



Mécanismes de progression des carcinomes de la prostate et recherche de nouveaux facteurs pronostiques

Nicolas Barry Delongchamps

► To cite this version:

Nicolas Barry Delongchamps. Mécanismes de progression des carcinomes de la prostate et recherche de nouveaux facteurs pronostiques. Cancer. Université Paris Sud - Paris XI, 2013. Français. NNT : 2013PA11T011 . tel-00965803

HAL Id: tel-00965803

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00965803>

Submitted on 25 Mar 2014

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

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

THESE DE DOCTORAT

Discipline : cancérologie

Titre délivré par l'Université Paris XI
Faculté de médecine du Kremlin-Bicêtre
Ecole doctorale de cancérologie

MECANISMES DE PROGRESSION

DES CARCINOMES DE LA PROSTATE

ET RECHERCHE DE NOUVEAUX FACTEURS PRONOSTIQUES

Par

Nicolas BARRY DELONGCHAMPS

Thèse effectuée sous la direction du Dr. Florence Cabon

Soutenue le 29 mars 2013

Jury

Pr Christian Auclair

Pr Stéphane Oudard

Pr Alexandre de la Taille

Pr Marc Zerbib

Dr Florence Cabon

Président du Jury

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Directrice de Thèse

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier ma responsable de thèse, Florence Cabon, pour son enseignement, son encadrement, son soutien et sa disponibilité tout au long de ces quatre années.

Je remercie le Pr Christian Auclair, le Pr Alexandre de la Taille, le Pr Stéphane Oudard et le Pr Marc Zerbib, qui m'ont fait l'honneur de participer à ce jury de thèse.

Je remercie également le Dr Hervé Prats de m'avoir accueilli à Toulouse au sein du laboratoire.

Cette thèse n'aurait pas été possible sans l'aide précieuse du Dr Frédéric Beuvon, que je remercie pour son soutien permanent.

Merci au Dr Jacques Mathieu, qui m'a enseigné, avec grande patience, les techniques de PCR. Merci à Jessica et Guillaume, Maud et Stéphanie pour leur aide et leurs encouragements.

Ce travail n'aurait pas été possible sans l'aide financière de l'Association pour la Recherche sur les Tumeurs de la Prostate (ARTP).

Merci à mon épouse de m'avoir soutenu tout au long de ces années.

RÉSUMÉ

Parallèlement au rôle central du récepteur aux androgènes, l'environnement tumoral immédiat exerce aussi une action majeure sur la progression du cancer de la prostate. L'hypoxie locale, par le biais de régulations multiples, serait impliquée dans la migration cellulaire et la dissémination tumorale. L'objectif de ma thèse a été d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et de nouveaux marqueurs pronostiques pour ces cancers. J'ai tout d'abord participé à l'identification d'un partenaire du récepteur aux androgènes, la protéine CAD, enzyme clé de la synthèse des pyrimidines. Parallèlement, nous nous sommes intéressés au rôle d'un anti-angiogénique endogène dans la progression du cancer de la prostate, la thrombospondine-1 (TSP-1). Bien que l'activité anti angiogénique soit souvent considérée comme anti-tumorale, nous avons mis en évidence le caractère protumoral de la TSP-1, par son action promigratoire sur les cellules tumorales. Ces travaux m'ont conduits à étudier l'axe CXCR4/SDF-1, régulé en partie par l'hypoxie et stimulant la migration cellulaire. Nous avons montré sur tissu humain que CXCR4 était exprimé principalement au niveau du front tumoral des cancers localisés et localement avancés, et que son expression était associée à une transition épithélio-mésenchymateuse. SDF-1 était surexprimée selon un gradient croissant allant du centre des tumeurs vers le tissu péri-tumoral distant, exerçant possiblement un chimiotactisme sur les cellules du front tumoral. La surexpression de CXCR4 au front tumoral ainsi que le gradient de SDF1 étaient associés au pronostic.

Mots clés : cancer de la prostate, CAD, angiogenèse, TSP-1, CXCR4, SDF-1, pronostic

SUMMARY

In addition to the pivotal role of the androgen receptor, the immediate tumor microenvironment plays an essential role in prostate cancer progression. Local hypoxia, through multiple regulation mechanisms, may be implicated in the migration of tumor cells and dissemination. The aim of my thesis was to identify new therapeutic targets and prognostic markers for these cancers. I first participated in the identification of a new partner of the androgen receptor, the protein CAD that is a key enzyme of pyrimidine synthesis. We also studied the role of the endogenous anti-angiogenic thrombospondin-1 (TSP-1) in prostate cancer progression. Although anti-angiogenic activity is usually matched with tumor inhibition, we showed that TSP-1 exerted protumoral effects by stimulating cell migration. These observations led me to study the hypoxia-induced CXCR4/SDF-1 axis that is known to promote cell migration through the extra-cellular matrix. We showed on human tissue that CXCR4 was overexpressed in the tumor front of localized and locally advanced prostate cancers, and that its expression was associated with an epithelial mesenchymal transition. An increasing gradient of SDF-1 was observed from the tumor center to the distant peritumoral tissue, potentially attracting CXCR4-expressing tumor cells of the tumor front. CXCR4 overexpression in the tumor front, as well as SDF1 gradient, were associated with prognosis.

Key words: prostate cancer, CAD, angiogenesis, TSP-1, CXCR4, SDF-1, prognosis

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	9
I. La prostate.....	10
I.1. Anatomie et fonction de la prostate.....	10
I.2. Organisation de la glande prostatique	12
I.3. Contrôle de l'homéostasie de la prostate.....	13
I.3.a. Les androgènes	13
Les androgènes testiculaires	14
Les androgènes surrénaliens	15
I.3.b. Effets directs des androgènes sur les cellules épithéliales prostatiques	15
I.3.c. Régulation paracrine des cellules épithéliales	16
I.3.d. Le récepteur des androgènes	17
I.4. Le cancer de la prostate	20
I.4a Origine	20
I.4b Epidémiologie	21
I.4c Diagnostic	22
Dépistage	22
Sur détection et risque de sur traitement	23
Biopsies de la prostate	23
I.4d Bilan d'extension et facteurs pronostiques	24
Extension loco-régionale	24
Extension à distance	25
Facteurs pronostiques	25
I.4e Traitement des cancers localisés	26
-Prostatectomie totale	26
-Radiothérapie externe conformationnelle	26
-Curiethérapie	27
-Surveillance active	27

-Traitements focaux	27
I.4f Suivi après traitement curatif	28
I.4g Traitement des CaP métastatiques	28
<i>Les thérapies hormonales</i>	28
I.4h Résistance à la castration	31
I.5. Carcinome prostatique et angiogenèse	34
II. La protéine CAD : CARBAMOYL-PHOSPHATE SYNTHETASE II, ASPARTATE TRANSCARBAMYLASE, ET DIHYDROOROTASE	39
III La thrombospondine 1	46
III. 1. Structure de la TSP1	46
III.2. Ligands de la TSP1	48
III.2.1. Protéines de la matrice extracellulaire (MEC)	49
III.2.2 TGF β	49
III.3. Récepteurs de la TSP1	51
III.3.1. Intégrines et CD47/IAP	51
III.3.2. CD36 et récepteurs non-intégrines	52
III.4. Régulation de la TSP1	53
III.4.1. Régulation par des oncogènes et par des gènes suppresseurs de tumeurs	53
III.4.2. Régulation par l'hypoxie	54
III.5. Fonctions de la TSP1	54
III.5.1. TSP1, une protéine anti-tumorale	55
III.5.2. TSP1, une protéine pro-tumorale	56
III.5.3. Thérapies basées sur la TSP1 et limites	58
III.6. TSP1 et carcinomes prostatiques	61
IV. L'axe CXCR4 / SDF-1	63
IV.1. CXCR4	63
IV.1.a Structure	63
IV.1.b Régulation	64

<i>Régulation transcriptionnelle de CXCR4</i>	64
<i>Régulation de l'expression de la protéine CXCR4</i>	65
IV.2. Le ligand SDF-1	65
IV.3. Liaison de SDF-1 par CXCR4 et signalisation intra-cellulaire	66
IV.3.a Liaison de SDF-1 par CXCR4	66
IV.3.b Voies de signalisation	67
<i>Voies dépendantes des protéines G</i>	67
<i>Voies indépendantes des protéines G</i>	68
IV.4. Autres ligands de CXCR4 – Autres récepteurs de SDF-1	68
IV.4.Fonctions de l'axe CXCR4 / SDF-1	69
IV.4.1. Fonctions physiologiques	69
IV.4.2. Processus pathologiques	69
IV.5. CXCR4 et adénocarcinome prostatique	70
<i>CXCR4 est régulé par le récepteur aux androgènes</i>	71
<i>CXCR4 et SDF-1 sont régulés par l'hypoxie</i>	71
<i>Rôle dans l'invasion locale des tumeurs prostatiques</i>	72
<i>Rôle dans la nidation métastatique des tumeurs prostatiques</i>	74
<i>Rôle pronostique de CXCR4 dans le cancer de la prostate</i>	75
OBJECTIFS	78
RESULTAT 1	79
RESULTAT 2	90
Rôle de la TSP1 dans les carcinomes prostatiques résistants à la castration	90
RESULTAT 3	113
Rôle de l'axe SDF-1/CXCR4 dans l'invasion tumorale prostatique	113
DISCUSSION GENERALE	137
CAD, potentielle cible thérapeutique	137
Réévaluation des effets des drogues antiangiogéniques et perspectives	138

L'axe SDF1/CXCR4.....	142
-----------------------	-----

INTRODUCTION

Les premières observations d'une augmentation de la vascularisation lors de la croissance tumorale datent d'environ un siècle. Depuis, de nombreux groupes ont observé une corrélation entre la progression tumorale et la vascularisation (Donoviel et al., 1990). En 1971, le docteur Folkman proposa le nouveau concept de traitement anti-angiogénique pour traiter les cancers métastatiques (Majack et al., 1987). En 2004, le premier agent anti-angiogénique (le Bevacizumab) fut approuvé par la FDA. Cependant les résultats rapportés de cet anticorps et d'autres molécules anti-angiogéniques chez les patients ayant un cancer métastatique étaient relativement modestes en termes de survie sans progression. Une hypothèse évoquée pour expliquer l'échappement tumorale est l'hypoxie elle-même, dans le tissu tumoral et péri-tumoral, engendrée par les traitements antiangiogéniques.

Au laboratoire, nous travaillons depuis plusieurs années sur les mécanismes de régulation de l'angiogénèse et la progression tumorale du cancer de la prostate. Nous avons plus spécifiquement étudié le rôle d'une protéine impliquée dans la régulation de l'angiogénèse de par ses propriétés anti-angiogéniques naturelles, la TSP1 (Thrombospondine 1). Nous avons montré qu'en dépit de ses propriétés anti-angiogéniques, le rôle de la TSP1 n'était pas strictement anti-tumoral. Enfin, nous avons étudié le rôle d'une protéine régulée par l'hypoxie, CXCR4, et de son ligand SDF-1 (Stromal Growth Factor 1). CXCR4 a été impliquée dans la progression de multiples cancers, et interviendrait au niveau de plusieurs étapes clés de la dissémination métastatique. Nos travaux se sont focalisés sur le rôle de CXCR4 et son ligand dans le tissu péri-tumoral des cancers de la prostate non métastatiques et de leur valeur potentielle en tant qu'outils pronostique.

Parallèlement à ces travaux, j'ai participé au laboratoire à l'identification d'un co-facteur du récepteur aux androgènes (AR), la protéine CAD, qui interviendrait dans la translocation de l'AR vers le noyau. Je débiterai donc la présentation de ma thèse par la description de ce travail.

Avant de présenter nos travaux, j'exposerai quelques données sur les carcinomes prostatiques, la protéine CAD, la TSP1, CXCR4 et son ligand SDF-1.

I. La prostate

I.1. Anatomie et fonction de la prostate

La prostate est un organe présent exclusivement chez les mammifères mâles. Très petite à la naissance, elle se développe fortement lors de la puberté pour atteindre 15 à 25g à l'âge adulte, puis augmente progressivement de volume avec l'âge. Elle est localisée sous la vessie où elle englobe la portion initiale de l'urètre (urètre prostatique). C'est au niveau de l'urètre prostatique que s'abouchent les canaux éjaculateurs, dont les méats sont localisés sur le veru montanum (figure 1). Enfin, la prostate est en avant du rectum et en arrière du pubis.



Figure 1 : visualisation endoscopique du veru montanum

La glande prostatique est impliquée à la fois dans la miction, la fertilité et l'éjaculation (figure 2).

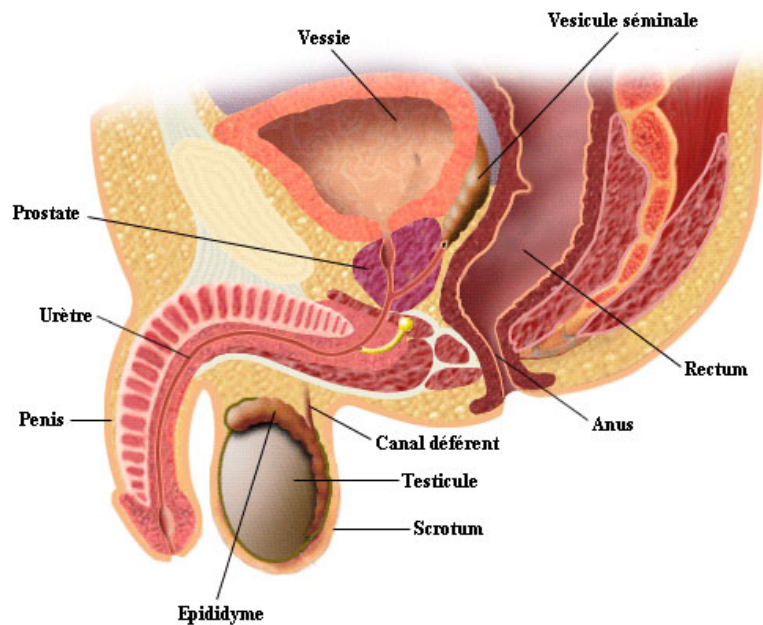


Figure 2 : situation de la prostate chez l'homme.

