs.

Thrombospondin-1 Triggers Cell Migration and Development of Advanced Prostate Tumors

Virginie Firlej¹, Jacques R.R. Mathieu¹, Cristèle Gilbert¹, Loïc Lemonnier², Jessica Nakhli^{1,3}, Catherine Gallou-Kabani³, Basma Guarnit⁴, Aurélie Morin¹, Natalia Prevarskaya², Nicolas Barry Delongchamps^{1,5}, and Florence Cabon^{1,3}

Abstract

The antitumor effects of pharmacologic inhibitors of angiogenesis are hampered in patients by the rapid development of tumor resistance, notably through increased invasiveness and accelerated metastasis. Here, we reevaluated the role of the endogenous antiangiogenic thrombospondin 1 (TSP1) in prostate carcinomas in which angiogenesis is an active process. In xenografted tumors, we observed that TSP1 altogether inhibited angiogenesis and fostered tumor development. Our results show that TSP1 is a potent stimulator of prostate tumor cell migration. This effect required CD36, which also mediates TSP1 antiangiogenic activity, and was mimicked by an antiangiogenic TSP1-derived peptide. As suspected for pharmacologic inhibitors of angiogenesis, the TSP1 capacities to increase hypoxia and to trigger cell migration are thus inherently linked. Importantly, although antiangiogenic TSP1 increases hypoxia *in vivo*, our data show that, in turn, hypoxia induced TSP1, thus generating a vicious circle in prostate tumors. In radical prostatectomy specimens, we found TSP1 expression significantly associated with invasive tumors and with tumors which eventually recurred. TSP1 may thus help select patients at risk of prostate-specific antigen relapse. Together, the data suggest that intratumor disruption of the hypoxic cycle through TSP1 silencing will limit tumor invasion. *Cancer Res*; 71(24): 7649–58. ©2011 AACR.

Introduction

Studies over the past 30 years have shown that angiogenesis is a key process in progression of cancer from an *in situ* lesion to invasive and metastatic disease, providing the rationale for the development of antiangiogenic therapies. Several antiangiogenic molecules are already in use or under clinical trial to treat various cancers, including prostate tumors (1). These treatments, which mostly target the VEGF pathway, can lead to disease stabilization and longer periods of progression free survival, but substantial benefits remain unrealized for the vast majority of patients in terms of overall survival because tumors elicit evasive resistance (2). Recent evidences in preclinical

models suggest that anti-VEGF therapies, although inhibiting the growth of primary tumors, promote tumor invasiveness and metastasis (3, 4). Treatment of mice with the antiangiogenic sunitinib was recently shown to foster the implantation into lungs of intravenously injected tumor cells (4). Interestingly, a comparable effect was reported more than 20 years ago with the endogenous antiangiogenic molecule Thrombospondin 1 (TSP1; ref. 5), and the TSP1-derived antiangiogenic peptide ABT-510 failed to show antitumor effects in 2 phase II clinical trials (6, 7). We hypothesized that the capacities to increase hypoxia and to trigger cell migration were inherently linked and that this link was shared by endogenous and pharmacologic inhibitors of angiogenesis. We thus reevaluated in experimental and clinical prostate tumors the role of TSP1, the first antiangiogenic molecule characterized (8).

TSP1 is a large—450 kDa—trimeric calcium-binding molecule composed of several domains (9), which binds to numerous ligands and receptors, including several integrins and the scavenger receptor CD36. TSP1 inhibits *in vitro* the migration of endothelial cells and induces their apoptosis (10). TSP1 expression is inhibited in a large number of tumors, including breast and androgen-dependent prostate carcinomas (ADCaP) in which there is an inverse correlation between TSP1 expression and microvessel density (MVD; refs. 11–13). The growth of prostate tumors is initially strictly dependent on androgens, and androgen ablation efficiently inhibits tumor growth. However, tumors eventually become resistant to castration, and recur with a poor prognosis. We previously reported that TSP1 expression is high, and no longer associated with a reduced MVD, in castration-resistant prostate carcinomas (CRCaP;

Authors' Affiliations: ¹CNRS, FRE3239, Université Paris Sud, Villejuif; ²INSERM U-1003, Université des Sciences et Technologies de Lille, Ville-neuve d'Ascq; ³SeleXel, BP50624, Toulouse; ⁴INSERM U895, Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire, Nice; and ⁵Department of Urology, Cochin Hospital, Paris Descartes University, Paris, France

Note: Supplementary data for this article are available at Cancer Research Online (<http://cancerres.aacrjournals.org/>).

V. Firlej and J.R.R. Mathieu contributed equally to the study.

Current address for F. Cabon: INSERM UMR1037, 1 avenue Jean Poulhes, Toulouse Cedex 4, France.

Corresponding Author: Florence Cabon, INSERM UMR1037, 1 avenue Jean Poulhes, 31403 Toulouse Cedex 4, France. Phone: 33-974-76-29-23; Fax: 33-974-76-29-47; E-mail: florence.cabon@inserm.fr

doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-0833

©2011 American Association for Cancer Research.

ref. 11), and in breast metastases (12), suggesting that TSP1 might stimulate tumor development. We therefore analyzed in prostate tumors the functions of TSP1 and the mechanisms controlling its expression, notably by regulators of calcium homeostasis and hypoxia.

It is now well established that calcium, which binds to the type III repeats of TSP1 and modifies its folding and properties (9, 14), regulates proliferation, differentiation, and apoptosis of cancer cells (15). The role of calcium signaling in migration and metastasis becomes now more and more evident. Indeed, the cyclic morphologic and adherence changes observed during cell migration are accompanied by repetitive changes in intracellular cytosolic calcium concentration ($[Ca^{2+}]_i$) depending on Ca^{2+} influx through channels located on the plasma membrane. The molecular nature of these channels in migrating cells, and even more so for metastatic cancer cells, is still largely unknown. Accumulating evidences suggest that the development of some cancers involves ion channel aberrations, notably in the prostate in which several nonvoltage-dependent cationic channels of the transient receptor potential (TRP) family were shown to be key players in calcium homeostasis (15). For instance, TRPM8 (16), TRPV6 (15), and TRPV2 (17) are differentially expressed between normal prostate and prostate carcinomas, and androgens regulate the expression of TRPM8 and TRPV3 (18). We therefore studied the role of calcium and calcium-permeable channels in the regulation of TSP1 and in the migration of prostate cancer cells.

Patients, Materials, and Methods

Reagents and siRNA

Camphor, thapsigargin, and $COCl_2$ were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier). TSP1 antibodies (Ab-1, Ab-4, and Ab-11) were from Neomarkers (Interchim), tubulin antibody from Sigma-Aldrich, collagen IV antibody from Novotec, hamster anti-CD31 clone 2H8 from Pierce, and Alexa-Fluor goat anti-rabbit 488 and Alexa-Fluor goat anti-mouse 568 were purchased from Molecular probes. siRNAs were purchased from Sigma-Aldrich. Sequences used are indicated in Supplementary Table S1. ABT-510 was a generous gift from Abbott laboratories.

Cell culture and transfection

LNCaP and C4-2 cells were grown in RPMI containing 10% fetal calf serum, PC-3 cells in Dulbecco's Modified Eagle's Medium containing 10% fetal calf serum. Hiperfect reagent (Qiagen) was used to transfect cells in 24-well plates with the indicated siRNAs (10 nmol/L) as recommended by the manufacturer. For hypoxic conditions, cells were cultured at 37°C with 5% CO_2 , 94% N_2 , and 1% O_2 in a hypoxic incubator (Binder GmbH). In some experiments, to mimic hypoxia, cells were grown in the presence of 300 μ mol/L cobalt chloride.

Migration assay

Migration capacity was measured by Transwell assays (BD Biosciences). Cells (40,000) were seeded in RPMI 1% FBS in the upper part of a cell culture-chamber-insert system

separated from the lower chamber by a 8 μ m PET membrane. RPMI 10% FBS, or cell-conditioned medium, was added in the lower compartment as indicated. Eighteen hours later, nonmigrating cells in the upper compartment were scrapped off with a cotton swab. Cells on the lower side of the membrane were fixed with methanol at $-20^\circ C$ and stained with Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich). Membranes were then excised, mounted on a glass slide with glycerol (Dako) and cells counted.

Real-time reverse transcriptase PCR, siRNA, and mRNA analysis

Total RNA was isolated with TRIzol reagent (Invitrogen). RNA was retrotranscribed using the High capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). cDNA was quantified by real-time PCR using the *Power* SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Human cyclophilin A was used as an internal control. Sequences of the PCR primers are indicated in Supplementary Table S2.

ELISA

TSP1 and VEGF protein contents in cell homogenates and supernatant were measured by ELISA (Quantikine, R&D systems).

Calcium imaging

Cytosolic Ca^{++} concentration was measured using ratio-metric dye Fura-2 (Invitrogen Ltd.) and quantified as described (19). Cells were loaded with 1 μ mol/L Fura-2/AM for 45 minutes, washed and bathed for at least 10 minutes in a solution containing 140 mmol/L NaCl, 5 mmol/L KCl, 1 mmol/L $MgCl_2$, 10 mmol/L HEPES, and 10 mmol/L glucose, before measuring Ca^{2+} .

Animals, siRNA injection, and tumorigenicity assays

Studies involving animals, including housing and care, method of euthanasia, and experimental protocols, were conducted in accordance with the local animal ethical committee in the Institut André Lwoff in Villejuif, France. Tumor cells (2×10^6 cells/mouse) were injected subcutaneously in 50% (v:v) Matrigel (BD Biosciences) to 6- to 8-week-old male nude mice and tumors were measured every day. When tumors grew exponentially, siRNA diluted in PBS was injected i.p. on a daily basis (120 μ g/kg). Tumor volume was estimated by the formula: length $\times$ width² $\times$ 0.5.

Subjects

Prostate tissue samples were obtained from 35 patients who underwent radical prostatectomy. Written consent was obtained from each patient. Immediately after prostate removal, small pieces of tissues were gross dissected by the pathologist, snap frozen, and stored in liquid nitrogen until analysis in tumor banks of the Centre hospitalier Lyon Sud (Lyon, France), groupe hospitalier Cochin-Saint Vincent de Paul (Paris, France), or CHU Henri Mondor (Créteil, France). Histologic analysis of a frozen section was conducted for each sample by the same pathologist before RNA extraction. The fragments fully constituted of cancerous glands were

selected and named "tumor" samples, whereas those that did not contain cancerous tissue were selected and named "peritumoral tissue."

Statistical analysis

Results are expressed as mean $\pm$ SEM. Differences between means were studied using a 2-tailed *t* test or ANOVA when 2 groups or more than 2 groups were compared respectively. *In vivo* experiments were analyzed by 2-way ANOVA with repeated measures followed by a Bonferroni post test. Statistically significant results are labeled as follows in all figures: *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$. Statistical analysis was done with GraphPad Prism5 (GraphPad Software Inc.).

Results

TSP1 is repressed in ADCaP but reexpressed in CRCaP and AICaP cell lines

The TSP1 promoter is methylated in the ADCaP cell line LNCaP (20) and accordingly, TSP1 mRNA and protein levels are very low (Fig. 1A-B). In contrast, we found a sustained TSP1 expression in C4-2 cells, which were established from LNCaP tumors recurring in mice after castration (21). TSP1 was also found expressed, at the mRNA (Fig. 1A) and protein (Fig. 1B) levels, in the CRCaP cell line 22RV1, and in the androgen-independent (AICaP) PC3 cell line which does not express the androgen receptor.

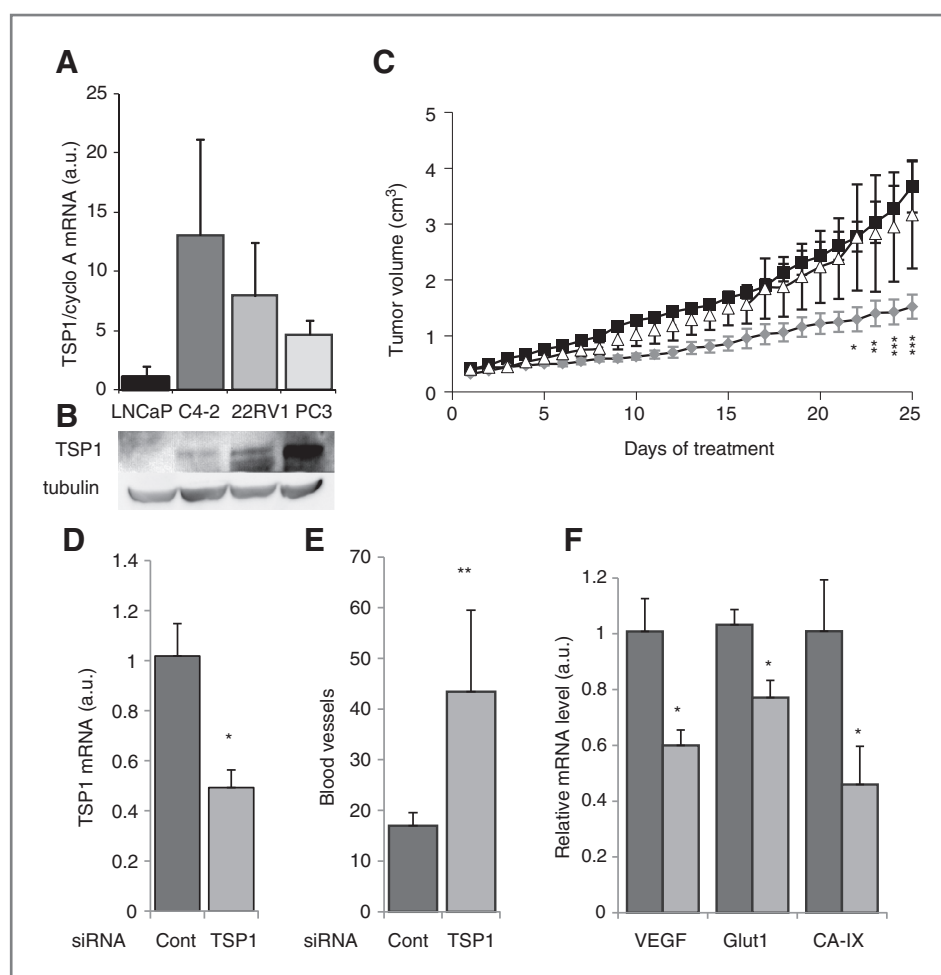


Figure 1. TSP1 is antiangiogenic but fosters tumor development in castration-resistant prostate tumors. A, TSP1 mRNA level in androgen-dependent (LNCaP), castration-resistant (C4-2 and 22RV1), or androgen-independent (PC3) prostate tumor cells. Results (mean $\pm$ SEM, $n > 3$) are normalized to the cyclophilin A mRNA level and expressed in arbitrary units (LNCaP set to 1). B, corresponding TSP1 protein level in the same prostate cell lines. Tubulin was used as a loading control. C, mice bearing exponentially growing C4-2 tumors were treated daily with i.p. injections of PBS (white triangles), control (black squares), or TSP1-siRNA (grey diamonds). All siRNAs were diluted (120 μ g/kg) in PBS. Tumor volume is expressed in cm³ (mean $\pm$ SEM, 6 mice per group). The experiment was repeated 3 times with comparable results. Tumor volumes in TSP1-siRNA-treated mice are significantly different from cont-siRNA-treated group (2-way ANOVA followed by a Bonferroni test: $P < 0.05$ on day 22, < 0.01 on day 23, < 0.001 on days 24 and 25). D, TSP1 mRNA level, normalized to cyclophilin A, in C4-2 tumors collected at the end of the experiment depicted in C. E, CD-31-positive blood vessels in C4-2 tumors collected at the end of the experiment shown in C. F, VEGF, GLUT1, and CA-IX mRNA levels, normalized to cyclophilin A, in control (black bars) or TSP1-siRNA-treated C4-2 tumors (gray bars) collected at the end of the experiment depicted in C. Cont, control.

***In vivo* silencing of TSP1 increases MVD but inhibits the growth of castration-resistant prostate tumors**

We used RNA interference *in vivo* to address the role of TSP1 in C4-2 tumors. Tumor cells were xenografted into nude mice. Once tumors were exponentially growing, mice were randomized for treatment and received daily a PBS i.p. injection, or 120 $\mu\text{g/kg}$ of either control-, or a TSP1-siRNA diluted into PBS and injected i.p. as previously described (22). As compared with tumors treated with PBS, or with a control siRNA with no known mRNA target, TSP1-siRNA reduced TSP1 mRNA levels in tumors (Fig. 1D) and significantly inhibited tumor growth (Fig. 1C). The TSP1-siRNA did not activate the innate immune system (Supplementary Fig. S1A). Similarly, TSP1-siRNA injected into mice bearing PC3 tumors inhibited tumor development (Supplementary Fig. S1B and S1C). Although the growth of C4-2 tumors was blunted by TSP1-siRNA, MVD was significantly higher than in controls in C4-2 (Fig. 1E, Supplementary Fig. S1D) and in PC3 tumors (Supplementary Fig. S1E). Several genes, including *VEGF*, *GLUT1*, and *CA-IX* are induced under hypoxic conditions (23). The increased MVD paralleled a reduced expression of these 3 genes in TSP1-siRNA-treated tumors (Fig. 1F and Supplementary Fig. S1F), strongly suggesting that blood vessels were functional. These results establish that the antiangiogenic properties of TSP1 are maintained in castration-resistant and androgen-independent prostate tumors. They also show that TSP1 stimulates the development of these tumors, and that this property is dominant over its antiangiogenic effects.

TSP1 stimulates the migration of prostate tumor cells

We used the above TSP1-siRNA (TSP1a-siRNA) and a second one (TSP1b-siRNA) to study the mechanism of the protumoral effect of TSP1 in prostate tumor cells *in vitro*. The 2 TSP1-siRNAs silenced TSP1 expression over 70% at the mRNA and protein levels (Supplementary Fig. S2A–S2B), with no effect on cell proliferation or apoptosis (Supplementary Fig. S2C–S2D). In contrast, TSP1 silencing strongly inhibited the migration of C4-2 cells in a Transwell assay (Fig. 2A). This effect was not dependent upon the expression of the androgen receptor because the migration of PC3 cells was also strongly affected by TSP1 silencing (Fig. 2A). Conversely, the migration of LNCaP cells, which do not express TSP1 and are poorly motile, was stimulated when cells migrated towards C4-2 cells-conditioned medium (Fig. 2B). To further establish the role of TSP1 on the migration of prostate tumor cells, we took advantage of a cell line, JT8, in which the production of TSP1 is under the control of a tetracycline-repressible promoter (24). We prepared conditioned media from TSP1-induced or TSP1-repressed JT8 cells (Supplementary Fig. S2E) and compared their effect on the migration of C4-2 cells. The presence of TSP1 strongly increased the capacity of cells to migrate (Fig. 2C).

Antiangiogenic TSP1 peptides foster prostate cell migration

TSP1-derived peptides inhibiting endothelial cell migration and neovascularization *in vivo* have been characterized (25). A stabilized derivative of one of these peptides, which retains the antiangiogenic activity of TSP1 (26) was further

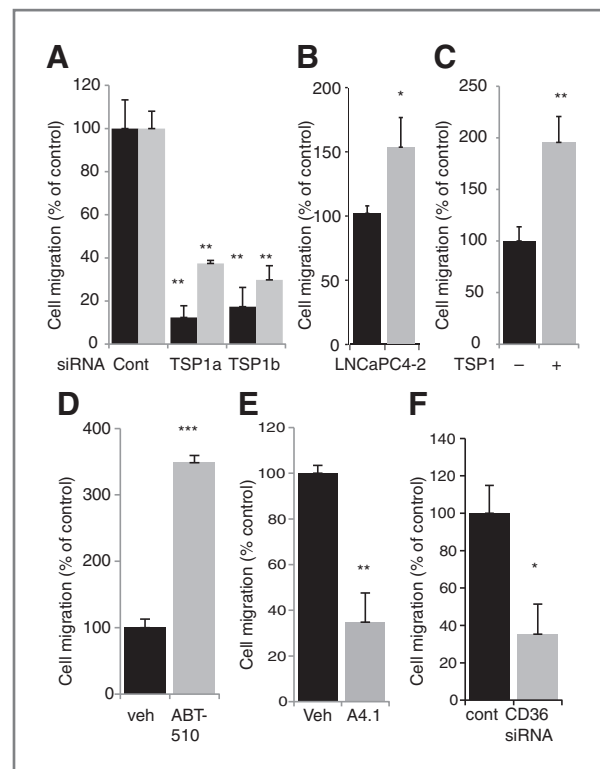


Figure 2. TSP1-stimulated migration of tumor cells requires CD36. A, C4-2 (black bars) or PC3 cells (gray bars) were transfected with the indicated siRNAs and their migration capacity toward culture medium containing 10% FBS measured 3 days later in a Transwell assay. The experiment was repeated 3 times with comparable results. B, LNCaP (black bars) or C4-2 cells (gray bars) were plated in the lower part of Boyden chambers. Two days later, LNCaP cells were seeded in the upper chamber and the number of migrating cells counted 18 hours later. C, migration of C4-2 cells toward medium conditioned by TSP1-tet-repressible JT8 cells grown in the presence of doxycycline (TSP1+) or in absence of doxycycline (TSP1-). D, migration of LNCaP cells toward 10% FBS-containing medium (veh) or the same medium complemented with 100 nmol/L of ABT-510. E, migration of C4-2 cells toward culture medium in the presence of vehicle (veh) or TSP1-Ab1 antibody A4.1 (1 $\mu\text{g/mL}$) in the upper compartment. F, C4-2 cells were transfected with cont-siRNA or CD36-siRNA as indicated, and their migration capacity measured 3 days later. Results in each panel are expressed as the number of migrating cells reported to cells migrating in control condition set to 100 (mean $\pm$ SEM, $n = 3$). A representative result of 3 independent experiments is shown.

developed by Abbott as ABT-510 for clinical applications. In a Transwell assay, ABT-510 induced a 3.5-fold increase in the number of LNCaP migrating cells (Fig. 2D).

TSP1-induced migration requires CD36

The antiangiogenic properties of TSP1 are mediated by its binding to the CD36 receptor (26, 27) which we previously found induced by androgen ablation and expressed in CRCaP tumors in patients (11). TSP1 antibody A4.1 inhibits the interaction between TSP1 and CD36 and blocks TSP1 antiangiogenic activity (25). This antibody inhibited by 65% the migration of C4-2 cells (Fig. 2E). Similarly, transfection of C4-2 cells with an siRNA silencing CD36 (Supplementary Fig. S2F) cells also inhibited cell migration by 65% (Fig. 2F). Altogether

these results show that the promigratory and antiangiogenic properties of TSP1 are closely linked at the molecular level.

TSP1 expression and secretion are regulated by cytosolic calcium concentration

We next sought the mechanisms inducing TSP1 in prostate tumors. Each TSP1 molecule binds approximately 35 calcium ions (28), which modifies its folding. TSP1 silencing significantly increased the basal cytosolic calcium concentration ($[Ca^{2+}]_i$) in C4-2 (Fig. 3A) and PC3 cells (Supplementary Fig. S3A), showing that, directly or indirectly, TSP1 contributes to regulate calcium concentration in prostate tumor cells. Because a 2-hour treatment with thapsigargin, an inhibitor of SERCA pump which increases $[Ca^{2+}]_i$, induced TSP1 secretion (Supplementary Fig. S3B–S3C), we investigated whether reciprocally the cytosolic calcium concentration in prostate tumor cells could regulate the expression and secretion of TSP1 and cell migration.

Several channels of the TRP family, which are deregulated during prostate tumor progression (15), actively regulate $[Ca^{2+}]_i$ in prostate cells, in particular TRPV2, TRPV6, and TRPM8 (16, 17, 29, 30). TRPV3 was recently described as an androgen-receptor target gene (18) and we found this channel expressed in prostate tumor cell lines (Fig. 3B), with a reduced

expression in LNCaP cells, as observed for TSP1 (Fig. 1A). In C4-2 cells, the basal $[Ca^{2+}]_i$ was not significantly affected by TRPV3 silencing but was increased 1.6-fold by thapsigargin-induced store depletion (Fig. 3C), indicating that this channel was regulating calcium homeostasis, possibly through an ER membrane localization. TRPV3 silencing in PC3 cells increased the basal $[Ca^{2+}]_i$ level but only marginally affected thapsigargin-induced store depletion (Supplementary Fig. S3D). Treatment of C4-2 cells with camphor, a well-established agonist of TRPV3 and TRPV1 (31, 32), induced after 2 hours a dose-dependent secretion of TSP1 in the culture medium (Fig. 3D), followed after 6 hours by a dose-dependent increase in TSP1 mRNA level (Fig. 3E). These results suggested that TRP channels might regulate TSP1 expression and cell migration. Indeed, silencing TRPV2, TRPV3, TRPV6 or TRPM8, resulted into a reduced TSP1 level in C4-2 cells (Fig. 3F and Supplementary Fig. S3E and S3F). In contrast, TRPC4 and TRPC6 silencing increased TSP1 mRNA level in C4-2 cells, whereas TRPC1, TRPC3 or ORAI had no significant effect (Fig. 3F). In addition, silencing TRPV3 or TRPM8 inhibited C4-2 cells migration as efficiently as TSP1-siRNA, whereas silencing TRPC4 or TRPC6 stimulated cell migration (Fig. 3G). We chose to further analyze the regulation of TSP1 expression by TRPV3

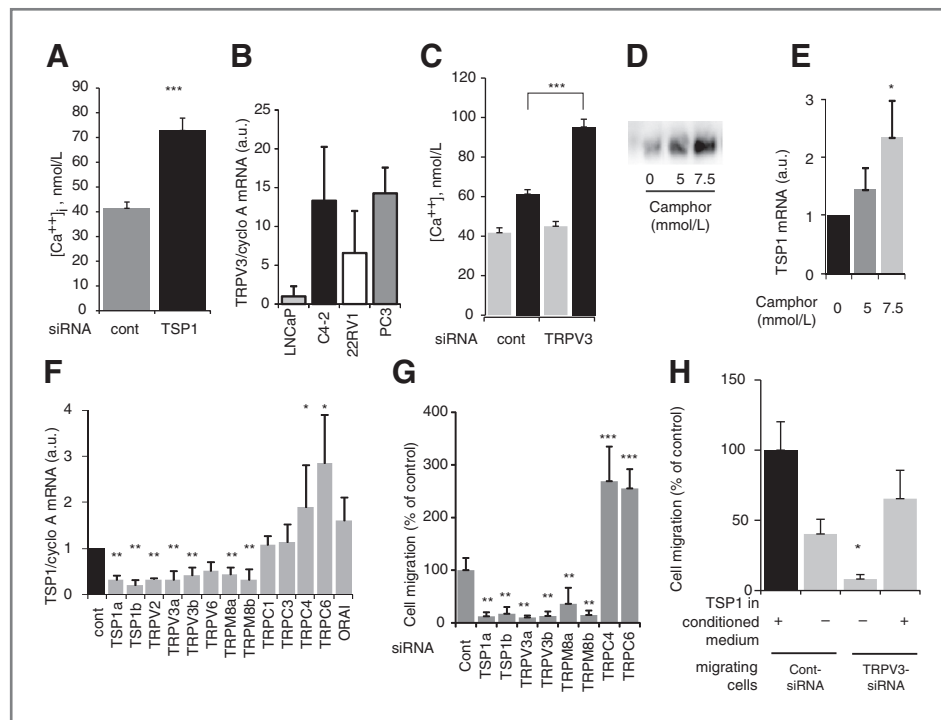


Figure 3. TSP1 regulation by calcium regulators. A, cytosolic calcium concentration in C4-2 cells placed for 5 minutes in calcium-free medium 48 hours after transfection with control- or TSP1-siRNA. B, TRPV3 mRNA level, normalized to cyclophilin A mRNA, in prostate tumor cell lines. Results are expressed in arbitrary units, TRPV3 level in LNCaP cells set to 1 (mean $\pm$ SEM, $n = 3$). C, cytosolic calcium concentrations in basal condition (gray bars) or after thapsigargin-induced store depletion (peak concentration, black bars) recorded in C4-2 cells transfected 2 days earlier with control-siRNA or TRPV3-siRNA. D, Western blot detection of TSP1 secreted in the culture medium of C4-2 cells 2 hours after treatment with camphor at the indicated concentration. E, TSP1 mRNA level, normalized to cyclophilin A mRNA in C4-2 cells 6 hours after treatment with camphor at the indicated concentrations. F, C4-2 cells were transfected by the indicated siRNAs and the TSP1 mRNA level, normalized to cyclophilin A, was quantified 2 days later (mean $\pm$ SEM, $n > 3$). To target TRPV3, TRPM8, and TSP1, 2 different siRNAs, noted a and b, were used for each gene. The TSP1 mRNA level in control cells was set to 1 (mean $\pm$ SEM, $n = 3$). G, migration in a Transwell assay toward medium containing 10% FBS of C4-2 cells transfected 3 days before with the indicated siRNAs. Results are expressed as in Fig. 2. H, C4-2 cells were transfected with control- or TRPV3-siRNA. Three days later, their migration toward conditioned medium prepared from control- or TSP1-siRNA-transfected C4-2 cells was quantified in a Transwell assay. Results expressed as the percentage of cells migrating in control condition (mean $\pm$ SEM, $n = 3$).

because this channel is expressed at all stages of prostate tumor progression (Fig. 3B), and because, in contrast with TRPV6 (30) and TRPM8, TRPV3 silencing did not affect cell proliferation (Supplementary Fig. S3G), a phenotype which could bias the interpretation of migration assays.

TSP1 mediates the regulation of prostate tumor cell migration by TRPV3

To further analyze the relative contributions of TSP1 and TRPV3 in cell migration, we prepared conditioned medium from control- or TSP1-siRNA-transfected C4-2 cells (Supplementary Fig. S3H). We then measured in Transwell assays the migration of control, or TRPV3-silenced C4-2 cells, toward control, or TSP1-depleted media. Consistent with the results shown in Fig. 3G, migration of TRPV3-silenced cells toward TSP1-depleted medium was inhibited by 86% (Fig. 3H). Importantly, addition of TSP1 in the lower compartment fully restored migration of TRPV3-silenced cells (Fig. 3H), showing that the stimulation of cell migration by TRPV3 is mediated by the secreted TSP1.

Using the same protocol as for TSP1-siRNA, we treated mice bearing exponentially growing C4-2 or PC3 tumors with TRPV3-siRNA daily. TRPV3-siRNA treatment was as efficient as TSP1 to inhibit tumor development in the 2 tumor models (Supplementary Fig. S4A and S4B).

Hypoxia modifies calcium homeostasis in C4-2 cells and induces TSP1 expression

The antitumoral properties of antiangiogenic molecules rely on their capacity to increase hypoxia. One of the constant early responses to hypoxia in almost all cell types is an increase in $[Ca^{2+}]_i$ (33). We thus analyzed how hypoxia affected calcium homeostasis and TSP1 expression in prostate tumor cells. As compared with normoxia, hypoxia induced in C4-2 cells a 2.2-fold increase in $[Ca^{2+}]_i$ level after thapsigargin-induced store depletion (Fig. 4A). TRPV3 silencing further increased both resting and thapsigargin-induced $[Ca^{2+}]_i$ levels in hypoxia. Similar results were obtained in PC3 cells (Supplementary Fig. S5A). These data suggested that TSP1 could also be induced by hypoxia. We thus measured in C4-2 cells grown in 1% or 20% oxygen, the expression and secretion of TSP1. We observed a time-dependent increase of both TSP1 and VEGF mRNA levels in hypoxia as compared with normoxia (Fig. 4B). TSP1 protein was synthesized in hypoxia (Fig. 4C) and secreted in the cell culture medium (Fig. 4D). TSP1 was also induced by hypoxia in PC3 cells (Supplementary Fig. S5B) and its secretion in cell culture medium was induced by thapsigargin and Colbalt Chloride treatments (Supplementary Fig. S5C).

TSP1 expression is associated with invasion and cancer recurrence after radical prostatectomy

In prostate tumors, TSP1 inhibits angiogenesis and thus increases hypoxia. Our results show that in turn, hypoxia induces TSP1 which fosters cell migration. A vicious circle is thus likely to take place as tumors progress toward more advanced and invasive stages. To test this hypothesis, we quantified TSP1 mRNA level in 35 frozen radical prostatectomy specimens from patients with clinically localized prostate

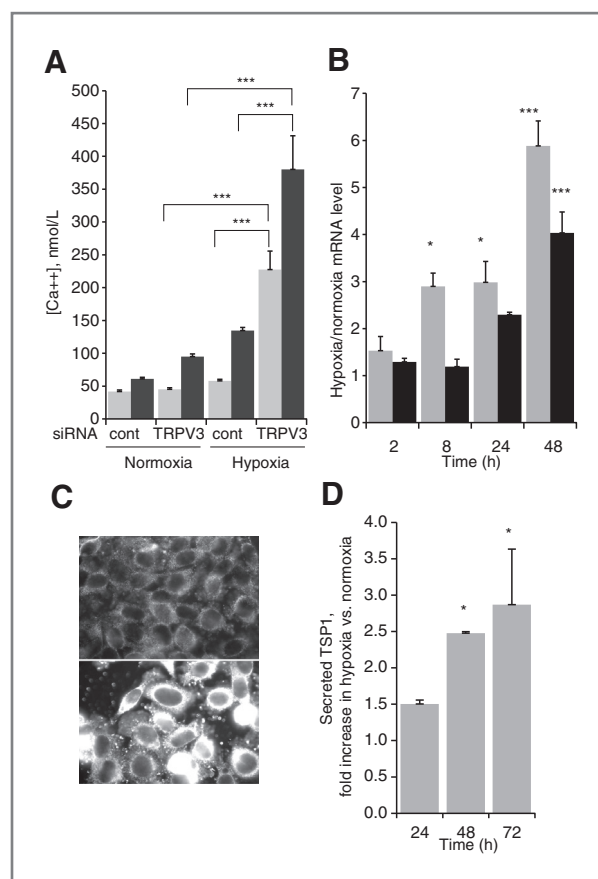


Figure 4. Regulation of calcium homeostasis and TSP1 by hypoxia. **A**, C4-2 cells were transfected with control- or TRPV3-siRNA. Two days later, half of the cells were maintained in normoxia while $COCl_2$ 300 μ mol/L was added to sister plates to mimic hypoxia. Cytosolic calcium concentrations in basal condition (gray bars) or after thapsigargin-induced store depletion (peak concentration, black bars) were recorded 24 hours later (48 hours after transfection). **B**, VEGF (gray bars) and TSP1 (black bars) mRNA levels in C4-2 cells incubated in 20% (normoxia) or 1% oxygen (hypoxia) for up to 48 hours. Results are normalized to the cyclophilin A mRNA level and expressed in arbitrary units (mean $\pm$ SEM, $n = 3$ independent experiments). **C**, TSP1 immunodetection in cells grown for 48 hours in control medium (top) or in the presence of 300 μ mol/L $COCl_2$ (bottom). **D**, TSP1 protein content measured by ELISA in conditioned medium of C4-2 cells grown in 1% or 20% oxygen for up to 72 hours. Results are expressed as (secreted TSP1/protein in cell homogenate in hypoxia)/(secreted TSP1/protein in cell homogenate in normoxia) (mean $\pm$ SEM, $n = 3$ independent experiments).

cancer who did not receive any radiotherapy and/or hormonal ablation treatment before surgery. Pairs of tumor and peritumoral tissue were analyzed in 32 specimens. There was no significant association between either tumoral or peritumoral TSP1 mRNA level and patients' age, Gleason score, or serum prostate-specific antigen (PSA) level before surgery (Table 1). As compared with prostate-localized pT2 tumors, and to pT3a tumors, in which the tumor has spread through the prostatic capsule, there was a significant increase in pT3b tumors, which invade seminal vesicles, indicating an association between TSP1 expression and invasion in patients (Fig. 5A; Table 1). Of the 35 patients included in this study, 9 experienced PSA

Table 1. TSP1 mRNA level in peritumoral and tumoral tissue from radical prostatectomy specimens

Criteria	n	TSP1 mRNA Mean (range)		P	n	TSP1 mRNA Mean (range)		pT versus PT
		PT				Tumor (T)		
All patients	32	0.38 (0.01–1.19)			35	0.71 (0.02–3.68)		0.041
Age								
≤60	16	0.37 (0.01–0.93)			18	0.95 (0.04–3.68)		0.048
>60	16	0.39 (0.01–1.19)	0.453		17	0.46 (0.02–1.37)	0.058	0.308
Gleason score								
6	6	0.26 (0.04–0.56)	0.266		6	0.86 (0.05–2.11)	0.189	0.127
7	20	0.41 (0.01–1.19)	0.404		22	0.52 (0.02–3.68)	0.280	0.307
>7	6	0.31 (0.13–0.59)	0.308		7	1.2 (0.07–3.48)	0.051	0.082
PSA before surgery								
<7	10	0.25 (0.01–0.91)	0.071		11	0.6 (0.02–3.68)	0.382	0.184
7–15	14	0.47 (0.05–1.19)	0.266		16	0.72 (0.04–3.48)	0.300	0.196
>15	8	0.36 (0.01–0.93)	0.269		8	0.84 (0.04–2.06)	0.381	0.088
Stage								
pT2	9	0.25 (0.01–0.89)	0.113		10	0.4 (0.04–1.33)	0.470	0.242
pT3a	10	0.51 (0.01–1.19)	0.206		10	0.41 (0.04–1.47)	0.041	0.329
pT3b	13	0.37 (0.02–0.93)	0.195		15	1.12 (0.02–3.68)	0.045	0.022
Relapse								
No	19	0.38 (0.01–1.19)			19	0.31 (0.02–1.33)		0.283
Yes	8	0.45 (0.13–0.93)	0.335		9	1.74 (0.27–3.68)	0.00003	0.013

relapse, whereas 19, followed for at least 30 months after surgery, did not show evidence of tumor recurrence. Importantly, at the time of radical prostatectomy, TSP1 mRNA level

in tumors, but not in peritumoral tissue, was significantly associated with PSA relapse (Table 1; Fig. 5B).

Discussion

The antiangiogenic functions of TSP1 in tumors, extensively showed in most tumor models, are exemplified by the inverse correlation between TSP1 expression and MVD in androgen-dependent prostate carcinomas (11, 13, 34). TSP1 expression is inhibited by promoter methylation in the androgen-dependent cell line LNCaP (20), but surprisingly, reexpressed in C4-2 cells, a castration-resistant derivative of LNCaP cells, and in androgen-independent PC3 cells. This TSP1 reexpression is also observed in CRCaP in patients in which angiogenesis is an active process (11). TSP1 reexpression in CRCaP and AICaP is not fortuitous as TSP1 silencing blunted tumor development *in vivo* (Fig. 1C and Supplementary Fig. S1B), showing that TSP1 actively stimulates tumor growth, as observed in other experimental (5, 35) and clinical situations (12, 36). Indeed, our experiments show that TSP1, which does not regulate CRCaP cell proliferation or apoptosis, is a potent trigger of tumor cell migration. This property was also observed in other cell types (35), and notably in a glioblastoma model, in which the overexpression of an N-terminal fragment of TSP1 gave rise to less angiogenic but more invasive tumors (37). Recently, it was also reported that the growth of primary tumors is increased in TSP1 knockout mice, whereas the number of metastases is decreased (38).

We investigated if, in addition to its stimulatory effect on tumor cell migration, TSP1 could have lost its antiangiogenic effects in CRCaP and AICaP. This might occur through an

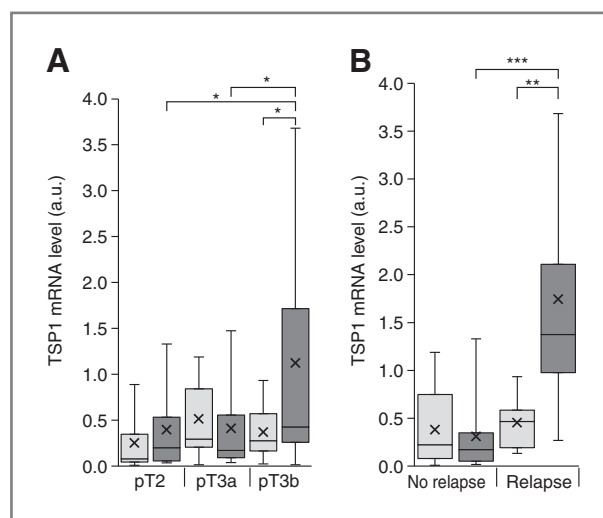


Figure 5. TSP1 mRNA in radical prostatectomy samples. TSP1 mRNA level, normalized to cyclophilin A mRNA level, in peritumoral (PT, gray bars) and tumoral (T, dark gray bars) tissues from frozen radical prostatectomy samples taken before any other treatment. Each box plot is composed of 3 horizontal lines that display the 25th, 50th (median), and 75th percentiles. The highest and lowest values are shown by error bars; mean value is indicated with an $\times$. A, analysis with respect to the pathologic tumor stage. B, comparison in samples from patients who did not show evidence of tumor recurrence for at least 30 months (mean follow-up: 48 months, range: 30–64 months, $n = 19$) or who experienced PSA relapse ($n = 9$).

increased secretion of proangiogenic factors (24), or through a lack of TSP1 secretion. The latter was described in renal cell carcinomas in which a decreased expression of TRPC4 impaired calcium uptake and TSP1 secretion (39). In CRCaP, however, TSP1 is secreted, and this secretion is fostered by hypoxia (Fig. 4D and Supplementary Fig. S5C) or by an increase in $[Ca^{2+}]_i$ (Fig. 3D, Supplementary Figs. S3B and S5C). In addition, silencing TSP1 increased tumor MVD (Fig. 1E, Supplementary Fig. S1D and S1E), showing that TSP1 is still antiangiogenic in CRCaP. It might seem paradoxical that silencing an antiangiogenic molecule inhibits tumor development. A similar situation was described for DLL4: the inhibition of this antiangiogenic factor increased MVD but reduced tumor development (40). However, DLL4 regulates the specification of tip cells and thus, despite an increased MVD, hypoxia was increased in DLL4-inhibited tumors because blood vessels were not functional. The antitumoral effects associated with TSP1 silencing are likely mediated by a different mechanism: TSP1, through its binding to CD36, induces apoptosis of endothelial cells (10), and in TSP1-siRNA-treated tumors the increased MVD was associated with a reduced VEGF, GLUT1, and CA-IX mRNA levels (Fig. 1F, Supplementary Fig. S1F), indicative of a reduced hypoxia, suggesting that blood vessels in TSP1-silenced tumors are functional. It thus seems that the proinvasive effects of TSP1 in CRCaP are dominant over its antiangiogenic effects.

TSP1 folding and functions depend on the binding of calcium ions (9, 14) whose intracellular concentration is tightly regulated (41). In C4-2 cells, at least 6 membrane receptors of the TRP family regulated the TSP1 expression positively—TRPM8, TRPV2, TRPV3, and TRPV6—or negatively—TRPC4 and TRPC6. Cell migration was induced by TRPC4 or TRPC6 silencing, or, conversely, inhibited by TRPM8 or TRPV3 silencing. In addition, in TRPV3-silenced cells, migration was restored by the addition of TSP1 in the extracellular medium, placing TSP1 as a central mediator of the TRPV3 effect on cell migration. These results show that intracellular calcium concentration is a major regulator of TSP1 synthesis, secretion, and capacity to induce cell migration. In patients, while prostate tumor progresses, the intracellular calcium homeostasis is disrupted, at least in part because the expression of several TRP channels is deregulated, notably TRPV2 (17), TRPV6, and TRPM8 (42). This mechanism thus most likely participates in the upregulation of TSP1 expression and secretion during prostate tumor progression.

Hypoxia, which spontaneously increases during prostate tumor progression (43), is associated with a shorter time to biochemical failure or progression free survival (44, 45). One of the early events induced by hypoxia is an increase in $[Ca^{2+}]_i$ (33), notably through TRP channels (46, 47). TRPV3 appears as an important regulator of calcium homeostasis in hypoxia in prostate tumor cells, as its silencing markedly increased $[Ca^{2+}]_i$ levels in C4-2 and PC3 cells. Because calcium homeostasis is an important regulator of TSP1 secretion and synthesis, we studied the effect of hypoxia on TSP1 expression. Importantly, hypoxia increased TSP1

protein synthesis and secretion (Fig. 4B, 4C, Supplementary Fig. S5B and S5C). TSP1 translation in hypoxia likely occurs through an internal ribosome entry site recently described in the 5' TSP1 mRNA (48). Hypoxia was also reported to induce TSP1 in heart infarction, in wound healing (49), and in several situations of ischemia in the retina, brain, leg (50), and kidney. In atherosclerotic lesions, hypoxia-induced TSP1 expression promotes migration of vascular smooth muscle cells (51), showing that the interplay between hypoxia, TSP1, and cell migration is not restricted to tumor cells. Likely, TSP1-induced migration helps cells survive escaping the hypoxic environment.

The antiangiogenic effects of TSP1 are mediated by its binding to CD36 (10, 27). The TSP1-CD36 interaction also stimulates resorption by osteoclasts (52) and induces TIMP-1 production and secretion in prostate and breast tumor cell lines (53). In addition, our results now establish that TSP1 promotes prostate tumor cell migration. This function also requires CD36 as silencing of this receptor, or inhibition of the TSP1-CD36 interaction using specific antibodies, impaired migration. The TSP1-mimetic antiangiogenic peptide ABT-510 also stimulated migration in LNCaP cells although the role of CD36 in that activity was not investigated. These results support the hypothesis that the capacity of TSP1 to stimulate cell migration, invasion, and tumor dissemination is intrinsically linked to its capacity to increase hypoxia. Similarly, hypoxia triggered by pharmacologic antiangiogenic drugs induces invasion (3, 4). These observations strongly suggest that the increased invasion and formation of distant metastasis in hypoxia occurs whatever the trigger of hypoxia. This is of particular importance in the treatment of prostate cancers because castration, the first-line treatment for invasive prostate tumors, represses VEGF (54) and induces TSP1 (11, 13, 55), creating a hypoxic stress which contributes to the antitumoral effect. Because hypoxia induces VEGF, the VEGF repression is only transient, and in the prostate of castrated rats, VEGF returns to control levels after 3 days (54). No such feedback mechanism occurs for TSP1, as castration induces TSP1 which increases hypoxia, which in turn induces TSP1 expression in a vicious circle. Castration-resistant cells express TSP1, which stimulates their migration. These cells, which proliferate in low testosterone levels, have enhanced migrating capabilities, and resist to hypoxia, are prone to give rise to aggressive metastases. Disrupting this vicious circle silencing TSP1 in patients undergoing chemical castration should help controlling cell dissemination in response to hypoxia-induced castration. In addition, our experimental data show that TSP1 silencing increases MVD. Therefore, association of TSP1 silencing with chemotherapeutic treatments should also be beneficial, improving penetration of therapeutic agents, and inhibiting invasion and metastasis dissemination.

Importantly, in radical prostatectomy specimens taken before any other treatment, we observed an increased TSP1 mRNA level in pT3b as compared with less invasive pT3a- and pT2-staged cancers and a statistically higher tumoral TSP1 expression in patients who experienced tumor recurrence. This finding may be of importance: with the

development of PSA screening, the number of so called "clinically insignificant cancers" has increased dramatically. TSP1 expression on prostate biopsies may have an incremental staging value in clinical practice, and improve identification of indolent tumors, thus avoiding unnecessary radical and possibly morbid treatment such as radical prostatectomy. On radical prostatectomy specimens, TSP1 mRNA may also be of clinical interest to select patients at risk of PSA relapse and propose additional treatments such as adjuvant radiotherapy.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

F. Cabon is a share holder of SeleXel. The other authors disclosed no potential conflicts of interest.

References

1. Aragon-Ching JB, Madan RA, Dahut WL. Angiogenesis inhibition in prostate cancer: current uses and future promises. *J Oncol* 2010;2010:361836.
2. Bergers G, Hanahan D. Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. *Nat Rev Cancer* 2008;8:592–603.
3. Páez-Ribes M, Allen E, Hudock J, Takeda T, Okuyama H, Viñals F, et al. Antiangiogenic therapy elicits malignant progression of tumors to increased local invasion and distant metastasis. *Cancer Cell* 2009;15:220–31.
4. Ebos JML, Lee CR, Cruz-Munoz W, Bjarnason GA, Christensen JG, Kerbel RS. Accelerated metastasis after short-term treatment with a potent inhibitor of tumor angiogenesis. *Cancer Cell* 2009;15:232–9.
5. Tuszyński GP, Gasic TB, Rothman VL, Knudsen KA, Gasic GJ. Thrombospondin, a potentiator of tumor cell metastasis. *Cancer Res* 1987;47:4130–3.
6. Markovic SN, Suman VJ, Rao RA, Ingle JN, Kaur JS, Erickson LA, et al. A phase II study of ABT-510 (thrombospondin-1 analog) for the treatment of metastatic melanoma. *Am J Clin Oncol* 2007;30:303–9.
7. Baker LH, Rowinsky EK, Mendelson D, Humerickhouse RA, Knight RA, Qian J, et al. Randomized, phase II study of the thrombospondin-1-mimetic angiogenesis inhibitor abt-510 in patients with advanced soft tissue sarcoma. *J Clin Oncol* 2008;26:5583–8.
8. Good DJ, Polverini PJ, Rastinejad F, Le BM, Lemons RS, Frazier WA, et al. A tumor suppressor-dependent inhibitor of angiogenesis is immunologically and functionally indistinguishable from a fragment of thrombospondin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:6624–8.
9. Carlson CB, Lawler J, Mosher DF. Structures of thrombospondins. *Cell Mol Life Sci* 2008;65:672–86.
10. Jimenez B, Volpert OV, Crawford SE, Febbraio M, Silverstein RL, Bouck N. Signals leading to apoptosis-dependent inhibition of neovascularization by thrombospondin-1. *Nat Med* 2000;6:41–8.
11. Colombel M, Filleur S, Fournier P, Merle C, Guglielmi J, Courtin A, et al. Androgens repress the expression of the angiogenesis inhibitor thrombospondin-1 in normal and neoplastic prostate. *Cancer Res* 2005;65:300–8.
12. Fontana A, Filleur S, Guglielmi J, Frappart L, Bruno-Bossio G, Boissier S, et al. Human breast tumors override the antiangiogenic effect of stromal thrombospondin-1 *in vivo*. *Int J Cancer* 2005;116:686–91.
13. Kwak C, Jin RJ, Lee C, Park MS, Lee SE. Thrombospondin-1, vascular endothelial growth factor expression and their relationship with p53 status in prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *BJU Int* 2002;89:303–9.
14. Adams JC. Functions of the conserved thrombospondin carboxy-terminal cassette in cell-extracellular matrix interactions and signaling. *Int J Biochem Cell Biol* 2004;36:1102–14.
15. Prevarskaya N, Zhang L, Barritt G. TRP channels in cancer. *Biochim Biophys Acta* 2007;1772:937–46.
16. Bidaux G, Flourakis M, Thebault S, Zholos A, Beck B, Gkika D, et al. Prostate cell differentiation status determines transient receptor potential melastatin member 8 channel subcellular localization and function. *J Clin Invest* 2007;117:1647–57.
17. Monet M, Lehen'kyi V, Gackiere F, Firlej V, Vandenberghe M, Roudbaraki M, et al. Role of cationic channel TRPV2 in promoting prostate cancer migration and progression to androgen resistance. *Cancer Res* 2010;70:1225–35.
18. Jariwala U, Prescott J, Jia L, Barski A, Pregizer S, Cogan JP, et al. Identification of novel androgen receptor target genes in prostate cancer. *Mol Cancer* 2007;6:39.
19. Gryniewicz G, Poenie M, Tsien R. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 1985;260:3440–50.
20. Li Q, Ahuja N, Burger PC, Issa JP. Methylation and silencing of the Thrombospondin-1 promoter in human cancer. *Oncogene* 1999;18:3284–9.
21. Thalmann GN, Anezinis PE, Chang SM, Zhou HE, Kim EE, Hopwood VL, et al. Androgen-independent cancer progression and bone metastasis in the LNCaP model of human prostate cancer. *Cancer Res* 1994;54:2577–81.
22. Compagno D, Merle C, Morin A, Gilbert C, Mathieu J, Bozec A, et al. siRNA-directed *in vivo* silencing of androgen receptor inhibits the growth of castration-resistant prostate carcinomas. *PLoS One* 2007;2:e1006.
23. Busk M, Toustrup K, Sorensen BS, Alsner J, Horsman MR, Jakobsen S, et al. *In vivo* identification and specificity assessment of mRNA markers of hypoxia in human and mouse tumors. *BMC Cancer* 2011;11:63.
24. Filleur S, Volpert OV, Degeorges A, Volland C, Reiher F, Clezardin P, et al. *In vivo* mechanisms by which tumors producing thrombospondin-1 bypass its inhibitory effects. *Genes Dev* 2001;15:1373–82.
25. Tolsma SS, Volpert OV, Good DJ, Frazier WA, Polverini PJ, Bouck N. Peptides derived from two separate domains of the matrix protein thrombospondin-1 have anti-angiogenic activity. *J Cell Biol* 1993;122:497–511.
26. Dawson DW, Volpert OV, Pearce SF, Schneider AJ, Silverstein RL, Henkin J, et al. Three distinct D-amino acid substitutions confer potent antiangiogenic activity on an inactive peptide derived from a thrombospondin-1 type 1 repeat. *Mol Pharmacol* 1999;55:332–8.
27. Dawson DW, Pearce SF, Zhong R, Silverstein RL, Frazier WA, Bouck NP. CD36 mediates the *in vitro* inhibitory effects of thrombospondin-1 on endothelial cells. *J Cell Biol* 1997;138:707–17.
28. Misenheimer TM, Mosher DF. Calcium ion binding to thrombospondin 1. *J Biol Chem* 1995;270:1729–33.
29. Fixemer T, Wissenbach U, Flockerzi V, Bonkhoff H. Expression of the Ca²⁺-selective cation channel TRPV6 in human prostate cancer: a

Acknowledgments

The authors thank Drs. Stéphanie Ovide-Bordeaux for her help, Annick Vieillefond, Myriam Decaussin, Claire Mauduit, Yves Allory, and Isabelle Metzger for their help with patients' specimens and files, and Drs. Christian Touriol, Hervé Prats, and Jack Henkin for helpful discussions.

Grant Support

This work was supported by a grant from INCa to F. Cabon and N. Prevarskaya and from ANR BiotecS (Prostima) to F. Cabon. J.R.R. Mathieu was a fellow from ARC.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

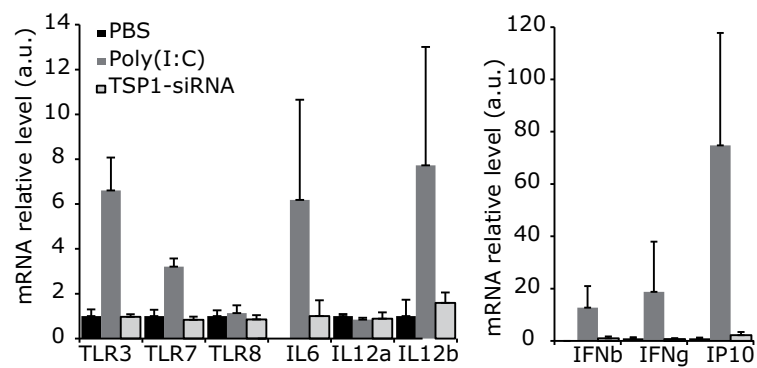
Received March 11, 2011; revised September 13, 2011; accepted September 24, 2011; published OnlineFirst October 28, 2011.

- novel prognostic marker for tumor progression. *Oncogene* 2003;22:7858–61.
30. Lehen'Kyri V, Flourakis M, Skryma R, Prevarskaya N. TRPV6 channel controls prostate cancer cell proliferation via Ca^{2+} /NFAT-dependent pathways. *Oncogene* 2007;26:7380–5.
 31. Moqrich A, Hwang SW, Earley TJ, Petrus MJ, Murray AN, Spencer KS, et al. Impaired thermosensation in mice lacking TRPV3, a heat and camphor sensor in the skin. *Science* 2005;307:1468–72.
 32. Vogt-Eisele AK, Weber K, Sherkheli MA, Vielhaber G, Panten J, Gisselmann G, et al. Monoterpenoid agonists of TRPV3. *Br J Pharmacol* 2007;151:530–40.
 33. Toescu EC. Hypoxia sensing and pathways of cytosolic Ca^{2+} increases. *Cell Calcium* 2004;36:187–99.
 34. Mehta R, Kyshtobayeva A, Kurosaki T, Small EJ, Kim H, Stroup R, et al. Independent association of angiogenesis index with outcome in prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2001;7:81–8.
 35. Sargiannidou I, Qiu C, Tuszyński GP. Mechanisms of thrombospondin-1-mediated metastasis and angiogenesis. *Semin Thromb Hemost* 2004;30:127–36.
 36. Ohtani Y, Kijima H, Dowaki S, Kashiwagi H, Tobita K, Tsukui M, et al. Stromal expression of thrombospondin-1 is correlated with growth and metastasis of human gallbladder carcinoma. *Int J Oncol* 1999;15:453–7.
 37. de Fraipont F, Keramidas M, El Atifi M, Chambaz EM, Berger F, Feige J-J. Expression of the thrombospondin 1 fragment 167–569 in C6 glioma cells stimulates tumorigenicity despite reduced neovascularization. *Oncogene* 2004;23:3642–9.
 38. Yee KO, Connolly CM, Duquette M, Kazerounian S, Washington R, Lawler J. The effect of thrombospondin-1 on breast cancer metastasis. *Breast Cancer Res Treat* 2009;114:85–96.
 39. Veliceasa D, Ivanovic M, Hoepfner FT, Thumbikat P, Volpert OV, Smith ND. Transient potential receptor channel 4 controls thrombospondin-1 secretion and angiogenesis in renal cell carcinoma. *FEBS J* 2007;274:6365–77.
 40. Noguera-Troise I, Daly C, Papadopoulos NJ, Coetzee S, Boland P, Gale NW, et al. Blockade of Dll4 inhibits tumour growth by promoting non-productive angiogenesis. *Nature* 2006;444:1032–7.
 41. Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003;4:517–29.
 42. Flourakis M, Prevarskaya N. Insights into Ca^{2+} homeostasis of advanced prostate cancer cells. *Biochim Biophys Acta* 2009;1793:1105–9.
 43. Carnell DM, Smith RE, Daley FM, Saunders MI, Bentzen SM, Hoskin PJ. An immunohistochemical assessment of hypoxia in prostate carcinoma using pimonidazole: implications for radioresistance. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006;65:91–9.
 44. Vergis R, Corbishley CM, Norman AR, Bartlett J, Jhavar S, Borre M, et al. Intrinsic markers of tumour hypoxia and angiogenesis in localised prostate cancer and outcome of radical treatment: a retrospective analysis of two randomised radiotherapy trials and one surgical cohort study. *Lancet Oncol* 2008;9:342–51.
 45. Jans J, van Dijk JH, van Schelven S, van der Groep P, Willems SH, Jonges TN, et al. Expression and localization of hypoxia proteins in prostate cancer: prognostic implications after radical prostatectomy. *Urology* 2010;75:786–92.
 46. Yao X, Garland CJ. Recent developments in vascular endothelial cell transient receptor potential channels. *Circ Res* 2005;97:853–63.
 47. Meng F, To WKL, Gu Y. Role of TRP channels and NCX in mediating hypoxia-induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ elevation in PC12 cells. *Respir Physiol Neurobiol* 2008;164:386–93.
 48. Laklai H, Laval Sv, Dumartin L, Rochaix P, Hagedorn M, Bikfalvi A, et al. Thrombospondin-1 is a critical effector of oncosuppressive activity of sst2 somatostatin receptor on pancreatic cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:17769–74.
 49. Kyriakides TR, MacLauchlan S. The role of thrombospondins in wound healing, ischemia, and the foreign body reaction. *J Cell Commun Signal* 2009;3:215–25.
 50. Favier J, Germain S, Emmerich J, Corvol P, Gasc J. Critical overexpression of thrombospondin 1 in chronic leg ischaemia. *J Pathol* 2005;207:358–66.
 51. Osada-Oka M, Ikeda T, Akiba S, Sato T. Hypoxia stimulates the autocrine regulation of migration of vascular smooth muscle cells via HIF-1 α -dependent expression of thrombospondin-1. *J Cell Biochem* 2008;104:1918–26.
 52. Carron JA, Wagstaff SC, Gallagher JA, Bowler WB. A CD36-binding peptide from thrombospondin-1 can stimulate resorption by osteoclasts *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;270:1124–7.
 53. John AS, Hu X, Rothman VL, Tuszyński GP. Thrombospondin-1 (TSP-1) up-regulates tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) production in human tumor cells: Exploring the functional significance in tumor cell invasion. *Exp Mol Pathol* 2009;87:184–8.
 54. Burchardt M, Burchardt T, Chen MW, Hayek OR, Knight C, Shabsigh A, et al. Vascular endothelial growth factor-A expression in the rat ventral prostate gland and the early effects of castration. *Prostate* 2000;43:184–94.
 55. Fitch PP, Wcislak SM, Lee C, Bergh A, Brendler CB, Stellmach VM, et al. Thrombospondin-1 regulates the normal prostate *in vivo* through angiogenesis and TGF- β activation. *Lab Invest* 2010;90:1078–90.