(Adapté de <http://www.cancersocietytt.org/prostate-cancer.html>).

La prostate est composée de 30 à 50 glandes tubulo-alvéolaires, qui déversent leurs sécrétions dans 15 à 30 canaux sécrétoires indépendants. Les glandes sont entourées par un stroma fibromusculaire, constitué de collagène, de cellules musculaires lisses, de fibres élastiques, de vaisseaux sanguins et lymphatiques, de nerfs et de cellules paraganglionnaires.

Les sécrétions prostatiques participent à la formation du sperme et constituent 30% du volume du liquide séminal. Celui-ci est essentiellement composé de liquide sécrété par les vésicules séminales, les glandes bulbo-urétrales (glandes de Cowper) et la prostate. Les canaux déférents provenant des testicules acheminent les spermatozoïdes jusqu'à la prostate. Le mélange de ceux-ci avec le liquide séminal constitue le sperme.

Bien qu'étant macroscopiquement homogène, la prostate comporte cinq zones anatomiques. Deux sont fibromusculaires et trois sont glandulaires. Les trois zones glandulaires (périphérique, centrale et de transition) occupent 70% de la prostate. La zone périphérique occupe environ 70% du tissu glandulaire. Elle est constituée de glandes entourées par un stroma peu dense constitué de cellules musculaires largement espacées. Environ 70% des cancers se développent dans cette zone, qui est postérieure et postéro-latérale. La zone centrale (25% du volume prostatique glandulaire) comporte des glandes de grande taille et irrégulières, qui sont appelées glandes principales ou sub mucosales, entourées par un stroma très dense. Elle est le siège de 10% des cancers. Entre les deux se trouve la zone

de transition (5% du volume prostatique glandulaire) qui contient les glandes dites mucosales. Elle est le site exclusif de l'hyperplasie prostatique bénigne (HBP), et est le siège de 20% des cancers prostatiques ().

I.2. Organisation de la glande prostatique

Dans la glande prostatique, l'épithélium stratifié est principalement constitué de deux couches : la couche basale faite de cellules cubitales basses, et la couche de cellules épithéliales sécrétrices luminales en colonnes (figure 3).

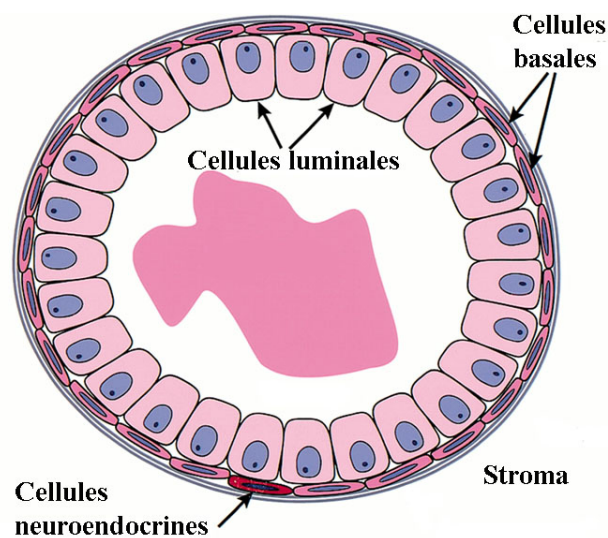


Figure 3 : organisation de la glande prostatique.

Les cellules basales incluent des cellules souches et des cellules amplificatrices peu différenciées, capables de proliférer et de se différencier en cellules épithéliales luminales ou en cellules neuroendocrines. Les cellules épithéliales sécrètent le liquide prostatique dans la lumière des glandes (adapté de (Abate-Shen and Shen, 2000)).

La couche basale inclut des cellules souches, qui donnent naissance à plusieurs sous-populations de cellules progénitrices (Isaacs and Coffey, 1989). Les cellules souches sont caractérisées par l'expression de marqueurs de cellules basales tel que le CD44, les cytokératines 5 et 14 (voir figure 3). Elles sont indépendantes des androgènes pour leur survie avec une capacité proliférative importante et un faible niveau apoptotique (Kim et al., 1992). Ces cellules donnent une population cellulaire transitoire qui va ensuite donner des cellules intermédiaires hétérogènes qui se différencient soit en cellules luminales sécrétrices soit en cellules neuroendocrines (Hudson et al., 2001). Cette population cellulaire intermédiaire est caractérisée par l'expression de la cytokératine 19 et de l'antigène des cellules souches

prostatiques (PSCA) (Hudson et al., 2001 ; Tran et al., 2002). Cette population peut se différencier en cellules luminales sécrétrices, exprimant le récepteur des androgènes, ou en cellules neuroendocrines, exprimant la chromogranine A (CgA) et l'énolase spécifique des neurones (NSE) (Berger et al., 2007 ; Bonkhoff, 2001; Bonkhoff et al., 1994).

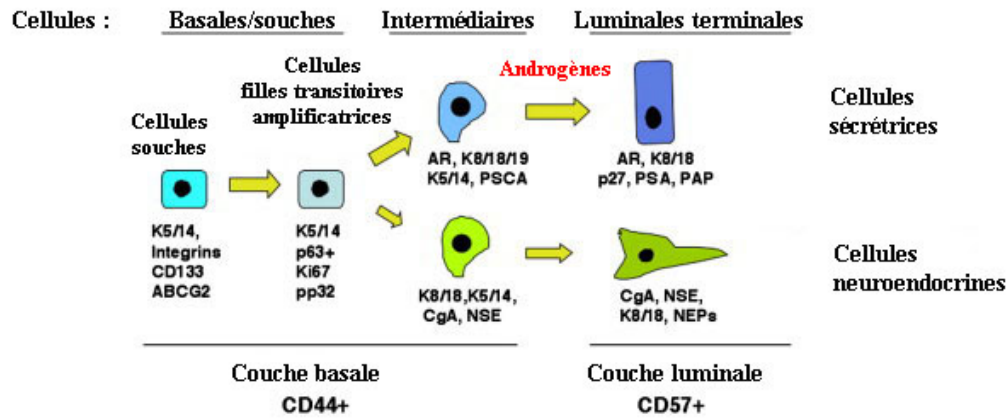


Figure 4 : modèle de différenciation des cellules prostatiques (adapté de (Zenzmaier et al., 2008)).

Les cellules luminales sécrétrices synthétisent et sécrètent les composants du liquide séminal, notamment l'antigène spécifique de la prostate (PSA), la phosphatase acide spécifique de la prostate (PAP), des polyamines et des prostaglandines (Coffey, 1992).

Les cellules neuroendocrines sont des cellules intraglandulaires hybrides épithéliales-neuroendocrines qui sécrètent de nombreuses hormones et neuropeptides qui régulent la croissance, la différenciation et l'activité sécrétrice de l'épithélium prostatique (Abrahamsson, 1996).

I.3. Contrôle de l'homéostasie de la prostate

L'équilibre entre prolifération et apoptose est essentiel au maintien de l'homéostasie de la glande prostatique. Les androgènes, *via* leur liaison à AR, jouent un rôle majeur, bien que non exclusif, dans ce mécanisme. Sous l'action des androgènes, la prostate croît rapidement lors la puberté, puis maintient un développement très lent jusqu'à l'andropause.

I.3.a. Les androgènes

Les androgènes proviennent de deux origines différentes : les testicules et les glandes surrénales (voir figure 5).

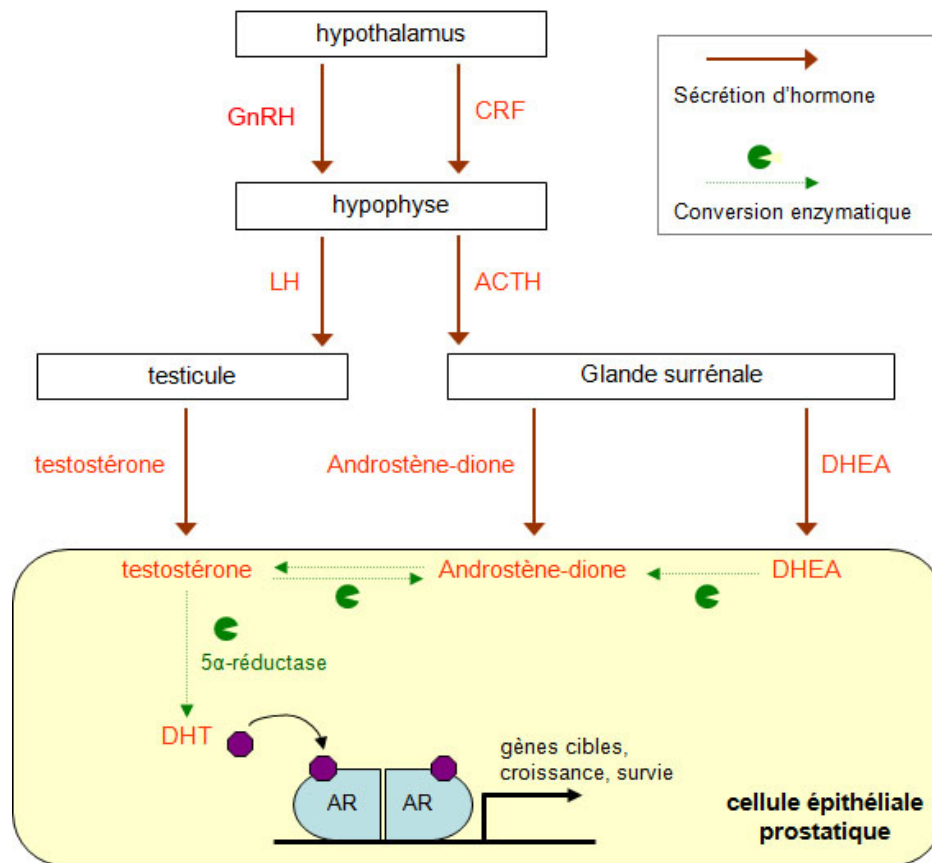


Figure 5 : les différentes sources d'androgènes activant AR dans la prostate (adapté de (Zhu, 2005)).

GnRH : Gonadotropin Releasing Hormone. CRF : Corticotropin-Releasing Hormone. LH : Luteinizing Hormone. ACTH : Adrenocorticotrophic Hormone. DHT : dihydrotestostérone. AR : récepteur des androgènes.

Les androgènes testiculaires

Chez l'homme adulte, les cellules de Leydig des testicules produisent 95% de la testostérone circulante. Les testicules produisent aussi de petites quantités de dihydrotestostérone (DHT), d'androstènedione ou 4-dione, d'œstradiol et de progestagènes. Seul 2% de la testostérone circulante est sous forme libre et capable de pénétrer dans les cellules. Le reste circule sous forme liée à l'albumine (40%) ou à la globuline liant les hormones sexuelles (SHBG). Dans les cellules prostatiques, 90% de la testostérone est rapidement convertie en DHT par la 5 α -réductase. La testostérone et la DHT se lient toutes deux au récepteur des androgènes ; cependant l'affinité de la DHT est cinq fois supérieure à celle de la testostérone.

Les androgènes surrénaliens

La glande surrénale sécrète des précurseurs inactifs de la DHT : la DHEA, qui est un précurseur des œstrogènes et de la testostérone, une forme sulfatée de la DHEA (la DHEAS) et l'androstènedione ou 4-dione. Ces précurseurs sont produits en grande quantité (Belanger et al., 1989; Labrie et al., 1985). La DHEAS est très abondante dans la prostate. Les complexes enzymatiques responsables de la transformation de ces précurseurs en DHT sont aussi exprimés dans la prostate, en particulier dans le compartiment stromal (Mizokami et al., 2009).

I.3.b. Effets directs des androgènes sur les cellules épithéliales prostatiques

Le rôle majeur des androgènes dans la prostate a pu être démontré par des expériences de castration chez le rat (Coffey et al., 1968 ; Colombel et al., 1992; Isaacs, 1984a ; Isaacs, 1984b ; Isaacs, 1984c ; Lesser and Bruchovsky, 1973).L'inhibition de la production d'androgènes testiculaires, par castration chirurgicale ou chimique, réduit considérablement le niveau d'androgènes circulant dans l'organisme, y compris dans la prostate. Elle induit chez le rat une involution rapide de la prostate avec un déroulement chronologique extrêmement reproductible. Le niveau de DHT dans la prostate diminue de 35% six heures après la castration et de 95% après sept jours. Durant les deux premiers jours, le nombre de cellules prostatiques reste constant, alors que la réduction du taux de DHT intra-prostatique est déjà maximale. Durant les huit jours suivants, une très forte réduction du nombre de cellules dans la prostate est observée. Dix jours après la castration, 80% des cellules prostatiques sont mortes par apoptose (Kyprianou and Isaacs, 1988). L'un des événements initiateurs de cette induction de l'apoptose dans la prostate ventrale semble être un changement de la localisation d'AR. En effet, trois heures seulement après la castration, le niveau d'AR nucléaire diminue de 50%, pour atteindre un niveau indétectable après 12h. L'apoptose des cellules prostatiques se poursuit pendant les 2 semaines suivant la castration, alors qu'AR a depuis longtemps disparu du noyau. De nombreux facteurs sont impliqués dans cette induction de l'apoptose (Ma et al., 2009). Les androgènes n'ont pas seulement un effet négatif sur l'apoptose des cellules épithéliales prostatiques, mais ont également un effet positif sur leur prolifération et sur la réplication de l'ADN. L'absence d'androgènes a donc un double effet : inhibition de la prolifération et induction de l'apoptose (Isaacs, 1984b ; Ma et al., 2009).

Les différents types cellulaires présents dans la prostate n'ont pas tous la même dépendance vis-à-vis des androgènes. Les cellules épithéliales expriment AR, et leur survie ainsi que leur activité sécrétoire sont dépendantes de la voie des androgènes. Au contraire, les cellules souches basales, qui n'expriment pas AR, ne sont pas affectées par la suppression androgénique et n'entrent pas en apoptose suite à la castration (Maitland and Collins, 2008; van Leenders and Schalken, 2003). Les cellules intermédiaires ne sont pas dépendantes des androgènes pour leur survie, mais leur croissance et leur différenciation sont sensibles à ces hormones. Ainsi, la prostate est un ensemble hétérogène de cellules strictement androgéno-dépendantes, de cellules androgéno-sensibles et de cellules androgéno-indépendantes (Maitland and Collins, 2008). Si la castration provoque une involution prostatique, inversement la restauration du taux d'androgènes provoque rapidement la différenciation de nombreuses cellules intermédiaires en cellules épithéliales sécrétrices. La réactivation de la voie de signalisation d'AR induit la survie, la prolifération et la différenciation des cellules épithéliales prostatiques, jusqu'à la restauration complète de la prostate fonctionnelle et la production de protéines séminales (Bruchovsky et al., 1975). A ce stade, un nouvel équilibre entre prolifération et apoptose se met en place. C'est cet équilibre qui est perturbé dans les pathologies prostatiques telles que l'hyperplasie bénigne (HBP) et le carcinome prostatique.

En plus des effets sur la prolifération et l'apoptose des cellules épithéliales, les androgènes régulent également l'état du réseau vasculaire dans la prostate normale et tumorale *via* la régulation de la sécrétion de facteurs pro- et anti-angiogéniques.

I.3.c. Régulation paracrine des cellules épithéliales

Le rôle du mésenchyme dans les organes adultes n'est sans doute pas restreint à un simple support mécanique : dans de nombreux cas, il communique avec les cellules épithéliales par le biais d'une signalisation paracrine (Condon and Bosland, 1999). Le stroma prostatique contient des cellules musculaires lisses et des fibroblastes, mais aussi des cellules endothéliales, des nerfs, des lymphocytes infiltrants. L'établissement de co-cultures de cellules épithéliales et stromales prostatiques ou l'utilisation de milieux conditionnés permettent d'étudier dans des conditions contrôlées les interactions entre cellules stromales et épithéliales, ainsi que les molécules impliquées dans ces interactions. Plusieurs équipes ont ainsi montré que des fibroblastes prostatiques ou non, pouvaient stimuler de manière

paracrine la croissance de cellules épithéliales prostatiques (Gleave et al., 1991 ; Kabalin et al., 1989 ; Shigemura et al., 2009).

Les androgènes étant le régulateur majeur de la croissance prostatique, il paraissait possible que ce contrôle paracrine soit régulé par les androgènes. Cette hypothèse a été confirmée par différentes équipes soit en co-culture soit en greffe orthotopique. Les résultats ne sont cependant pas tous concordants (stimulation ou inhibition de la prolifération) mais démontrent que les androgènes peuvent influencer la croissance des cellules épithéliales en passant par les cellules stromales (Halin et al., 2007; Hayward et al., 1992 ; Jennbacken et al., 2009; Yan et al., 1992). Les facteurs de croissance sécrétés par le stroma sous l'influence des androgènes sont appelés « andromédines ». Ces facteurs sont des membres de la famille du FGF, mais aussi du TGF β , le VEGF, l'EGF, les IGF...L'induction de la prolifération des cellules épithéliales et la régulation de l'angiogenèse par les androgènes seraient en partie relayées par le stroma *via* les andromédines. Ces résultats permettent d'appréhender le stroma prostatique comme une cible éventuelle dans les carcinomes prostatiques.

Outre la régulation par les sécrétions stromales, la croissance, la différenciation et l'activité sécrétoire des cellules épithéliales prostatiques sont également sous le contrôle d'une autre régulation paracrine : la régulation neuroendocrine. Les cellules neuroendocrines n'exprimant pas AR, elles régulent de manière paracrine et endocrine les cellules épithéliales, indépendamment des androgènes. Le NGF, la neurotrophine-3, la bombésine, la neurotensine, la sérotonine, le gastrin-releasing peptide, par exemple, sont impliqués dans ces régulations (Abrahamsson, 1999 ; Bologna et al., 1989 ; Dalsgaard et al., 1989 ; Kung and Evans, 2009; Lee et al., 2001 ; Seuwen and Pouyssegur, 1990 ; Zachary et al., 1987).

I.3.d. Le récepteur des androgènes

Les androgènes régulent donc la croissance, le développement et la fonction de la glande prostatique. Ils agissent sur les cellules épithéliales prostatiques en se fixant au récepteur des androgènes (AR). AR est un membre de la superfamille des récepteurs nucléaires comprenant entre autre les récepteurs des stéroïdes, des rétinoïdes, de la vitamine D3 et des hormones thyroïdes (Mozer et al., 2009). Il possède 4 différents domaines fonctionnels: un domaine de fixation du ligand, un domaine de liaison à l'ADN, une région charnière et un domaine de transactivation (figure 6).

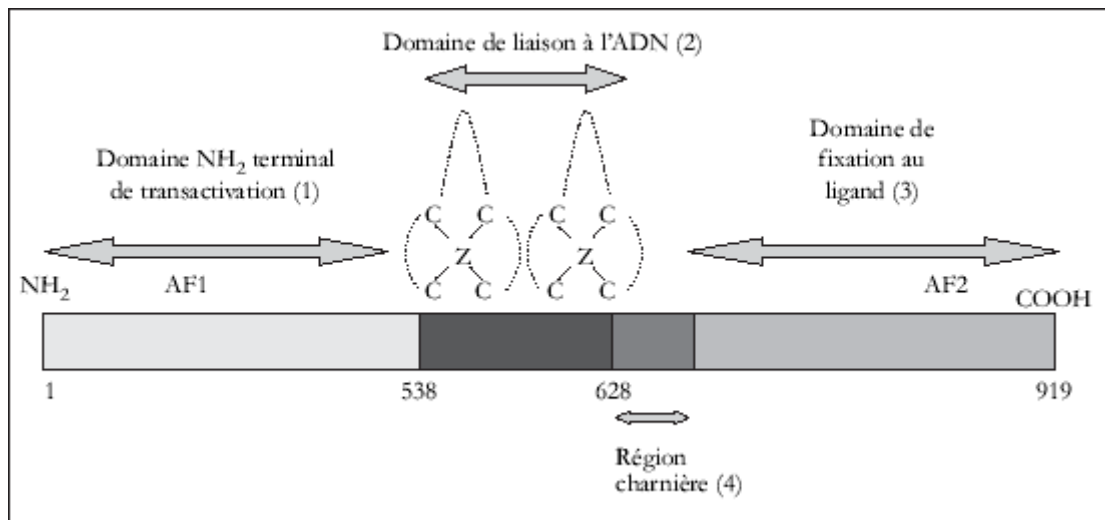


Figure 6 : Organisation du récepteur aux androgènes.

La protéine est constituée de 919 acides aminés et divisée en quatre domaines fonctionnels : un domaine NH₂ terminal de transactivation (1), un domaine de liaison à l'ADN (DBD) (2), une région charnière (4) et un domaine de fixation au ligand (LBD) (3). AF1 et AF2 sont deux régions activatrices situées respectivement dans le domaine NH₂ terminal et dans le domaine de fixation au ligand (d'après (Zhou et al., 1994)).

En l'absence de ligand, AR est extrait des cellules sous la forme d'hétérocomplexes de haut poids moléculaire (250-300kDa). De nombreuses protéines constituant ces hétérocomplexes ont été identifiées : ce sont des protéines chaperonnes ou protéines de choc thermique, telles que Hsp70, Hsp90, Hsp40, Hip, Hop, ou encore p23. Ces complexes permettent de maintenir AR dans une conformation inactive mais avec une haute affinité pour le ligand. Hsp40 est d'ailleurs indispensable à la liaison AR-ligand (Fan et al., 2005; Kung and Evans, 2009). Au contraire, Hsp70 fonctionne comme un régulateur négatif de l'activité transcriptionnelle d'AR (Terada, 2005). Hsp90 joue un rôle dans la conformation d'AR dans le cytoplasme, mais aussi dans la translocation nucléaire d'AR en démasquant le NLS (signal de localisation nucléaire) et les sites de dimérisation. Enfin, après liaison du ligand, elle confère au récepteur une conformation qui le rend apte à la liaison de l'ADN (Heemers and Tindall, 2007; Prescott and Coetzee, 2006).

La fixation du ligand entraîne un changement de conformation d'AR, qui permet une interaction entre ses parties amino-terminale et carboxy-terminale. Lors de la fixation du ligand, une grande partie des protéines formant le complexe d'AR se dissocie (Prescott and Coetzee, 2006). De nombreux auteurs ont montré que la fixation du ligand s'accompagne

d'une hyperphosphorylation d'AR (Gioeli et al., 2002 ; Kuiper and Brinkmann, 1995 ; Wong et al., 2004). Le rôle de la phosphorylation de chaque résidu dans l'activation d'AR n'est pas totalement défini. Globalement, la phosphorylation induite par le ligand permettrait à AR de transloquer dans le noyau et d'activer la transcription (Bruggenwirth et al., 1997; Jenster et al., 1994).

Comme tous les récepteurs nucléaires, AR possède une séquence signal de localisation nucléaire (NLS) qui est démasquée lors de la liaison du ligand. Le NLS d'AR est situé dans le domaine carboxyterminal du DBD ainsi que dans la région charnière (Zhou et al., 1994). AR interagit alors avec de nombreuses protéines qui vont moduler son activité en agissant sur les différentes étapes allant de l'induction du récepteur par son ligand jusqu'à son activité transcriptionnelle sur ses gènes cibles. Ils peuvent ainsi moduler positivement (coactivateurs) ou négativement (corépresseurs) le taux de transcription des gènes cibles du récepteur (Heemers and Tindall, 2007; Heinlein and Chang, 2002).

Dans le noyau, AR se lie à l'ADN sur de courtes séquences mises en évidence principalement dans les régions promotrices de ses gènes cibles. La séquence consensus de l'élément de réponse aux androgènes (ARE) dit « classique » est constituée de deux répétitions inversées de la séquence 5'-AGAACA-3' (Cato et al., 1987 ; Ham et al., 1988). Les ARE identifiés dans les promoteurs des gènes cibles naturels d'AR diffèrent parfois considérablement de cette séquence consensus. Ces séquences ARE peuvent être répétées un grand nombre de fois dans les promoteurs des gènes cibles et, peuvent être très proches du site d'initiation de la transcription ou bien dans des enhancers qui se trouvent parfois plusieurs kilobases en amont du site d'initiation de la transcription (Gelman, 2002).

De nombreux gènes ont été mis en évidence comme régulés par les androgènes. Les gènes identifiés sont de nature variée, impliqués dans la survie, la croissance, la division, le métabolisme, la différenciation, la signalisation cellulaire et l'angiogenèse (D'Amico et al., 2001 ; D'Amico et al., 1998 ; Lamont and Tindall, 2010 ; Lin et al., 2005; Nantermet et al., 2004). Le gène cible le plus connu est l'Antigène Spécifique de la Prostate (PSA) (Cleutjens et al., 1996 ; Schuur et al., 1996). Le PSA, ou kallikréine-3 est fortement exprimé dans les cellules épithéliales prostatiques, et très faiblement exprimé voire absent dans les autres tissus. Il est normalement indétectable dans le sang. Le PSA fait partie d'une famille de gènes, les kallikréines, qui comprennent une dizaine de gènes localisés sur le chromosome 19 et codant pour des sérines protéases. Plusieurs de ces gènes sont fortement exprimés dans la

prostate. La détection du PSA dans le sang traduit un dysfonctionnement de la prostate, comme une HBP, une prostatite, ou un cancer. Le PSA est un marqueur utilisé en routine chez les malades atteints du cancer de la prostate pour évaluer le grade tumoral, la réponse au traitement, le pronostic et la progression tumorale. En effet, la production de PSA chez la plupart des patients est initialement strictement dépendante des androgènes et subit un déclin très marqué suite à la castration chimique ou chirurgicale. Cependant, sa fiabilité en tant que marqueur prédictif est très contestée, et la recherche de nouveaux marqueurs prédictifs est un axe de recherche important pour les cancers de la prostate.

I.4. Le cancer de la prostate

L'adénocarcinome prostatique est la première cause de mortalité par cancer chez les hommes de plus de cinquante ans. La voie androgénique joue un rôle central dans cette pathologie, et la surproduction du PSA est le critère de diagnostic principal. Cependant les mutations d'AR dans les tumeurs prostatiques primaires sont peu nombreuses (Gottlieb et al., 2004). Il semblerait qu'elles apparaissent préférentiellement au stade métastatique de la maladie (Avila et al., 2001 ; Lamb et al., 2001). Ces mutations provoquent un gain de fonction d'AR qui aboutissent entre particulier à l'activation constitutive de la prolifération des cellules cancéreuses (Gottlieb et al., 2004 ; Rajender et al., 2007).

I.4a Origine

Le carcinome prostatique a été initialement décrit comme se développant à partir des cellules épithéliales des glandes dites principales, situées dans la zone centrale de la prostate. En effet, on note un fort avantage prolifératif ainsi qu'un déficit d'apoptose dans ce compartiment cellulaire. De plus, les carcinomes prostatiques sont androgéno-dépendants, tout comme les cellules épithéliales. Les carcinomes prostatiques peuvent se développer consécutivement à une PIN, et donc prendre leur origine dans ce compartiment cellulaire. Cependant, l'initiation du CaP pourrait avoir lieu plus en amont, dans les cellules souches situées dans la membrane basale de la glande prostatique (Lawson et al., 2010). Il existe en effet une forte surexpression du PSCA (Prostate stem cell antigen), exprimé par les cellules basales, dans 88% des carcinomes prostatiques (Reiter et al., 1998). Il pourrait aussi être initié au niveau des cellules souches épithéliales luminales (Wang et al., 2009c). Les cellules souches cancéreuses ne sont pas encore parfaitement décrites et caractérisées (Xin et al.,

2005). Néanmoins, les cellules souches prostatiques du compartiment basal n'expriment pas AR, ce qui les rend insensibles aux traitements hormonaux, et elles expriment de forts niveaux de la protéine anti-apoptotique Bcl2, ce qui les rend peu sensibles aux autres thérapies (Salm et al., 2005). Ceci pourrait expliquer le manque d'efficacité des traitements actuels dans un certain nombre de cas, et incite au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques.