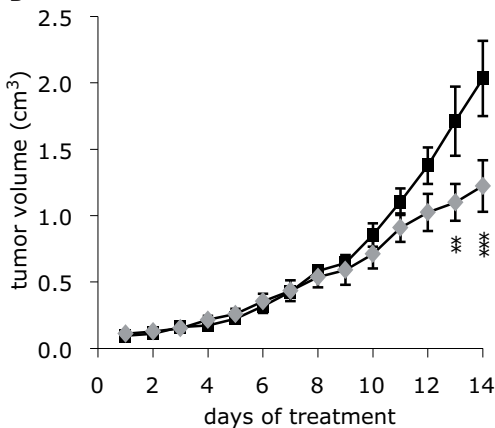
Rapport-gratuit.com 

LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

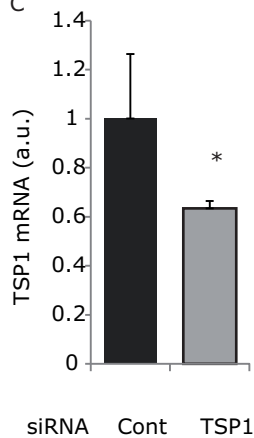
A



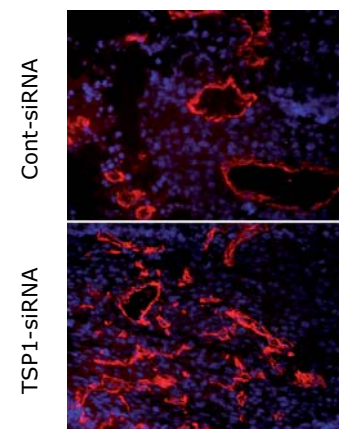
B



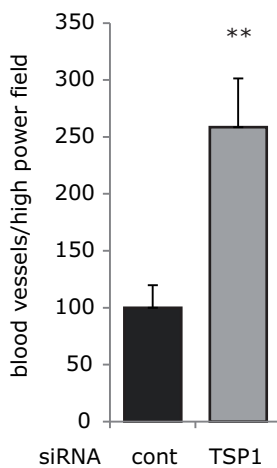
C



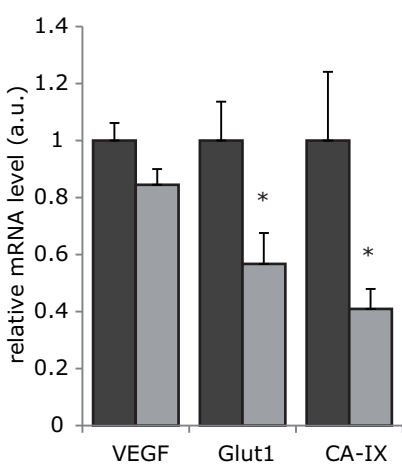
D

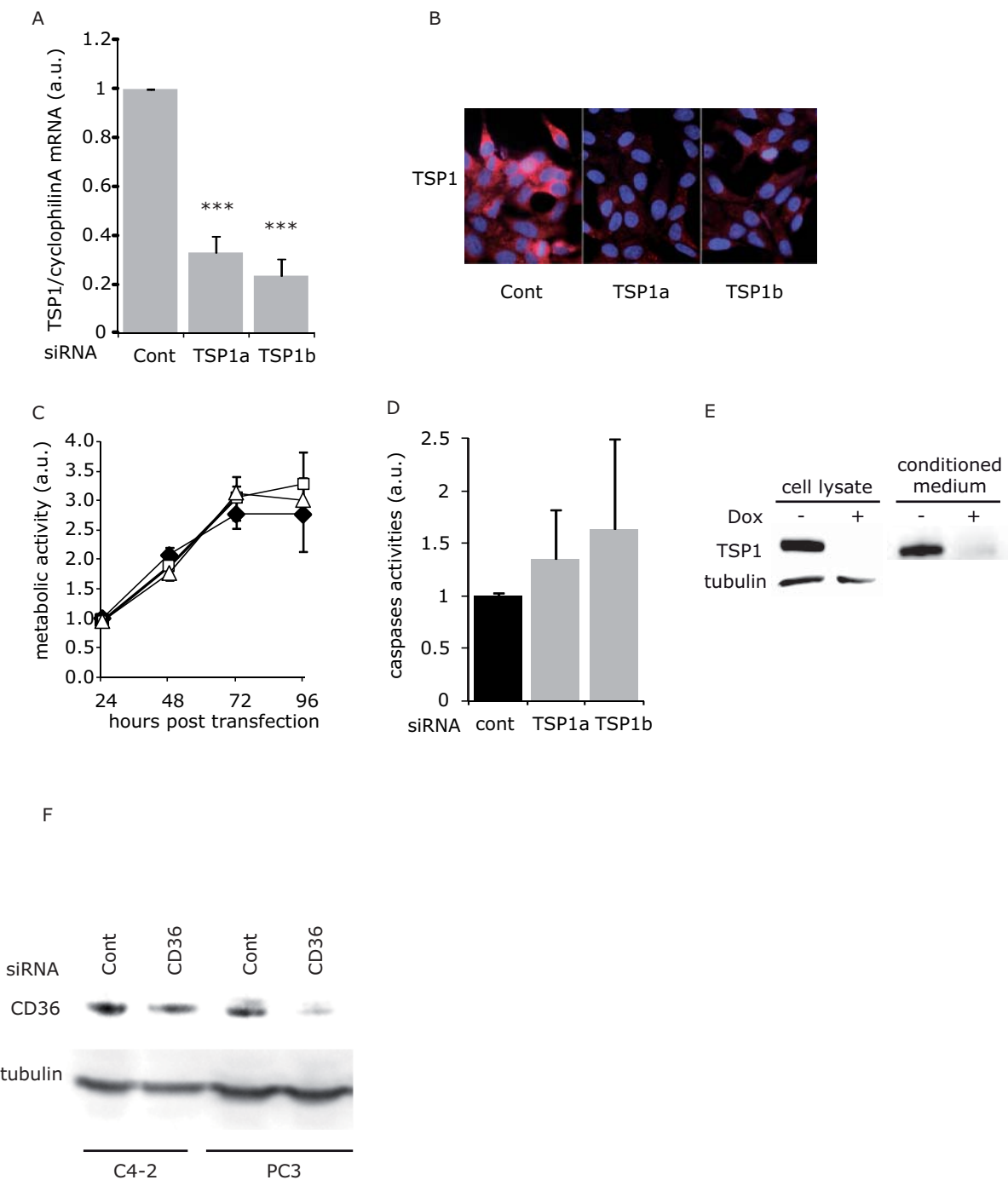


E

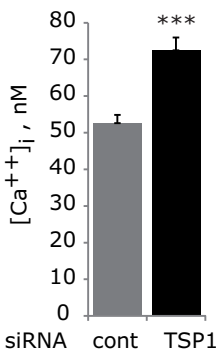


F

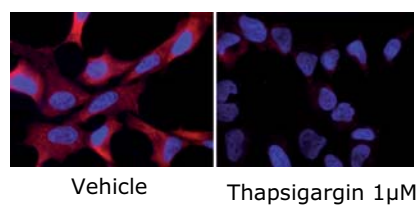




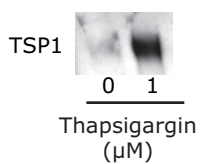
A



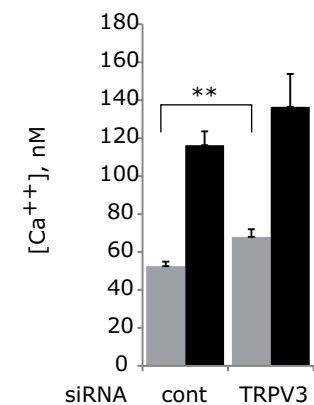
B



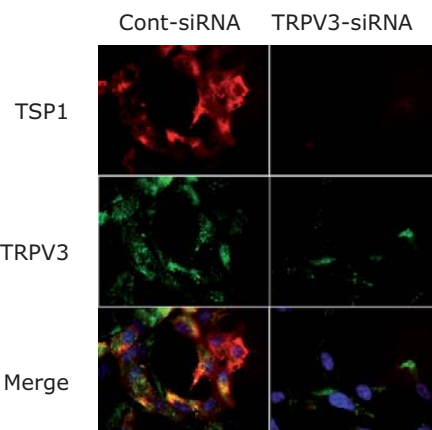
C



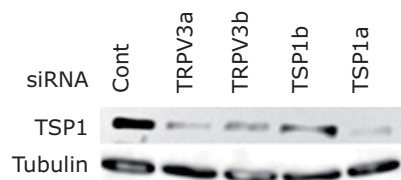
D



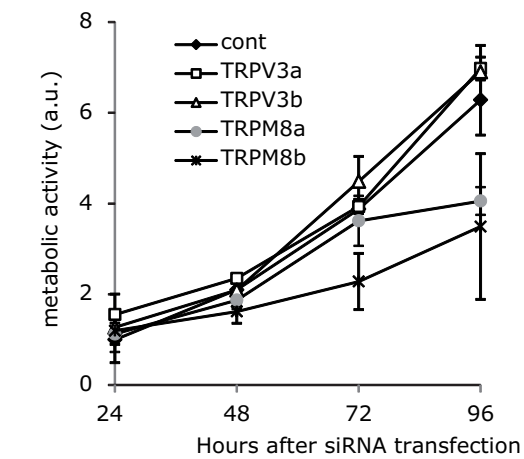
E



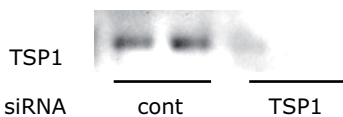
F



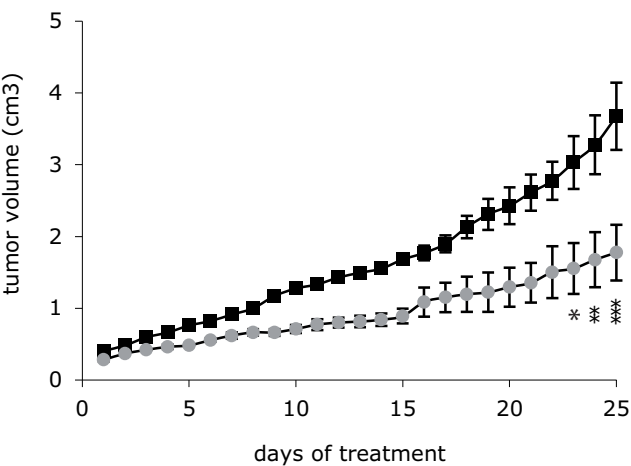
G



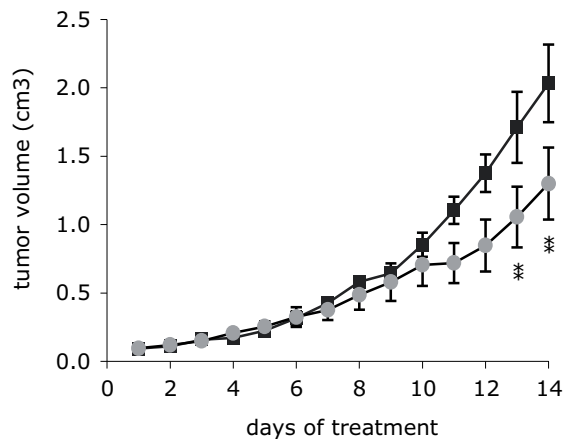
H



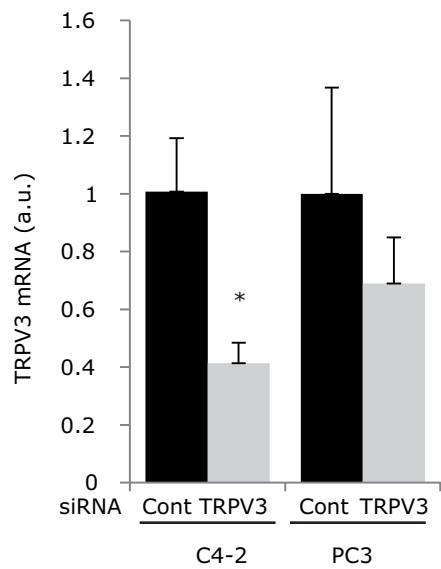
A



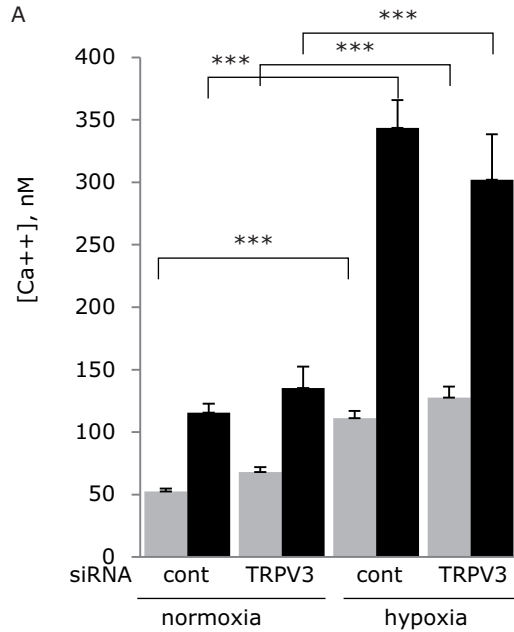
B



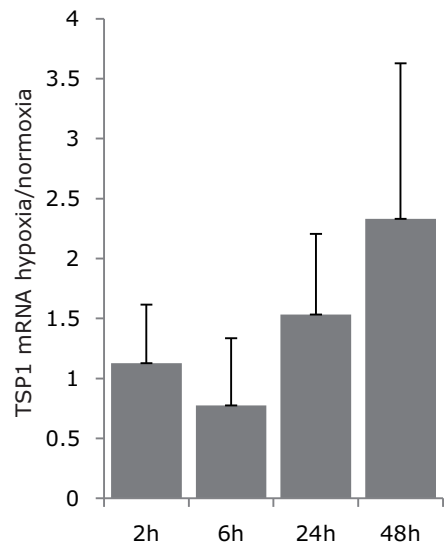
C



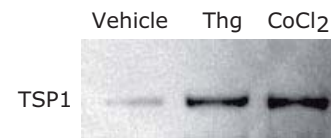
A



B



C



Legends to supplementary figures

Supplementary figure 1: A: TSP1-siRNA does not induce a non-sequence specific activation of the immune system. Naive mice (5 per group) received a single IP injection of PBS (black bars), poly(I:C) 4mg/kg (grey bars) or TSP-siRNA, 4mg/kg (white bars) and the mRNA levels of the indicated Toll Like Receptors (TLR) and cytokines were measured 5 hours later in spleen homogenates. Values were normalized to cyclophilin A mRNA levels and are expressed in arbitrary units, value in the PBS group set to 1. Poly(I:C), a ligand of TLR3, was used as a positive control. At a dose 30 fold higher than that used in the *in vivo* experiment shown in Fig. 1C and Fig S1B, TSP1-siRNA failed to activate the indicated genes. In tumors collected at the end of the experiment shown in figure 1C, mRNA levels of the above measured TLR and cytokines genes were not different between the PBS, cont-siRNA and TSP1-siRNA treated groups (not shown). **B:** Mice bearing exponentially growing PC3 tumors were treated daily with i.p. injections of Control- (black squares), or TSP1-siRNA (grey circles). siRNAs were diluted (120µg/kg) in PBS. Tumor volume is expressed in cm³ (mean ± SEM, 6 mice per group). Tumor volumes in TSP1-siRNA treated mice are significantly different from cont-siRNA treated group (two way ANOVA followed by a Bonferroni test: $p < 0.01$ on day 13, < 0.001 on day 14). **C:** TSP1 mRNA level, normalized to cyclophilin A, in PC3 tumors collected at the end of the experiment depicted in B. **D:** Blood vessels in C4-2 tumors collected at the end of the experiment depicted in Fig 1C were detected by Collagen-IV immunolabelling. **E:** CD-31 positive blood vessels in PC3 tumors collected at the end of the experiment shown in B were quantified in hot spots of vascularization. **F:** VEGF, GLUT1 and CA-IX mRNA relative levels, normalized to cyclophilin A, in PC3 tumors collected at the end of the experiment depicted in B.

Supplementary figure 2: A: TSP1 mRNA level in C4-2 cells 48h after transfection with two different siRNAs targeting the TSP1 mRNA. Results (arbitrary unit), normalized to cyclophilin A mRNA level; mean ± SEM of 3 independent experiments. **B:** TSP1 immunodetection in C4-2 cells 48h after transfection with TSP1a- or TSP1b-siRNA. DAPI was used to counterstain nuclei. **C:** Metabolic activity (WST1 detection kit, Roche Diagnostics, Meylan France) of C4-2 cells after transfection of TSP1a- or TSP1b-siRNA. **D:** Enzymatic activity of caspases 3 and 7 were measured using the Apo-One assay (Promega, Charbonnières, France) 48h after transfection of C4-2 cells with the TSP1a- or TSP1b-siRNA. Results are not statistically different between control or TSP1-siRNA transfected cells. **E:** TSP1 expression, measured by western blotting, in cellular homogenates and in the conditioned medium of JT8 cells grown for 2 days in the presence (dox+) or absence (dox-) of doxycycline. JT8 cells are fibrosarcoma cells stably transfected with a tet-repressible plasmid coding for TSP1²⁶. **F:** Western blot detection of

CD36 in C4-2 and PC3 cells 48 hours after transfection with a control (cont) or CD36-siRNA.

Supplementary figure 3: A: Cytosolic calcium concentration in PC3 cells maintained for 5 minutes in calcium-free medium 48h after transfection with control- or TSP1-siRNA **B** and **C:** C4-2 cells were treated for 2h by thapsigargin 1 μ M or vehicle. TSP1 expression in cells was visualized by indirect immunofluorescence (B) and TSP1 release in the medium analyzed by western blotting (C). **D:** Cytosolic calcium concentrations in basal condition (grey bars) or after thapsigargin-induced store depletion (black bars) recorded in PC3 cells transfected 2 days earlier with control-siRNA or TRPV3-siRNA. **E:** TSP1 and TRPV3 expression in C4-2 48h after transfection of a TRPV3a siRNA. TRPV3 antibodies were from Santa-Cruz (Heidelberg, Germany). **F:** Western blot detection of TSP1 in C4-2 cells transfected with TRPV3 siRNA or TSP1 siRNA 48h after transfection. **G:** C4-2 cells were transfected with the indicated siRNAs and their proliferation measured using a metabolic assay (mean $\pm$ SEM, $n=3$, representative of 3 separate experiments). **H:** Western blot detection of TSP1 in the culture medium of cells transfected with cont- or TSP1-siRNA in the experiment shown in Figure 3H.

Supplementary figure 4: A and B: Mice bearing exponentially growing C4-2 (A) or PC3 tumors (B) were treated daily with i.p. injections of Control- (black squares), or TRPV3-siRNA (grey circles). siRNAs were diluted (120 μ g/kg) in PBS. Tumor volume is expressed in cm³ (mean $\pm$ SEM, 6 mice per group). Tumor volumes in TRPV3-siRNA treated mice are significantly different from cont-siRNA treated group (two way ANOVA followed by a Bonferroni test; C4-2 tumors: $p<0.05$ on days 22, 23, 24, <0.01 on day 25; PC3 tumors: $p<0.05$ on days 13 and 14) **C:** TRPV3 mRNA level normalized to cyclophilin A mRNA level in C4-2 and PC3 tumors collected at the end of experiments shown in A and B respectively. **D:** TSP1 mRNA level normalized to cyclophilin A mRNA level in C4-2 and PC3 tumors collected at the end of experiments shown in A and B respectively.

Supplementary figure 5: A: PC3 cells were transfected with control- or TRPV3-siRNA. Two days later, half of the cells were maintained in normoxia while COCl₂ 300 μ M was added to sister plates to mimic hypoxia. Cytosolic calcium concentrations in basal condition (grey bars) or after thapsigargin-induced store depletion (black bars) were recorded 24 hours later (48h after transfection). **B:** Hypoxia/normoxia ratio of TSP1 mRNA level, normalized to cyclophilin A mRNA level in PC3 cells as a function of time in hypoxia. **C:** TSP1 secreted in PC3 culture medium after 2 hours of incubation in control medium or medium supplemented with 1 μ M thapsigargin (Thg) or 300 μ M CoCl₂.

Supplementary table 1: Sequences of siRNAs used. Sequence of the sense strand is indicated

Cont	5' - UAGCAAUGACGAAUGCGUAdTdT-3'
TSP1a	5' - CCUUGACAACAACGUGGUGdTdT-3'
TSP1b	5' - UACCCGAGACGAUUGUAUGdTdT-3'
TRPV3a	5' - CAAGGAGAGCGAACGCAUCdTdT-3'
TRPV3b	5' - AUGUACAGCGUCAUGAUCCdTdT-3'
TRPM8a	5' - UCUCUGAGCGCACUAUUCAdTdT-3'
TRPM8b	5' - UAUUCCGUUCGGUCAUCUAdTdT-3'
CD36	5' - UACAGACAGUUUUGGAUCUdTdT-3'
TRPV2	5' - UAAGAGUCAACCUCAACUAdTdT-3'
TRPC1	5' - GGGUGACUAUUUAUAUGGUUdTdT-3'
TRPC3	5' - UGAUGUGGUCUGAAUGUAAdTdT-3'
TRPC4	5' - UUUACUGAGUUUGUUGGUGdTdT-3'
TRPC6	5' - UUGAACGGCCUCAUGAUUAdTdT-3'
ORAI	5' - UGAGCAACGUGCACAAUCUdTdT-3'

Supplementary table 2: Sequences of real time PCR primers used.

Cyclophilin A	Forward 5' - GTCAACCCACCGTGTCTT-3'
	Reverse 5' - CTGCTGTCTTTGGGACCTTGT-3'
TRPV3	Forward 5' - AACCCACAGTTGCCAAGAC-3'
	Reverse 5' - TCCACGCAGCCCTCAGA-3'
TSP1	Forward 5' - CTCAGGACCCATCTATGATAAAACC-3'
	Reverse 5' - AAGAAGGAAGCCAAGGAGAAGTG-3'
TRPM8	Forward 5' - CGGTCATCTACGAGCCCTAC-3'
	Reverse 5' - CACACACAGTGGCTTGGACT-3'
VEGF	Forward 5' - GCCCACTGAGGAGTCCAACA-3'
	Reverse 5' - GCTGGCCTTGGTGAGGTTT-3'
actin	Forward 5' - CTGGTGCCTGGGGCG-3'
	Reverse 5' - AGCCTCGCCTTTGCCGA-3'
TLR3	Forward 5' - GGCTTTTGAGGTTGACGCAC-3'
	Reverse 5' - CCCTTTCATGATTCAGCCCA-3'
TLR7	Forward 5' - CCACCAGACCTCTTGATTCCAT-3'
	Reverse 5' - CCATCGAAACCCAAAGACTCTAGA-3'
TLR8	Forward 5' - CGATCTGAACCACAATGCCA-3'
	Forward 5' - AGACTCAGGCAACCCAGCAG-3'
IL6	Forward 5' - ACCACGGCCTTCCCTACTTC-3'
	Reverse 5' - TGCAAGTGCATCATCGTTGT-3'
IL12a	Forward 5' - AAGACCTGTTTACCACTGGAACTACAC-3'
	Reverse 5' - CTCCCTCTTGTTGTGGAAGAAGTC-3'
IL12b	Forward 5' - TCATGGCTGGTGCAAAGAAA-3'
	Reverse 5' - GCAGACAGAGACGCCATTCC-3'
IFN β	Forward 5' - GCAGCTCCAGCTCCAAGAAA-3'
	Reverse 5' - TGGATGGCAAAGGCAGTGTA-3'
IFN γ	Forward 5' - TGGCTTTGCAGCTCTTCCTC-3'
	Reverse 5' - TCCTTTTGCCAGTTCCTCCA-3'
IP10	Forward 5' - AGCTTGAAATCATCCCTGCG-3'
	Reverse 5' - GGGGAGTGATGGAGAGAGGC-3'
GLUT 1	Forward 5' - GTGCAGCAGCCTGTGTATGC-3'
	Reverse 5' - GCACAACCCGCCATGC-3'
CA-IX	Forward 5' - GTGTCATCTGGACTGTGTTTAACCA-3'
	Reverse 5' - GAAGTTCAGCTGTAGCCGAGAGT-3'

Principales observations

Dans cette étude, nous avons pu mettre en évidence que l'inhibition de la TSP1 *in vivo* par ARN interférence réduit la croissance tumorale dans des modèles de xénogreffes CRCaP. Cet effet pro-tumoral de la TSP1 est pourtant associé à ses capacités anti-angiogéniques qui sont conservées. De façon intéressante, nous démontrons que la TSP1 médie son rôle promoteur de la progression tumorale via différents mécanismes. En effet, la TSP1 régule, via le CD36, la migration cellulaire *in vitro* alors qu'elle est sans effet sur la prolifération des cellules tumorales prostatiques. Son expression ainsi que sa sécrétion par les cellules CRCaP est modulée par l'hypoxie et par le flux de calcium intracellulaire.

L'analyse des tumeurs de patients atteints de cancer de la prostate montre une plus forte expression dans les stades pT3 caractérisés par l'invasion de la capsule prostatique et des vésicules séminales, que dans les stades pT2, caractérisés par des tumeurs localisées et limitées à la prostate. De plus, une forte expression de la TSP1 au moment de la prostatectomie radicale est corrélée avec la rechute des patients dans les mois ou les années suivant la chirurgie.

Discussion

L'ensemble de ces résultats ont permis de montrer que :

- dans des modèles précliniques de carcinomes de la prostate, l'inhibition de la TSP1, tumorale et stromale, est capable de réduire la croissance tumorale primaire. Ce qui suggère l'utilisation de la TSP1 comme une nouvelle cible thérapeutique pour le traitement des carcinomes de la prostate résistants à la castration.

- la forte expression de la TSP1 étant corrélée à l'invasion et à la rechute des patients, la TSP1 pourrait être utilisée comme un marqueur pronostic d'invasion et de rechute. Cette approche est particulièrement intéressante pour prédire le devenir clinique des patients, un objectif qui n'est que partiellement atteint aujourd'hui grâce aux méthodes classiques de dosages du PSA, qui délivrent aussi bien des faux positifs que des faux négatifs.

Cependant, ces résultats encourageants soulèvent d'autres questions pertinentes quant au rôle pro-tumoral associé à la TSP1 aux stades avancés de la progression tumorale.

- Cet effet est-il dû à une surexpression concomitante de la TSP1 par les cellules tumorales et par le stroma, ou est-il dû à une action paracrine du stroma tumoral sur les cellules tumorales ? En d'autres termes, une inhibition de l'expression de la TSP1 uniquement dans les cellules tumorales ou dans le stroma manifesterait-elle aussi un phénotype moins invasif ?
- La diminution de la croissance des tumeurs primaires prostatiques suite à un traitement siRNA-TSP1 est-elle accompagnée par une réduction de l'occurrence des métastases à distance ? Une question pour laquelle il n'existe pas de modèles prostatiques pertinents pour y répondre.
- L'effet pro-invasif de la TSP1 est-il limité au cancer de la prostate ou ceci est aussi vrai pour d'autres types de cancers, notamment le cancer du sein ?

L'article N°2 qui suit a permis de rapporter des éléments de réponse à certaines de ces questions soulevées.

**Article N°2 : Rôle de la TSP1 dans la progression tumorale
mammaire.**

Introduction

Malgré la forte incidence du cancer du sein qui se situe au premier rang des cancers survenant chez la femme (*Figure 20*), on note une diminution de la mortalité au cours des dix dernières années qui pourrait s'expliquer en partie par l'amélioration de la prise en charge thérapeutique et par un diagnostic plus précoce lié au développement du dépistage en France. Cependant, le carcinome mammaire demeure le plus mortel parmi l'ensemble des cancers incidents chez la femme en 2011.

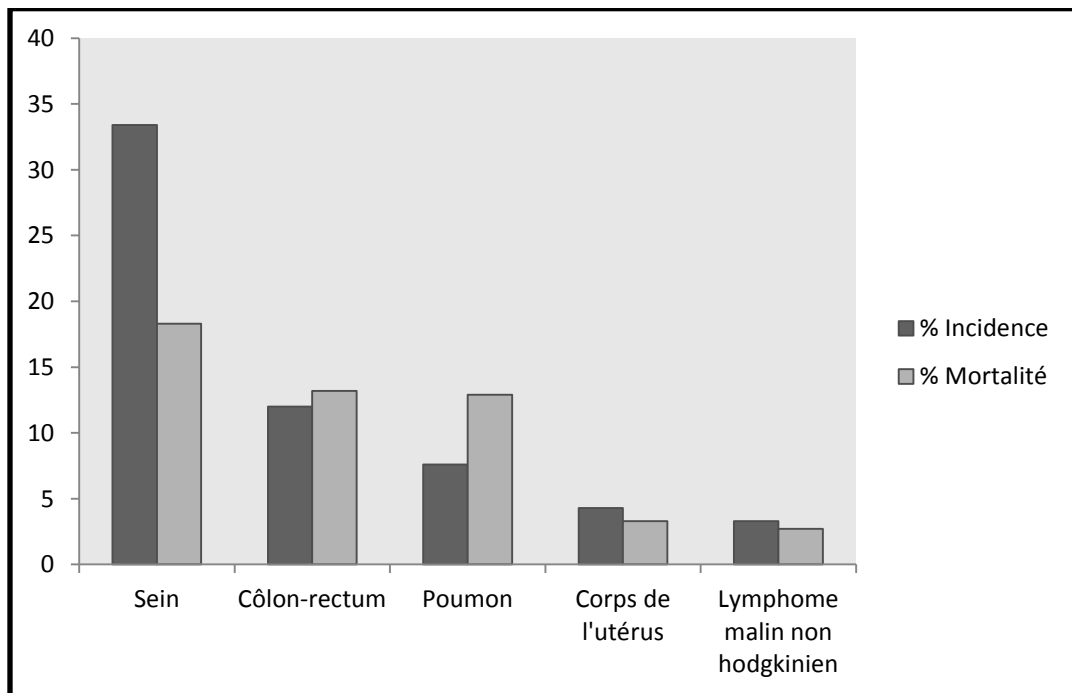


Figure 20 : Incidence et mortalité estimées des cancers en France métropolitaine chez la femme en 2011 (d'après l'Institut National du Cancer).

Malgré de grands progrès dans le traitement, les métastases restent la cause la plus fréquente de décès par cancer. A ce stade, les thérapies conventionnelles proposées ne sont que palliatives, ne fournissant qu'une extension très limitée de la survie. Se basant sur le fait que les cellules tumorales ont besoin en permanence d'oxygène et de nutriments pour survivre et progresser, les inhibiteurs de l'angiogenèse ont été développés ces dernières années comme une stratégie innovante et prometteuse pour « asphyxier » les tumeurs, en bloquant leur apport vasculaire sanguin. L'utilisation de l'Avastin pour le traitement du

cancer du sein métastatique a été approuvée par la FDA en février 2008. Des milliers de patientes dans le monde ont pu bénéficier de ces thérapies. Les premiers effets de ces agents sont de normaliser le système vasculaire, de réduire la pression interstitielle et l'hypoxie dans les tumeurs, et donc de soulager la douleur associée (Jain 2005). Mais malheureusement, cet effet n'est que transitoire puisque des voies de nécrose et d'apoptose induite par l'hypoxie sont activées. L'Avastin, a été ré-évalué récemment par la FDA. Cet organisme a considéré qu'à l'égard des effets secondaires toxiques nombreux et sévères d'une part, et l'absence de démonstration d'un bénéfice significatif sur la survie des patientes d'autre part, ce médicament ne devait plus être prescrit pour le traitement des patientes atteintes d'un cancer du sein, tant qu'une population de femmes répondant significativement au traitement n'est identifiable.

L'étude des mécanismes possibles de résistance à la thérapie anti-angiogénique dans des modèles précliniques a révélé une augmentation de l'invasion et une accélération du processus métastatique (Ebos et al 2009 ; Paez-Ribes et al 2009), probablement dus à l'hypoxie induite par ces traitements (Loges et al 2009). De façon intéressante, Tuszynski avait montré il y a 25 ans que la TSP1 était capable de stimuler la colonisation des cellules tumorales aux poumons (Tuszynski et al., 1987). Ces résultats communs aux inhibiteurs de l'angiogenèse, qu'ils soient synthétiques ou naturels, nous ont conduit à réévaluer le rôle de la TSP1 dans la progression tumorale, et en particulier dans la dissémination métastatique.

En effet, dans les tumeurs primaires des cancers du sein, on observe une corrélation inverse entre la MVD et le niveau d'expression de la TSP1. En revanche, dans les ganglions métastatiques de ces cancers, on observe de façon constante une MVD élevée, en dépit d'une forte expression de la TSP1 (Fontana et al., 2005). Bien que le rôle de la TSP1 dans l'inhibition de l'angiogenèse soit souvent associé à une diminution de la tumeur primaire, son effet sur la formation de métastases reste très controversé. En effet, dans un modèle de tumorigenèse mammaire établi sur des souris KO pour la TSP1, une diminution de la croissance des tumeurs primaires a été observée (Yee et al., 2009). Cependant, alors qu'Urquidi et al. proposent que l'incapacité des cellules tumorales mammaires NM-2C5 à former des métastases est liée à leur forte expression de TSP1 (Urquidi et al., 2002), Yee et

al. démontrent que l'inhibition de la TSP1 est associée à la réduction de l'occurrence de métastases pulmonaires (Yee et al., 2009).

La capacité de la TSP1 à se lier à différents partenaires, et à médier différentes fonctions dépendantes du contexte, nous a incités à réévaluer le rôle de la TSP1 dans la formation de métastases spontanées. Dans cette étude, nous avons utilisé un modèle syngénique de tumorigenèse mammaire (4T1). Compte tenu de l'effet de la TSP1 dans l'inflammation (Lopez-Dee et al., 2011), et dans la réponse immunitaire adaptative (Baumgartner et al., 2008), il est en effet intéressant d'évaluer l'effet de la TSP1 exprimée et sécrétée dans son contexte naturel sur la progression tumorale mammaire.

Thrombospondin-1 fosters spontaneous metastatic dissemination in breast tumors.

Jessica Nakhlé^{1,2}, Guillaume Labrousse¹, Anne-Françoise Tilkin-Mariamé¹, Barbara Garmy-Susini¹, Hervé Prats¹, Florence Cabon^{1,2}.

¹ INSERM UMR-1037, Université de Toulouse, Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse (CRCT), BP-84225, CHU Rangueil, 31432 Toulouse, France.

² SeleXel, 1 place Pierre Potier, BP50624, 31106 Toulouse Cedex 1

Abstract

The antitumor effects of pharmacological inhibitors of angiogenesis are hampered in patients by the rapid development of tumor resistance, notably through increased invasiveness and accelerated metastasis. Here, using RNA interference in vitro and in vivo we reevaluated the role of the endogenous antiangiogenic Thrombospondin 1 (TSP1) in a metastatic model of breast carcinoma. TSP1 was overexpressed in 4T1 metastatic mouse breast tumor cells as compared to their non-metastatic sister cells 67NR. TSP1 expression was induced by hypoxia and fostered tumor cell migration and invasion in vitro. Migration was also induced in 67NR and 4T1 cells by an antiangiogenic peptide derived from TSP1. In vivo, TSP1 increased extravasation into the lungs of tumor cells injected IV into mice. In primary tumors, silencing TSP1 increased blood vessel density, pericyte coverage and reduced hypoxia but had no effect on tumor take or growth rate. Importantly, despite an increased MVD in tumors, silencing TSP1 strongly hampered the development of lung metastases. Altogether these data establish that the antiangiogenic and pro-stimulatory effects of TSP1 are closely related. Our preclinical results suggest to target TSP1 in a therapeutic perspective as this treatment in patients should normalize vasculature, increase tumor perfusion by chemotherapeutic treatments, restore radiosensitivity and importantly inhibit invasion and metastatic dissemination.