I.4b Epidémiologie

L'incidence du CaP est en constante augmentation en France depuis le début des années 1990 [Institut National du Cancer. Dynamique d'évolution des taux de mortalité des principaux cancers en France. <http://www.e-cancer.fr/toutes-les-actualites/81/4703-la-baisse-de-la-mortalite-par-cancers-sacelere-en-france>]. Aux Etats-Unis, il a été constaté un « pic » d'incidence au cours de la même période, suivi d'une augmentation de l'incidence jusqu'à nos jours (Jemal et al., 2010). L'hypothèse d'un lien entre l'augmentation de l'incidence et la pratique croissante du dosage du PSA a été évoquée, bien qu'elle ne puisse être clairement confirmée. L'augmentation de la prévalence du cancer, elle-même dépendante de facteurs environnementaux, est aussi une hypothèse possible (DeLongchamps et al., 2006).

Le taux de mortalité, après avoir culminé au début des années 1990, a ensuite diminué. Selon les projections, le taux est estimé à 11,2 décès pour 100 000 hommes en 2010. Cette diminution concerne toutes les tranches d'âge sur la période décennale récente, en particulier entre 60 et 84 ans. La baisse est de -16 % chez les 55-59 ans et -11 % chez les 85 ans et plus [Institut National du Cancer. Dynamique d'évolution des taux de mortalité des principaux cancers en France. <http://www.e-cancer.fr/toutes-les-actualites/81/4703-la-baisse-de-la-mortalite-par-cancers-sacelere-en-france>]. La baisse du taux de mortalité observée, alors que le taux d'incidence a augmenté fortement, est principalement attribuée à la fréquence croissante des stades limités au diagnostic, beaucoup mieux curables que les stades avancés. L'évolution concomitante de l'accès aux soins et aux progrès thérapeutiques y a aussi largement contribué.

La prévalence du CaP augmente avec l'âge. Elle a pu être évaluée grâce aux études autopsiques réalisées en Europe (Sanchez-Chapado et al., 2003; Soos et al., 2005) et aux Etats-Unis (Haas et al., 2007; Sakr et al., 1994). Alors que l'incidence observée est quasiment nulle à 50 ans, la prévalence réelle est d'environ 10%. Après 60 ans, le nombre de cancers détectés reste inférieur de trois fois au nombre réel de cancers présents dans la population.

Ces données épidémiologiques ont permis de comprendre que la majorité des cancers étaient latents, encore appelés indolents ou cliniquement non significatifs. Ces cancers, de faible potentiel évolutif, sont considérés comme inoffensifs. Caractérisés histologiquement par leur faible volume (tumeur index <0,5 cc) et leur faible grade (score de Gleason <3+3), ils sont néanmoins difficiles à caractériser sans une analyse anatomopathologique exhaustive de la prostate. La « sur détection » de ces cancers par le dépistage pose donc le problème de la prise en charge de ces patients, et du risque de « sur traitement ».

I.4c Diagnostic

Dépistage

Depuis plusieurs années, l'association française d'urologie, de même que les sociétés savantes européennes et américaines, recommandent d'effectuer un dépistage individuel du cancer de la prostate (CaP), avec un rythme laissé à la discrétion du praticien [Recommandations CCAFU 2007-Cancer de la prostate. Étude scientifique sur l'état des lieux en France sur le dépistage individuel et le traitement initial du cancer de la prostate pour l'OPEPS: http://www.urofrance.org/fileadmin/user_upload/afu-info/2009-05-n38/OPEPSetude-cancer-prostate.pdf]. Ce dépistage s'adresse aux hommes âgés de 50 à 75 ans, c'est à dire ceux ayant une espérance de vie de plus de 10 ans. Il est recommandé de débiter ce dépistage dès l'âge de 45 ans en cas de risque familial (antécédents familiaux de CaP) ou ethnique (populations d'origine africaine ou antillaise). Le dépistage repose sur 2 outils, le toucher rectal (TR) et le dosage du PSA total.

Le dépistage du CaP fait l'objet de nombreuses controverses, qui concernent principalement trois points: son bénéfice en terme de survie, le risque de « sur détection » et donc de « sur traitement », et enfin sur le cout engendré par la prise en charge des patients.

Sur détection et risque de sur traitement

Le dépistage individuel, tel qu'il est pratiqué actuellement, a naturellement augmenté la proportion de révélation de tumeurs dites non significatives. Ainsi, une étude américaine a estimé en 2002 que 29 % des cancers chez les hommes de race blanche et 44 % des cancers chez les hommes de race noire étaient des cancers « sur-diagnostiqués » (Etzioni et al., 2002). De même, d'après les données du groupe ECRPC de Rotterdam, le taux de « sur-diagnostic » du CaP serait de 50 % (Draisma et al., 2003). Enfin, une étude de détection biopsique sur prostate autopsique a évalué le taux de détection des cancers significatifs et non significatifs par rapport à la prévalence réelle de ces 2 formes histologiques (Haas et al., 2007). En pratiquant « ex-vivo » des protocoles standards de biopsies prostatiques (12 prélèvements), les auteurs ont constaté que 80% des cancers significatifs étaient détectés au prix d'une détection de 33% des cancers non significatifs.

La « sur détection » de cancers latents, dits « non significatifs », entraine naturellement un risque de « sur traitement », constaté par l'étude ECRPC (Draisma et al., 2003). Ce « sur traitement » est principalement lié aux difficultés de caractérisation du cancer, à la fois par le taux de PSA et les biopsies de la prostate. Celles-ci, de par leur caractère randomisé et peu reproductible (Mozer et al., 2009), sous-estiment à la fois le score de Gleason et le volume tumoral, conduisant à une sous-stadification du cancer. Même en l'absence de critères biopsiques péjoratifs, tels qu'un score de Gleason ou un pourcentage d'envahissement biopsique élevé, le risque de cancer cliniquement significatif a été rapporté à plus de 30 % (Boccon-Gibod et al., 2006). L'étude Prostate Cancer Prevention Trial (PCPT) a en outre suggéré qu'un PSA sérique inférieur à 4 ng/mL ne permettait pas non plus de diminuer ce risque (Lucia et al., 2008).

Biopsies de la prostate

Depuis l'introduction des biopsies systématisées pour le diagnostic du cancer de la prostate (Hodge et al., 1989), de nombreuses études ont été réalisées pour établir le schéma de biopsies idéal (nombre et sites des prélèvements) mais aucun consensus vrai n'a été obtenu. Cela est

dû, d'une part, à la grande hétérogénéité des populations et des protocoles étudiés et, d'autre part, à la variabilité anatomique interindividuelle des patients et la variabilité intra et inter observateur dans le placement (positionnement) des biopsies. Par ailleurs, les sensibilités et spécificités des différents schémas proposés pour le diagnostic du cancer de la prostate ne peuvent être établies en raison de l'absence d'un test de référence pouvant remplacer l'analyse histologique de la prostate incluse dans sa totalité. Malgré cette absence de consensus, le schéma standard accepté et largement utilisé est passé de six à dix à 12 biopsies postérieures réalisées par voie transrectale échoguidée.



Vue sagittale du bassin montrant la position intrarectale (Re) de la sonde d'échographie munie de son guide de ponction dans lequel est placée l'aiguille 18 Gauge. La prostate (P) est visualisée et les biopsies sont placées précisément soit selon un schéma systématisé, soit dirigées sur une anomalie. Ve : vessie.

Figure 7: coupe sagittale schématique du bassin montrant la position de la sonde d'échographie.

I.4d Bilan d'extension et facteurs pronostiques

Extension loco-régionale

L'IRM (imagerie par résonance magnétique) avec antenne endo-rectale donne de bonnes images de l'anatomie prostatique dans les différents plans de l'espace. La détection d'une extension extra-capsulaire de plus de 1 mm (stade pT3 établi) est possible avec une sensibilité

de 70% et une spécificité de 95% (Cornud et al., 2002 ; Jager et al., 1996). Les signes d'envahissement des vésicules séminales ont une spécificité de pratiquement 100% (Cornud et al., 2002 ; Jager et al., 1996).

Extension à distance

Les métastases osseuses sont recherchées par la scintigraphie osseuse qui est l'examen de référence. La scintigraphie n'est pas recommandée en cas de PSA < à 10 ng/mL, car le taux de métastases est <1% (Oesterling, 1993). Avec un seuil de 20 ng/mL, le taux de métastases est <2%. La recherche de métastases osseuses ne devrait être idéalement réalisée qu'avec des valeurs de PSA >20 ng/mL. En pratique néanmoins, elle est recommandée en cas de PSA >10 ng/mL ou lorsqu'il existe un cancer de score de Gleason >3+3 sur les biopsies.

Facteurs pronostiques

En cas de cancer localisé, la stratification du risque évolutif, établi sur la valeur du PSA, le score de Gleason biopsique et le stade clinique (tableau 1), permet d'estimer le risque de récurrence biologique et le taux de mortalité spécifique après traitement curatif (D'Amico et al., 1998).

Les analyses statistiques de survie sans récurrence après prostatectomie radicale ont permis de distinguer trois groupes de patients en préopératoire (groupes à risque de D'Amico, figure 8) (D'Amico et al., 1998): les patients à faible risque, risque intermédiaire, et haut risque de récurrence après prostatectomie radicale.

	PSA (ng/mL)	Stade clinique	Score de Gleason biopsique
Faible risque	≤10	<T2b	<7
Risque intermédiaire	[11-20]	T2b	7
Haut risque	>20	≥T2c	≥8

La présence d'un seul critère de chaque groupe est suffisante

Figure 8 : classification des groupes à risque de D'Amico

D'autres facteurs pronostiques préopératoires doivent être considérés, en plus des critères de D'Amico. Ces facteurs sont la vélocité du PSA et le TD PSA (temps de doublement du PSA) (Lin et al., 2005), le pourcentage de biopsies positives (D'Amico et al., 2001), et le pourcentage de tissu biopsique envahi (Ravery et al., 2000). En effet, les patients présentant un PSA DT < 6 mois, une vélocité du PSA > 2 ng/mL/an, plus de 50% de biopsies positives, ou plus de 30% de tissu biopsique envahi, sont considérés comme à haut risque de récurrence après prostatectomie radicale.

Après prostatectomie radicale, l'évaluation du pronostic peut être réalisée de manière plus fiable grâce à l'analyse anatomopathologique de la pièce opératoire, et l'établissement du stade pT ainsi que du score de Gleason final.

I.4e Traitement des cancers localisés

-Prostatectomie totale

Une sélection rigoureuse des patients est indispensable avant de poser l'indication chirurgicale. Cette sélection repose en premier lieu sur l'âge, la présence de co-morbidités, et donc de l'espérance de vie des patients. Le cancer de la prostate présente une évolution lente, et un traitement à visée curative n'est susceptible d'améliorer la survie qu'en cas d'espérance de vie de plus de 10 ans au moment du diagnostic. Sur le plan carcinologique, ce traitement curatif pose actuellement un problème de « sur traitement » déjà évoqué précédemment. En effet, en cas de cancer à risque faible de D'Amico, jusqu'à 40% des patients seraient porteurs d'un cancer latent, dit non significatif. Or, les outils actuels de caractérisation ne permettent pas de manière fiable de sélectionner ces patients. De nouveaux marqueurs pronostiques sont donc nécessaires pour améliorer la caractérisation du CaP et adapter la prise en charge.

-Radiothérapie externe conformationnelle

La radiothérapie est une des options fréquemment retenues dans le traitement des tumeurs de risque intermédiaire. Elle est soit exclusive avec escalade de dose, soit associée à une hormonothérapie courte.

-Curiethérapie

Ce traitement moins invasif et morbide est possible sur le plan carcinologique en cas de cancer de la prostate à faible risque, de stade $\leq$ à T2b, de score de Gleason <7 et avec une valeur de PSA ≤ 10 ng/mL. Les études de D'AMICO montrent un risque de récurrence plus important après curiethérapie des cancers de risque intermédiaire que celui observé après prostatectomie totale ou radiothérapie externe (D'Amico et al., 1998). Pour certains auteurs, le score de Gleason 3+4 ou un PSA entre 10 et 15 ne constituent une contre-indication formelle.

-Surveillance active

La notion de surveillance active (« active monitoring ») est récente. Elle s'adresse aux patients suspectés d'avoir un cancer « non significatif ». Un programme de surveillance active a deux objectifs :

- proposer un traitement définitif pour les cancers localisés à faible risque initial mais enclins à progresser.
- réduire le risque des effets secondaires et des complications des traitements pour des cancers non susceptibles de progresser.

Une surveillance active peut être proposée pour des tumeurs sans grade 4 majoritaire (Gleason 7=3+4), T1c ou T2a avec un PSA <10 ng/mL, avec moins de 3 biopsies positives (sur au moins 6 réalisées) et moins de 50% de tumeur sur chaque biopsie envahie (Wong et al., 2006). Le traitement curatif est proposé en cas d'élévation : de la valeur du PSA > 10 ng/mL ou d'un temps de doublement du PSA <3 ans, ou d'une évolution locale $>T2a$, ou de la présence de plus de 2 biopsies positives au contrôle histologique à distance ou de grade 4 majoritaire. Néanmoins, comme cela a été précédemment précisé, de nouveaux marqueurs pronostiques de risque de progression sont nécessaires pour mieux sélectionner les patients vers cette prise en charge.

-Traitements focaux

Différents protocoles de traitement focal, le plus souvent par hémiablation, sont en cours d'évaluation par des études de phase II et III. Plusieurs types d'outils ablatifs sont testés, tels

que la photothérapie dynamique, les micro-ondes (HIFU), la cryothérapie ou la curiethérapie focale. Ces traitements expérimentaux ne sont pas actuellement recommandés en pratique courante.

I.4f Suivi après traitement curatif

Le suivi repose principalement sur la surveillance du taux sérique du PSA. La récurrence biologique est définie par la persistance d'un PSA détectable après PR ou la réapparition du PSA après une période plus ou moins longue d'indétectabilité (Partin and Oesterling, 1994). Il n'existe pas de consensus concernant la définition de la récurrence biologique après chirurgie (Cookson et al., 2007). L'EAU (European Association of Urology) recommande de considérer le seuil de 0,2 ng/mL, confirmé par un deuxième prélèvement, comme récurrence biologique (Aus et al., 2005). D'après Lange et al (Lange et al., 1989), la récurrence biologique précède la récurrence clinique de 6 à 48 mois.

I.4g Traitement des CaP métastatiques

Le cancer de la prostate métastase préférentiellement dans les ganglions lymphatiques et dans l'os. Le traitement repose sur le blocage androgénique, obtenu en inhibant la sécrétion de testostérone testiculaire (castration chirurgicale ou chimique) ou en inhibant les récepteurs aux androgènes.