Introduction

Despite great advances in treatment, metastasis remains the most common cause of death from cancer. Current therapies at that stage are palliative, providing only a limited extension of survival. Based on the assumption that tumor cells continuously need oxygen and nutrients to survive and progress, inhibitors of angiogenesis were developed in the recent years as an attractive new strategy to starve tumors blocking their vascular blood supply. Since the first approval in 2004 of Bevacizumab, a VEGF-blocking antibody, to treat metastatic colon cancer in combination with chemotherapy, thousands of patients have benefited from antiangiogenic treatments and several molecules are now approved in different tumor types. The first recognized effect of these agents is to normalize vasculature, reducing hypoxia and interstitial pressure in tumors, alleviating associated pain (Jain, 2005). This effect is transient, preceding the sought induction of necrosis and apoptosis induced by hypoxia. However results in patients failed to confirm the spectacular anti-tumoral effect of antiangiogenics observed in preclinical studies (Potente et al., 2011b). If in most tumors antiangiogenics increase progression-free survival, they frequently only marginally extend overall survival (De Bock et al., 2011). Development of tumor resistance, as well as significant and unexpected unwanted side effects, limit clinical usage of antiangiogenics and the American Food and Drug Administration revoked in 2011 approval of Bevacizumab for metastatic breast cancer, citing a lack of evidence that benefits outweigh risks.

Analysis of possible mechanisms of tumor resistance revealed in different preclinical models that treatments by antiangiogenic molecules lead to an increased invasion and acceleration of the metastatic process (Ebos et

al 2009, Paez-Ribes et al 2009), most likely resulting from the induced hypoxia (Loges et al., 2009). These results also suggested that endogenous inhibitors of angiogenesis might produce similar effects, which led us to reevaluate the role of Thrombospondin-1 (TSP1), a major inhibitor of angiogenesis in normal as in tumor tissues.

TSP1 is a large - 450kDa - multidomain extracellular matrix protein. Through its binding to several cell surface receptors, including CD36, CD47 and multiple integrins, TSP1 regulates a wide variety of biological functions (Rusnati et al., 2010), including cell adhesion, proliferation and angiogenesis. In vitro, TSP1 promotes migration of distinct tumor cell lines including prostate, melanoma and breast cancer cells (Firlej et al 2011, Taraboletti et al 1987). In patients, TSP1 is frequently found inhibited in primary tumors, including breast cancer, where there is an inverse correlation between TSP1 expression and microvessel density (MVD)(Fontana et al., 2005a). This correlation is however lost in lymphnode metastases and a high TSP1 level in N+ primary tumors was found associated with a reduction of progression-free-survival (Fontana et al., 2005). To study whether TSP1 could foster metastatic dissemination, we used in this study the 67NR/4T1 syngeneic mouse mammary tumor model (Aslakson and Miller, 1992). These cells were derived from a single mammary tumor that arose spontaneously in a syngeneic BALB/c mouse. Injected into the mammary fat pads of female mice, these cells form primary tumors with similar kinetics. However 4T1, but not 67NR, spontaneously disseminate and develop metastases into the lungs. TSP1 expression in this experimental model was disrupted using an RNA interference approach or induced using expression vectors.

Results

Increased expression of TSP1 correlates with mammary tumor metastasis

We first compared TSP1 expression in 67NR and 4T1 cell lines. TSP1 mRNA level, measured by RT-qPCR was increased in 4T1 as compared to 67NR cells (figure 1A). This increase in TSP1 expression was confirmed at the protein level in cell lysates (Fig 1B). TSP1 was secreted by the two cell lines in the cell culture medium (figure 1B).

TSP1 expression does not regulate 67NR or 4T1 proliferation

67NR doubling time (28h) is significantly longer than that of 4T1 cells (16h) (figure 1C). We then asked if TSP1 modifies cell proliferation. For this purpose, we compared the proliferation of 67NR cells transfected with a control, CMV-luciferase plasmid, or with a CMV-TSP1 construct. Proliferation rate was unmodified as compared to control cells (Fig 1C). Conversely, transfection of 4T1 cells with a TSP1-siRNA, described in (Firlej et al., 2011), which reduced by more than 70% TSP1 mRNA level (Fig 1D) and protein content in 4T1 cells (figure 1E) had no effect on 4T1 cell proliferation (Fig 1C).

We then stably inserted by lentiviral infection a luciferase reporter gene and a construct coding for a TSP1-shRNA in 4T1 cells. The latter targets the same TSP1 mRNA region than siRNA-TSP1a and reduced TSP1 mRNA level by 63% (figure 1F). The proliferation rate of these cells, denominated shTSP1-4T1-LucF in this manuscript, was not statistically different from that of the parental 4T1 cells and of 4T1 cells stably expressing a control-shRNA, shCont-4T1-LucF (figure 1G).

TSP1 stimulates the migration and invasion of mammary tumor cells

We then compared the migration properties of 67NR and 4T1 cells in a transwell assay. Cells, placed in the upper chamber in medium containing 1% FBS migrated towards medium containing 10% FBS. 67NR cells appeared poorly motile as compared to 4T1 cells (Fig 2A). Transfection of 67NR with a plasmid coding for mTSP1 strongly stimulated 67NR migration (figure 2B) and invasion (figure 2C). Conversely, migration (figure 2D) and invasion (figure 2E) of 4T1 cells was strongly impaired by transfection with TSP1-siRNA and comparable to that of shTSP1-4T1 cells (not shown). All together these experiments establish that TSP1 promotes migration and invasion of mammary tumor cell lines.

Anti-angiogenic and migratory properties of TSP1 are intrinsically linked

Because TSP1 is a large multidomain protein, it might be that its antiangiogenic and pro-migratory properties are bound to different domains, activating different signal transduction pathway. ABT-510, an antiangiogenic nonapeptide derived from a sequence included in TSP1 TSR repeats was developed by Abbott. Interestingly, ABT-510 induced 67NR and 4T1 cells migration (Figure 2F), suggesting that angiostatic and migratory properties of TSP1 are interdependent.

TSP1 expression is induced by hypoxia in mammary tumor cells

We quantified TSP1 and VEGF mRNA levels in 67NR and 4T1 cells grown in 1% or 20% oxygen. We observed a time-dependent increase of both TSP1 and VEGF mRNA levels in hypoxia as compared with normoxia (figure 3A-D). TSP1 mRNA was translated in hypoxia and the protein secreted as shown by its accumulation in cell culture medium over time (Fig 3E).

TSP1 potentializes tumor cell extravasation into the lungs of immunocompetent mice

Extravasation is a key and limiting process in metastatic dissemination. To study whether TSP1 affects this step, we injected tumor cells IV in the tail vein of immunocompetent BALB/c mice and monitored cell extravasation into the lungs. To more easily quantify this process, a luciferase reporter gene was stably introduced into 4T1 cells. The resulting 4T1-lucF cells were then in vitro transfected with both control- or TSP1-siRNA, and injected IV 2 days after transfection. Mice were sacrificed 24h later, lungs dissected and luciferase activity measured. Silencing TSP1 reduced by 80% luciferase expression in lungs (figure 4A). Similarly, luciferase activity in lungs was reduced by 60% 24h after injection of shTSP1-4T1-LucF cells as compared to that measured after injection of shCont-4T1-LucF cells (figure 4B).

Silencing TSP1 increases angiogenesis in primary tumors and normalizes tumor blood vessels

To analyze the role of TSP1 in primary tumors and in spontaneous metastasis dissemination, shCont-4T1-LucF or shTSP1-4T1-LucF cells were then orthotopically implanted into mouse mammary fat pad. The rate of development of primary tumors was similar in the two groups (Fig 4C), and tumor volumes at sacrifice are not statistically different: $1655 \pm 170 \text{ mm}^3$ in the control group and $1532 \pm 127 \text{ mm}^3$ in TSP1-silenced group respectively (mean $\pm$ SE). To measure hypoxia in primary tumors, pimonidazole was injected 20 minutes before sacrifice. Immunodetection of pimonidazole was performed on tumor sections, endothelial cells and pericytes labeled using CD31 and α -SMA actin antibodies respectively (Fig 4D). Average MVD and pericyte coverage were significantly higher in shTSP1-4T1-LucF than in shCont-4T1-LucF tumors (figure 4D and 4E). The increased blood vessel density and pericyte coverage came along with a reduced hypoxia in tumors (figure 4D), indicating that these blood vessels are functional. These data confirm that TSP1 exerts an antiangiogenic role in mammary tumors. However, increasing MVD in tumors did not foster the development of primary tumors (figure 4C).

Tumoral TSP1 fosters spontaneous mammary cancer metastasis

Despite the fact that blood vessel density is increased in TSP1 silenced tumors (figure 4E), which should facilitate intravasation of tumor cells into the circulation, macroscopic examination and luciferase quantification showed that only 3 out of 11 mice developed lung metastases in mice bearing shTSP1-4T1-LucF tumors as compared to 8 out of 12 in the control group, representing a 50% drop in metastasis frequency (figure 4F). No correlation was observed between tumor volume at sacrifice and the metastasis efficiency, reflected by the luciferase activity in lungs.

Discussion

Most schematic representations of the angiogenic balance in tumors depict an increase in proangiogenic factors and a decrease in antiangiogenic factors. However, even though tumors are mostly angiogenic, antiangiogenic molecules are frequently increased as compared to normal tissues, and/or increase during tumor progression. This is notably the case for endogenous matrix-derived angiogenesis inhibitors, cleaved from larger ECM proteins, such as type IV and XVIII collagens by tumor proteases (Kalluri, 2003). This is also the case for thrombospondin-1 whose level increases during mammary tumor progression (Byrne et al 2007, Suh et al 2011, Wang-Rodriguez et al 2003). We previously reported that TSP1 expression in primary N+

breast tumors is inversely correlated with MVD, however a high TSP1 level, and thus a reduced vascularization index, is associated with a reduced progression-free survival (Fontana et al., 2005b).

Through its different domains, TSP1 interacts with numerous partners and receptors and is involved in a number of physiological and pathologic processes including platelet aggregation, adhesion, migration, neurite outgrowth, TGF β activation, and inhibition of angiogenesis. It might be therefore that, pending on partners and receptors present, which obviously change during tumor progression, the role of TSP1 also changes to become protumoral. To explore this possibility we used here an RNA interference approach to inhibit TSP1 synthesis and thwart simultaneously all its activities in tumors.

Our results establish that TSP1 expression, which is induced by hypoxia, fosters tumor cell migration. Silencing TSP1 strongly inhibited the capacity of tumor cells injected into the circulation to extravasate into lungs. In primary tumors, silencing TSP1 increased blood vessel density, pericyte coverage and reduced hypoxia but had no effect on tumor take or growth rate. Importantly, despite an increased MVD in tumors, silencing TSP1 strongly hampered the development of lung metastases.

Jack Lawler's group studied mammary tumors and metastasis in TSP-1-null-Pyt transgenic mice (Yee et al., 2009). As compared with control tumors in Pyt transgenic mice, tumors spontaneously arising in TSP1 null mice were larger and their blood vessels' diameter was increased. We found similarly that silencing TSP1 in 4T1 tumors increased MVD. However, although MVD was higher in TSP1-silenced 4T1 tumors than in control tumors, tumor take did not occur earlier, and the rate of tumor development was not increased, indicating that the growth of control tumors is not limited by a default in blood supply. Model differences likely explain why TSP1 affects or not the growth of primary tumors: In the transgenic model, tumor cells transform from endogenous normal breast cells spring into a TSP1 null environment, including platelets, stromal and immune cells, and tissues where metastases will eventually settle. In contrast we implanted cells that are already cancerous, metastatic, and used to grow in the presence of TSP1 that they normally express, and 4T1 tumors develop in the presence of a TSP1-positive mouse. The differential effect of TSP1 on primary tumor growth therefore suggests that the antitumoral effect of TSP1 is prominent at the onset of tumors but less once tumors become aggressive. Indeed, TSP1 expression by human cancer cells is usually repressed in the first stages of tumor progression. TSP1 in tumors thus initially originates from stromal cells and platelets. As tumors progress, hypoxia increases, inducing TSP1 synthesis by tumor cells, this in turn increases hypoxia due to TSP1 potent antiangiogenic activity, establishing a vicious hypoxic circle. Progressively, cells able to evade from the toxic hypoxic regions to survive are selected, notably those expressing TSP1, which actively stimulates their migration.

The TSP1 effect on pericyte coverage also contributes to maintain hypoxia in tumors. Indeed, it was recently shown that in 4T1 tumors pericyte depletion increases hypoxia, fosters epithelial to mesenchymal transition (EMT), suppresses primary tumor growth, but enhances lung metastasis (Cooke et al., 2012). Low pericyte coverage in breast human tumors was found significantly associated with metastasis and a reduced overall survival (Cooke et al., 2012). Sunitinib, an antiangiogenic drug approved for several cancers in patients, also induced pericyte depletion in 4T1 tumors, at least partly through an increased expression of phosphorylated Met, and fostered lung metastasis (Cooke et al., 2012).

Although signaling pathways activated by TSP1 and Sunitinib are different, it is noteworthy that both induce hypoxia and pericyte depletion in primary tumors and foster metastasis. Indeed, if antiangiogenic therapies increase progression free survival, their capacity to increase overall survival is limited by toxic side effects and development of tumor resistances, notably through stimulation of invasion and metastatic dissemination (De Bock et al 2011, de Groot et al 2010).

Vessels supplying tumors tend to be disorganized, oversized, leaky, and their pericyte coverage reduced. Despite a high blood vessel density, most tumors are therefore hypoxic, a phenotype associated with resistance to radiotherapy. During the first cycles of treatment, pharmacologic inhibitors of angiogenesis reduce interstitial pressure, normalize vasculature and reduce hypoxia, as observed when TSP1 is inhibited in tumors (this study and (Yee et al., 2009)). Importantly, normalization of vasculature was shown to potentialize the efficacy of radiotherapy and chemotherapy (Chauhan et al 2012, Zhang et al 2011). This beneficial effect of pharmacologic inhibitors of angiogenesis is however transient and can only improve the

function of preexisting vessels that have an open lumen, whereas silencing TSP1 increases the number and proportion of functional vessels.

Despite the fact that primary tumors were better perfused than controls in TSP-1-null-Pyt transgenic mice (Yee et al., 2009) and in TSP1-silenced 4T1 tumors (this study), metastasis to the lungs was strongly inhibited in both cases. These counter-intuitive data show that vascularization in primary tumors is not correlated to metastasis. Absence of correlation between vascular pattern and aggressiveness in breast tumors was also recently described in a retrospective study in patients (Adler et al., 2012). In contrast, hypoxia in tumors was associated with metastasis and radioresistance in a number of studies. In addition, hypoxia in breast tumors was also associated with the development of resistance to hormonal therapy (Generali et al., 2009).

TSP1 synthesized by tumor cells plays a major role in metastasis: its silencing strongly inhibits extravasation and metastasis, even though TSP1 is expressed by platelets or lungs. It might be however that an elevation of TSP1 in blood, resulting from its secretion by primary tumors, as observed in patients (Byrne et al 2007, Fontana et al 2005, Suh et al 2011) contributes to metastasis. Indeed, the number of sarcoma cells injected IV able to extravasate into the lungs was increased two fold when mice received 5 minutes earlier an injection of purified TSP1 (Tuszynski et al., 1987).

The pro-tumoral role of TSP1 in tumors is not restricted to breast cancers. Increased TSP1 expression in clinical tumors was associated with aggressiveness in colorectal carcinoma (Yamashita et al., 1998), gallbladder (Ohtani et al., 1999), gliomas (Kawataki et al., 2000b), pancreas (Okada et al 2010), and prostate (Firlej et al., 2011b).

In view of these data, silencing TSP1 in advanced tumors seems an attractive strategy as it would altogether increase tumor perfusion by chemotherapeutic drugs, reduce hypoxia thus enhancing the efficacy of radiotherapy and importantly inhibit metastasis dissemination.

Material and methods

Reagents, siRNA and shRNA: The following antibodies were used: TSP1 antibodies Ab-4, and Ab-11 (Microm Microtech, Francheville, France), tubulin antibody and Mouse anti- α SMA (Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France), Rat anti-CD31 antibody (BD Pharmingen, Le Pont de Claix, France), Mouse anti-pimonidazole (Euromedex, Souffelweyersheim, France), Goat anti-mouse peroxidase (Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France), Goat anti-rat DyLight 549 (Tebu-bio, Le Perray en Yvelines, France). Synthetic siRNA and shRNA were purchased from Sigma-Aldrich. Sequences of the sens strand were as follows: Cont-siRNA: 5'-TAGCAATGACGAATGCGTAdTdT; TSP1-siRNA: 5'-CCTTGACAACAACGTGGTGdTdT. ABT-510 was a generous gift from Abbott laboratories. Plasmids coding from shRNA were ordered from Sigma-Aldrich. The TSP1 mRNA sequence targeted by the TSP1 shRNA is: 5'- CCTTGACAACAACGTGGTGAA-3'. Control shRNA does not target any sequence identified in eukaryotic mRNAs (5'-CAACAAGATGAAGAGCACCAA).

Cell culture and transfection: 67NR and 4T1 mouse mammary tumor cell lines were obtained from Dr. Stephan Vagner, Institut Claudius Regaud, Toulouse, France. Cells were cultured in high glucose DMEM supplemented 10% FBS at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. For hypoxic conditions, cells were cultured at 37°C with 5% CO₂, 94% N₂ and 1% O₂ in a hypoxic incubator (Binder GmbH, Tuttlingen, France). CalPhos™ Mammalian Transfection Kit (Clontech, Saint-Germain-en-Laye, France) and Lipofectamine RNAimax reagent (Invitrogen, Illkirch Cedex, France) were used for plasmids or siRNAs transfection as recommended by the manufacturer.

Lentivector production and cell transduction: The cDNA coding Luciferase Firefly (Luc F) was subcloned into the lentiviral pTRIP-DU3-CMV-MCS plasmid derived from the self-inactivating lentiviral plasmid pTRIP-DU3-EF1a-EGFP (Sirven et al 2001). The MISSION shRNA lentiviral plasmids (pLKO) encoding TSP1-shRNA (TRCN0000039696) or control-shRNA (SHC002) were purchased from Sigma-aldrich. Lentivector particles were produced by the BIVIC vector facility (L. Van den Berghe, F. Gross). Briefly, HEK293-FT cells were co-transfected by the calcium phosphate method with a pLKO or a pTRIP lentiviral plasmid, the packaging p8.91

plasmid (coding human immunodeficiency virus 1 proteins), and the pVSVg plasmid (coding vesicular stomatitis virus G envelope protein). Culture supernatants were collected 48h after transfection, filtered through a 0,45mm filter, divided into aliquots and stored at -80°C. Filtered supernatants were used for cell transduction. Reverse and double transduction experiments were done in six-well plates in a final volume of 1 ml. 2.5×10^4 4T1 cells/well were seeded in presence of filtered vector and 6 mg/ml of protamine sulfate. Luciferase activity per million cell differed by less than 10% between 4T1-shRNA-cont-LucF and 4T1-shRNA-TSP1-LucF cells.

Migration and Invasion assay: Migration capacity was measured by Transwell assays (BD Biosciences). Cells (30,000) were seeded in DMEM 1% FBS in the upper part of a cell culture-chamber-insert system separated from the lower chamber by a 8 mm PET membrane. DMEM 10% FBS was added in the lower compartment. Twenty-four hours later, non-migrating cells in the upper compartment were scrapped off with a cotton swab. Cells on the lower side of the membrane were fixed with methanol at -20°C and stained with Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich). Membranes were then excised, mounted on a glass slide and cells counted. Cell invasion assay was performed in conditions similar to above, with wells precoated with Matrigel. Twenty-four hours later, cells were fixed, stained, and counted as above.

Real-time reverse transcriptase PCR, and mRNA analysis: Total RNA was isolated with TRIzol reagent (Invitrogen). RNA was retrotranscribed using the High capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). cDNA was quantified by real-time PCR using the Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Human cyclophilin A was used as an internal control.

Immunoblotting: Cells were scraped and washed in PBS. Proteins were extracted in 0.2% SDS complemented with 1mg/mL protease inhibitor (Roche). The crude lysate was briefly sonicated on ice. Protein extracts were quantified by Bradford assay. Aliquots containing 20µg of total cell proteins were resolved on SDS-PAGE gels 7.5% and transferred onto nitrocellulose membranes. These membranes are blocked in 5% nonfat milk powder in PBS containing 0,01% Tween-20 (TBST) for 30 minutes at room temperature then probed using Ab-4 or Ab-11 primary antibodies at a dilution of 1:200. After incubation overnight at 4°C, membranes are washed in TBST and incubated with the goat-anti mouse peroxidase-conjugated secondary antibody (1:10000).

Animal studies, tumorigenicity assay and quantification of lungs metastasis: Studies involving animals, including housing and care, method of euthanasia, and experimental protocols, were conducted in accordance with the regional animal ethical committee of Midi-Pyrénées. Tumor cells (100 000 cells/mouse) were injected into the 4th inguinal mammary fat pads of 8-week-old female Balb/c mice. Tumors were measured every day. Tumor volume was estimated by the formula: length X width² X 0.5.

To study the capacity of mammary tumor cells to extravasate into lungs, 500 000 cells were injected into the tail vein of Balb/c mice. Animals were sacrificed 24h later.

Tissues stored at -80°C were pulverized in liquid nitrogen into fine powder using a Mikro-Dismembrator S apparatus (Sartorius). Luciferase assays were performed using Luciferase Firefly Assay system reagents (Promega) and luminescence quantified with a Mithras Microplate reader (Berthold).

Histology and Immunohistochemistry: Seven µM cryosections of tissues were prepared. Slides were fixed in ice-cold acetone for 2 min, permeabilized in 0.1% Triton X-100 in phosphate buffered saline (PBS), blocked in 5% bovine serum albumin in PBS for 1 h at room temperature and then incubated with anti-CD31 (1:100), anti-α-SMA (1:500) or anti-pimonidazole (1:100) antibody. After extensive washing, slides were incubated with 2 µg/ml goat anti-rat DyLight 549 (Tebu-bio, Le Perray en Yvelines, France). Slides were counterstained with DAPI (Tebu-bio). Coverslips were mounted with Dako fluorescent mounting medium.

Statistical analysis: Statistical analyses were performed using T-test. *, P < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0.001.

References

Adler EH, Sunkara JL, Patchefsky AS, Koss LG, Oktay MH (2012). Predictors of disease progression in ductal carcinoma in situ of the breast and vascular patterns. *Human Pathology* **43**: 550-556.

Aslakson CJ, Miller FR (1992). Selective events in the metastatic process defined by analysis of the sequential dissemination of subpopulations of a mouse mammary tumor. *Cancer Res* **52**: 1399-1405.

Byrne GJ, Hayden KE, McDowell G, Lang H, Kirwan CC, Tetlow L *et al* (2007). Angiogenic characteristics of circulating and tumoural thrombospondin-1 in breast cancer. *Int J Oncol* **31**: 1127-1132.

Chauhan VP, Stylianopoulos T, Martin JD, Popovic Z, Chen O, Kamoun WS *et al* (2012). Normalization of tumour blood vessels improves the delivery of nanomedicines in a size-dependent manner. *Nat Nanotechnol* **7**: 383-388.

Cooke Vesselina G, LeBleu Valerie S, Keskin D, Khan Z, O'Connell Joyce T, Teng Y *et al* (2012). Pericyte Depletion Results in Hypoxia-Associated Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Metastasis Mediated by Met Signaling Pathway. *Cancer Cell* **21**: 66-81.

De Bock K, Mazzone M, Carmeliet P (2011). Antiangiogenic therapy, hypoxia, and metastasis: risky liaisons, or not? *Nat Rev Clin Oncol* **8**: 393-404.

de Groot JF, Fuller G, Kumar AJ, Piao Y, Eterovic K, Ji Y *et al* (2010). Tumor invasion after treatment of glioblastoma with bevacizumab: radiographic and pathologic correlation in humans and mice. *Neuro Oncol* **12**: 233-242.

Ebos JM, Lee CR, Cruz-Munoz W, Bjarnason GA, Christensen JG, Kerbel RS (2009). Accelerated metastasis after short-term treatment with a potent inhibitor of tumor angiogenesis. *Cancer Cell* **15**: 232-239.

Firlej V, Mathieu JR, Gilbert C, Lemonnier L, Nakhle J, Gallou-Kabani C *et al* (2011). Antiangiogenic Thrombospondin-1 triggers cell migration and development of advanced prostate tumors. *Cancer Res*.

Fontana A, Filleur S, Guglielmi J, Frappart L, Bruno-Bossio G, Boissier S *et al* (2005). Human breast tumors override the antiangiogenic effect of stromal thrombospondin-1 in vivo. *Int J Cancer* **116**: 686-691.

Generali D, Buffa FM, Berruti A, Brizzi MP, Campo L, Bonardi S *et al* (2009). Phosphorylated ER α , HIF-1 α , and MAPK Signaling As Predictors of Primary Endocrine Treatment Response and Resistance in Patients With Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology* **27**: 227-234.

Jain RK (2005). Normalization of Tumor Vasculature: An Emerging Concept in Antiangiogenic Therapy. *Science* **307**: 58-62.

Kalluri R (2003). Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer* **3**: 422-433.

Kawataki T, Naganuma H, Sasaki A, Yoshikawa H, Tasaka K, Nukui H (2000). Correlation of thrombospondin-1 and transforming growth factor- β expression with malignancy of glioma. *Neuropathology* **20**: 161-169.

Loges S, Mazzone M, Hohensinner P, Carmeliet P (2009). Silencing or Fueling Metastasis with VEGF Inhibitors: Antiangiogenesis Revisited. *Cancer Cell* **15**: 167-170.

Ohtani Y, Kijima H, Dowaki S, Kashiwagi H, Tobita K, Tsukui M *et al* (1999). Stromal expression of thrombospondin-1 is correlated with growth and metastasis of human gallbladder carcinoma. *Int J Oncol* **15**: 453-457.

Okada K, Hirabayashi K, Imaizumi T, Matsuyama M, Yazawa N, Dowaki S *et al* (2010). Stromal thrombospondin-1 expression is a prognostic indicator and a new marker of invasiveness in intraductal papillary-mucinous neoplasm of the pancreas. *Biomed Res* **31**: 13-19.

Paez-Ribes M, Allen E, Hudock J, Takeda T, Okuyama H, Vinals F *et al* (2009). Antiangiogenic therapy elicits malignant progression of tumors to increased local invasion and distant metastasis. *Cancer Cell* **15**: 220-231.

Potente M, Gerhardt H, Carmeliet P (2011). Basic and Therapeutic Aspects of Angiogenesis. *Cell* **146**: 873-887.

Rusnati M, Urbinati C, Bonifacio S, Presta M, Taraboletti G (2010). Thrombospondin-1 as a Paradigm for the Development of Antiangiogenic Agents Endowed with Multiple Mechanisms of Action. *Pharmaceuticals* **3**: 1241-1278.

Sirven A, Ravet E, Charneau P, Zennou V, Coulombel L, Guetard D *et al* (2001). Enhanced transgene expression in cord blood CD34(+)-derived hematopoietic cells, including developing T cells and NOD/SCID mouse repopulating cells, following transduction with modified trip lentiviral vectors. *Mol Ther* **3**: 438-448.

Suh EJ, Kabir MH, Kang UB, Lee JW, Yu J, Noh DY *et al* (2011). Comparative profiling of plasma proteome from breast cancer patients reveals thrombospondin-1 and BRWD3 as serological biomarkers. *Exp Mol Med*.

Taraboletti G, Roberts DD, Liotta LA (1987). Thrombospondin-induced tumor cell migration: haptotaxis and chemotaxis are mediated by different molecular domains. *J Cell Biol* **105**: 2409-2415.

Tuszynski GP, Gasic TB, Rothman VL, Knudsen KA, Gasic GJ (1987). Thrombospondin, a Potentiator of Tumor Cell Metastasis. *Cancer Res* **47**: 4130-4133.

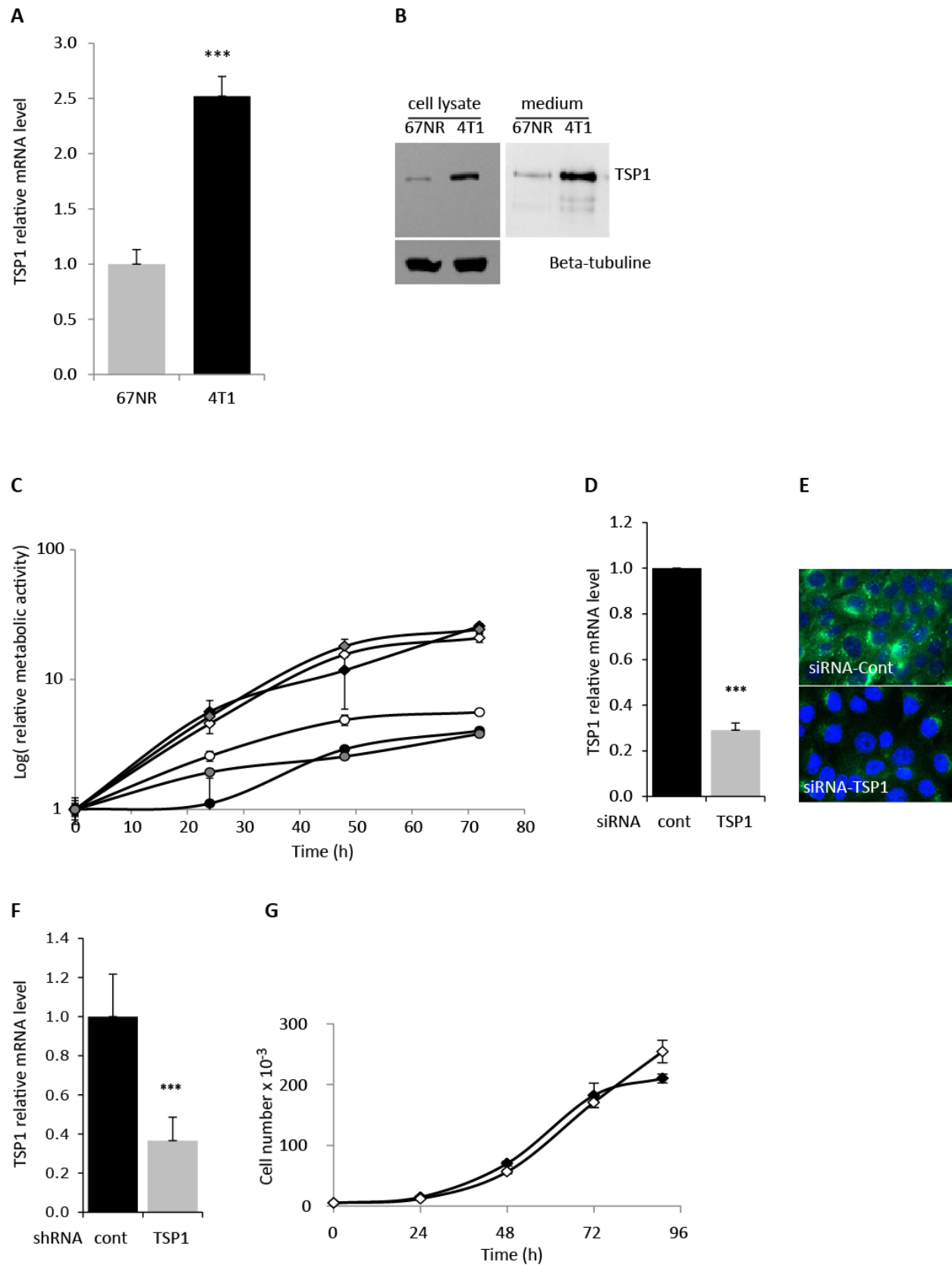
Wang-Rodriguez J, Urquidi V, Rivard A, Goodison S (2003). Elevated osteopontin and thrombospondin expression identifies malignant human breast carcinoma but is not indicative of metastatic status. *Breast Cancer Res* **5**: R136-143.

Yamashita Y, Kurohiji T, Tuszynski GP, Sakai T, Shirakusa T (1998). Plasma thrombospondin levels in patients with colorectal carcinoma. *Cancer* **82**: 632-638.

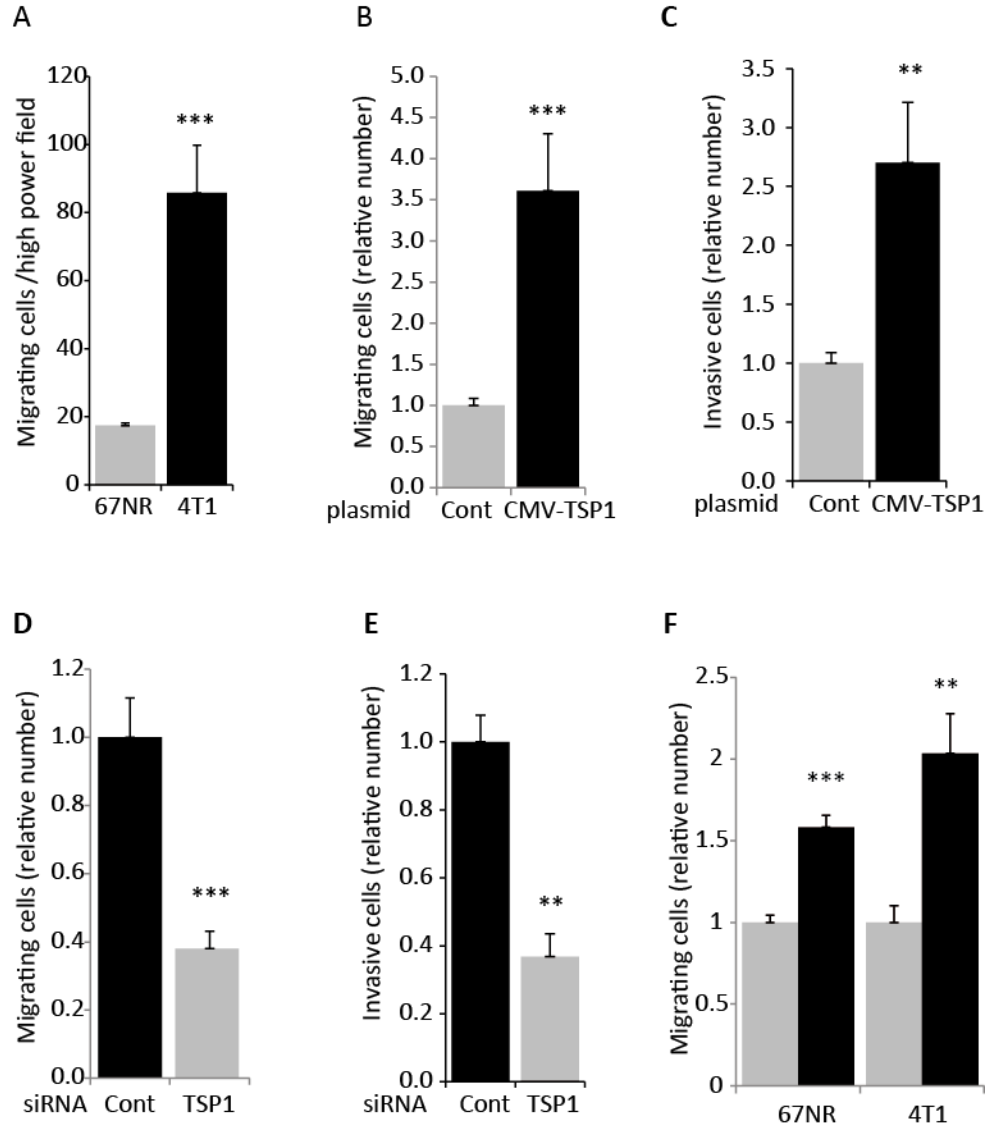
Yee KO, Connolly CM, Duquette M, Kazerounian S, Washington R, Lawler J (2009). The effect of thrombospondin-1 on breast cancer metastasis. *Breast Cancer Res Treat* **114**: 85-96.

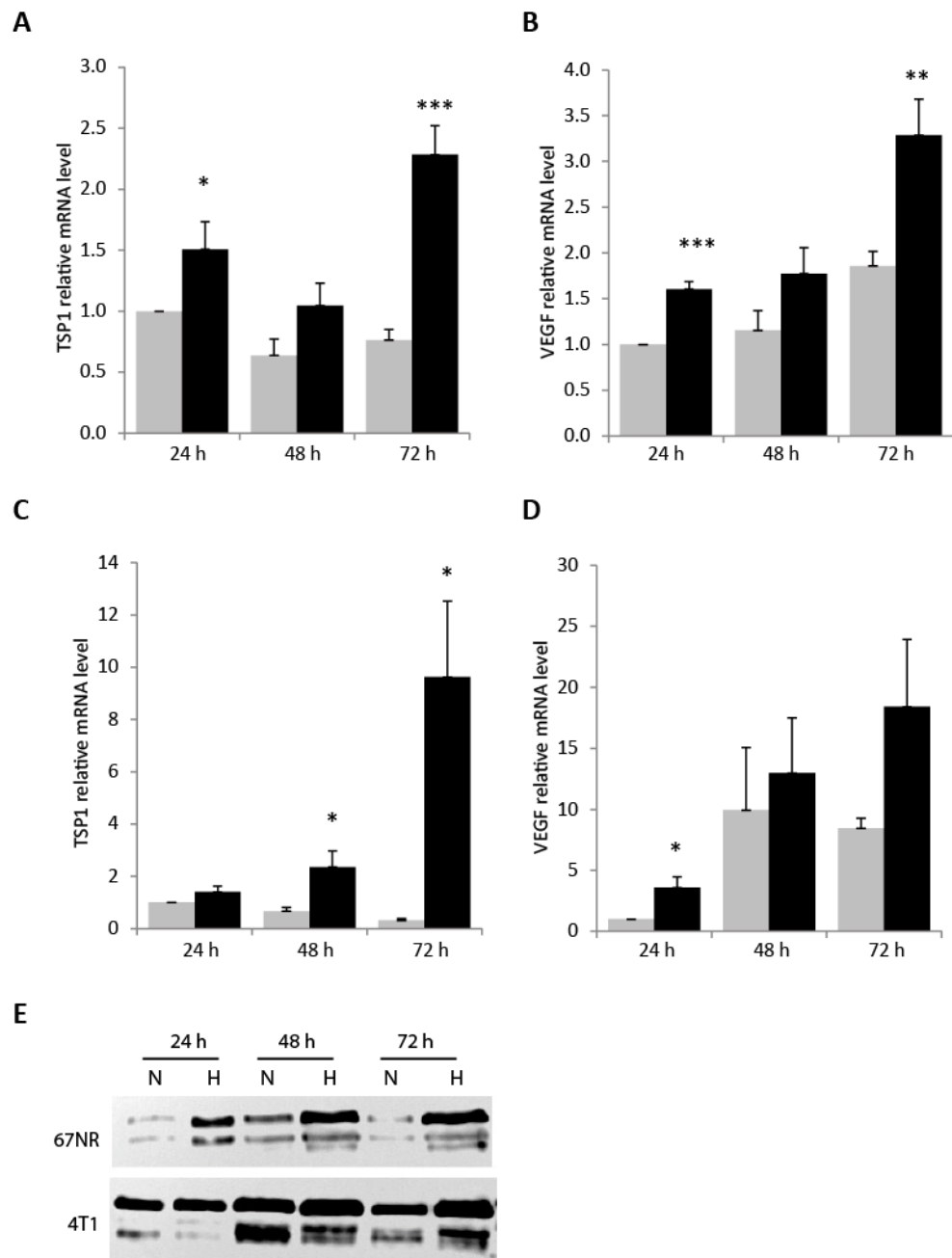
Zhang Q, Bindokas V, Shen J, Fan H, Hoffman RM, Xing HR (2011). Time-Course Imaging of Therapeutic Functional Tumor Vascular Normalization by Antiangiogenic Agents. *Molecular Cancer Therapeutics* **10**: 1173-1184.

Nakhlé et al, Fig.1



Nakhlé et al, Fig.2





Nakhlé et al., Fig.4

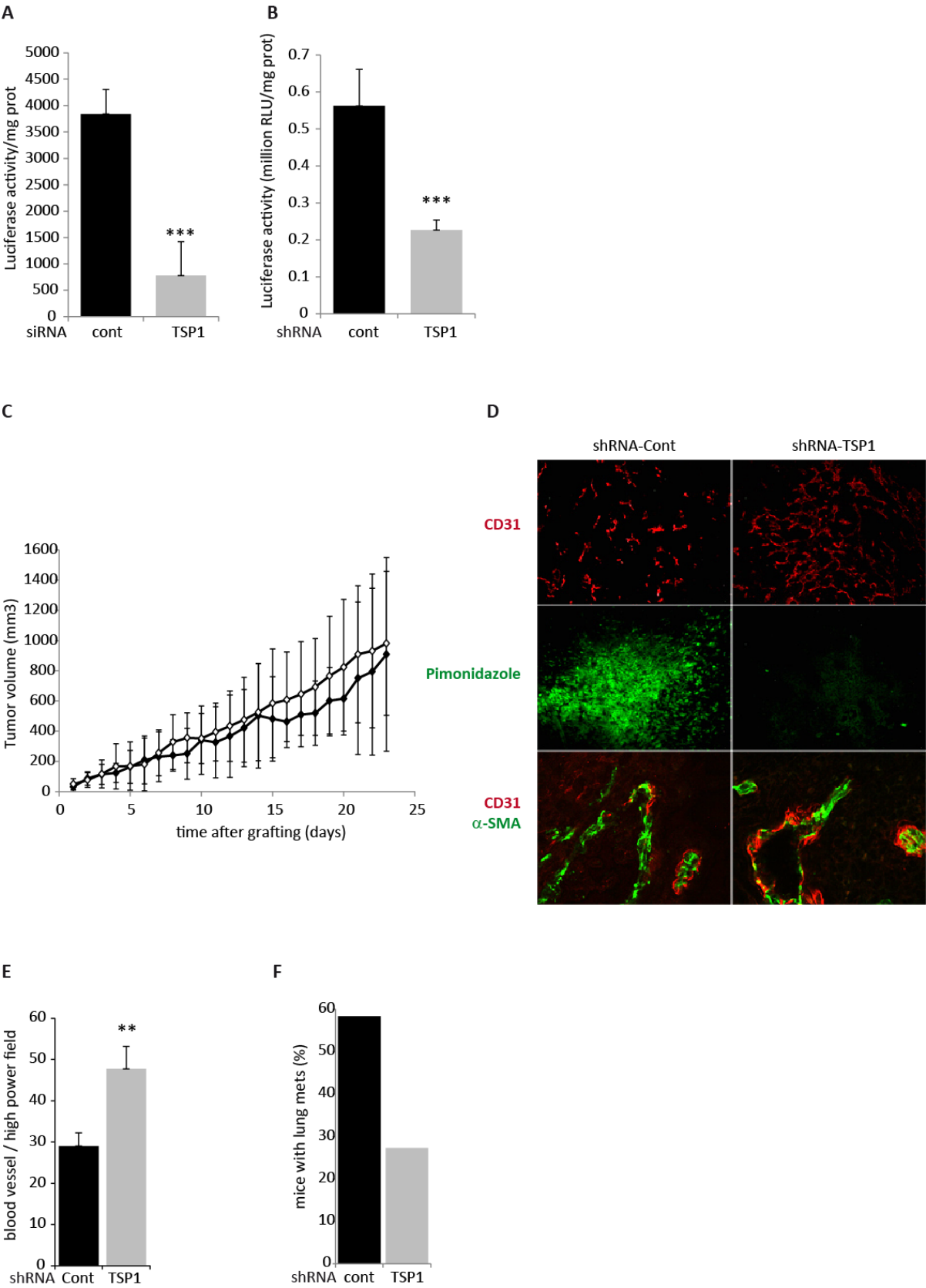


Figure legends

Figure 1: Increased TSP1 expression in metastatic mammary tumor cells. **A:** TSP1 mRNA level in non-metastatic (67NR) and metastatic (4T1) breast tumor cells. Results are normalized to cyclophilin A mRNA level and expressed in arbitrary units, mean value in 67NR cells set to 1 (mean $\pm$ SEM, $n=3$). **B:** TSP1 protein level in 67NR and 4T1 cell lysates (left) and secreted in culture medium in 48 h. α -Tubulin was used as a loading control of cell lysates extracts. **C:** Cell proliferation measured using an MTT assay in 4T1 cells (white diamonds), 4T1 cells transfected 48 h earlier by a control- (black diamond) or TSP1-siRNA (grey diamond), 67NR cells (white circle), 67NR cells transfected 48 h earlier by a CMV-luciferase plasmid used as control (black circles), or by a CMV-TSP1 construct (grey circles) (mean $\pm$ SEM, $n=3$). **D:** TSP1 mRNA level in 4T1 cells 48h after transfection of Cont-siRNA or TSP1-siRNA. Results are expressed as in A. **E:** Immunodetection of TSP1 in 4T1 cells 48h after transfection by control- or TSP1-siRNA. **F:** TSP1 mRNA level in shCont-4T1-LucF or shTSP1-4T1-LucF cells. Results are expressed as in A. **G:** Proliferation of shCont-4T1-LucF and shTSP1-4T1-LucF cells. ** $P<0.01$; *** $P<0.001$.

Figure 2: TSP1 fosters migration of mammary tumor cells. **A:** Comparison of the migration capacity of 67NR and 4T1 cells. Results are expressed as the number of cells migrating/high power field, corrected by the number of cells initially seeded. **B and C:** Migration (B) or invasion through matrigel (C) of 67NR cells seeded 3 days after transfection with a CMV-luciferase plasmid used as control or a CMV-TSP1 plasmid. **D and E:** Migration (D) or invasion through matrigel (E) of 4T1 cells seeded 3 days after transfection with control- or TSP1-siRNA. **F:** Migration of 67NR or 4T1 cells towards culture medium (grey bars) or medium containing ABT-510 (100 nM). Results in B to F are reported to the control value set to 1 (mean $\pm$ SEM, $n=3$). ** $P<0.01$; *** $P<0.001$.

Figure 3: TSP1 expression is induced by hypoxia. TSP1 (A, C) or VEGF (B, D) mRNA levels in 67NR (A, B) or 4T1 (C, D) cells grown in normoxia (grey bars) or hypoxia (black bars) for the indicated time. All values, normalized to cyclophilin A mRNA level are expressed in comparison to values measured at 24h in normoxia, set to 1. **E:** TSP1 protein secreted in the media of 67NR or 4T1 cells grown for the indicated time in normoxia (N) or hypoxia (H). * $p<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$.

Figure 4: TSP1 promotes extravasation and metastasis while stimulating angiogenesis and normalization of tumor vasculature. **A:** Luciferase activity in lungs of mice 24 after IV injection of 4T1-LucF cells that were transfected 48h earlier with cont- or TSP1-siRNA as indicated. Results are expressed as arbitrary units of luciferase activity/mg protein, mean $\pm$ SEM, $n=6$ mice per group). **B:** Luciferase activity in lungs of mice 24 hours after injection of shcont-4T1-LucF or shTSP1-4T1-LucF cells. Results are expressed as in A (mean $\pm$ SEM, $n>9$ mice per group). **C:** Volumes of orthotopically grafted shcont-4T1-LucF or shTSP1-4T1-LucF tumors over time (mean $\pm$ SEM, $n>12$ mice per group). At the end of the experiment pimonidazole was injected IV and mice sacrificed 20 minutes later; tumors and lungs were dissected and analyzed. **D:** Left panels: shcont-4T1-LucF tumors, right panels shTSP1-4T1-LucF tumors. Upper panels: CD31 detection of blood vessels (magnification: x20). Middle panels: Detection of pimonidazole adduits, indicative of hypoxia (magnification: x20). Lower panels: co-localization of CD31 positive endothelial cells and α -SMA positive pericytes in tumors (magnification: x63). **E:** quantification of CD31 positive blood vessel density in primary tumors (vessels/high power field, mean $\pm$ SEM). **F:** Percentage of mice in each group with lung metastases. Presence of metastases were assessed by macroscopic examination and confirmed by luciferase quantification in lungs homogenates.

Principales observations

Dans cette étude, nous démontrons que la TSP1 favorise l'extravasation des cellules 4T1 aux poumons ainsi que leur dissémination métastatique spontanée, bien que la TSP1 conserve toutes ses propriétés anti-angiogéniques. Nous montrons également que l'effet pro-tumoral de la TSP1 est lié à ses capacités à promouvoir la migration et l'invasion cellulaires, alors qu'elle demeure sans effet sur l'implantation et la croissance des tumeurs mammaires primaires. De façon intéressante, le ciblage de la TSP1 est associé à une augmentation de la MVD, à une diminution de l'hypoxie intratumorale et à une amélioration de la couverture péricytaire. Ces différents mécanismes responsables de l'induction de l'effet pro-métastatique semblent être communs aux inhibiteurs de l'angiogenèse, qu'ils soient endogènes ou pharmacologiques, et identifient la TSP1 comme une cible thérapeutique potentielle pour le traitement du cancer du sein métastatique.

Discussion

Cette étude démontre un rôle inattendu d'une molécule anti-angiogénique, la TSP1, dans l'induction d'un processus pro-métastatique. Elle suggère la présence d'une interdépendance entre les propriétés anti-angiogéniques et pro-invasives de la TSP1. En effet, un traitement des cellules mammaires à un nonapeptide anti-angiogénique, l'ABT-510, augmente leur pouvoir migratoire *in vitro*. Cependant, les mécanismes empruntés par la TSP1 pour induire ce phénotype agressif n'ont pas encore été élucidés. Mais, un certain nombre d'arguments, dont l'activation du TGF- β latent par la TSP1 via son domaine KRFG, et la capacité de l'ABT-510 à augmenter l'expression du TGF- β actif et non latent dans un modèle de prolactinome *in vivo* (Recouvreux et al., 2012), suggèrent fortement que la TSP1 exerce ses capacités pro-invasives via l'activation du TGF- β . Ces hypothèses sont en cours d'études par le laboratoire.

Discussion générale et conclusion

On retrouve dans la bibliographie des études contradictoires sur le rôle de la TSP1 dans les tumeurs. La majorité de ces études se sont focalisées sur le rôle anti-angiogénique, et donc supposé anti-tumoral de la TSP1. D'autres cependant ont, depuis plus de 25 ans, associé la TSP1 avec la progression tumorale. Le groupe de Georges Tuszynski en particulier a documenté les propriétés pro-invasives et pro-métastatiques de la TSP1 dans différents modèles dès 1987 (Sargiannidou et al., 2004; Tuszynski et al., 1987). D'autres laboratoires, trouvant une augmentation de la TSP1 associée avec une forte densité vasculaire ont conclu que la TSP1 devenait pro-angiogénique (Byrne et al., 2007).

La mise à disposition des anti-angiogéniques en clinique n'a pas apporté les bouleversements espérés quant à la survie des patients. Ces résultats décevants s'expliquent par le développement de mécanismes de résistance, notamment par l'augmentation de l'invasion et l'accélération de la dissémination métastatique. La communauté scientifique et médicale est sensibilisée quant aux sérieux effets secondaires toxiques associés à la thérapie anti-angiogénique. De nombreux essais cliniques basés sur l'inhibition de l'angiogenèse ont été arrêtés, notamment deux études cliniques de phase II sur l'ABT-510, suite au manque d'efficacité thérapeutique. Des autorisations d'utilisation clinique ont été réévaluées et certaines ont été révoquées, notamment dans le cancer du sein métastatique. D'autres prescriptions ne sont plus préconisées qu'en fin de vie des patients à cause des capacités invasives qui leur ont été associées, notamment dans les glioblastomes.

Notre laboratoire a été le premier à montrer qu'une exposition prolongée et continue aux inhibiteurs de l'angiogenèse, telle que la TSP1, entraîne une résistance des tumeurs qui deviennent insensibles à la TSP1 (Filleur et al., 2001). Le développement de résistances contre des inhibiteurs pharmacologiques de l'angiogenèse d'une part, et le fait que les tumeurs soient capables de développer des résistances contre la TSP1 nous ont conduit à réévaluer le rôle de cette protéine dans deux types de cancers, mammaires et prostatiques, afin de déterminer si des mécanismes communs de résistance se développent contre les inhibiteurs endogènes et pharmacologiques.

Nous démontrons que l'inhibition de la TSP1, par ARN interférence, augmente la MVD intra-tumorale dans nos modèles précliniques étudiés. Nous confirmons donc le rôle anti-angiogénique de la TSP1, qui est très largement documenté dans la littérature. Cependant, cette augmentation

de la MVD est associée à une diminution de la croissance tumorale prostatique et à l'apparition de métastases pulmonaires mammaires. Il est important de noter qu'à ce jour il n'y a pas de modèle expérimental pertinent de tumeurs prostatiques formant des métastases. Il est donc difficile de tester l'effet de l'inhibition de la TSP1 sur la formation de métastases prostatiques. Dans nos études, l'invalidation de la TSP1, par une approche qui bloque toutes ses fonctions simultanément et qui montre une augmentation de la MVD, permet d'affirmer que la TSP1 conserve ses propriétés anti-angiogéniques dans les tumeurs de haut grade du sein comme de la prostate. Les effets pro-tumoraux de la TSP1 observés dans nos deux modèles ne sont donc pas liés à la perte de la fonctionnalité de la TSP1 (mutation, rétention dans le réticulum, protéine tronquée, dégradée), ni à une perte d'expression de ses récepteurs.

En comparant les résultats de nos deux études, nous notons une différence d'effets induits par la TSP1 sur les tumeurs primaires de la prostate et du sein : l'inhibition de la TSP1 réprimant la croissance des tumeurs prostatiques humaines xénogreffées en sous-cutané, mais étant sans effet sur celle des tumeurs mammaires murines orthotopiques. Plusieurs hypothèses pourraient expliquer les différences phénotypiques observées :

Bien que le cancer du sein et le cancer de la prostate soient les deux cancers invasifs les plus courants chez les femmes et les hommes respectivement, et bien que les tumeurs qui en découlent soient généralement hormono-dépendantes et possèdent de remarquables similitudes biologiques au cours de la progression, ces cancers surviennent dans des organes qui sont différents en termes d'anatomie et de fonctions physiologiques et physiopathologiques, et ne répondraient donc pas forcément de la même façon à une thérapie les ciblant (Risbridger et al., 2010). De plus, nous avons montré que différents canaux calciques, tels que le TRPV2, le TRPV3, le TRPV6, le TRPM8, le TRPC4 et le TRPC6 régulent l'expression de la TSP1 dans le carcinome de la prostate, et que suivant le canal calcique impliqué, on observe une augmentation ou une diminution de l'expression de la TSP1. Des profils d'expression des canaux calciques différents entre les carcinomes prostatiques et mammaires pourraient ainsi être impliqués dans des réponses tumorales différentes. Ainsi, il serait intéressant d'étudier dans la carcinogenèse mammaire la régulation calcique en réponse à l'inhibition de la TSP1, étude qui n'a pas été abordée au cours de ma thèse.

Les modèles précliniques utilisés dans le cadre de nos études présentent également des différences majeures. Les xénogreffes prostatiques humaines ont été établies en sous-cutané chez des souris immunodéprimées, alors que celles mammaires syngéniques sont orthotopiques chez des souris immunocompétentes. Cependant, les avis des scientifiques restent partagés concernant le choix des modèles expérimentaux les plus performants pour mimer la pathologie humaine. L'utilisation de lignées humaines permet de rester le plus proche possible de ce qui se passe chez l'Homme, tandis que les modèles murins tiennent compte de tout l'environnement naturel et du système immunitaire de la tumeur.

Une autre variante est aussi importante à noter. Dans notre première étude, l'injection des siRNA-TSP1 en intrapéritonéal inhibe l'ARNm TSP1 dans les tumeurs prostatiques, composées de cellules stromales murines (fibroblastes, CE, cellules immunitaires...) et de cellules tumorales humaines. Cependant, la séquence du siRNA-TSP1 utilisée inhibe l'expression de la TSP1 humaine et mammaire, et la TSP1 est donc inhibée dans le compartiment tumoral et stromal. Dans notre deuxième étude, l'extinction de la TSP1 par des shRNA-TSP1 est limitée aux cellules tumorales mammaires. Il est donc possible que la TSP1 exprimée par le stroma tumoral soit responsable, ou tout au moins impliquée dans l'effet stimulateur de la croissance tumorale prostatique. L'injection des cellules 4T1 chez une souris KO-TSP1 ou le traitement des tumeurs 4T1 par des siRNA-TSP1 permettrait d'apporter des éléments de réponse à cette hypothèse.

Nous montrons que la TSP1 exerce son effet pro-tumoral en partie via son rôle stimulateur de la migration cellulaire. Cependant, cet effet pro-migratoire est médié, au moins en partie, par une action autocrine via le CD36 exprimé à la surface des cellules tumorales prostatiques. Ce récepteur n'est pas impliqué dans le rôle pro-migratoire des cellules 4T1 puisque ces cellules n'expriment pas le CD36. Ce résultat laisse supposer que l'inhibition de la croissance tumorale prostatique pourrait être due au blocage de l'interaction TSP1-CD36. De façon intéressante, la même différence d'expression du CD36 a été notée chez les patients. Aucune immunoréactivité pour le CD36 n'a été observée à la surface des cellules tumorales de carcinomes canauxaires invasives du sein (Cleardin et al., 1993), alors qu'il est fortement exprimé sur les cellules tumorales des patients atteints de carcinomes prostatiques métastatiques (Colombel et al., 2005).

Nous nous sommes donc demandé quels étaient les partenaires qui pourraient être impliquées dans l'effet pro-tumoral de la TSP1, notamment dans le carcinome mammaire. De façon intéressante, nous observons que le CD47 est plus fortement exprimé dans les cellules 4T1 métastatiques que dans les cellules 67NR non métastatiques. Il faudrait donc tester si le blocage de l'interaction TSP1-CD47 est capable de produire les mêmes effets anti-métastatiques qu'un siRNA-TSP1 ou un siRNA-CD47.

Une étude récente a montré que le blocage du TGF β dans les cellules 4T1 réduit l'apparition de nodules métastatiques aux poumons, tout en augmentant le taux de vaisseaux perfusés, ainsi que le recrutement et l'incorporation des péricytes au niveau des vaisseaux sanguins (Liu et al., 2012). Nous pourrions donc penser que la TSP1 pourrait également médier ses effets pro-métastatiques dans le modèle 4T1 via l'inactivation du TGF β . Cette hypothèse sera également testée par notre laboratoire.

Plusieurs fonctions ont été associées à la TSP1 dans la littérature. Nous démontrons que la TSP1 exerce son effet pro-tumoral grâce à ses capacités activatrices de la migration et de l'invasion. En effet, nous observons que la TSP1 stimule la migration d'un grand nombre de types cellulaires tumoraux: prostatiques (C4-2, LNCaP, PC3), mammaires (67NR, 4T1, MCF7, MDA-MB231), pulmonaires (LLC) et de mélanomes (B16-F10, B16-BL6). La synthèse et la sécrétion de la TSP1 générées par l'hypoxie, stimule la capacité des cellules tumorales à migrer vers des régions moins hypoxiques. Cependant, d'autres fonctions de la TSP1 peuvent être aussi impliquées dans l'effet pro-tumoral observé, notamment sa fonction d'adhésion plaquettaire. En effet, il a été montré que le prétraitement des souris par une injection de la protéine TSP1 purifiée, suivie 5 minutes plus tard par une injection de cellules de sarcome, augmente de deux fois la capacité d'extravasation de ces cellules dans les poumons, mais cette capacité est inhibée dans le cas d'une thrombocytopénie générée *in vivo* (Tuszynski et al., 1987). En effet, il est connu que la TSP1 est un constituant majeur des granules α des plaquettes, et qu'elle est fortement exprimée à leur surface lors de l'activation plaquettaire (Packham and Mustard, 1984). De plus, des données expérimentales ainsi que cliniques montrent que les interactions entre les cellules tumorales et les plaquettes sont cruciales pour favoriser la progression tumorale et la formation de métastases (Buergey et al., 2012; Gay and Felding-Habermann, 2011). Nous

démontrons que la TSP1 synthétisée et sécrétée par les 4T1 stimule l'extravasation de ces cellules aux poumons, de façon similaire aux cellules de sarcomes pré-traitées à la TSP1. Il faudrait donc vérifier dans notre modèle si la déplétion des plaquettes murines inhiberait l'effet de la TSP1 sur l'extravasation ; et/ou si des anticorps bloquant la liaison de la TSP1 aux récepteurs des plaquettes tels que le CD36 ou le CD47 inhiberaient également cet effet.

Il est largement admis que la lymphangiogenèse, qui est une étape clé dans la formation de métastases ganglionnaires, s'effectue dans un environnement tumoral indépendant des plaquettes (Stacker et al., 2002). Nous nous sommes donc intéressés au rôle que pourrait avoir la TSP1 dans ce contexte. De façon surprenante, on ne retrouve dans la littérature que deux articles qui traitent le rôle de la TSP1 dans la lymphangiogenèse et leurs conclusions sont opposées. Le premier montre que dans un modèle de rétine avasculaire, la TSP1 est inhibitrice de la lymphangiogenèse via le CD36 exprimé à la surface des monocytes (Cursiefen et al., 2011), alors que le second note que la TSP1 reste sans effet sur la lymphangiogenèse et la formation de métastases ganglionnaires dans des modèles précliniques de cancers de la peau (Hawighorst et al., 2002). Nos résultats préliminaires montrent que la lymphangiogenèse intratumorale n'est pas affectée par l'inhibition de la TSP1 dans le modèle 4T1, et ceci à deux temps différents : un temps précoce après 15 jours de la prise tumorale, et un temps plus tardif après 40 jours en moyenne. Cependant, nous n'avons pas observé de métastases ganglionnaires. Il est donc possible que la voie lymphatique ne soit pas celle préférentiellement utilisée pour la formation de métastases à distance dans notre modèle 4T1. Ces résultats nécessitent d'être confirmés sur le même modèle à différents temps, voire sur d'autres modèles cellulaires beaucoup plus performants pour la formation de métastases ganglionnaires telles que les LLC ou les B16-BL6.

Un rôle pro-tumoral a été également associé à d'autres protéines anti-angiogéniques telles que DLL4 (Noguera-Troise et al., 2006) ou CXCL4L1 (Bikfalvi et al., 2011). Cependant nous notons une différence par rapport à ces deux études. L'inhibition de CXCL4L1 ou de DLL4 dans des modèles précliniques n'induit pas la formation de néo-vaisseaux (C. Quemener, A. Dubrac, H. Prats and A. Bikfalvi, travaux non publiés), ou induit celle de vaisseaux non

fonctionnels (Noguera-Troise et al., 2006). L'inhibition de la TSP1 quant à elle conduit à une augmentation de la densité des vaisseaux dont une partie au moins est fonctionnelle, couverts par des péricytes, ce qui conduit à une réduction de l'hypoxie. Des expériences complémentaires (Doppler, FITC-Dextran) seraient utiles pour confirmer la fonctionnalité de ces vaisseaux.

Rakesh Jain a dès 2005 proposé le concept de normalisation vasculaire (Jain, 2005). Selon ce concept, un effet bénéfique majeur des inhibiteurs de l'angiogenèse serait leur capacité à éliminer en premier les vaisseaux tumoraux instables et anormaux, diminuant ainsi la pression interstitielle tumorale et améliorant la diffusion intratumorale des traitements conventionnels telles que la chimiothérapie ou la radiothérapie. Cependant cette étape de normalisation n'est que transitoire, suivie par une seconde étape pendant laquelle les traitements anti-angiogéniques accroissent massivement l'hypoxie dans la tumeur. L'effet de normalisation vasculaire des inhibiteurs pharmacologiques ne s'exerce que sur les vaisseaux préexistants.

Par rapport à ces traitements, l'inhibition de la TSP1 présente plusieurs avantages en produisant :

- Une augmentation du nombre de vaisseaux fonctionnels ayant une bonne couverture péricytaire. Cette augmentation, qui perdure tout au long du traitement devrait permettre une meilleure pénétration des médicaments chimiothérapeutiques et une amélioration de la sensibilité à la radiothérapie.
- Une diminution de l'hypoxie intratumorale
- Une très forte inhibition de la capacité d'extravasation des cellules tumorales
- Une réduction de la dissémination métastatique dans les poumons

De façon intéressante, il a été montré que le blocage de la liaison TSP1-CD47 augmente la radioprotection des cellules normales (Isenberg et al., 2008), et la radiosensibilité des tumeurs pulmonaires et de mélanomes (Maxhimer et al., 2009b). Cependant, l'oxygénation et la perfusion des tumeurs suite aux traitements combinés (blocage Liaison TSP1-CD47 + radiothérapie) n'ont pas été étudiées dans leurs modèles expérimentaux et nécessitent d'être exploitées plus en détails.