Les thérapies hormonales

Dès 1941, Charles Huggins a montré que la castration par pulpectomie bilatérale induisait une régression du cancer de la prostate, ce qui lui a valu le prix Nobel de médecine (Gottlieb et al., 2004). Depuis cette date, un blocage androgénique est proposé chez les patients ayant un cancer de la prostate métastatique, dans le cadre d'un traitement unique ou combiné.

- ***La pulpectomie***

Considérée comme le traitement castrateur de référence, la pulpectomie bilatérale permet d'obtenir une castration irréversible, avec une testostéronémie <15 ng/dL en moins de 12 heures. Néanmoins, le seuil de castration communément admis est plus élevé, à 50 ng/dL.

- ***Les agonistes de la LHRH***

Les agonistes de la LHRH (busereline, gosereline, leuprorelina, triptoreline) (Labrie et al., 1993) sont les principaux traitements castrateurs médicamenteux et semblent avoir une efficacité équivalente quelle que soit leur formulation. Ils sont délivrés par injections SC ou IM à un rythme de 3 ou 6 mois. Ils stimulent initialement l'axe hypothalamo-hypophysaire, entraînant une élévation de la testostérone plasmatique pendant environ une semaine (« flare up »). Le seuil de castration est atteint en 2 à 4 semaines. Leur efficacité est similaire à la pulpectomie. En cas de maladie avancée, le “flare-up” peut se traduire cliniquement par une augmentation des douleurs osseuses, une rétention aigue d'urine, une insuffisance rénale obstructive, une compression médullaire ou un événement thrombo-embolique. Pour éviter ces complications, un anti-androgène périphérique doit être débuté le même jour et poursuivi pendant 2 semaines.

- ***Les antagonistes de la LHRH***

Les antagonistes de la LHRH sont des inhibiteurs compétitifs des récepteurs de la LHRH. Leur effet est rapide sans phénomène de « flare up ». Le Degarelix est le seul antagoniste de la LHRH commercialisé. La dose recommandée est de 240 mg le premier mois, suivi de 80 mg par mois en injections SC. Le seuil de castration est atteint au bout de 3 jours chez plus de 95% des patients. Des douleurs légères à modérées au point d'injection ont été rapportées chez 40% des patients, principalement après la première injection. Une étude a suggéré une meilleure survie sans progression sous Degarelix par rapport à la leuproréline après un suivi médian de 27 mois (Pinski et al., 1992).

- ***Les anti-androgènes***

Les anti-androgènes inhibent le récepteur aux androgènes dans le noyau des cellules prostatiques. Il en existe 2 types :

-Les anti-androgènes stéroïdiens, qui en plus de leur action périphérique inhibent l'axe hypothalamo-hypophysaire, entraînant une diminution de la testostéronémie (Schroder, 1993).

-Les anti-androgènes non stéroïdiens, qui ont une action uniquement périphérique.

Parmi les anti-androgènes stéroïdiens, l'acétate de cyprotérone est le plus utilisé. Ses principaux effets secondaires sont une diminution de la libido et une dysfonction érectile. Il est aussi potentiellement cardio-toxique et hépato-toxique. En raison de l'absence de preuve de non infériorité par rapport aux agonistes de la LHRH, il n'est pas recommandé en monothérapie.

Parmi les anti-androgènes non stéroïdiens, le bicalutamide est le plus utilisé (Kolvenbag et al., 1998). Ses effets secondaires sexuels et osseux ont été suggérés moins importants que les anti-androgènes stéroïdiens ou que les agonistes de la LHRH. Ses principaux effets secondaires sont la gynécomastie et les bouffées de chaleur. En traitement primaire, et utilisé en monothérapie à la dose de 150 mg par jour, le Bicalutamide a une efficacité équivalente à la castration chimique ou chirurgicale chez les patients ayant un cancer localement avancé M0. En cas de stade M1, la castration permet d'obtenir une meilleure survie globale. Le Bicalutamide en monothérapie doit donc être réservé aux patients M1 sélectionnés et informés, ayant un PSA peu élevé. En traitement adjuvant à la radiothérapie pour cancer localement avancé, il n'existe pas un niveau de preuve suffisant pour recommander son utilisation en monothérapie.

- **Les œstrogènes**

Le Diethylstilboesterol (DES) est l'œstrogène le plus utilisé chez les patients ayant un cancer de la prostate. Son efficacité est similaire à la pulpectomie bilatérale (niveau de preuve 1a). Néanmoins, son utilisation est limitée en raison de sa cardio-toxicité, même à une dose faible de 1 mg / jour.

I.4h Résistance à la castration

Quel que soit le traitement hormonal utilisé, l'évolution se fait inéluctablement vers le stade de résistance à la castration au bout d'une durée médiane de 18 à 20 mois, puis au décès du patient après une durée médiane d'un an.

Les mécanismes de résistance à la suppression androgénique peuvent être subdivisés en deux, ceux dépendants d'AR et ceux indépendants de la signalisation androgénique (Boehm et al., 1997; Feldman and Feldman, 2001). La figure 6 résume les différents mécanismes d'émergence de résistance à la castration.

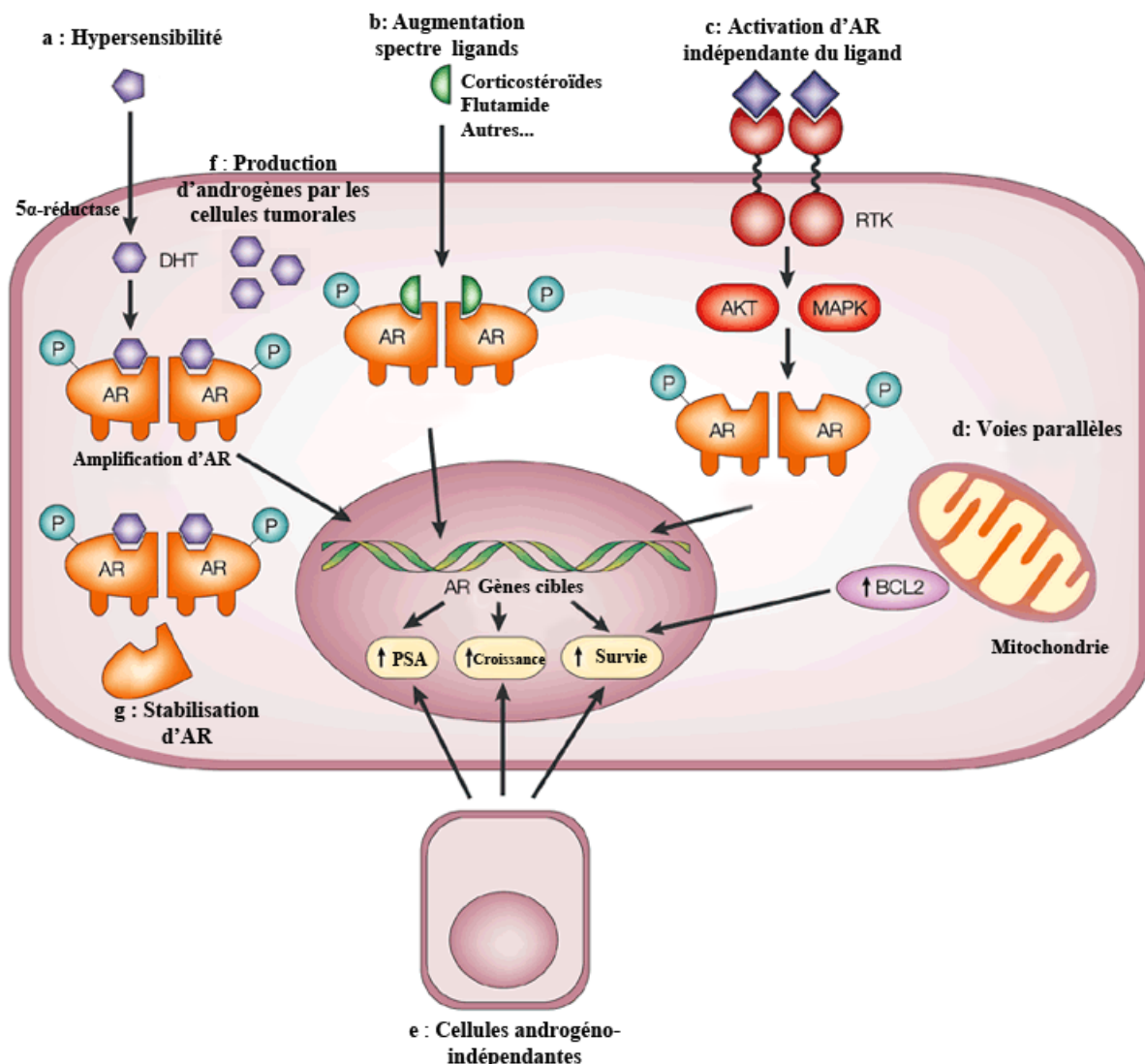


Figure 9 : Les mécanismes d'émergence de résistance à la castration.

a. La voie d'hypersensibilité d'AR : AR est surexprimé ou a une sensibilité accrue pour les androgènes, ce qui permet de compenser les faibles taux d'androgènes circulant. Par ailleurs, une

augmentation de l'activité 5 α -réductase peut permettre une plus forte activation d'AR par les androgènes. **b.** La liaison par AR d'autres ligands (stéroïdes, glucocorticoïdes), ou son activation par des ligands normalement antagonistes. **c.** Une voie d'activation d'AR indépendamment du ligand peut passer par l'activation de récepteurs tyrosine kinases, et la phosphorylation d'AR par différentes voies. **d.** Des voies parallèles de survie cellulaire, indépendantes des androgènes, peuvent aussi être activées. **e.** Des cellules androgéno-indépendantes – toujours présentes dans la prostate et pouvant inclure des cellules progénitrices ou des cellules neuroendothéliales – peuvent aussi être sélectionnées par les thérapies anti-androgéniques et être à l'origine de l'échappement tumoral. **f.** Les cellules tumorales peuvent produire directement des androgènes. **g.** La stabilité d'AR peut être augmentée soit par phosphorylation, soit par des modifications des co-récepteurs d'AR. (adapté d'après (Feldman and Feldman, 2001))(Feldman and Feldman, 2001)(Feldman and Feldman, 2001)(Feldman and Feldman, 2001)(Feldman and Feldman, 2001)(Feldman et Feldman 2001)

L'expression d'AR a été identifiée dans la grande majorité des carcinomes prostatiques, y compris ceux qui ne répondent plus aux anti-androgènes, ainsi que dans leurs métastases. Il reste actif et participe à la progression tumorale par différents mécanismes (Chi et al., 2009). Des nombreuses études confirment l'importance de la signalisation androgénique dans les cancers de la prostate résistant à la castration (CRCaP), en effet l'inhibition d'AR dans des modèles de tumeurs résistantes à la castration, diminue fortement la croissance tumorale (Compagno et al., 2007 ; Snoek et al., 2009). Des études ont démontré une augmentation de l'expression d'AR dans des xénogreffes hormono-résistantes ainsi que dans des prélèvements de tumeurs prostatiques de patients atteints de CRCaP (Antonarakis et al., 2009 ; Linja et al., 2001 ; Mohler et al., 2004). *In vitro* et *in vivo*, la transformation de cellules prostatiques hormono-sensibles en cellules résistantes à la castration peut être induite par une augmentation de l'expression d'AR (Antonarakis et al., 2009). Des antagonistes d'AR, le bicalutamide, le flutamide, l'acétate de cyprotérone, peuvent devenir agonistes ainsi que d'autres ligands tel que les œstrogènes ou la progestérone (Antonarakis et al., 2009 ; Culig et al., 1997 ; Culig et al., 1999). Des mutations ponctuelles sont retrouvées dans les carcinomes prostatiques, et conduisent également à l'activation d'AR par des ligands non conventionnels (Culig et al., 1997 ; McDonald et al., 2000 ; Zhao et al., 1999). Il a également été démontré que, sous la pression des traitements hormonaux, les carcinomes prostatiques pouvaient surexprimer les enzymes responsables de la synthèse des androgènes, et ainsi produire des androgènes de manière intracrine, ce qui serait un autre mécanisme d'échappement (Locke et al., 2008 ; Mostaghel et al., 2009 ; Stanbrough et al., 2006). Enfin, AR peut être activé indépendamment de ses ligands par de nombreuses molécules. Cette activation passe par des modifications post-traductionnelles d'AR induites par différentes molécules comme des facteurs de croissance ou des cytokines (Cato et al., 1987 ; Gupta et al., 1996 ; Hobisch et al., 1998 ; Leader et al., 2006 ; Xu et al., 2009).

En ce qui concerne les mécanismes indépendants d'AR, on peut également noter qu'à un stade avancé, les cellules tumorales prostatiques expriment généralement de grandes quantités de protéines pro-prolifératives et anti-apoptotiques qui leur permettent de mieux résister aux différentes thérapies utilisées, comme la protéine anti-apoptotique Bcl2 (Colombel et al., 1993 ; Gleave et al., 1999). Parmi les cellules basales androgéno-indépendantes, il existe un petit nombre de cellules souches capables de résister à la suppression androgénique. Ces cellules peuvent être sélectionnées dans le carcinome prostatique résistant et être à l'origine de la récurrence des tumeurs et de l'échec thérapeutique, ainsi que d'une augmentation de la différenciation neuroendocrine. Chez les patients, la différenciation neuroendocrine est accélérée par les traitements anti-androgéniques, et certains modèles cellulaires épithéliaux de tumeur prostatique sont capables de se différencier en cellules neuroendocrines en condition de suppression androgénique (Nelson et al., 2007 ; Yuan et al., 2007). Par ailleurs, les cellules neuroendocrines peuvent sécréter des neuropeptides, tels que le gastrin-releasing peptide, la bombésine ou la neurotensine, qui seraient capables d'activer AR indépendamment de son ligand (Kung and Evans, 2009 ; Lee et al., 2001).