Notre approche thérapeutique avec SeleXel prévoit d'utiliser des siRNA-TSP1 pour le traitement des cancers avancés, notamment des cancers de la prostate androgéno-indépendants et des cancers du sein métastatiques. Plusieurs essais cliniques basés sur l'utilisation des siRNAs sont actuellement en cours, notamment pour des tumeurs métastatiques (Davidson and McCray, 2011). Cependant, les vrais défis de cette technologie sont les voies d'administration, les méthodes de vectorisation et la biodistribution des siRNAs. Nous avons démontré que des siRNA injectés en solution saline en intrapéritonéal ou en sous-cutané pénètrent dans les tumeurs xénogreffées et inhibent efficacement leur cible (Compagno et al., 2007; Delloye-Bourgeois et al., 2009; Firlej et al., 2011; Morin et al., 2009). L'administration de siRNAs non vectorisés par ces voies systémiques est également efficace pour faire pénétrer des siRNAs dans différents organes, en particulier la prostate et les os chez les mâles. Des études de la biodistribution des siRNAs injectés par ces voies chez les femelles sont en cours. Elles permettront de déterminer si ces méthodes sont applicables pour l'administration de siRNAs dans le tissu mammaire.

Sur le plan clinique, la surexpression de la TSP1 a été observée dans plusieurs types de cancers humains tels que les cancers de la vésicule biliaire (Ohtani et al., 1999), les cancers gynécologiques (Nathan et al., 1994), les carcinomes colorectaux (Yamashita et al., 1998), les glioblastomes (Kawataki et al., 2000b) et le cancer du pancréas (Okada et al., 2010).

Il est vrai que certains laboratoires ont associé l'augmentation de la TSP1 dans certains types de cancers à un meilleur pronostic. C'est le cas par exemple des carcinomes urothéliaux dans lesquels l'augmentation de l'expression du peptide 4N1K, localisé dans l'extrémité C-terminale de la TSP1, est inversement corrélée avec le phénotype agressif des tumeurs. Ces résultats sont intéressants car ils révèlent que soit :

- 1- Le rôle de chaque peptide pris séparément de la TSP1 sur la progression tumorale pourrait être différent de celui effectué par la protéine entière.
- 2- Le rôle pro-tumoral et pro-métastatique de la TSP1 dans les carcinomes prostatiques et mammaires pourraient ne pas être un mécanisme général à tous les types de cancers. De ce fait, il serait intéressant de tester le rôle de la TSP1 dans d'autres modèles, de caractéristiques différentes, qui progressent plus ou

moins rapidement ou dont le processus de l'angiogenèse est plus ou moins important pour mieux comprendre le rôle de la TSP1 dans différents contextes.

Toutefois, il faut être très prudent quant à l'analyse des différentes données de la littérature, et plus précisément comprendre les objectifs des études publiées. Aussi, faut-il observer de près les différentes ségrégations des groupes de patients et voir si elles répondent à la question posée.

Dans le cadre de notre étude, nous démontrons que l'expression de la TSP1 en ARNm est corrélée avec l'augmentation de l'invasion et de la rechute des patients atteints de cancers de la prostate (Firlej et al., 2011). De plus, les premiers résultats d'une étude en cours de notre laboratoire montrent que l'expression protéique de la TSP1 plasmatique est en corrélation directe avec le grade tumoral des patients atteints de cancers de la prostate. Ces observations seront complétées sur un plus grand nombre d'échantillons plasmatiques de patients de différents grades. Parallèlement, nous avons entrepris une étude similaire avec les cliniciens de l'Institut Claudius Regaud à Toulouse pour déterminer si l'expression tumorale de la TSP1 et le taux plasmatique sont corrélés à l'état invasif des tumeurs, et si ce marqueur pourrait permettre d'identifier de façon précoce les patientes à risque de tumeurs invasives. Ce programme est justifié par la nécessité de disposer de marqueurs biologiques permettant lors des dépistages systématiques d'identifier de façon précoce le caractère agressif des tumeurs afin d'orienter les traitements.

En conclusion de ce travail, nous pouvons proposer le modèle suivant pour rendre compte des effets de la TSP1 au cours de la progression tumorale :

Lors des premières phases de développement des tumeurs, les cellules tumorales sont très dépendantes de l'angiogenèse pour leur développement, ce qui favorise la sélection de cellules réprimant l'expression de la TSP1. Cependant, au fur et à mesure de la progression tumorale, la croissance hétérogène des tumeurs, la mauvaise qualité de la vascularisation tumorale et son instabilité créent des zones hypoxiques. Cette hypoxie stimule la production de la TSP1. Un cercle vicieux s'établit alors, la TSP1 accroissant l'hypoxie du fait de son activité anti-angiogénique (Figure 21, partie gauche).

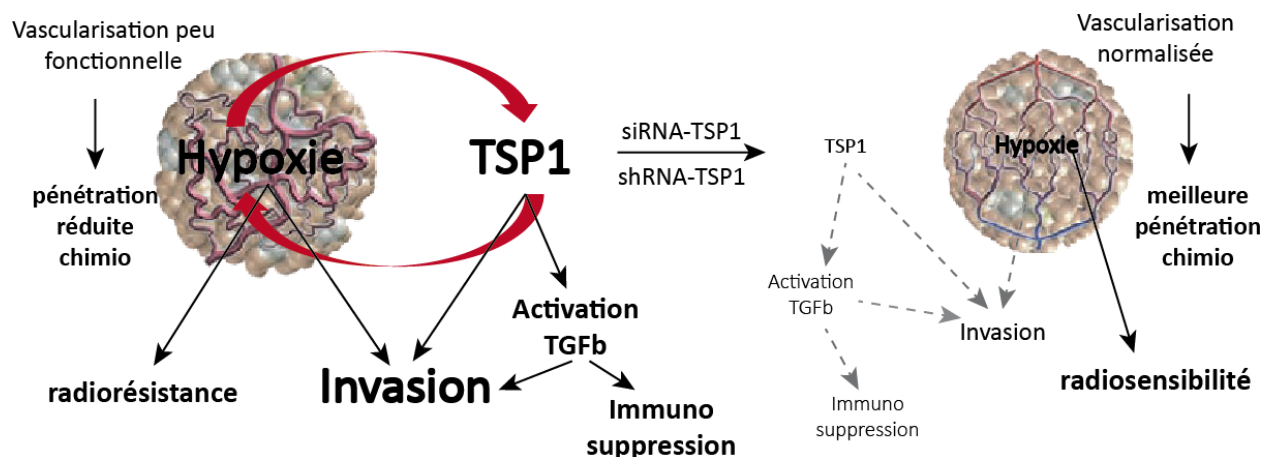


Figure 21 : Notre modèle proposé sur les effets de la TSP1.

Les cellules tumorales qui survivent à ce stress se sont adaptées à l'hypoxie et à l'acidose et sont moins dépendantes de l'angiogenèse pour leur survie. Ces cellules sont aussi plus agressives et dotées de capacités importantes de migration et d'invasion, ce qui facilite leur dissémination métastatique. Quel que soit le stade tumoral, la TSP1 est, et reste une protéine anti-angiogénique et stimulatrice de la migration. C'est donc la capacité des cellules tumorales à résister au stress hypoxique, et non les propriétés intrinsèques de la TSP1, qui explique pourquoi cette protéine est considérée comme une protéine anti-tumorale dans certains cancers et comme une protéine associée à l'invasion et à un mauvais pronostic dans d'autres situations. Nos résultats montrent que les effets anti-angiogéniques et pro-migratoires de la TSP1 sont étroitement liés, un nonapeptide dérivé de la TSP1 induisant tout à la fois une inhibition de l'angiogenèse in vitro et in vivo (Henkin and Volpert, 2011) et une stimulation de la migration des cellules tumorales mammaires (nos travaux récents) et prostatiques (Firlej et al., 2011).

Nos résultats nous conduisent à proposer une stratégie thérapeutique qui au lieu d'inhiber l'angiogenèse a pour objectif en inhibant la TSP1 (Figure 21, partie droite) de normaliser la vascularisation tumorale, pour réduire l'hypoxie, améliorer l'efficacité de traitements chimiothérapeutiques ou de radiothérapie associés, et surtout de réduire l'invasion et la dissémination métastatique en rendant les vaisseaux sanguins moins perméables et en diminuant la capacité d'extravasation et la motilité des cellules tumorales.

Références

- Adams, J. C. (1995). Formation of stable microspikes containing actin and the 55 kDa actin bundling protein, fascin, is a consequence of cell adhesion to thrombospondin-1: implications for the anti-adhesive activities of thrombospondin-1. *J Cell Sci* 108 (Pt 5), 1977-1990.
- Adams, J. C. (2001). Thrombospondins: multifunctional regulators of cell interactions. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17, 25-51.
- Adams, J. C., and Lawler, J. (1993). Diverse mechanisms for cell attachment to platelet thrombospondin. *J Cell Sci* 104 (Pt 4), 1061-1071.
- Adams, J. C., and Tucker, R. P. (2000). The thrombospondin type 1 repeat (TSR) superfamily: diverse proteins with related roles in neuronal development. *Dev Dyn* 218, 280-299.
- Adler, E. H., Sunkara, J. L., Patchefsky, A. S., Koss, L. G., and Oktay, M. H. (2012). Predictors of disease progression in ductal carcinoma in situ of the breast and vascular patterns. *Human Pathology* 43, 550-556.
- Agah, A., Kyriakides, T. R., Lawler, J., and Bornstein, P. (2002). The lack of thrombospondin-1 (TSP1) dictates the course of wound healing in double-TSP1/TSP2-null mice. *Am J Pathol* 161, 831-839.
- Albo, D., Berger, D. H., Rothman, V. L., and Tuszynski, G. P. (1999). Role of urokinase plasminogen activator receptor in thrombospondin 1-mediated tumor cell invasion. *J Surg Res* 82, 331-338.
- Albo, D., Berger, D. H., Wang, T. N., Hu, X., Rothman, V., and Tuszynski, G. P. (1997). Thrombospondin-1 and transforming growth factor-beta I promote breast tumor cell invasion through up-regulation of the plasminogen/plasmin system. *Surgery* 122, 493-499; discussion 499-500.
- Albo, D., and Tuszynski, G. P. (2004). Thrombospondin-1 up-regulates tumor cell invasion through the urokinase plasminogen activator receptor in head and neck cancer cells. *J Surg Res* 120, 21-26.
- Algire, G. H., Chalkley, H. W., Earle, W. E., Legallais, F. Y., Park, H. D., Shelton, E., and Schilling, E. L. (1950). Vascular reactions of normal and malignant tissues in vivo. III. Vascular reactions' of mice to fibroblasts treated in vitro with methylcholanthrene. *J Natl Cancer Inst* 11, 555-580.
- Alitalo, K., Tammela, T., and Petrova, T. V. (2005). Lymphangiogenesis in development and human disease. *Nature* 438, 946-953.
- Ambati, B. K., Nozaki, M., Singh, N., Takeda, A., Jani, P. D., Suthar, T., Albuquerque, R. J., Richter, E., Sakurai, E., Newcomb, M. T., *et al.* (2006). Corneal avascularity is due to soluble VEGF receptor-1. *Nature* 443, 993-997.
- Anderson, J. C., Grammer, J. R., Wang, W., Nabors, L. B., Henkin, J., Stewart, J. E., Jr., and Gladson, C. L. (2007). ABT-510, a modified type 1 repeat peptide of thrombospondin, inhibits malignant glioma growth in vivo by inhibiting angiogenesis. *Cancer Biol Ther* 6, 454-462.
- Andre, F., Berrada, N., and Desmedt, C. (2010). Implication of tumor microenvironment in the resistance to chemotherapy in breast cancer patients. *Curr Opin Oncol* 22, 547-551.
- Annis, D. S., Gunderson, K. A., and Mosher, D. F. (2007). Immunochemical analysis of the structure of the signature domains of thrombospondin-1 and thrombospondin-2 in low calcium concentrations. *J Biol Chem* 282, 27067-27075.
- Armstrong, L. C., and Bornstein, P. (2003). Thrombospondins 1 and 2 function as inhibitors of angiogenesis. *Matrix Biol* 22, 63-71.
- Asch, A. S., Barnwell, J., Silverstein, R. L., and Nachman, R. L. (1987). Isolation of the thrombospondin membrane receptor. *J Clin Invest* 79, 1054-1061.
- Aslakson, C. J., and Miller, F. R. (1992). Selective events in the metastatic process defined by analysis of the sequential dissemination of subpopulations of a mouse mammary tumor. *Cancer Res* 52, 1399-1405.
- Auguste, P., Lemiére, S., Larrieu-Lahargue, F., and Bikfalvi, A. (2005). Molecular mechanisms of tumor vascularization. *Crit Rev Oncol Hematol* 54, 53-61.

Azam, F., Mehta, S., and Harris, A. L. (2010). Mechanisms of resistance to antiangiogenesis therapy. *Eur J Cancer* 46, 1323-1332.

Backer, M. V., and Backer, J. M. (2012). Imaging key biomarkers of tumor angiogenesis. *Theranostics* 2, 502-515.

Baenziger, N. L., Brodie, G. N., and Majerus, P. W. (1971). A thrombin-sensitive protein of human platelet membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68, 240-243.

Bagavandoss, P., and Wilks, J. W. (1990). Specific inhibition of endothelial cell proliferation by thrombospondin. *Biochem Biophys Res Commun* 170, 867-872.

Baker, L. H., Rowinsky, E. K., Mendelson, D., Humerickhouse, R. A., Knight, R. A., Qian, J., Carr, R. A., Gordon, G. B., and Demetri, G. D. (2008). Randomized, phase II study of the thrombospondin-1-mimetic angiogenesis inhibitor ABT-510 in patients with advanced soft tissue sarcoma. *J Clin Oncol* 26, 5583-5588.

Bale, M. D., Westrick, L. G., and Mosher, D. F. (1985). Incorporation of thrombospondin into fibrin clots. *J Biol Chem* 260, 7502-7508.

Batchelor, T. T., Sorensen, A. G., di Tomaso, E., Zhang, W. T., Duda, D. G., Cohen, K. S., Kozak, K. R., Cahill, D. P., Chen, P. J., Zhu, M., *et al.* (2007). AZD2171, a pan-VEGF receptor tyrosine kinase inhibitor, normalizes tumor vasculature and alleviates edema in glioblastoma patients. *Cancer Cell* 11, 83-95.

Baumgartner, M. J., Palmer, B. E., Banerjee, A., and McCarter, M. D. (2008). Role of Melanoma Secreted Thrombospondin-1 on

Induction of Immunosuppressive Regulatory T Cells

through CD47. *Journal of Cancer Molecules* 4, 145-152.

Bein, K., and Simons, M. (2000). Thrombospondin type 1 repeats interact with matrix metalloproteinase 2. Regulation of metalloproteinase activity. *J Biol Chem* 275, 32167-32173.

Bergers, G., and Benjamin, L. E. (2003). Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* 3, 401-410.

Bergers, G., and Hanahan, D. (2008). Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. *Nat Rev Cancer* 8, 592-603.

Bikfalvi, A., Moenner, M., Javerzat, S., North, S., and Hagedorn, M. (2011). Inhibition of angiogenesis and the angiogenesis/invasion shift. *Biochem Soc Trans* 39, 1560-1564.

Bleuel, K., Popp, S., Fusenig, N. E., Stanbridge, E. J., and Boukamp, P. (1999). Tumor suppression in human skin carcinoma cells by chromosome 15 transfer or thrombospondin-1 overexpression through halted tumor vascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 2065-2070.

Bocci, G., Francia, G., Man, S., Lawler, J., and Kerbel, R. S. (2003). Thrombospondin 1, a mediator of the antiangiogenic effects of low-dose metronomic chemotherapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 12917-12922.

Boissonnas, A., Fetler, L., Zeelenberg, I. S., Hugues, S., and Amigorena, S. (2007). In vivo imaging of cytotoxic T cell infiltration and elimination of a solid tumor. *J Exp Med* 204, 345-356.

Bornstein, P. (2009). Thrombospondins function as regulators of angiogenesis. *J Cell Commun Signal* 3, 189-200.

Buergy, D., Wenz, F., Groden, C., and Brockmann, M. A. (2012). Tumor-platelet interaction in solid tumors. *Int J Cancer* 130, 2747-2760.

Bussolati, B., Grange, C., Sapino, A., and Camussi, G. (2009). Endothelial cell differentiation of human breast tumour stem/progenitor cells. *J Cell Mol Med* 13, 309-319.

Byrne, G. J., Hayden, K. E., McDowell, G., Lang, H., Kirwan, C. C., Tetlow, L., Kumar, S., and Bundred, N. J. (2007). Angiogenic characteristics of circulating and tumoural thrombospondin-1 in breast cancer. *Int J Oncol* 31, 1127-1132.

Caduff, J. H., Fischer, L. C., and Burri, P. H. (1986). Scanning electron microscope study of the developing microvasculature in the postnatal rat lung. *Anat Rec* 216, 154-164.

Calzada, M. J., Annis, D. S., Zeng, B., Marcinkiewicz, C., Banas, B., Lawler, J., Mosher, D. F., and Roberts, D. D. (2004a). Identification of novel beta1 integrin binding sites in the type 1 and type 2 repeats of thrombospondin-1. *J Biol Chem* 279, 41734-41743.

Calzada, M. J., Kuznetsova, S. A., Sipes, J. M., Rodrigues, R. G., Cashel, J. A., Annis, D. S., Mosher, D. F., and Roberts, D. D. (2008). Calcium indirectly regulates immunochemical reactivity and functional activities of the N-domain of thrombospondin-1. *Matrix Biol* 27, 339-351.

Calzada, M. J., Zhou, L., Sipes, J. M., Zhang, J., Kruttsch, H. C., Iruela-Arispe, M. L., Annis, D. S., Mosher, D. F., and Roberts, D. D. (2004b). Alpha4beta1 integrin mediates selective endothelial cell responses to thrombospondins 1 and 2 in vitro and modulates angiogenesis in vivo. *Circ Res* 94, 462-470.

Cariati, M., Naderi, A., Brown, J. P., Smalley, M. J., Pinder, S. E., Caldas, C., and Purushotham, A. D. (2008). Alpha-6 integrin is necessary for the tumourigenicity of a stem cell-like subpopulation within the MCF7 breast cancer cell line. *Int J Cancer* 122, 298-304.

Carlson, C. B., Lawler, J., and Mosher, D. F. (2008). Structures of thrombospondins. *Cell Mol Life Sci* 65, 672-686.

Carmeliet, P. (2000). Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 6, 389-395.

Carmeliet, P. (2005). Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* 438, 932-936.

Carmeliet, P., and Jain, R. K. (2011a). Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* 473, 298-307.

Carmeliet, P., and Jain, R. K. (2011b). Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases. *Nat Rev Drug Discov* 10, 417-427.

Casanovas, O., Hicklin, D. J., Bergers, G., and Hanahan, D. (2005). Drug resistance by evasion of antiangiogenic targeting of VEGF signaling in late-stage pancreatic islet tumors. *Cancer Cell* 8, 299-309.

Cascone, T., Herynk, M. H., Xu, L., Du, Z., Kadara, H., Nilsson, M. B., Oborn, C. J., Park, Y. Y., Erez, B., Jacoby, J. J., *et al.* (2011). Upregulated stromal EGFR and vascular remodeling in mouse xenograft models of angiogenesis inhibitor-resistant human lung adenocarcinoma. *J Clin Invest* 121, 1313-1328.

Chambers, A. F., Groom, A. C., and MacDonald, I. C. (2002). Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer* 2, 563-572.

Chang, Y. S., di Tomaso, E., McDonald, D. M., Jones, R., Jain, R. K., and Munn, L. L. (2000). Mosaic blood vessels in tumors: frequency of cancer cells in contact with flowing blood. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 14608-14613.

Chen, H. X., and Cleck, J. N. (2009). Adverse effects of anticancer agents that target the VEGF pathway. *Nat Rev Clin Oncol* 6, 465-477.

Christopherson, K. S., Ullian, E. M., Stokes, C. C., Mallowney, C. E., Hell, J. W., Agah, A., Lawler, J., Mosher, D. F., Bornstein, P., and Barres, B. A. (2005). Thrombospondins are astrocyte-secreted proteins that promote CNS synaptogenesis. *Cell* 120, 421-433.

Clezardin, P., Frappart, L., Clerget, M., Pechoux, C., and Delmas, P. D. (1993). Expression of thrombospondin (TSP1) and its receptors (CD36 and CD51) in normal, hyperplastic, and neoplastic human breast. *Cancer Res* 53, 1421-1430.

Clezardin, P., Lawler, J., Amiral, J., Quentin, G., and Delmas, P. (1997). Identification of cell adhesive active sites in the N-terminal domain of thrombospondin-1. *Biochem J* 321 (Pt 3), 819-827.

Cobleigh, M. A., Langmuir, V. K., Sledge, G. W., Miller, K. D., Haney, L., Novotny, W. F., Reimann, J. D., and Vassel, A. (2003). A phase I/II dose-escalation trial of bevacizumab in previously treated metastatic breast cancer. *Semin Oncol* 30, 117-124.

Colombel, M., Filleur, S., Fournier, P., Merle, C., Guglielmi, J., Courtin, A., Degeorges, A., Serre, C. M., Bouvier, R., Clezardin, P., and Cabon, F. (2005). Androgens repress the expression of the angiogenesis inhibitor thrombospondin-1 in normal and neoplastic prostate. *Cancer Res* 65, 300-308.

Compagno, D., Merle, C., Morin, A., Gilbert, C., Mathieu, J., Bozec, A., Mauduit, C., Benhamed, M., and Cabon, F. (2007). SIRNA-Directed In Vivo Silencing of Androgen Receptor Inhibits the Growth of Castration-Resistant Prostate Carcinomas. *PLoS ONE* 2, e1006.

Condeelis, J., and Segall, J. E. (2003). Intravital imaging of cell movement in tumours. *Nat Rev Cancer* 3, 921-930.

Cooke, Vesselina G., LeBleu, Valerie S., Keskin, D., Khan, Z., O'Connell, Joyce T., Teng, Y., Duncan, Michael B., Xie, L., Maeda, G., Vong, S., *et al.* (2012). Pericyte Depletion Results in Hypoxia-Associated Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Metastasis Mediated by Met Signaling Pathway. *Cancer Cell* 21, 66-81.

Crawford, S. E., Stellmach, V., Murphy-Ullrich, J. E., Ribeiro, S. M., Lawler, J., Hynes, R. O., Boivin, G. P., and Bouck, N. (1998). Thrombospondin-1 is a major activator of TGF-beta1 in vivo. *Cell* 93, 1159-1170.

Crawford, Y., Kasman, I., Yu, L., Zhong, C., Wu, X., Modrusan, Z., Kaminker, J., and Ferrara, N. (2009). PDGF-C mediates the angiogenic and tumorigenic properties of fibroblasts associated with tumors refractory to anti-VEGF treatment. *Cancer Cell* 15, 21-34.

Culp, W. D., Tsagozis, P., Burgio, M., Russell, P., Pisa, P., and Garland, D. (2007). Interference of macrophage migration inhibitory factor expression in a mouse melanoma inhibits tumor establishment by up-regulating thrombospondin-1. *Mol Cancer Res* 5, 1225-1231.

Cursiefen, C., Maruyama, K., Bock, F., Saban, D., Sadrai, Z., Lawler, J., Dana, R., and Masli, S. (2011). Thrombospondin 1 inhibits inflammatory lymphangiogenesis by CD36 ligation on monocytes. *J Exp Med* 208, 1083-1092.

Dameron, K. M., Volpert, O. V., Tainsky, M. A., and Bouck, N. (1994). Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1. *Science* 265, 1582-1584.

Davidson, B. L., and McCray, P. B. (2011). Current prospects for RNA interference-based therapies. *Nat Rev Genet* 12, 329-340.

Dawson, D. W., Pearce, S. F., Zhong, R., Silverstein, R. L., Frazier, W. A., and Bouck, N. P. (1997). CD36 mediates the In vitro inhibitory effects of thrombospondin-1 on endothelial cells. *J Cell Biol* 138, 707-717.

Dawson, D. W., Volpert, O. V., Pearce, S. F., Schneider, A. J., Silverstein, R. L., Henkin, J., and Bouck, N. P. (1999). Three distinct D-amino acid substitutions confer potent antiangiogenic activity on an inactive peptide derived from a thrombospondin-1 type 1 repeat. *Mol Pharmacol* 55, 332-338.

De Bock, K., Mazzone, M., and Carmeliet, P. (2011). Antiangiogenic therapy, hypoxia, and metastasis: risky liaisons, or not? *Nat Rev Clin Oncol* 8, 393-404.

de Fraipont, F., Keramidas, M., El Atifi, M., Chambaz, E. M., Berger, F., and Feige, J. J. (2004). Expression of the thrombospondin 1 fragment 167-569 in C6 glioma cells stimulates tumorigenicity despite reduced neovascularization. *Oncogene* 23, 3642-3649.

de Groot, J. F., Fuller, G., Kumar, A. J., Piao, Y., Eterovic, K., Ji, Y., and Conrad, C. A. (2010). Tumor invasion after treatment of glioblastoma with bevacizumab: radiographic and pathologic correlation in humans and mice. *Neuro Oncol* 12, 233-242.

Decker, S., van Valen, F., and Vischer, P. (2002). Adhesion of osteosarcoma cells to the 70-kDa core region of thrombospondin-1 is mediated by the alpha 4 beta 1 integrin. *Biochem Biophys Res Commun* 293, 86-92.

Delloye-Bourgeois, C., Brambilla, E., Coissieux, M.-M., Guenebeaud, C., Pedoux, R., Firllej, V., Cabon, F., Brambilla, C., Mehlen, P., and Bernet, A. (2009). Interference With Netrin-1 and Tumor Cell Death in Non-Small Cell Lung Cancer. *J Natl Cancer Inst* 101, 237-247.

DiCesare, P., Hauser, N., Lehman, D., Pasumarti, S., and Paulsson, M. (1994). Cartilage oligomeric matrix protein (COMP) is an abundant component of tendon. *FEBS Lett* 354, 237-240.

Doyen, V., Rubio, M., Braun, D., Nakajima, T., Abe, J., Saito, H., Delespesse, G., and Sarfati, M. (2003). Thrombospondin 1 is an autocrine negative regulator of human dendritic cell activation. *J Exp Med* 198, 1277-1283.

Ebos, J. M., and Kerbel, R. S. (2011). Antiangiogenic therapy: impact on invasion, disease progression, and metastasis. *Nat Rev Clin Oncol* 8, 210-221.

Ebos, J. M., Lee, C. R., Cruz-Munoz, W., Bjarnason, G. A., Christensen, J. G., and Kerbel, R. S. (2009). Accelerated metastasis after short-term treatment with a potent inhibitor of tumor angiogenesis. *Cancer Cell* 15, 232-239.

Egeblad, M., and Werb, Z. (2002). New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2, 161-174.

El Hallani, S., Boisselier, B., Peglion, F., Rousseau, A., Colin, C., Idbaih, A., Marie, Y., Mokhtari, K., Thomas, J. L., Eichmann, A., *et al.* (2010). A new alternative mechanism in glioblastoma vascularization: tubular vasculogenic mimicry. *Brain* 133, 973-982.

Escudier, B., Bellmunt, J., Negrier, S., Bajetta, E., Melichar, B., Bracarda, S., Ravaud, A., Golding, S., Jethwa, S., and Sneller, V. (2010). Phase III trial of bevacizumab plus interferon alfa-2a in patients with metastatic renal cell carcinoma (AVOREN): final analysis of overall survival. *J Clin Oncol* 28, 2144-2150.

Evan, G. I., and Vousden, K. H. (2001). Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* 411, 342-348.

Farmer, P., Bonnefoi, H., Anderle, P., Cameron, D., Wirapati, P., Becette, V., Andre, S., Piccart, M., Campone, M., Brain, E., *et al.* (2009). A stroma-related gene signature predicts resistance to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Nat Med* 15, 68-74.

Favier, J., Germain, S., Emmerich, J., Corvol, P., and Gasc, J. M. (2005). Critical overexpression of thrombospondin 1 in chronic leg ischaemia. *J Pathol* 207, 358-366.

Feld, R., Rubinstein, L. V., and Weisenberger, T. H. (1984). Sites of recurrence in resected stage I non-small-cell lung cancer: a guide for future studies. *J Clin Oncol* 2, 1352-1358.

Feron, O. (2004). Targeting the tumor vascular compartment to improve conventional cancer therapy. *Trends Pharmacol Sci* 25, 536-542.

Ferrara, N., and Kerbel, R. S. (2005). Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature* 438, 967-974.

Fidler, I. J. (2003). The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer* 3, 453-458.

Filleur, S., Volpert, O. V., Degeorges, A., Volland, C., Reiher, F., Clezardin, P., Bouck, N., and Cabon, F. (2001). In vivo mechanisms by which tumors producing thrombospondin 1 bypass its inhibitory effects. *Genes Dev* 15, 1373-1382.

Finak, G., Laferriere, J., Hallett, M., and Park, M. (2009). [The tumor microenvironment: a new tool to predict breast cancer outcome]. *Med Sci (Paris)* 25, 439-441.

Firlej, V., Mathieu, J. R., Gilbert, C., Lemonnier, L., Nakhle, J., Gallou-Kabani, C., Guarmit, B., Morin, A., Prevarskaya, N., Barry-Delongchamps, N., and Cabon, F. (2011). Antiangiogenic Thrombospondin-1 triggers cell migration and development of advanced prostate tumors. *Cancer Res*.

Fitchev, P. P., Wcislak, S. M., Lee, C., Bergh, A., Brendler, C. B., Stellmach, V. M., Crawford, S. E., Mavroudis, C. D., Cornwell, M. L., and Doll, J. A. (2010). Thrombospondin-1 regulates the normal prostate in vivo through angiogenesis and TGF-beta activation. *Lab Invest* 90, 1078-1090.

Folkman, J. (1971). Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 285, 1182-1186.

Folkman, J. (2006). Antiangiogenesis in cancer therapy--endostatin and its mechanisms of action. *Exp Cell Res* 312, 594-607.

Fontana, A., Filleur, S., Guglielmi, J., Frappart, L., Bruno-Bossio, G., Boissier, S., Cabon, F., and Clezardin, P. (2005). Human breast tumors override the antiangiogenic effect of stromal thrombospondin-1 in vivo. *Int J Cancer* 116, 686-691.

Fusenig, N. E., and Boukamp, P. (1998). Multiple stages and genetic alterations in immortalization, malignant transformation, and tumor progression of human skin keratinocytes. *Mol Carcinog* 23, 144-158.

Galvez, A. F., Huang, L., Magbanua, M. M., Dawson, K., and Rodriguez, R. L. (2011). Differential expression of thrombospondin (THBS1) in tumorigenic and nontumorigenic prostate epithelial cells in response to a chromatin-binding soy peptide. *Nutr Cancer* 63, 623-636.

Galvin, N. J., Vance, P. M., Dixit, V. M., Fink, B., and Frazier, W. A. (1987). Interaction of human thrombospondin with types I-V collagen: direct binding and electron microscopy. *J Cell Biol* 104, 1413-1422.

Gao, A. G., Lindberg, F. P., Finn, M. B., Blystone, S. D., Brown, E. J., and Frazier, W. A. (1996). Integrin-associated protein is a receptor for the C-terminal domain of thrombospondin. *J Biol Chem* 271, 21-24.

Gay, L. J., and Felding-Habermann, B. (2011). Contribution of platelets to tumour metastasis. *Nat Rev Cancer* 11, 123-134.

Geiger, T. R., and Peeper, D. S. (2005). The neurotrophic receptor TrkB in anoikis resistance and metastasis: a perspective. *Cancer Res* 65, 7033-7036.

Geiger, T. R., and Peeper, D. S. (2009). Metastasis mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 1796, 293-308.

Generali, D., Buffa, F. M., Berruti, A., Brizzi, M. P., Campo, L., Bonardi, S., Bersiga, A., Allevi, G., Milani, M., Aguggini, S., *et al.* (2009). Phosphorylated ER α , HIF-1 α , and MAPK Signaling As Predictors of Primary Endocrine Treatment Response and Resistance in Patients With Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology* 27, 227-234.

Giantonio, B. J., Catalano, P. J., Meropol, N. J., O'Dwyer, P. J., Mitchell, E. P., Alberts, S. R., Schwartz, M. A., and Benson, A. B., 3rd (2007). Bevacizumab in combination with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin (FOLFOX4) for previously treated metastatic colorectal cancer: results from the Eastern Cooperative Oncology Group Study E3200. *J Clin Oncol* 25, 1539-1544.

Goel, S., Duda, D. G., Xu, L., Munn, L. L., Boucher, Y., Fukumura, D., and Jain, R. K. (2011). Normalization of the vasculature for treatment of cancer and other diseases. *Physiol Rev* 91, 1071-1121.

Good, D. J., Polverini, P. J., Rastinejad, F., Le Beau, M. M., Lemons, R. S., Frazier, W. A., and Bouck, N. P. (1990). A tumor suppressor-dependent inhibitor of angiogenesis is immunologically and functionally indistinguishable from a fragment of thrombospondin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 6624-6628.

Gotis-Graham, I., Hogg, P. J., and McNeil, H. P. (1997). Significant correlation between thrombospondin 1 and serine proteinase expression in rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum* 40, 1780-1787.

Greenaway, J., Henkin, J., Lawler, J., Moorehead, R., and Petrik, J. (2009). ABT-510 induces tumor cell apoptosis and inhibits ovarian tumor growth in an orthotopic, syngeneic model of epithelial ovarian cancer. *Mol Cancer Ther* 8, 64-74.

Greenaway, J., Lawler, J., Moorehead, R., Bornstein, P., Lamarre, J., and Petrik, J. (2007). Thrombospondin-1 inhibits VEGF levels in the ovary directly by binding and internalization via the low density lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP-1). *J Cell Physiol* 210, 807-818.

Gressett, S. M., and Shah, S. R. (2009). Intracacies of bevacizumab-induced toxicities and their management. *Ann Pharmacother* 43, 490-501.

Gridelli, C., Rossi, A., Maione, P., Rossi, E., Castaldo, V., Sacco, P. C., and Colantuoni, G. (2009). Vascular disrupting agents: a novel mechanism of action in the battle against non-small cell lung cancer. *Oncologist* 14, 612-620.

Griffioen, A. W., and Molema, G. (2000). Angiogenesis: potentials for pharmacologic intervention in the treatment of cancer, cardiovascular diseases, and chronic inflammation. *Pharmacol Rev* 52, 237-268.

Grothey, A., and Ellis, L. M. (2008). Targeting angiogenesis driven by vascular endothelial growth factors using antibody-based therapies. *Cancer J* 14, 170-177.

Guo, N., Kruttsch, H. C., Inman, J. K., and Roberts, D. D. (1997). Thrombospondin 1 and type I repeat peptides of thrombospondin 1 specifically induce apoptosis of endothelial cells. *Cancer Res* 57, 1735-1742.

Guo, W., Dong, Z., He, M., Guo, Y., Guo, J., Chen, Z., Yang, Z., and Kuang, G. (2010). Aberrant methylation of thrombospondin-1 and its association with reduced expression in gastric cardia adenocarcinoma. *J Biomed Biotechnol* 2010, 721485.

Gupta, G. P., and Massague, J. (2006). Cancer metastasis: building a framework. *Cell* 127, 679-695.

Gupta, G. P., Nguyen, D. X., Chiang, A. C., Bos, P. D., Kim, J. Y., Nadal, C., Gomis, R. R., Manova-Todorova, K., and Massague, J. (2007). Mediators of vascular remodelling co-opted for sequential steps in lung metastasis. *Nature* 446, 765-770.

Gupta, K., Gupta, P., Wild, R., Ramakrishnan, S., and Hebbel, R. P. (1999). Binding and displacement of vascular endothelial growth factor (VEGF) by thrombospondin: effect on human microvascular endothelial cell proliferation and angiogenesis. *Angiogenesis* 3, 147-158.

Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.

Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646-674.

Hannah, B. L., Misenheimer, T. M., Annis, D. S., and Mosher, D. F. (2003). A polymorphism in thrombospondin-1 associated with familial premature coronary heart disease causes a local change in conformation of the Ca²⁺-binding repeats. *J Biol Chem* 278, 8929-8934.

Hawighorst, T., Oura, H., Streit, M., Janes, L., Nguyen, L., Brown, L. F., Oliver, G., Jackson, D. G., and Detmar, M. (2002). Thrombospondin-1 selectively inhibits early-stage carcinogenesis and angiogenesis but not tumor lymphangiogenesis and lymphatic metastasis in transgenic mice. *Oncogene* 21, 7945-7956.

Hayashi, T., Noshita, N., Sugawara, T., and Chan, P. H. (2003). Temporal profile of angiogenesis and expression of related genes in the brain after ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 23, 166-180.

He, J., Eastlack, J. P., and Bazan, H. E. (2010). The induction of an angiogenic response in corneal myofibroblasts by platelet-activating factor (PAF). *Curr Eye Res* 35, 1063-1071.

Helfrich, I., and Schadendorf, D. (2011). Blood vessel maturation, vascular phenotype and angiogenic potential in malignant melanoma: one step forward for overcoming anti-angiogenic drug resistance? *Mol Oncol* 5, 137-149.

Henkin, J., and Volpert, O. V. (2011). Therapies using anti-angiogenic peptide mimetics of thrombospondin-1. *Expert Opin Ther Targets* 15, 1369-1386.

Hiscott, P., Schlotzer-Schrehardt, U., and Naumann, G. O. (1996). Unexpected expression of thrombospondin 1 by corneal and iris fibroblasts in the pseudoexfoliation syndrome. *Hum Pathol* 27, 1255-1258.

Hobson, B., and Denekamp, J. (1984). Endothelial proliferation in tumours and normal tissues: continuous labelling studies. *Br J Cancer* 49, 405-413.

Hoffman, P. C., Mauer, A. M., and Vokes, E. E. (2000). Lung cancer. *Lancet* 355, 479-485.

Hogg, P. J., Jimenez, B. M., and Chesterman, C. N. (1994). Identification of possible inhibitory reactive centers in thrombospondin 1 that may bind cathepsin G and neutrophil elastase. *Biochemistry* 33, 6531-6537.

Holash, J., Maisonpierre, P. C., Compton, D., Boland, P., Alexander, C. R., Zagzag, D., Yancopoulos, G. D., and Wiegand, S. J. (1999). Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *Science* 284, 1994-1998.

Hu, C. J., Chen, S. D., Yang, D. I., Lin, T. N., Chen, C. M., Huang, T. H., and Hsu, C. Y. (2006). Promoter region methylation and reduced expression of thrombospondin-1 after oxygen-glucose deprivation in murine cerebral endothelial cells. *J Cereb Blood Flow Metab* 26, 1519-1526.

Hurwitz, H., Fehrenbacher, L., Novotny, W., Cartwright, T., Hainsworth, J., Heim, W., Berlin, J., Baron, A., Griffing, S., Holmgren, E., *et al.* (2004). Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 350, 2335-2342.

Hynes, R. O., and Zhao, Q. (2000). The evolution of cell adhesion. *J Cell Biol* 150, F89-96.

Iruela-Arispe, M. L., Liska, D. J., Sage, E. H., and Bornstein, P. (1993). Differential expression of thrombospondin 1, 2, and 3 during murine development. *Dev Dyn* 197, 40-56.

Iruela-Arispe, M. L., Lombardo, M., Kruttsch, H. C., Lawler, J., and Roberts, D. D. (1999). Inhibition of angiogenesis by thrombospondin-1 is mediated by 2 independent regions within the type 1 repeats. *Circulation* 100, 1423-1431.

Isenberg, J. S., Calzada, M. J., Zhou, L., Guo, N., Lawler, J., Wang, X. Q., Frazier, W. A., and Roberts, D. D. (2005). Endogenous thrombospondin-1 is not necessary for proliferation but is permissive for vascular smooth muscle cell responses to platelet-derived growth factor. *Matrix Biol* 24, 110-123.

Isenberg, J. S., Maxhimer, J. B., Hyodo, F., Pendrak, M. L., Ridnour, L. A., DeGraff, W. G., Tsokos, M., Wink, D. A., and Roberts, D. D. (2008). Thrombospondin-1 and CD47 limit cell and tissue survival of radiation injury. *Am J Pathol* 173, 1100-1112.

Isenberg, J. S., Romeo, M. J., Abu-Asab, M., Tsokos, M., Oldenburg, A., Pappan, L., Wink, D. A., Frazier, W. A., and Roberts, D. D. (2007). Increasing survival of ischemic tissue by targeting CD47. *Circ Res* 100, 712-720.

Iwamoto, F. M., Abrey, L. E., Beal, K., Gutin, P. H., Rosenblum, M. K., Reuter, V. E., DeAngelis, L. M., and Lassman, A. B. (2009). Patterns of relapse and prognosis after bevacizumab failure in recurrent glioblastoma. *Neurology* 73, 1200-1206.

Jacobsen, J., Grankvist, K., Rasmuson, T., and Ljungberg, B. (2006). Different isoform patterns for vascular endothelial growth factor between clear cell and papillary renal cell carcinoma. *BJU Int* 97, 1102-1108.

Jain, R. K. (2005). Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science* 307, 58-62.

Jain, R. K., and Carmeliet, P. (2012). SnapShot: Tumor Angiogenesis. *Cell* 149, 1408-1408 e1401.

Jakobisiak, M., Lasek, W., and Golab, J. (2003). Natural mechanisms protecting against cancer. *Immunol Lett* 90, 103-122.

Jimenez, B., Volpert, O. V., Crawford, S. E., Febbraio, M., Silverstein, R. L., and Bouck, N. (2000). Signals leading to apoptosis-dependent inhibition of neovascularization by thrombospondin-1. *Nat Med* 6, 41-48.

Johansson, U., Higginbottom, K., and Londei, M. (2004). CD47 ligation induces a rapid caspase-independent apoptosis-like cell death in human monocytes and dendritic cells. *Scand J Immunol* 59, 40-49.

John, A. S., Hu, X., Rothman, V. L., and Tuszynski, G. P. (2009). Thrombospondin-1 (TSP-1) up-regulates tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) production in human tumor cells: exploring the functional significance in tumor cell invasion. *Exp Mol Pathol* 87, 184-188.

John, A. S., Rothman, V. L., and Tuszynski, G. P. (2010). Thrombospondin-1 (TSP-1) Stimulates Expression of Integrin alpha6 in Human Breast Carcinoma Cells: A Downstream Modulator of TSP-1-Induced Cellular Adhesion. *J Oncol* 2010, 645376.

Jouanneau, E., Alberti, L., Nejari, M., Treilleux, I., Vilgrain, I., Duc, A., Combaret, V., Favrot, M., Leboulch, P., and Bachelot, T. (2001). Lack of antitumor activity of recombinant endostatin in a human neuroblastoma xenograft model. *J Neurooncol* 51, 11-18.

Kalluri, R. (2003). Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer* 3, 422-433.

Karamouzis, M. V., and Moschos, S. J. (2009). The use of endostatin in the treatment of solid tumors. *Expert Opin Biol Ther* 9, 641-648.

Karrison, T. G., Ferguson, D. J., and Meier, P. (1999). Dormancy of mammary carcinoma after mastectomy. *J Natl Cancer Inst* 91, 80-85.

Kawataki, T., Naganuma, H., Sasaki, A., Yoshikawa, H., Tasaka, K., and Nukui, H. (2000a). Correlation of thrombospondin-1 and transforming growth factor-beta expression with malignancy of glioma. *Neuropathology* 20, 161-169.

Kawataki, T., Naganuma, H., Sasaki, A., Yoshikawa, H., Tasaka, K., and Nukui, H. (2000b). Correlation of thrombospondin-1 and transforming growth factor- β expression with malignancy of glioma. *Neuropathology* 20, 161-169.

Kaygusuz, G., Tulunay, O., Baltaci, S., and Gogus, O. (2007). Microvessel density and regulators of angiogenesis in malignant and nonmalignant prostate tissue. *Int Urol Nephrol* 39, 841-850.

Kazerounian, S., Yee, K. O., and Lawler, J. (2008). Thrombospondins in cancer. *Cell Mol Life Sci* 65, 700-712.

Kelly, W. K., Halabi, S., Carducci, M., George, D., Mahoney, J. F., Stadler, W. M., Morris, M., Kantoff, P., Monk, J. P., Kaplan, E., *et al.* (2012). Randomized, double-blind, placebo-controlled phase III trial comparing docetaxel and prednisone with or without bevacizumab in men with metastatic castration-resistant prostate cancer: CALGB 90401. *J Clin Oncol* 30, 1534-1540.

Kerbel, R. S. (1991). Inhibition of tumor angiogenesis as a strategy to circumvent acquired resistance to anti-cancer therapeutic agents. *Bioessays* 13, 31-36.

Kerbel, R. S. (2008). Tumor angiogenesis. *N Engl J Med* 358, 2039-2049.

Kienast, Y., von Baumgarten, L., Fuhrmann, M., Klinkert, W. E., Goldbrunner, R., Herms, J., and Winkler, F. (2010). Real-time imaging reveals the single steps of brain metastasis formation. *Nat Med* 16, 116-122.

Kim, K. J., Li, B., Winer, J., Armanini, M., Gillett, N., Phillips, H. S., and Ferrara, N. (1993). Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature* 362, 841-844.

Kim, M. Y., Oskarsson, T., Acharyya, S., Nguyen, D. X., Zhang, X. H., Norton, L., and Massague, J. (2009). Tumor self-seeding by circulating cancer cells. *Cell* 139, 1315-1326.

Kindler, H. L., Niedzwiecki, D., Hollis, D., Sutherland, S., Schrag, D., Hurwitz, H., Innocenti, F., Mulcahy, M. F., O'Reilly, E., Wozniak, T. F., *et al.* (2010). Gemcitabine plus bevacizumab compared with gemcitabine plus placebo in patients with advanced pancreatic cancer: phase III trial of the Cancer and Leukemia Group B (CALGB 80303). *J Clin Oncol* 28, 3617-3622.

Konerding, M. A., Fait, E., and Gaumann, A. (2001). 3D microvascular architecture of pre-cancerous lesions and invasive carcinomas of the colon. *Br J Cancer* 84, 1354-1362.

Koop, S., Schmidt, E. E., MacDonald, I. C., Morris, V. L., Khokha, R., Grattan, M., Leone, J., Chambers, A. F., and Groom, A. C. (1996). Independence of metastatic ability and extravasation: metastatic ras-transformed and control fibroblasts extravasate equally well. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 11080-11084.

Kulke MH, Bergsland EK, Ryan DP, Enzinger PC, Lynch TJ, and Zhu AX (2006). Phase II study of recombinant human endostatin in patients with advanced neuroendocrine tumors. *J Clin Oncol* 24, 3555-3561.

Kunkel, P., Ulbricht, U., Bohlen, P., Brockmann, M. A., Fillbrandt, R., Stavrou, D., Westphal, M., and Lamszus, K. (2001). Inhibition of glioma angiogenesis and growth in vivo by systemic treatment with a monoclonal antibody against vascular endothelial growth factor receptor-2. *Cancer Res* 61, 6624-6628.

Kurz, H., Burri, P. H., and Djonov, V. G. (2003). Angiogenesis and vascular remodeling by intussusception: from form to function. *News Physiol Sci* 18, 65-70.

Kuznetsova, S. A., Day, A. J., Mahoney, D. J., Rugg, M. S., Mosher, D. F., and Roberts, D. D. (2005). The N-terminal module of thrombospondin-1 interacts with the link domain of TSG-6 and enhances its covalent association with the heavy chains of inter-alpha-trypsin inhibitor. *J Biol Chem* 280, 30899-30908.

Kuznetsova, S. A., Issa, P., Perruccio, E. M., Zeng, B., Sipes, J. M., Ward, Y., Seyfried, N. T., Fielder, H. L., Day, A. J., Wight, T. N., and Roberts, D. D. (2006). Versican-thrombospondin-1 binding in vitro and colocalization in microfibrils induced by inflammation on vascular smooth muscle cells. *J Cell Sci* **119**, 4499-4509.

Kwak, C., Jin, R. J., Lee, C., Park, M. S., and Lee, S. E. (2002). Thrombospondin-1, vascular endothelial growth factor expression and their relationship with p53 status in prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *BJU Int* **89**, 303-309.

Laderoute, K. R., Alarcon, R. M., Brody, M. D., Calaoagan, J. M., Chen, E. Y., Knapp, A. M., Yun, Z., Denko, N. C., and Giaccia, A. J. (2000). Opposing effects of hypoxia on expression of the angiogenic inhibitor thrombospondin 1 and the angiogenic inducer vascular endothelial growth factor. *Clin Cancer Res* **6**, 2941-2950.

Lahav, J., Lawler, J., and Gimbrone, M. A. (1984). Thrombospondin interactions with fibronectin and fibrinogen. Mutual inhibition in binding. *Eur J Biochem* **145**, 151-156.

Lamszus, K., Kunkel, P., and Westphal, M. (2003). Invasion as limitation to anti-angiogenic glioma therapy. *Acta Neurochir Suppl* **88**, 169-177.

Lawler, J. (1986). The structural and functional properties of thrombospondin. *Blood* **67**, 1197-1209.

Lawler, J. (2002). Thrombospondin-1 as an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *J Cell Mol Med* **6**, 1-12.

Lawler, J., Duquette, M., Whittaker, C. A., Adams, J. C., McHenry, K., and DeSimone, D. W. (1993). Identification and characterization of thrombospondin-4, a new member of the thrombospondin gene family. *J Cell Biol* **120**, 1059-1067.

Lawler, J., and Hynes, R. O. (1986). The structure of human thrombospondin, an adhesive glycoprotein with multiple calcium-binding sites and homologies with several different proteins. *J Cell Biol* **103**, 1635-1648.

Lawler, J., Sunday, M., Thibert, V., Duquette, M., George, E. L., Rayburn, H., and Hynes, R. O. (1998). Thrombospondin-1 is required for normal murine pulmonary homeostasis and its absence causes pneumonia. *J Clin Invest* **101**, 982-992.

Lawler, J., Weinstein, R., and Hynes, R. O. (1988). Cell attachment to thrombospondin: the role of ARG-GLY-ASP, calcium, and integrin receptors. *J Cell Biol* **107**, 2351-2361.

Lawler, J. W., Slayter, H. S., and Coligan, J. E. (1978). Isolation and characterization of a high molecular weight glycoprotein from human blood platelets. *J Biol Chem* **253**, 8609-8616.

Lehen'kyi, V., Flourakis, M., Skryma, R., and Prevarskaya, N. (2007). TRPV6 channel controls prostate cancer cell proliferation via Ca(2+)/NFAT-dependent pathways. *Oncogene* **26**, 7380-7385.

Lehen'kyi, V., and Prevarskaya, N. (2011). Study of TRP Channels in Cancer Cells.

Leung, L. L., and Nachman, R. L. (1982). Complex formation of platelet thrombospondin with fibrinogen. *J Clin Invest* **70**, 542-549.

Leung, L. L., Nachman, R. L., and Harpel, P. C. (1984). Complex formation of platelet thrombospondin with histidine-rich glycoprotein. *J Clin Invest* **73**, 5-12.

Leupold, J. H., Asangani, I., Maurer, G. D., Lengyel, E., Post, S., and Allgayer, H. (2007). Src induces urokinase receptor gene expression and invasion/intravasation via activator protein-1/p-c-Jun in colorectal cancer. *Mol Cancer Res* **5**, 485-496.

Li, C. Y., Shan, S., Huang, Q., Braun, R. D., Lanzen, J., Hu, K., Lin, P., and Dewhirst, M. W. (2000). Initial stages of tumor cell-induced angiogenesis: evaluation via skin window chambers in rodent models. *J Natl Cancer Inst* **92**, 143-147.

Li, Q., Ahuja, N., Burger, P. C., and Issa, J. P. (1999). Methylation and silencing of the Thrombospondin-1 promoter in human cancer. *Oncogene* **18**, 3284-3289.

Lin, T. N., Kim, G. M., Chen, J. J., Cheung, W. M., He, Y. Y., and Hsu, C. Y. (2003). Differential regulation of thrombospondin-1 and thrombospondin-2 after focal cerebral ischemia/reperfusion. *Stroke* 34, 177-186.

Lin, X. D., Chen, S. Q., Qi, Y. L., Zhu, J. W., Tang, Y., and Lin, J. Y. (2012a). Overexpression of thrombospondin-1 in stromal myofibroblasts is associated with tumor growth and nodal metastasis in gastric carcinoma. *J Surg Oncol* 106, 94-100.

Lin, X. D., Chen, S. Q., Qi, Y. L., Zhu, J. W., Tang, Y., and Lin, J. Y. (2012b). Polymorphism of THBS1 rs1478604 A>G in 5-untranslated region is associated with lymph node metastasis of gastric cancer in a Southeast Chinese population. *DNA Cell Biol* 31, 511-519.

Liu, B. L., Cheng, J. X., Zhang, W., Zhang, X., Wang, R., Lin, H., Huo, J. L., and Cheng, H. (2010). Quantitative detection of multiple gene promoter hypermethylation in tumor tissue, serum, and cerebrospinal fluid predicts prognosis of malignant gliomas. *Neuro Oncol* 12, 540-548.

Liu, J., Liao, S., Diop-Frimpong, B., Chen, W., Goel, S., Naxerova, K., Ancukiewicz, M., Boucher, Y., Jain, R. K., and Xu, L. (2012). TGF-beta blockade improves the distribution and efficacy of therapeutics in breast carcinoma by normalizing the tumor stroma. *Proc Natl Acad Sci U S A*.

Liu, W., Xu, J., Wang, M., Wang, Q., Bi, Y., and Han, M. (2011). Tumor-derived vascular endothelial growth factor (VEGF)-a facilitates tumor metastasis through the VEGF-VEGFR1 signaling pathway. *Int J Oncol* 39, 1213-1220.

Loges, S., Mazzone, M., Hohensinner, P., and Carmeliet, P. (2009). Silencing or Fueling Metastasis with VEGF Inhibitors: Antiangiogenesis Revisited. *Cancer Cell* 15, 167-170.

Lopez-Dee, Z., Pidcock, K., and Gutierrez, L. S. (2011). Thrombospondin-1: multiple paths to inflammation. *Mediators Inflamm* 2011, 296069.

Lu, P., Li, L., Kuno, K., Wu, Y., Baba, T., Li, Y. Y., Zhang, X., and Mukaida, N. (2008). Protective roles of the fractalkine/CX3CL1-CX3CR1 interactions in alkali-induced corneal neovascularization through enhanced antiangiogenic factor expression. *J Immunol* 180, 4283-4291.

Luzzi, K. J., MacDonald, I. C., Schmidt, E. E., Kerkvliet, N., Morris, V. L., Chambers, A. F., and Groom, A. C. (1998). Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases. *Am J Pathol* 153, 865-873.

Lyden, D., Hattori, K., Dias, S., Costa, C., Blaikie, P., Butros, L., Chadburn, A., Heissig, B., Marks, W., Witte, L., *et al.* (2001). Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nat Med* 7, 1194-1201.

Majack, R. A., Goodman, L. V., and Dixit, V. M. (1988). Cell surface thrombospondin is functionally essential for vascular smooth muscle cell proliferation. *J Cell Biol* 106, 415-422.

Maniotis, A. J., Folberg, R., Hess, A., Seftor, E. A., Gardner, L. M., Pe'er, J., Trent, J. M., Meltzer, P. S., and Hendrix, M. J. (1999). Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry. *Am J Pathol* 155, 739-752.

Margosio, B., Marchetti, D., Vergani, V., Giavazzi, R., Rusnati, M., Presta, M., and Taraboletti, G. (2003). Thrombospondin 1 as a scavenger for matrix-associated fibroblast growth factor 2. *Blood* 102, 4399-4406.

Markovic, S. N., Suman, V. J., Rao, R. A., Ingle, J. N., Kaur, J. S., Erickson, L. A., Pitot, H. C., Croghan, G. A., McWilliams, R. R., Merchan, J., *et al.* (2007). A phase II study of ABT-510 (thrombospondin-1 analog) for the treatment of metastatic melanoma. *Am J Clin Oncol* 30, 303-309.

Maxhimer, J. B., Shih, H. B., Isenberg, J. S., Miller, T. W., and Roberts, D. D. (2009a). Thrombospondin-1/CD47 blockade following ischemia-reperfusion injury is tissue protective. *Plast Reconstr Surg* 124, 1880-1889.

Maxhimer, J. B., Soto-Pantoja, D. R., Ridnour, L. A., Shih, H. B., Degraff, W. G., Tsokos, M., Wink, D. A., Isenberg, J. S., and Roberts, D. D. (2009b). Radioprotection in normal tissue and delayed tumor growth by blockade of CD47 signaling. *Sci Transl Med* 1, 3ra7.

McClenic, B. K., Mitra, R. S., Riser, B. L., Nickoloff, B. J., Dixit, V. M., and Varani, J. (1989). Production and utilization of extracellular matrix components by human melanocytes. *Exp Cell Res* 180, 314-325.

McDonald, D. M., and Choyke, P. L. (2003). Imaging of angiogenesis: from microscope to clinic. *Nat Med* 9, 713-725.

Mehlen, P., and Puisieux, A. (2006). Metastasis: a question of life or death. *Nat Rev Cancer* 6, 449-458.

Mejean, A., and Lebreton, T. (2008). [The metastatic cascade: angiogenesis and new concepts]. *Prog Urol* 18 Suppl 7, S156-166.

Miles, D., Harbeck, N., Escudier, B., Hurwitz, H., Saltz, L., Van Cutsem, E., Cassidy, J., Mueller, B., and Sirzen, F. (2011). Disease course patterns after discontinuation of bevacizumab: pooled analysis of randomized phase III trials. *J Clin Oncol* 29, 83-88.

Miller, K., Wang, M., Gralow, J., Dickler, M., Cobleigh, M., Perez, E. A., Shenkier, T., Cella, D., and Davidson, N. E. (2007). Paclitaxel plus bevacizumab versus paclitaxel alone for metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 357, 2666-2676.

Moller, J. C., Klein, M. A., Haas, S., Jones, L. L., Kreutzberg, G. W., and Raivich, G. (1996). Regulation of thrombospondin in the regenerating mouse facial motor nucleus. *Glia* 17, 121-132.

Monet, M., Gkika, D., Lehen'kyi, V., Pourtier, A., Vanden Abeele, F., Bidaux, G., Juvin, V., Rassendren, F., Humez, S., and Prevarskaya, N. (2009). Lysophospholipids stimulate prostate cancer cell migration via TRPV2 channel activation. *Biochim Biophys Acta* 1793, 528-539.

Monteith, G. R., Davis, F. M., and Roberts-Thomson, S. J. (2012). Calcium channels and pumps in cancer: changes and consequences. *J Biol Chem* 287, 31666-31673.

Moodley, Y., Rigby, P., Bundell, C., Bunt, S., Hayashi, H., Misso, N., McAnulty, R., Laurent, G., Scaffidi, A., Thompson, P., and Knight, D. (2003). Macrophage recognition and phagocytosis of apoptotic fibroblasts is critically dependent on fibroblast-derived thrombospondin 1 and CD36. *Am J Pathol* 162, 771-779.

Morandi, V., Cherradi, S. E., Lambert, S., Fauvel-Lafeve, F., Legrand, Y. J., and Legrand, C. (1994). Proinflammatory cytokines (interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha) down regulate synthesis and secretion of thrombospondin by human endothelial cells. *J Cell Physiol* 160, 367-377.

Morin, A., Gallou-Kabani, C., Mathieu, J. R., and Cabon, F. (2009). Systemic delivery and quantification of unformulated interfering RNAs in vivo. *Curr Top Med Chem* 9, 1117-1129.

Motzer, R. J., Hutson, T. E., Tomczak, P., Michaelson, M. D., Bukowski, R. M., Oudard, S., Negrier, S., Szczylik, C., Pili, R., Bjarnason, G. A., *et al.* (2009). Overall survival and updated results for sunitinib compared with interferon alfa in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 27, 3584-3590.

Motzer, R. J., Michaelson, M. D., Redman, B. G., Hudes, G. R., Wilding, G., Figlin, R. A., Ginsberg, M. S., Kim, S. T., Baum, C. M., DePrimo, S. E., *et al.* (2006). Activity of SU11248, a multitargeted inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor and platelet-derived growth factor receptor, in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 24, 16-24.

Muller, A., Homey, B., Soto, H., Ge, N., Catron, D., Buchanan, M. E., McClanahan, T., Murphy, E., Yuan, W., Wagner, S. N., *et al.* (2001). Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 410, 50-56.

Mumby, S. M., Raugi, G. J., and Bornstein, P. (1984). Interactions of thrombospondin with extracellular matrix proteins: selective binding to type V collagen. *J Cell Biol* 98, 646-652.

Murphy-Ullrich, J. E., and Hook, M. (1989). Thrombospondin modulates focal adhesions in endothelial cells. *J Cell Biol* 109, 1309-1319.

Muthukkaruppan, V., and Auerbach, R. (1979). Angiogenesis in the mouse cornea. *Science* 205, 1416-1418.

Nash, G. F., Turner, L. F., Scully, M. F., and Kakkar, A. K. (2002). Platelets and cancer. *Lancet Oncol* 3, 425-430.

Nathan, F. E., Hernandez, E., Dunton, C. J., Treat, J., Switalska, H. I., Joseph, R. R., and Tuszynski, G. P. (1994). Plasma thrombospondin levels in patients with gynecologic malignancies. *Cancer* 73, 2853-2858.

Neri, D., and Bicknell, R. (2005). Tumour vascular targeting. *Nat Rev Cancer* 5, 436-446.

Nguyen, D. X., Bos, P. D., and Massague, J. (2009). Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nat Rev Cancer* 9, 274-284.

Noguera-Troise, I., Daly, C., Papadopoulos, N. J., Coetzee, S., Boland, P., Gale, N. W., Lin, H. C., Yancopoulos, G. D., and Thurston, G. (2006). Blockade of DLL4 inhibits tumour growth by promoting non-productive angiogenesis. *Nature* 444, 1032-1037.

Norden, A. D., Drappatz, J., and Wen, P. Y. (2009). Antiangiogenic therapies for high-grade glioma. *Nat Rev Neurol* 5, 610-620.

Norden, A. D., Young, G. S., Setayesh, K., Muzikansky, A., Klufas, R., Ross, G. L., Ciampa, A. S., Ebbeling, L. G., Levy, B., Drappatz, J., *et al.* (2008). Bevacizumab for recurrent malignant gliomas: efficacy, toxicity, and patterns of recurrence. *Neurology* 70, 779-787.

Nozawa, H., Chiu, C., and Hanahan, D. (2006). Infiltrating neutrophils mediate the initial angiogenic switch in a mouse model of multistage carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 12493-12498.

Ohtani, Y., Kijima, H., Dowaki, S., Kashiwagi, H., Tobita, K., Tsukui, M., Tanaka, Y., Tsuchida, T., Tokunaga, T., Yamazaki, H., *et al.* (1999). Stromal expression of thrombospondin-1 is correlated with growth and metastasis of human gallbladder carcinoma. *Int J Oncol* 15, 453-457.

Okada, K., Hirabayashi, K., Imaizumi, T., Matsuyama, M., Yazawa, N., Dowaki, S., Tobita, K., Ohtani, Y., Tanaka, M., Inokuchi, S., and Makuuchi, H. (2010). Stromal thrombospondin-1 expression is a prognostic indicator and a new marker of invasiveness in intraductal papillary-mucinous neoplasm of the pancreas. *Biomed Res* 31, 13-19.

Oliver, G. (2004). Lymphatic vasculature development. *Nat Rev Immunol* 4, 35-45.

Olson, P., Chu, G. C., Perry, S. R., Nolan-Stevaux, O., and Hanahan, D. (2011). Imaging guided trials of the angiogenesis inhibitor sunitinib in mouse models predict efficacy in pancreatic neuroendocrine but not ductal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, E1275-1284.

Packham, M. A., and Mustard, J. F. (1984). Platelet adhesion. *Prog Hemost Thromb* 7, 211-288.

Padua, D., Zhang, X. H., Wang, Q., Nadal, C., Gerald, W. L., Gomis, R. R., and Massague, J. (2008). TGFbeta primes breast tumors for lung metastasis seeding through angiopoietin-like 4. *Cell* 133, 66-77.