En pratique clinique, le CRCaP est défini par une testostéronémie totale inférieure à 0,5 ng/mL (ou 1,7 nmol/L) et trois augmentations successives, à une semaine d'intervalle minimum, du PSA (Mottet et al., 2011). À ce jour, une chimiothérapie à base de docetaxel à la dose de 75 mg/m² toutes les trois semaines associée à 10 mg/j de Prednisone, une poursuite de la suppression androgénique et les soins de support constitue le traitement standard (Salomon et al., 2010). Ce schéma thérapeutique va être rapidement modifié grâce à l'avènement de nouvelles thérapeutiques qui ont prouvé leur efficacité en gain de survie globale par rapport à un placebo (soins de confort incluant la poursuite de la suppression androgénique). Parmi celles-ci, on distingue plus particulièrement de nouvelles hormonothérapies (abiratérone, TAK-700, MDV 3100).

L'acétate d'abiratérone (Zytiga®) est un inhibiteur sélectif de la biosynthèse des androgènes, bloquant le cytochrome P450 c17 (CYP17), une enzyme clé dans la synthèse de la testostérone. Ainsi, la synthèse des androgènes par la glande surrénale, les testicules et les cellules tumorales est inhibée (Potter et al., 1995), de même que la synthèse intra-tumorale. La dose est de 1 g/j (4 comprimés de 250 mg). Dans l'étude pivot (de Bono et al., 2011), 1195

patients ont été randomisés pour recevoir ce traitement associé à la prednisone (797 patients) ou le placebo associé à la prednisone (398 patients) en double insu, après échec d'un traitement par docetaxel. Le critère de jugement principal était l'amélioration de la survie globale. Après un suivi médian de 12,8 mois, la survie globale était en faveur de l'abiratéron (14,8 mois versus 10,9 mois ; HR=0,65 ; IC 95%: 0,54 à 0,77 ; $p<0,001$). Par ailleurs, tous les critères de jugement secondaires (la progression du PSA, la survie sans progression et la baisse du PSA) étaient en faveur de l'abiratéron. Les effets secondaires les plus fréquents étaient la douleur dorsale (30%), les nausées (30%), la constipation (26%), les douleurs osseuses (25%) et les arthralgies (25%). L'abiratéron a obtenu récemment l'autorisation de mise sur le marché en France. Un autre médicament ayant un mécanisme d'action identique, le TAK-700 (Orteronel), est en cours d'évaluation par un essai de phase III (Sonpavde et al., 2011). Le MDV 3100 est un nouvel inhibiteur de la voie de signalisation du RA. C'est un inhibiteur compétitif du RA qui empêche partiellement sa translocation nucléaire et, a priori, complètement sa liaison à l'ADN. Dans l'étude de phase III (étude AFFIRM) (Scher et al., 2012), 1199 patients ont été randomisés pour recevoir 160 mg/j de MDV 3100 contre un placebo avant ou après chimiothérapie. À l'analyse intermédiaire après 520 décès, la survie globale était significativement meilleure dans le bras traité avec 18,4 mois versus 13,6 (HR=0,63 ; $p<0,0001$) conférant ainsi un gain de survie médian de 4,8 mois soit une réduction de mortalité de 37%. Le MDV n'a pas encore obtenu l'AMM. Il sera disponible en autorisation temporaire d'utilisation (ATU) dans les prochains mois. Les effets secondaires les plus fréquents étaient la fatigue (33%), les nausées (33%), l'anorexie (25%) la constipation (24%) et les douleurs dorsales (24%) sans différence significative avec le bras placebo.

I.5. Carcinome prostatique et angiogenèse

Comme nous l'avons vu, le développement de la prostate est sous la dépendance des androgènes. Leur suppression provoque une involution de la glande prostatique, *via* le rôle de ces hormones sur la régulation de gènes impliqués dans le cycle cellulaire, la survie mais également la vascularisation de la prostate. L'involution prostatique observée chez le rat après castration est précédée d'une diminution importante de sa vascularisation liée à une diminution du VEGF (English et al., 1985 ; Hayward et al., 1992 ; Hodge et al., 1989 ; Labrie et al., 1985 ; Ravery et al., 2000). De plus, la masse prostatique est rétablie dès l'administration d'androgènes chez les animaux castrés suite à la reconstitution du réseau vasculaire induite par le VEGF sécrété par les cellules épithéliales (Burchardt et al., 2000 ;

Coffey et al., 1968 ; Huggins and Hodges, 1941 ; Isaacs, 1984c; Lucia et al., 2008).Ces observations démontrent une influence androgénique sur le réseau vasculaire prostatique en partie via la régulation du VEGF par AR par divers mécanismes.

Cette régulation est maintenue dans les carcinomes prostatiques. La castration ou l'inhibition d'AR (par ARN interférence par exemple) chez des souris portant des tumeurs prostatiques androgéno-dépendantes, diminue l'expression du VEGF par les cellules épithéliales. Cette inhibition conduit à une diminution de la vascularisation et donc participe à l'inhibition de la croissance tumorale (Compagno et al., 2007; Labrie et al., 1985 ; Mizokami et al., 2009). Chez les patients atteints d'un carcinome prostatique, les traitements hormono-suppresseurs induisent également une diminution de l'expression du VEGF observée dans les prélèvements tumoraux effectués avant et après traitement (Hayward et al., 1992 ; Zenzmaier et al., 2008). Dans les stades où les traitements anti-androgéniques n'ont plus d'effet sur la croissance tumorale, le VEGF est toujours fortement exprimé. Cependant, son expression est toujours régulée par AR (Compagno et al., 2007).

En plus de la régulation du VEGF par les androgènes, AR régule également des protéines anti-angiogéniques. En effet, l'expression de la maspine, du PEDF ainsi que de la thrombospondine-1 (TSP1) est augmentée dans la prostate ventrale de rat après castration ou après utilisation d'antagoniste des androgènes (Doll et al., 2003 ; Huggins and Hodges, 1941; Zhang et al., 1997). Dans les premiers stades du cancer de prostate, l'expression dans les tumeurs de la TSP1 serait faible voire absente (Cussenot et al., 1994 ; Li et al., 1999). Après une thérapie hormonale, on observe une réexpression de la TSP1 et une diminution de la densité vasculaire (Huggins and Hodges, 1941). Cependant dans les CRCaP, qui ne répondent pourtant plus à l'ablation androgénique, la TSP1 reste fortement exprimée bien que la densité vasculaire reste très élevée (Huggins and Hodges, 1941).

Dans les tumeurs humaines, il a été observé que la densité micro vasculaire (MVD) est plus élevée dans les prélèvements de carcinome prostatique que dans la prostate normale (Bigler et al., 1993). De nombreuses études ont tenté d'associer une valeur pronostique à l'angiogenèse dans le carcinome prostatique. Cependant des résultats contradictoires ont été obtenus suivant les études. Dans plusieurs études, la MVD a été corrélée à des facteurs pronostiques d'agressivité et de métastases, et également de survie des patients (Borre et al., 1998; Strohmeyer et al., 2000 ; Weidner et al., 1993). Sur d'autres études, aucune corrélation

particulière n'a été démontrée (Gettman et al., 1998 ; Gettman et al., 1999), et la MVD n'est pas étudiée en routine par les anatomopathologistes.

En dépit des résultats encourageant des essais cliniques de phase II, les essais de phase III n'ont pas montré de bénéfice de survie des inhibiteurs du VEGF. Le bevacizumab en combinaison avec le docetaxel et la prednisone, ou le sunitinib après docetaxel n'ont pas apporté de bénéfice en survie (Kelly et al., 2012 ; Sonpavde et al., 2010). D'autres inhibiteurs de l'angiogenèse sont en cours d'évaluation. Le "VEGF Trap", une protéine de fusion comportant les récepteurs pour les domaines extracellulaires du VEGF et la portion Fc de l'immunoglobuline humaine IgG1, inhibe toutes les isoformes du VEGF ainsi que le PlGF (placental growth factor). Cette molécule est en cours d'évaluation dans un essai de phase III. Le Dovitinib, qui est un inhibiteur de tyrosine kinase de la voie de signalisation du VEGF, PDGF et FGF, est en cours d'évaluation clinique (Udayakumar et al., 2003). Le lenalidomide, connu pour ses propriétés de modulateur de l'angiogenèse et de l'immunité, a été testé en combinaison avec le docétaxel dans une étude de phase III (essai MAINSAIL). Néanmoins, l'essai a été arrêté en raison d'effets secondaires excessifs et de l'absence de bénéfice. Enfin, le tasquinimod, un dérivé per os de la quinoline-3-carboxamide, régule positivement la thrombospondine. Cette molécule a fait la preuve d'un bénéfice en survie sans progression par rapport au placebo, avec un profil de toxicité acceptable (Pili et al., 2011). Une étude de phase III est actuellement en cours pour évaluer ce traitement chez les patients chimio-naïfs.

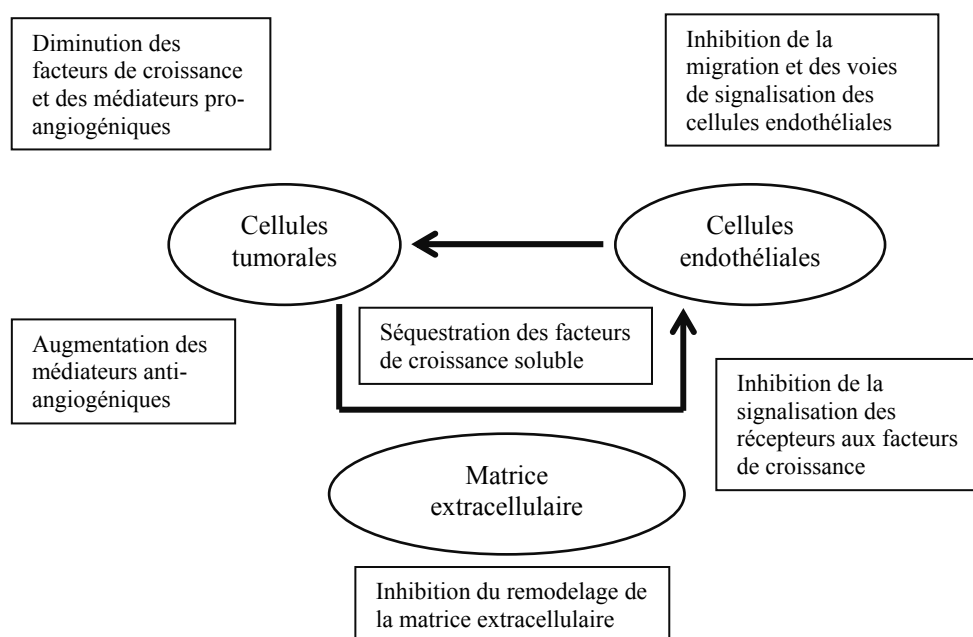


Figure 10 : Cibles potentielles pour l'inhibition de l'angiogenèse (d'après (Aragon-Ching and Dahut, 2009)).

L'inhibition de l'angiogenèse tumorale peut passer par la modulation de nombreuses cibles (Folkman et al., 2001). De nombreux inhibiteurs pharmacologiques de l'angiogenèse ont été développés et plusieurs sont utilisés en clinique. La plupart ciblent le VEGF ou ses voies de signalisation (récepteurs à activité tyrosine kinase), avec une spécificité plus ou moins large. Ces inhibiteurs visent à induire une forte hypoxie au sein de la tumeur, de façon à provoquer l'entrée en apoptose ou en nécrose des cellules tumorales par déficit d'oxygène et de nutriments. Les cellules endothéliales de l'hôte ciblées par ces traitements étant génétiquement stables, il était attendu que les inhibiteurs de l'angiogenèse n'induisent pas de mécanismes de résistance et qu'ils permettent de traiter aussi bien la tumeur primaire que ses métastases, et ce quel que soit le type de tumeur (Boehm et al., 1997). A l'heure actuelle, de nombreuses molécules ciblant l'angiogenèse dans les CRCaP sont à l'étude dans différents essais cliniques (Antonarakis et al., 2009 ; Aragon-Ching and Dahut, 2009 ; Chi et al., 2009 ; Hwang and Heath, 2010).

Les inhibiteurs pharmacologiques de l'angiogenèse ont montré dans plusieurs types de tumeurs leur efficacité pour prolonger la survie sans progression des patients. Cependant, la survie globale n'est que peu, voire pas du tout améliorée dans de nombreux cancers (Young and Reed, 2012). Plusieurs études cliniques démontrent ainsi que le Bevacizumab, un

anticorps anti-VEGF qui augmente l'hypoxie, stimule dans les glioblastomes l'invasion tumorale et la rechute à distance du site initial (de Groot et al., 2010 ; Norden et al., 2008 ; Thompson et al., 2011 ; Wick et al., 2011). Cet effet proinvasif n'a pas été démontré dans d'autres types de cancers bien que dans plusieurs modèles précliniques, un effet proinvasif et prométastatique de plusieurs antiangiogéniques ait été établi (Ebos et al., 2009 ; Paez-Ribes et al., 2009). L'utilisation des antiangiogéniques a révélé des toxicités inattendues au regard des connaissances sur le rôle du VEGF (Hwang and Heath, 2010). Cette toxicité, les données précliniques et cliniques montrant des effets proinvasifs et/ou prométastatiques, les résultats décevants en termes de survie globale sont une limite à l'utilisation des antiangiogéniques. Ils démontrent que des mécanismes de résistance se mettent en place en réponse à ces agents (Bergers and Hanahan, 2008). Ils soulignent aussi qu'il est indispensable de mieux comprendre les mécanismes de régulation de l'angiogenèse dans les tumeurs, et l'effet de l'hypoxie, pour pouvoir améliorer l'utilisation de ces nouveaux médicaments, en prolonger les effets et diminuer leur toxicité. À cet égard, il est important de noter que les facteurs pro et anti angiogéniques endogènes (VEGF, PDGF, FGF2, TSP1, Maspine, PEDF...) ont tous des fonctions en dehors de l'angiogenèse et qu'il est par conséquent réducteur, voire incohérent, de ne les considérer que pour leurs effets sur l'angiogenèse. Il est également probablement simpliste de considérer que les termes antiangiogéniques et antitumoraux sont synonymes.