Paez-Ribes, M., Allen, E., Hudock, J., Takeda, T., Okuyama, H., Vinals, F., Inoue, M., Bergers, G., Hanahan, D., and Casanovas, O. (2009). Antiangiogenic therapy elicits malignant progression of tumors to increased local invasion and distant metastasis. *Cancer Cell* 15, 220-231.

Paget, S. (1989). The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer Metastasis Rev* 8, 98-101.

Pantel, K., and Brakenhoff, R. H. (2004). Dissecting the metastatic cascade. *Nat Rev Cancer* 4, 448-456.

Pectasides, D., Papaxoinis, G., Kotoula, V., Fountzilas, H., Korantzis, I., Koutras, A., Dimopoulos, A. M., Papakostas, P., Aravantinos, G., Varthalitis, I., *et al.* (2012). Expression of angiogenic markers in the peripheral blood of docetaxel-treated advanced breast cancer patients: A Hellenic Cooperative Oncology Group (HeCOG) study. *Oncol Rep* 27, 216-224.

Pepper, M. S. (2000). Lymphangiogenesis and tumor metastasis: more questions than answers. *Lymphology* 33, 144-147.

Pezzolo, A., Parodi, F., Corrias, M. V., Cinti, R., Gambini, C., and Pistoia, V. (2007). Tumor origin of endothelial cells in human neuroblastoma. *J Clin Oncol* 25, 376-383.

Phillips, K. G., Kolatkar, A., Rees, K. J., Rigg, R., Marrinucci, D., Luttgen, M., Bethel, K., Kuhn, P., and McCarty, O. J. T. (2012). Quantification of cellular volume and sub-cellular density fluctuations: comparison of normal peripheral blood cells and circulating tumor cells identified in a breast cancer patient. *Front Oncol* 2.

Potente, M., Gerhardt, H., and Carmeliet, P. (2011a). Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell* 146, 873-887.

Potente, M., Gerhardt, H., and Carmeliet, P. (2011b). Basic and Therapeutic Aspects of Angiogenesis. *Cell* 146, 873-887.

Pratt, D. A., Miller, W. R., and Dawes, J. (1989). Thrombospondin in malignant and non-malignant breast tissue. *Eur J Cancer Clin Oncol* 25, 343-350.

Presta, M., Dell'Era, P., Mitola, S., Moroni, E., Ronca, R., and Rusnati, M. (2005). Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 16, 159-178.

Qian, X., Rothman, V. L., Nicosia, R. F., and Tuszynski, G. P. (2001). Expression of thrombospondin-1 in human pancreatic adenocarcinomas: role in matrix metalloproteinase-9 production. *Pathol Oncol Res* 7, 251-259.

Quigley, J. P., and Armstrong, P. B. (1998). Tumor cell intravasation elucidated: the chick embryo opens the window. *Cell* 94, 281-284.

Raman, P., Harry, C., Weber, M., Krukovets, I., and Stenina, O. I. (2011). A novel transcriptional mechanism of cell type-specific regulation of vascular gene expression by glucose. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31, 634-642.

Raman, P., Krukovets, I., Marinic, T. E., Bornstein, P., and Stenina, O. I. (2007). Glycosylation mediates up-regulation of a potent antiangiogenic and proatherogenic protein, thrombospondin-1, by glucose in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 282, 5704-5714.

Ramis-Conde, I., Chaplain, M. A., Anderson, A. R., and Drasdo, D. (2009). Multi-scale modelling of cancer cell intravasation: the role of cadherins in metastasis. *Phys Biol* 6, 016008.

Rapisarda, A., and Melillo, G. (2012). Overcoming disappointing results with antiangiogenic therapy by targeting hypoxia. *Nat Rev Clin Oncol* 9, 378-390.

Raugi, G. J., Mullen, J. S., Bark, D. H., Okada, T., and Mayberg, M. R. (1990). Thrombospondin deposition in rat carotid artery injury. *Am J Pathol* 137, 179-185.

Raugi, G. J., Olerud, J. E., and Gown, A. M. (1987). Thrombospondin in early human wound tissue. *J Invest Dermatol* 89, 551-554.

Reck, M., von Pawel, J., Zatloukal, P., Ramlau, R., Gorbounova, V., Hirsh, V., Leighl, N., Mezger, J., Archer, V., Moore, N., and Manegold, C. (2010). Overall survival with cisplatin-gemcitabine and bevacizumab or placebo as first-line therapy for nonsquamous non-small-cell lung cancer: results from a randomised phase III trial (AVAiL). *Ann Oncol* 21, 1804-1809.

Recouvreux, M. V., Camilletti, M. A., Rifkin, D. B., Becu-Villalobos, D., and Diaz-Torga, G. (2012). Thrombospondin-1 (TSP-1) analogs ABT-510 and ABT-898 inhibit prolactinoma growth and recover active pituitary transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1). *Endocrinology* 153, 3861-3871.

Rege, T. A., Stewart, J., Jr., Dranka, B., Benveniste, E. N., Silverstein, R. L., and Gladson, C. L. (2009). Thrombospondin-1-induced apoptosis of brain microvascular endothelial cells can be mediated by TNF-R1. *J Cell Physiol* 218, 94-103.

Ribatti, D., and Djonov, V. (2012). Intussusceptive microvascular growth in tumors. *Cancer Lett* 316, 126-131.

Ricci-Vitiani, L., Pallini, R., Biffoni, M., Todaro, M., Invernici, G., Cenci, T., Maira, G., Parati, E. A., Stassi, G., Larocca, L. M., and De Maria, R. (2010). Tumour vascularization via endothelial differentiation of glioblastoma stem-like cells. *Nature* 468, 824-828.

Risau, W. (1997). Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 386, 671-674.

Risbridger, G. P., Davis, I. D., Birrell, S. N., and Tilley, W. D. (2010). Breast and prostate cancer: more similar than different. *Nat Rev Cancer* 10, 205-212.

Roberts, D. D. (2008). Thrombospondins: from structure to therapeutics. *Cell Mol Life Sci* 65, 669-671.

Rodrigues, R. G., Guo, N., Zhou, L., Sipes, J. M., Williams, S. B., Templeton, N. S., Gralnick, H. R., and Roberts, D. D. (2001). Conformational regulation of the fibronectin binding and $\alpha 3\beta 1$ integrin-mediated adhesive activities of thrombospondin-1. *J Biol Chem* 276, 27913-27922.

Rodriguez-Antona, C., Pallares, J., Montero-Conde, C., Inglada-Perez, L., Castelblanco, E., Landa, I., Leskela, S., Leandro-Garcia, L. J., Lopez-Jimenez, E., Leton, R., *et al.* (2010). Overexpression and activation of EGFR and VEGFR2 in medullary thyroid carcinomas is related to metastasis. *Endocr Relat Cancer* 17, 7-16.

Roh, Y. H., Kim, Y. H., Choi, H. J., Lee, K. E., and Roh, M. S. (2009). Fascin overexpression correlates with positive thrombospondin-1 and syndecan-1 expressions and a more aggressive clinical course in patients with gallbladder cancer. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 16, 315-321.

Rosca, E. V., Koskimaki, J. E., Rivera, C. G., Pandey, N. B., Tamiz, A. P., and Popel, A. S. (2011). Anti-angiogenic peptides for cancer therapeutics. *Curr Pharm Biotechnol* 12, 1101-1116.

Roth, J. J., Gahtan, V., Brown, J. L., Gerhard, C., Swami, V. K., Rothman, V. L., Tulenko, T. N., and Tuszynski, G. P. (1998). Thrombospondin-1 is elevated with both intimal hyperplasia and hypercholesterolemia. *J Surg Res* 74, 11-16.

Ruiter, D. J., van Krieken, J. H., van Muijen, G. N., and de Waal, R. M. (2001). Tumour metastasis: is tissue an issue? *Lancet Oncol* 2, 109-112.

Rusnati, M., and Presta, M. (2006). Extracellular angiogenic growth factor interactions: an angiogenesis interactome survey. *Endothelium* 13, 93-111.

Rusnati, M., Urbinati, C., Bonifacio, S., Presta, M., and Taraboletti, G. (2010). Thrombospondin-1 as a Paradigm for the Development of Antiangiogenic Agents Endowed with Multiple Mechanisms of Action. *Pharmaceuticals* 3, 1241-1278.

Sahora, A. I., Rusk, A. W., Henkin, J., McKeegan, E. M., Shi, Y., and Khanna, C. (2012). Prospective Study of Thrombospondin-1 Mimetic Peptides, ABT-510 and ABT-898, in Dogs with Soft Tissue Sarcoma. *J Vet Intern Med*.

Samoszuk, M., Tan, J., and Chorn, G. (2005). Clonogenic growth of human breast cancer cells co-cultured in direct contact with serum-activated fibroblasts. *Breast Cancer Res* 7, R274-283.

Sandler, A., Gray, R., Perry, M. C., Brahmer, J., Schiller, J. H., Dowlati, A., Lilienbaum, R., and Johnson, D. H. (2006). Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 355, 2542-2550.

Sargiannidou, I., Qiu, C., and Tuszynski, G. P. (2004). Mechanisms of thrombospondin-1-mediated metastasis and angiogenesis. *Semin Thromb Hemost* 30, 127-136.

Sargiannidou, I., Zhou, J., and Tuszynski, G. P. (2001). The role of thrombospondin-1 in tumor progression. *Exp Biol Med (Maywood)* 226, 726-733.

Sathornsumetee, S., Cao, Y., Marcello, J. E., Herndon, J. E., 2nd, McLendon, R. E., Desjardins, A., Friedman, H. S., Dewhirst, M. W., Vredenburgh, J. J., and Rich, J. N. (2008). Tumor angiogenic and hypoxic profiles predict radiographic response and survival in malignant astrocytoma patients treated with bevacizumab and irinotecan. *J Clin Oncol* 26, 271-278.

Schwarte-Waldhoff, I., Volpert, O. V., Bouck, N. P., Sipos, B., Hahn, S. A., Klein-Scory, S., Luttes, J., Kloppel, G., Graeven, U., Eilert-Micus, C., *et al.* (2000). Smad4/DPC4-mediated tumor suppression through suppression of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 9624-9629.

Seymour, K. A., Sadowitz, B., Stein, J. J., Lawler, J., Maier, K. G., and Gahtan, V. (2011). Vascular smooth muscle cell migration induced by domains of thrombospondin-1 is differentially regulated. *Am J Surg* 202, 553-557.

Sezaki, S., Hirohata, S., Iwabuchi, A., Nakamura, K., Toeda, K., Miyoshi, T., Yamawaki, H., Demircan, K., Kusachi, S., Shiratori, Y., and Ninomiya, Y. (2005). Thrombospondin-1 is induced in rat myocardial infarction and its induction is accelerated by ischemia/reperfusion. *Exp Biol Med (Maywood)* 230, 621-630.

Shafer, M. W., Mangold, L., Partin, A. W., and Haab, B. B. (2007). Antibody array profiling reveals serum TSP-1 as a marker to distinguish benign from malignant prostatic disease. *Prostate* 67, 255-267.

Shaked, Y., Bertolini, F., Man, S., Rogers, M. S., Cervi, D., Foutz, T., Rawn, K., Voskas, D., Dumont, D. J., Ben-David, Y., *et al.* (2005). Genetic heterogeneity of the vasculogenic phenotype parallels angiogenesis; Implications for cellular surrogate marker analysis of antiangiogenesis. *Cancer Cell* 7, 101-111.

Sheibani, N., Sorenson, C. M., Cornelius, L. A., and Frazier, W. A. (2000). Thrombospondin-1, a natural inhibitor of angiogenesis, is present in vitreous and aqueous humor and is modulated by hyperglycemia. *Biochem Biophys Res Commun* 267, 257-261.

Shi, M., Zhu, J., Wang, R., Chen, X., Mi, L., Walz, T., and Springer, T. A. (2011). Latent TGF-beta structure and activation. *Nature* 474, 343-349.

Shojaei, F. (2012). Anti-angiogenesis therapy in cancer: current challenges and future perspectives. *Cancer Lett* 320, 130-137.

Shojaei, F., Lee, J. H., Simmons, B. H., Wong, A., Esparza, C. O., Plumlee, P. A., Feng, J., Stewart, A. E., Hu-Lowe, D. D., and Christensen, J. G. (2010). HGF/c-Met acts as an alternative angiogenic pathway in sunitinib-resistant tumors. *Cancer Res* 70, 10090-10100.

Shojaei, F., Wu, X., Malik, A. K., Zhong, C., Baldwin, M. E., Schanz, S., Fuh, G., Gerber, H. P., and Ferrara, N. (2007a). Tumor refractoriness to anti-VEGF treatment is mediated by CD11b+Gr1+ myeloid cells. *Nat Biotechnol* 25, 911-920.

Shojaei, F., Wu, X., Zhong, C., Yu, L., Liang, X. H., Yao, J., Blanchard, D., Bais, C., Peale, F. V., van Bruggen, N., *et al.* (2007b). Bv8 regulates myeloid-cell-dependent tumour angiogenesis. *Nature* 450, 825-831.

Shull, M. M., Ormsby, I., Kier, A. B., Pawlowski, S., Diebold, R. J., Yin, M., Allen, R., Sidman, C., Proetzel, G., Calvin, D., and *et al.* (1992). Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* 359, 693-699.

Sid, B., Sartelet, H., Bellon, G., El Btaouri, H., Rath, G., Delorme, N., Haye, B., and Martiny, L. (2004). Thrombospondin 1: a multifunctional protein implicated in the regulation of tumor growth. *Crit Rev Oncol Hematol* 49, 245-258.

Siemann, D. W. (2011). The unique characteristics of tumor vasculature and preclinical evidence for its selective disruption by Tumor-Vascular Disrupting Agents. *Cancer Treat Rev* 37, 63-74.

Silverstein, R. L., and Febbraio, M. (2009). CD36, a scavenger receptor involved in immunity, metabolism, angiogenesis, and behavior. *Sci Signal* 2, re3.

Sipes, J. M., Kruttsch, H. C., Lawler, J., and Roberts, D. D. (1999). Cooperation between thrombospondin-1 type 1 repeat peptides and alpha(v)beta(3) integrin ligands to promote melanoma cell spreading and focal adhesion kinase phosphorylation. *J Biol Chem* 274, 22755-22762.

Smith, S. K. (2001). Regulation of angiogenesis in the endometrium. *Trends Endocrinol Metab* 12, 147-151.

Soda, Y., Marumoto, T., Friedmann-Morvinski, D., Soda, M., Liu, F., Michiue, H., Pastorino, S., Yang, M., Hoffman, R. M., Kesari, S., and Verma, I. M. (2011). Transdifferentiation of glioblastoma cells into vascular endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 4274-4280.

Song, H. F., Liu, X. W., Zhang, H. N., Zhu, B. Z., Yuan, S. J., Liu, S. Y., and Tang, Z. M. (2005). Pharmacokinetics of His-tag recombinant human endostatin in Rhesus monkeys. *Acta Pharmacol Sin* 26, 124-128.

Stacker, S. A., Baldwin, M. E., and Achen, M. G. (2002). The role of tumor lymphangiogenesis in metastatic spread. *FASEB J* 16, 922-934.

Staniszewska, I., Zaveri, S., Del Valle, L., Oliva, I., Rothman, V. L., Croul, S. E., Roberts, D. D., Mosher, D. F., Tuszyński, G. P., and Marcinkiewicz, C. (2007). Interaction of alpha9beta1 integrin with thrombospondin-1 promotes angiogenesis. *Circ Res* 100, 1308-1316.

Stenina, O. I., Byzova, T. V., Adams, J. C., McCarthy, J. J., Topol, E. J., and Plow, E. F. (2004). Coronary artery disease and the thrombospondin single nucleotide polymorphisms. *Int J Biochem Cell Biol* 36, 1013-1030.

Stevenson, C. E., Nagahashi, M., Ramachandran, S., Yamada, A., Bear, H. D., and Takabe, K. (2012). Bevacizumab and breast cancer: what does the future hold? *Future Oncol* 8, 403-414.

Stohrer, M., Boucher, Y., Stangassinger, M., and Jain, R. K. (2000). Oncotic pressure in solid tumors is elevated. *Cancer Res* 60, 4251-4255.

Streit, M., Stephen, A. E., Hawighorst, T., Matsuda, K., Lange-Asschenfeldt, B., Brown, L. F., Vacanti, J. P., and Detmar, M. (2002). Systemic inhibition of tumor growth and angiogenesis by thrombospondin-2 using cell-based antiangiogenic gene therapy. *Cancer Res* 62, 2004-2012.

Streubel, B., Chott, A., Huber, D., Exner, M., Jager, U., Wagner, O., and Schwarzingner, I. (2004). Lymphoma-specific genetic aberrations in microvascular endothelial cells in B-cell lymphomas. *N Engl J Med* 351, 250-259.

Suh, E. J., Kabir, M. H., Kang, U. B., Lee, J. W., Yu, J., Noh, D. Y., and Lee, C. (2011). Comparative profiling of plasma proteome from breast cancer patients reveals thrombospondin-1 and BRWD3 as serological biomarkers. *Exp Mol Med*.

Sweetwyne, M. T., and Murphy-Ullrich, J. E. (2012). Thrombospondin1 in tissue repair and fibrosis: TGF-beta-dependent and independent mechanisms. *Matrix Biol* 31, 178-186.

Sweetwyne, M. T., Pallero, M. A., Lu, A., Van Duyn Graham, L., and Murphy-Ullrich, J. E. (2010). The calreticulin-binding sequence of thrombospondin 1 regulates collagen expression and organization during tissue remodeling. *Am J Pathol* 177, 1710-1724.

Tang, D., Nagano, H., Yamamoto, H., Wada, H., Nakamura, M., Kondo, M., Ota, H., Yoshioka, S., Kato, H., Damdinsuren, B., *et al.* (2006). Angiogenesis in cholangiocellular carcinoma: expression of vascular endothelial growth factor, angiopoietin-1/2, thrombospondin-1 and clinicopathological significance. *Oncol Rep* 15, 525-532.

Taraboletti, G., Morbidelli, L., Donnini, S., Parenti, A., Granger, H. J., Giavazzi, R., and Ziche, M. (2000). The heparin binding 25 kDa fragment of thrombospondin-1 promotes angiogenesis and modulates gelatinase and TIMP-2 production in endothelial cells. *FASEB J* 14, 1674-1676.

Taraboletti, G., Roberts, D., Liotta, L. A., and Giavazzi, R. (1990). Platelet thrombospondin modulates endothelial cell adhesion, motility, and growth: a potential angiogenesis regulatory factor. *J Cell Biol* 111, 765-772.

Taraboletti, G., Rusnati, M., Ragona, L., and Colombo, G. (2010). Targeting tumor angiogenesis with TSP-1-based compounds: rational design of antiangiogenic mimetics of endogenous inhibitors. *Oncotarget* 1, 662-673.

Teicher, B. A. (1996). A systems approach to cancer therapy. (Antioncogenics + standard cytotoxics-->mechanism(s) of interaction). *Cancer Metastasis Rev* 15, 247-272.

Tenan, M., Fulci, G., Albertoni, M., Diserens, A. C., Hamou, M. F., El Atifi-Borel, M., Feige, J. J., Pepper, M. S., and Van Meir, E. G. (2000). Thrombospondin-1 is downregulated by anoxia and suppresses tumorigenicity of human glioblastoma cells. *J Exp Med* 191, 1789-1798.

Thompson, E. M., Dosa, E., Kraemer, D. F., and Neuwelt, E. A. (2011). Correlation of MRI sequences to assess progressive glioblastoma multiforme treated with bevacizumab. *J Neurooncol* 103, 353-360.

Tolsma, S. S., Volpert, O. V., Good, D. J., Frazier, W. A., Polverini, P. J., and Bouck, N. (1993). Peptides derived from two separate domains of the matrix protein thrombospondin-1 have anti-angiogenic activity. *J Cell Biol* 122, 497-511.

Topol, E. J., McCarthy, J., Gabriel, S., Moliterno, D. J., Rogers, W. J., Newby, L. K., Freedman, M., Metivier, J., Cannata, R., O'Donnell, C. J., *et al.* (2001). Single nucleotide polymorphisms in multiple novel thrombospondin genes may be associated with familial premature myocardial infarction. *Circulation* 104, 2641-2644.

Trojan, L., Schaaf, A., Steidler, A., Haak, M., Thalmann, G., Knoll, T., Gretz, N., Alken, P., and Michel, M. S. (2005). Identification of metastasis-associated genes in prostate cancer by genetic profiling of human prostate cancer cell lines. *Anticancer Res* 25, 183-191.

Tsavalier, L., Shaperro, M. H., Morkowski, S., and Laus, R. (2001). Trp-p8, a novel prostate-specific gene, is up-regulated in prostate cancer and other malignancies and shares high homology with transient receptor potential calcium channel proteins. *Cancer Res* 61, 3760-3769.

Tseng, P. L., Tai, M. H., Huang, C. C., Wang, C. C., Lin, J. W., Hung, C. H., Chen, C. H., Wang, J. H., Lu, S. N., Lee, C. M., *et al.* (2008). Overexpression of VEGF is associated with positive p53 immunostaining in hepatocellular carcinoma (HCC) and adverse outcome of HCC patients. *J Surg Oncol* 98, 349-357.

Tuszynski, G. P., Gasic, T. B., Rothman, V. L., Knudsen, K. A., and Gasic, G. J. (1987). Thrombospondin, a potentiator of tumor cell metastasis. *Cancer Res* 47, 4130-4133.

Tuszynski, G. P., Smith, M., Rothman, V. L., Capuzzi, D. M., Joseph, R. R., Katz, J., Besa, E. C., Treat, J., and Switalska, H. I. (1992). Thrombospondin levels in patients with malignancy [published erratum appears in *Thromb Haemost* 1992 Oct 5;68(4):485]. *Thromb Haemost* 67, 607-611.

Urquidi, V., Sloan, D., Kawai, K., Agarwal, D., Woodman, A. C., Tarin, D., and Goodison, S. (2002). Contrasting expression of thrombospondin-1 and osteopontin correlates with absence or presence of metastatic phenotype in an isogenic model of spontaneous human breast cancer metastasis. *Clin Cancer Res* 8, 61-74.

Vajkoczy, P., Farhadi, M., Gaumann, A., Heidenreich, R., Erber, R., Wunder, A., Tonn, J. C., Menger, M. D., and Breier, G. (2002). Microtumor growth initiates angiogenic sprouting with simultaneous expression of VEGF, VEGF receptor-2, and angiopoietin-2. *J Clin Invest* 109, 777-785.

van den Hooff, A. (1988). Stromal involvement in malignant growth. *Adv Cancer Res* 50, 159-196.

Veliceasa, D., Ivanovic, M., Hoepfner, F. T., Thumbikat, P., Volpert, O. V., and Smith, N. D. (2007). Transient potential receptor channel 4 controls thrombospondin-1 secretion and angiogenesis in renal cell carcinoma. *FEBS J* 274, 6365-6377.

Volpert, O. V., Zaichuk, T., Zhou, W., Reiher, F., Ferguson, T. A., Stuart, P. M., Amin, M., and Bouck, N. P. (2002). Inducer-stimulated Fas targets activated endothelium for destruction by anti-angiogenic thrombospondin-1 and pigment epithelium-derived factor. *Nat Med* 8, 349-357.

Vos, H. L., Devarayalu, S., de Vries, Y., and Bornstein, P. (1992). Thrombospondin 3 (Thbs3), a new member of the thrombospondin gene family. *J Biol Chem* 267, 12192-12196.

Walton, K. L., Makanji, Y., Chen, J., Wilce, M. C., Chan, K. L., Robertson, D. M., and Harrison, C. A. (2010). Two distinct regions of latency-associated peptide coordinate stability of the latent transforming growth factor-beta1 complex. *J Biol Chem* 285, 17029-17037.

Wang-Rodriguez, J., Urquidi, V., Rivard, A., and Goodison, S. (2003). Elevated osteopontin and thrombospondin expression identifies malignant human breast carcinoma but is not indicative of metastatic status. *Breast Cancer Res* 5, R136-143.

Wang, H., Fu, W., Im, J. H., Zhou, Z., Santoro, S. A., Iyer, V., DiPersio, C. M., Yu, Q. C., Quaranta, V., Al-Mehdi, A., and Muschel, R. J. (2004). Tumor cell $\alpha 3 \beta 1$ integrin and vascular laminin-5 mediate pulmonary arrest and metastasis. *J Cell Biol* 164, 935-941.

Wang, R., Chadalavada, K., Wilshire, J., Kowalik, U., Hovinga, K. E., Geber, A., Fligelman, B., Leversha, M., Brennan, C., and Tabar, V. (2010). Glioblastoma stem-like cells give rise to tumour endothelium. *Nature* 468, 829-833.

Wang, T. N., Qian, X., Granick, M. S., Solomon, M. P., Rothman, V. L., Berger, D. H., and Tuszynski, G. P. (1996). Thrombospondin-1 (TSP-1) promotes the invasive properties of human breast cancer. *J Surg Res* 63, 39-43.

Wang, X. Q., and Frazier, W. A. (1998). The thrombospondin receptor CD47 (IAP) modulates and associates with $\alpha 2 \beta 1$ integrin in vascular smooth muscle cells. *Mol Biol Cell* 9, 865-874.

Warren, R. S., Yuan, H., Matli, M. R., Gillett, N. A., and Ferrara, N. (1995). Regulation by vascular endothelial growth factor of human colon cancer tumorigenesis in a mouse model of experimental liver metastasis. *J Clin Invest* 95, 1789-1797.

Watkins, S. C., Lynch, G. W., Kane, L. P., and Slayter, H. S. (1990). Thrombospondin expression in traumatized skeletal muscle. Correlation of appearance with post-trauma regeneration. *Cell Tissue Res* 261, 73-84.

Wedam, S. B., Low, J. A., Yang, S. X., Chow, C. K., Choyke, P., Danforth, D., Hewitt, S. M., Berman, A., Steinberg, S. M., Liewehr, D. J., *et al.* (2006). Antiangiogenic and antitumor effects of bevacizumab in patients with inflammatory and locally advanced breast cancer. *J Clin Oncol* 24, 769-777.

Weiss, L. (2000). Metastasis of cancer: a conceptual history from antiquity to the 1990s. *Cancer Metastasis Rev* 19, I-XI, 193-383.

Wen, S., Stolarov, J., Myers, M. P., Su, J. D., Wigler, M. H., Tonks, N. K., and Durden, D. L. (2001). PTEN controls tumor-induced angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 4622-4627.

Wick, W., Wick, A., Weiler, M., and Weller, M. (2011). Patterns of progression in malignant glioma following anti-VEGF therapy: perceptions and evidence. *Curr Neurol Neurosci Rep* 11, 305-312.

Wight, T. N., Raugi, G. J., Mumby, S. M., and Bornstein, P. (1985). Light microscopic immunolocalization of thrombospondin in human tissues. *J Histochem Cytochem* 33, 295-302.

Willett, C. G., Boucher, Y., di Tomaso, E., Duda, D. G., Munn, L. L., Tong, R. T., Chung, D. C., Sahani, D. V., Kalva, S. P., Kozin, S. V., *et al.* (2004). Direct evidence that the VEGF-specific antibody bevacizumab has antivascular effects in human rectal cancer. *Nat Med* 10, 145-147.

Willett, C. G., Boucher, Y., Duda, D. G., di Tomaso, E., Munn, L. L., Tong, R. T., Kozin, S. V., Petit, L., Jain, R. K., Chung, D. C., *et al.* (2005). Surrogate markers for antiangiogenic therapy and dose-limiting toxicities for bevacizumab with radiation and chemotherapy: continued experience of a phase I trial in rectal cancer patients. *J Clin Oncol* 23, 8136-8139.

Wilting, J., Christ, B., Yuan, L., and Eichmann, A. (2003). Cellular and molecular mechanisms of embryonic haemangiogenesis and lymphangiogenesis. *Naturwissenschaften* 90, 433-448.

Wong, C. W., Lee, A., Shientag, L., Yu, J., Dong, Y., Kao, G., Al-Mehdi, A. B., Bernhard, E. J., and Muschel, R. J. (2001). Apoptosis: an early event in metastatic inefficiency. *Cancer Res* 61, 333-338.

Wong, S. Y., and Hynes, R. O. (2006). Lymphatic or hematogenous dissemination: how does a metastatic tumor cell decide? *Cell Cycle* 5, 812-817.

Wong, S. Y., Purdie, A. T., and Han, P. (1992). Thrombospondin and other possible related matrix proteins in malignant and benign breast disease. An immunohistochemical study. *Am J Pathol* 140, 1473-1482.

Wu, J. M., and Staton, C. A. (2012). Anti-angiogenic drug discovery: lessons from the past and thoughts for the future. *Expert Opin Drug Discov*.

Xian, X., Hakansson, J., Stahlberg, A., Lindblom, P., Betsholtz, C., Gerhardt, H., and Semb, H. (2006). Pericytes limit tumor cell metastasis. *J Clin Invest* 116, 642-651.

Yakes, F. M., Chen, J., Tan, J., Yamaguchi, K., Shi, Y., Yu, P., Qian, F., Chu, F., Bentzien, F., Cancilla, B., *et al.* (2011). Cabozantinib (XL184), a novel MET and VEGFR2 inhibitor, simultaneously suppresses metastasis, angiogenesis, and tumor growth. *Mol Cancer Ther* 10, 2298-2308.

Yamashita, Y., Kurohiji, T., Tuszynski, G. P., Sakai, T., and Shirakusa, T. (1998). Plasma thrombospondin levels in patients with colorectal carcinoma. *Cancer* 82, 632-638.

Yang, Q., Tian, Y., Ostler, K. R., Chlenski, A., Guerrero, I. J., Salwen, H. R., Godley, L. A., and Cohn, S. L. (2010). Epigenetic alterations differ in phenotypically distinct human neuroblastoma cell lines. *BMC Cancer* 10, 286.

Yap, R., Veliceasa, D., Emmenegger, U., Kerbel, R. S., McKay, L. M., Henkin, J., and Volpert, O. V. (2005). Metronomic low-dose chemotherapy boosts CD95-dependent antiangiogenic effect of the

thrombospondin peptide ABT-510: a complementation antiangiogenic strategy. *Clin Cancer Res* 11, 6678-6685.

Yee, K. O., Connolly, C. M., Duquette, M., Kazerounian, S., Washington, R., and Lawler, J. (2009). The effect of thrombospondin-1 on breast cancer metastasis. *Breast Cancer Res Treat* 114, 85-96.

You, Z. Y., Zhao, Y., Liu, F., Zhang, Y. D., and Wang, J. J. (2010). The radiosensitization effects of Endostar on human lung squamous cancer cells H-520. *Cancer Cell Int* 10, 17.

Young, G. D., and Murphy-Ullrich, J. E. (2004). Molecular interactions that confer latency to transforming growth factor-beta. *J Biol Chem* 279, 38032-38039.

Yu, Q., and Stamenkovic, I. (2000). Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev* 14, 163-176.

Yuan, A., Lin, C. Y., Chou, C. H., Shih, C. M., Chen, C. Y., Cheng, H. W., Chen, Y. F., Chen, J. J., Chen, J. H., Yang, P. C., and Chang, C. (2011). Functional and structural characteristics of tumor angiogenesis in lung cancers overexpressing different VEGF isoforms assessed by DCE- and SSCE-MRI. *PLoS One* 6, e16062.

Yue, P. Y., Mak, N. K., Cheng, Y. K., Leung, K. W., Ng, T. B., Fan, D. T., Yeung, H. W., and Wong, R. N. (2007). Pharmacogenomics and the Yin/Yang actions of ginseng: anti-tumor, angiomodulating and steroid-like activities of ginsenosides. *Chin Med* 2, 6.

Zhang, X., Xu, J., Lawler, J., Terwilliger, E., and Parangi, S. (2007). Adeno-associated virus-mediated antiangiogenic gene therapy with thrombospondin-1 type 1 repeats and endostatin. *Clin Cancer Res* 13, 3968-3976.

Zhou, W., Negash, S., Liu, J., and Raj, J. U. (2009). Modulation of pulmonary vascular smooth muscle cell phenotype in hypoxia: role of cGMP-dependent protein kinase and myocardin. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 296, L780-789.

Zulato, E., Curtarello, M., Nardo, G., and Indraccolo, S. (2012). Metabolic effects of anti-angiogenic therapy in tumors. *Biochimie* 94, 925-931.