Il était attendu que l'inhibition de l'angiogenèse limite à terme la pénétration des chimiothérapies au sein des tumeurs et que l'hypoxie diminue l'efficacité de la radiothérapie. En 2005 le groupe de Jain a mis en évidence que dans les premiers jours d'un traitement par un inhibiteur de l'angiogenèse, il se produit une normalisation vasculaire transitoire résultant de la suppression des vaisseaux les plus immatures. Pendant cette phase, l'hypoxie diminue, les tumeurs sont mieux perfusées, ouvrant une fenêtre thérapeutique qui précède l'hypoxie (Jain, 2005). Ce concept de normalisation vasculaire a été montré dans plusieurs modèles précliniques (Goel et al., 2011) mais sa confirmation clinique reste à établir (Van der Veldt et al., 2012). Certains auteurs attribuent une part importante des effets bénéfiques des inhibiteurs de l'angiogenèse à cet état transitoire de normalisation vasculaire (Jain, 2005). Prolonger cet effet de normalisation serait alors un nouvel objectif.

II. La protéine CAD : CARBAMOYL-PHOSPHATE SYNTHETASE II, ASPARTATE TRANSCARBAMYLASE, ET DIHYDROOROTASE

La protéine CAD a été décrite dans la première moitié des années 70, dans différents modèles animaux (rat, drosophile, grenouille, oursin), comme un complexe multienzymatique regroupant 3 activités enzymatiques différentes : Glutamine-dépendant carbamoyl-phosphate synthetase (CPSase), aspartate transcarbamylase (ATCase), et dihydroorotase (DHOase) (Jarry, 1976). Ces enzymes catalysent les trois premières étapes de la biosynthèse des pyrimidines.

II.1. Les voies de synthèse des bases pyrimidiques

Les bases azotées puriques et pyrimidiques sont nécessaires à la synthèse des acides nucléiques, des phospholipides, du glycogène et des sucres UDP, ainsi qu'à la glycosylation UDP-dépendante des protéines. Elles peuvent être issues de deux mécanismes de synthèse distincts : la voie de synthèse *de novo*, ou la voie de récupération. Ces deux voies pour les bases pyrimidiques sont schématisées dans la figure 11.

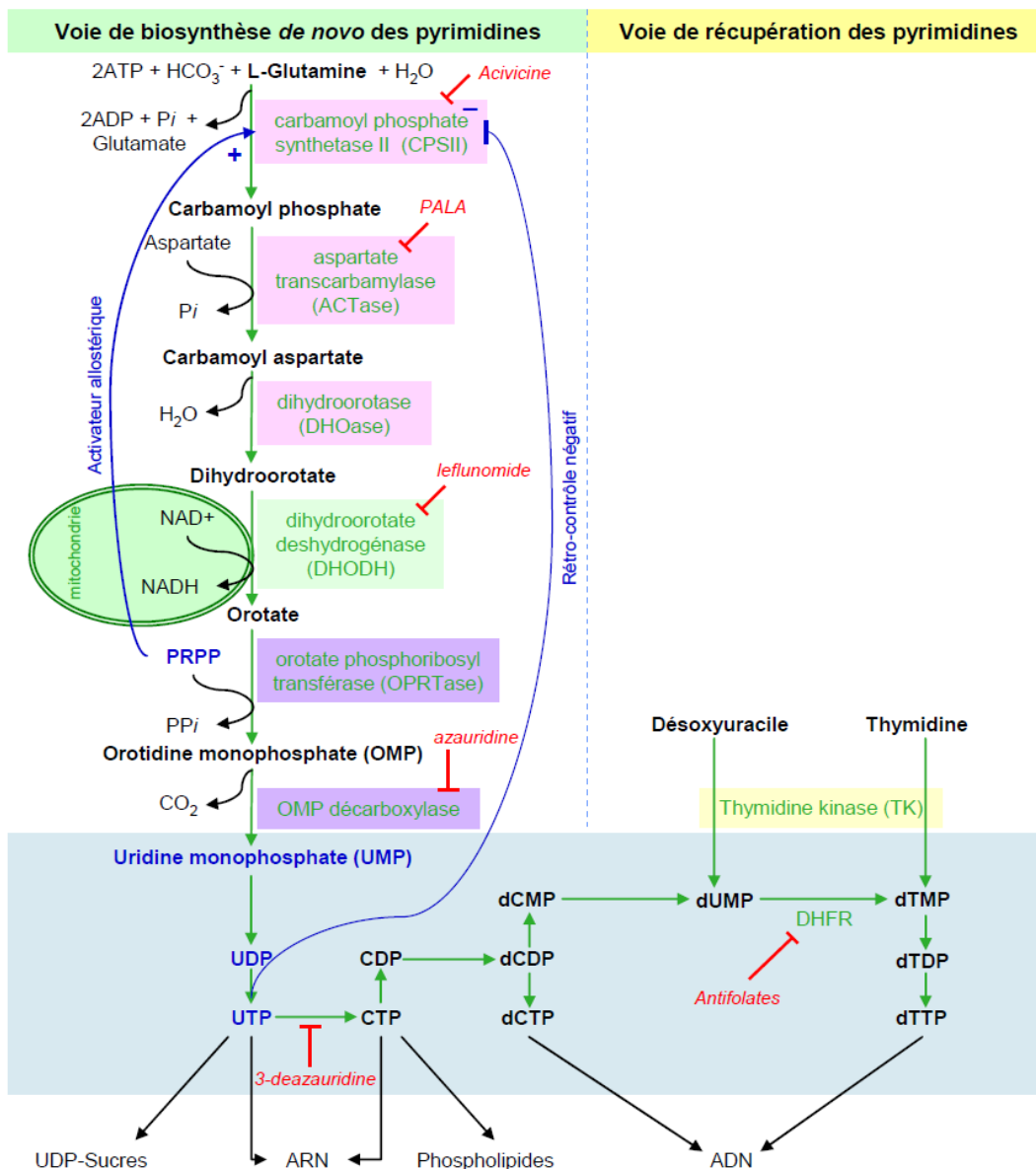
II.1.1. La voie de biosynthèse *de novo* des pyrimidines

Les bases pyrimidiques sont obtenues par réaction enzymatique à partir de l'uridine. La néosynthèse d'uridine requiert plusieurs réactions enzymatiques catalysées successivement. La partie ribose phosphate des nucléotides puriques et pyrimidiques provient du PRPP (5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate), forme activée du ribose-5-phosphate issu de la voie des pentoses phosphate.

II.1.2. La voie de récupération des pyrimidines

Les cellules animales, en particulier les cellules hépatiques, peuvent utiliser les bases issues de la dégradation de l'ADN (lors de l'apoptose cellulaire) et de l'ARN (dans les cellules vivantes), voire celles issues de l'alimentation. Cette voie requiert plusieurs enzymes pour les

bases puriques, et la thymidine kinase pour les bases pyrimidiques. *In vivo*, cette voie permet la synthèse de désoxyuridine et désoxythymidine à partir de désoxyuracile ou de thymidine. Il n'existe pas de voie de récupération pour la cytosine (Qiu and Davidson, 2000). Cependant, les cellules en culture peuvent directement récupérer l'uridine présente dans le sérum du milieu pour synthétiser l'ensemble des bases pyrimidiques, y compris les cytosines.



II.2. Gène et ARN messenger de CAD

Le gène humain de CAD a été cloné en 1996 (Iwahana et al., 1996). Il est localisé sur le chromosome 2 en position p22-p21 (Chen et al., 1989 ; Evans et al., 1993; Kim et al., 1992).

L'ARN messenger de CAD fait 7,5 kilobases (Padgett et al., 1982a ; Padgett et al., 1982b) et sa séquence codante est de 6675 pb. La région 5'UTR a été étudiée par Farnham et Kollmar. Ils ont localisé le promoteur et identifié une séquence minimale de 114 pb suffisante à la transcription du gène (Farnham and Kollmar, 1990).

II.3. La protéine CAD

II.3.1 Structure et domaines de la protéine CAD

La protéine, qui fait 243kDa au total, peut être clivée par la trypsine ou l'élastase en trois polypeptides distincts portant les différentes fonctions enzymatiques ((Davidson et al., 1981 ; Grayson and Evans, 1983 ; Grayson et al., 1985) (figure 12).

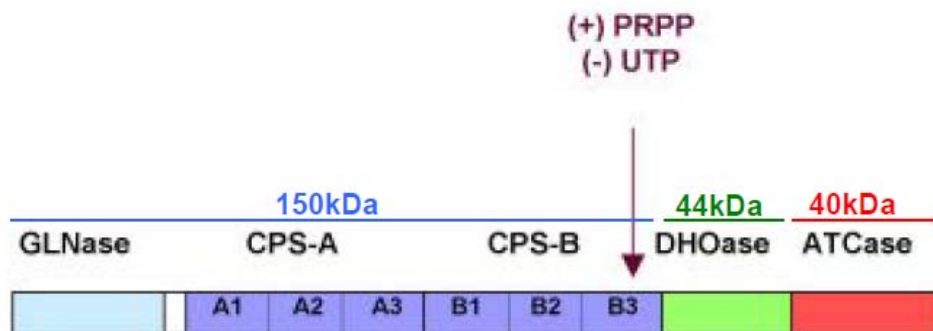


Figure 12 : les domaines de la protéine CAD (adapté de(Serre et al., 2004)

II.3.2 Régulation de la protéine CAD

L'activité de la protéine CAD est finement régulée par un ensemble de mécanismes comprenant amplification génique, régulation transcriptionnelle, régulation allostérique, phosphorylation et protéolyse (Carrey, 1993 ; Huang and Graves, 2003).

II.3.2.1. Amplification génique de CAD

Le N-Phosphonacetyl-l-aspartate (PALA) est un inhibiteur spécifique de l'aspartate transcarbamylase (Collins and Stark, 1971), et donc de la synthèse de novo des pyrimidines. En absence d'uridine dans le milieu, le PALA – comme d'autres inhibiteurs de CAD tels que l'acivicine (Aoki et al., 1982) ou le 3-deazauridine (Karle and Cysyk, 1984) – bloque la prolifération de cellules de mammifères en culture (Sweryd et al., 1974). De même que les mutants CAD $-/-$ peuvent croître à condition de disposer d'uridine dans le milieu de culture (Patterson and Carnright, 1977), l'effet toxique du PALA à 10^{-4} M est annihilé par l'ajout de 10^{-4} M d'uridine dans le milieu. L'utilisation du PALA in vitro se fait donc en présence de sérum dialysé, ou en présence de dipyridamole, un inhibiteur de l'uptake d'uridine (Tessera et al., 1995).

Cependant, le traitement de cellules de rongeur avec du PALA (en absence d'uridine) induit l'émergence de clones résistants (Kempe et al., 1976). Dans les cellules de rongeur, cette augmentation de l'activité de CAD provient systématiquement d'une amplification génique (Wahl et al., 1979 ; Wahl et al., 1982).

Dans les cellules humaines, ce mécanisme ne serait pas aussi courant. L'amplification de CAD et l'émergence de clones résistants au PALA sont rarissimes parmi les cellules non tumorales. Cependant, la perte de la p53 ou des protéines de stabilisation génique MLH1 et MSH6 (Chen et al., 2008), ainsi que la surexpression de Myc (Chernova et al., 1998), Ras (Smith et al., 1995) ou du FGF-2 (Dini et al., 2002) peuvent accroître leur capacité de résistance au PALA.

II.3.2.2. Régulation transcriptionnelle de CAD par Myc et Hif1alpha

L'expression de CAD augmente à la transition G1/S. L'équipe de Farnham a montré que cette régulation était due à la fixation d'un complexe protéique associé à Myc, sur une région palindromique appelée boîte E. La mutation de cette boîte inhibe la fixation de Myc et empêche aussi l'activation transcriptionnelle de CAD à la transition G1/S (Boyd and Farnham, 1997; Miltenberger et al., 1995). De même, les cellules contenant une délétion homozygote de c-myc présentent une expression de CAD fortement réduite, et une inhibition de son activation par le sérum (Bush et al., 1998). Outre la régulation transcriptionnelle de CAD, Myc peut également participer à son amplification génique, en particulier dans les cellules ayant perdu l'expression de la p53 (Fukasawa et al., 1997).

Enfin, CAD est réprimé transcriptionnellement par Hif1alpha (Chen et al., 2005).

II.3.2.3. Régulation allostérique de l'enzyme CAD

L'activité de la protéine CAD est régulée de manière allostérique par les composés situés en amont et en aval de la chaîne enzymatique (Carrey, 1995). Le 5-phosphoribose 1-diphosphate (PRPP), qui est le donneur de cycle ribose dans la voie de synthèse des purines et des pyrimidines, est un activateur allostérique de la voie (Hager and Jones, 1967 ; Levine et al., 1971; Tatibana and Ito, 1969). L'UTP produite en fin de chaîne exerce un rétrocontrôle négatif sur l'activité de CAD (Aoki et al., 1980). La biosynthèse de CAD est inhibée à 95% dès une concentration extracellulaire en uridine de 12 μ M. Dans ces conditions, les cellules utilisent donc exclusivement l'uridine extracellulaire et la voie de récupération des nucléotides. De ce fait, elles ne sont plus sensibles au PALA (Karle and Cysyk, 1984).

II.3.2.4. Phosphorylation de CAD et localisation subcellulaire

L'activité enzymatique de CAD est également régulée par la phosphorylation de la protéine. Celle-ci peut impliquer plusieurs résidus distincts et mettre en jeu diverses kinases impliquées dans les cascades de signalisation cellulaire.

La PKA (cAMP-dependent protein kinase A) peut phosphoryler CAD sur deux sites distincts, Ser1406 et Ser1859, mais seule la Ser1406 serait impliquée dans la régulation de CAD. Cette phosphorylation par PKA peut être médiée par différents facteurs de croissance tels que le PDGF ou l'EGF. Cependant, l'effet de la phosphorylation de CAD par PKA est controversé : le groupe d'Evans a montré qu'elle diminue aussi la régulation positive par PRPP, et que l'effet cumulé serait négatif sur l'activité de CAD (Sahay et al., 1998 ; Sigoillot et al., 2002b).

CAD a tout d'abord été décrit comme une protéine cytosolique, et très peu d'études ont montré une localisation nucléaire de CAD. Angellei et Engler ont montré qu'en réponse à une infection adénovirale, CAD s'associait spécifiquement à la matrice nucléaire. Dans ces conditions, CAD interagit avec la protéine préterminale (pTP) de l'adénovirus, ce qui suggère qu'il serait recruté au niveau du domaine de réplication (Angeletti and Engler, 1998). Par ailleurs, l'analyse de l'homologue de CAD chez la levure (Ura2) suggère la présence d'un

signal de translocation nucléaire bipartite dont la mutation empêche la translocation nucléaire de CAD. La séquence qui pourrait correspondre à ce signal de translocation nucléaire chez les mammifères est située dans la région phosphorylée par PKA (Denis-Duphil et al., 1990 ; Nagy et al., 1989). Cependant, seul le groupe d'Evans a observé la présence de CAD dans le noyau de cellules animales non infectées. Ces auteurs détectent CAD presque exclusivement dans le cytoplasme (marquage punctiforme) par immunomarquage, mais détectent environ 30% de la protéine dans le noyau dans des expériences de fractionnement nucléaire (Chaparian and Evans, 1988). Il n'est donc pas impossible que la présence importante de CAD dans la fraction nucléaire provienne d'une fuite du cytoplasme dans cette fraction. Cependant, l'immunomarquage de CAD phosphorylé sur la Thr456 montre un marquage nucléaire. Il semble donc en fait que CAD transloque dans le noyau de manière très transitoire, et que cette translocation permette son activation par phosphorylation sur la Thr456 (Sigoillot et al., 2005). D'autre part, ce groupe a montré que CAD était capable de s'autophosphoryler au niveau de la thréonine 1037 du domaine CPS II, certainement de manière intermoléculaire (Sigoillot et al., 2002a).

II.4. CAD et cancer

II.4.1. Expression et activité de CAD dans les cancers

L'expression de CAD est augmentée dans plusieurs types de cancers, tels que les cancers du sein (Khan et al., 2003) ou du foie. CAD est surexprimé par amplification génique dans les cellules de carcinome hépatique 3924A en comparaison au foie normal (Reardon et al., 1987). Dans les cellules de cancer du sein humaines MCF-7, CAD est surexprimé au niveau transcriptionnel, entre autre par les oestrogènes (Khan et al., 2003).

Aucune étude n'a été menée sur l'expression, l'activité ou la régulation de CAD dans les carcinomes prostatiques.

II.4.2. Stratégies anti-cancéreuses ciblant CAD

Différents inhibiteurs de la voie de synthèse des pyrimidines ont été mis au point et utilisés en clinique pour limiter la prolifération cellulaire. Tous ne sont pas utilisés dans le traitement du cancer. Le leflunomide (un inhibiteur de la DHODH) par exemple, est utilisé dans le

traitement de fond de la polyarthrite rhumatoïde : il bloque la prolifération des cellules immunitaires responsables de cette pathologie. En revanche, les antifolates [5 fluoro-uracile (5-FU) ou methotrexate par exemple], qui sont des inhibiteurs de la DHFR, sont largement utilisés en oncologie. Ils inhibent la synthèse de novo des pyrimidines et des purines, rendant les cellules strictement dépendantes de la voie de récupération des nucléotides.

Le PALA a démontré une bonne efficacité anti-tumorale sur plusieurs modèles de tumeurs solides xénogreffées chez la souris (Johnson et al., 1976), et a donc été testé en clinique pour le traitement de divers cancers, souvent en combinaison avec d'autres antipyrimidiques tels que le 5-FU (Ettinger et al., 1984 ; Kemeny et al., 1992; Muggia et al., 1984 ; Muss et al., 1984 ; Presant et al., 1983). Cependant, l'efficacité de ces thérapies est assez limitée : dans le cas du carcinome colorectal par exemple, moins de 40% des patients répondent au traitement combiné PALA+5-FU, et la durée médiane de survie des patients est de 18 mois environ. Aucun bénéfice n'a été rapporté dans le traitement du cancer du col de l'utérus ou du lymphome malin. Les principaux effets secondaires décrits sont des complications cutanées et hématologiques et des diarrhées aiguës.

En conclusion, outre les effets secondaires importants induits par de telles chimiothérapies (complications hépatiques, problèmes cutanés, possibles effets néfastes sur la moelle osseuse, etc.), leur efficacité est limitée par les phénomènes de résistance impliquant des altérations géniques ou transcriptionnelles, ou l'utilisation favorisée de voies alternatives.

III La thrombospondine 1

La thrombospondine 1 (TSP1) a été découverte en 1971 (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 publications 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.

III. 1. Structure de la TSP1

La thrombospondine-1 (TSP1) fait partie d'une petite famille constituée de cinq membres : TSP1, TSP2, TSP3, TSP4 et TSP5/COMP (Cartilage Oligomeric MatrixProtein). Cette famille peut être divisée en 2 sous-groupes sur la base de leur architecture moléculaire et de leur oligomérisation : les TSP1 et 2 d'une part (sous-groupe A) et les TSP3, 4 et 5 d'autre part (sous-groupe B) (Carlson et al., 2008). Les TSP1 et 2 s'organisent sous la forme d'un homo-trimère alors que les TSP3, 4 et 5 forment des pentamères. De plus, 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 (figure 13).

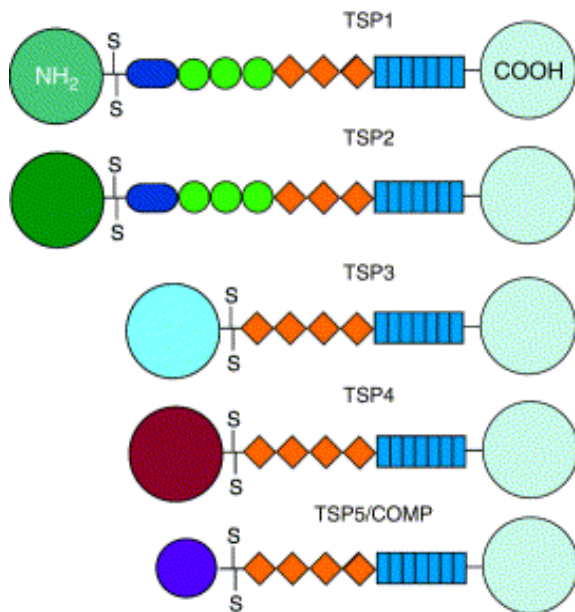
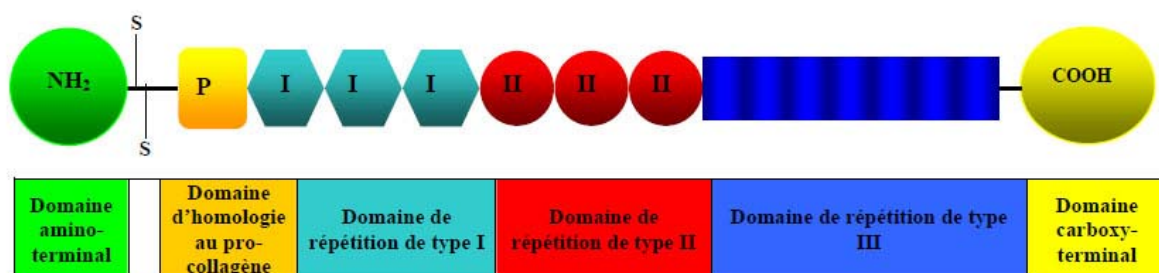


Figure 13 : Membres de la famille des TSP.

TSP1 et 2 sont composées d'un domaine N-terminal (cercle vert foncé), d'un domaine pro-collagène (ovale bleu), de trois répétitions de types I (cercle vert clair), de trois répétitions de type II (carré orange), de sept répétitions de type III (rectangle bleu) et d'un domaine globulaire en C-terminal. Les autres TSP contiennent des domaines N-terminaux différents, quatre répétitions de type II, sept répétitions de types III et un domaine C-terminal identique. Les S indiquent les résidus cystéine responsables trimérisation (d'après (de Fraipont et al., 2001)).

La TSP1 en conformation native est un homotrimère dont les chaînes sont reliées par des ponts disulfures. La chaîne mature de la TSP1 contient 1152 résidus d'acides aminés. En conditions électrophorétiques dénaturantes et réductrices, la TSP-1 migre sous forme d'une bande dont la masse moléculaire varie de 145 à 185 kDa. En absence d'agent réducteur, sa masse moléculaire est estimée à 450 kDa. Chaque sous-unité présente des domaines N-terminal et C-terminal globulaires connectés par une longue région linéaire. Celle-ci est organisée en modules qui définissent des domaines conférant à la macromolécule matricielle des fonctions diverses lorsque ces derniers interagissent avec des récepteurs de surface cellulaire de type intégrine ou non, d'autres constituants matriciels, des cytokines ou des facteurs de croissance. La figure 14 représente la structure d'un monomère de la TSP1 ainsi que les sites d'interactions de la TSP1 avec ces différents ligands et récepteurs. Un monomère de TSP1 est constitué de différents domaines :

- une région globulaire N-terminale,
- un domaine de type pro-collagène permettant la trimérisation,
- trois répétitions de type I ou TSR (thrombospondinrepeat) ou de type properdine,
- trois domaines de type II ou de type EGF,
- sept répétitions de types III, fixant le Ca^{2+} ,
- une région globulaire C-terminale.



Domaine de TSP-1	Séquences	Récepteurs et ligands	Fonctions
Domaine amino-terminal	QNV	Intégrine $\alpha 3 \beta 1$	Adhésion cellulaire Hémostase
	RKGSGR/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 modulaire de la TSP-1 et les fonctions associées. Le tableau indique les séquences peptidiques reconnues par différents récepteurs ou ligands, ainsi que les activités biologiques associées (adapté de (Bergers and Hanahan, 2008)).

III.2. Ligands de la TSP1

La TSP1 a été identifié comme étant le constituant majeur des granules à des plaquettes. Depuis, il est apparu que la TSP1 est également synthétisée et sécrétée par un grand nombre de types cellulaires tels que les fibroblastes, les cellules endothéliales, les cellules musculaires, les cellules épithéliales, les kératinocytes, les monocytes, les adipocytes, les astrocytes ou les macrophages. La TSP1 apparait donc être une protéine assez ubiquitaire.

Selon les tissus ou compartiments dans lesquels elle 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, syndécane, fibronectine...), des récepteurs cellulaires (intégrines, CD36...), des enzymes (élastase, plasmine, MMPs...) et également des cytokines (TGF β , 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 9 situe les sites d'interactions de la TSP1 avec ses différents ligands et récepteurs.

III.2.1. Protéines de la matrice extracellulaire (MEC)

La TSP1 présente la capacité d'interagir avec de nombreux composants de la MEC, des protéases, des cytokines et des facteurs de croissance (Adams, 2001). Dans de nombreux cas, la liaison de la TSP1 sur ces partenaires module leur activité. Le fibrinogène, sécrété dans le plasma, peut se lier à la surface des plaquettes activées et représente un des ligands spécifiques de la TSP1 (Legrand et al., 1992). Cette interaction joue un rôle important lors du processus de coagulation. Récemment, 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). Les activités catalytiques de la thrombine, de la plasmine, de l'élastase ou de la cathepsine G sont inhibées par la liaison sur les motifs de type 3 de la TSP1 (Hogg, 1994). La TSP1 peut également se lier avec les MMP2 et MMP9 au niveau de leurs sites catalytiques et ainsi inhiber leur activité protéasique (Bein and Simons, 2000). Ces régulations par la TSP1 sont importantes au cours du remodelage tissulaire associé à l'inflammation ou à la réparation tissulaire. En plus de ses liaisons avec les protéines de la MEC, la TSP1 peut moduler l'activité de certaines cytokines. L'interaction de la TSP1 avec le TGF β est l'une des plus intéressantes.

III.2.2 TGF β

La TSP1 interagit avec le TGF β latent et active cette cytokine. Le phénotype de souris invalidées pour la TSP1 montre une forte similitude sur le plan histologique que celui des souris TGF $\beta^{-/-}$ et cela pour de nombreux organes, tels que les poumons et le pancréas (Crawford et al., 1998). D'autre part, le phénotype pulmonaire et pancréatique des animaux TSP1 $^{-/-}$ peut être inversé en injectant aux souris un peptide de la TSP1 contenant la séquence

responsable de l'activation du TGF β (Crawford et al., 1998). Cependant, le phénotype des souris TGF $\beta^{-/-}$ est plus sévère que celui des souris TSP1 $^{-/-}$ ce qui montre que la TSP1, bien qu'ayant un rôle majeur dans l'activation du TGF β , n'est pas le seul activateur de cette cytokine.

Le TGF β est sécrété par les cellules sous la forme d'un propeptide, le pro-TGF β , constitué d'un peptide LAP (Latency Associated Peptide) associé de manière non covalente à un peptide contenant le domaine actif du TGF β . Ce peptide et le LAP proviennent de la même chaîne polypeptidique et le LAP est clivé à l'intérieur des cellules. Les cellules sécrètent le pro-TGF β sous forme d'homodimère. Le peptide LAP reste associé au TGF β mature ainsi produit et participe à son inactivation, formant ainsi un complexe latent. Différents motifs de la TSP1 ont été démontré comme capable d'activer le TGF β (figure 15).

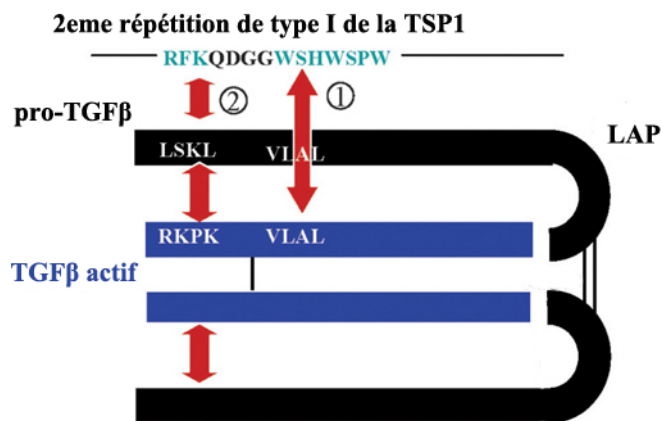


Figure15 : Modèle d'activation du TGF β par la TSP1 (adapté de (Kazerounian et al., 2008)).

Les séquences WSHWSPW et RFK présentes dans la seconde répétition de type I de la TSP1 sont impliquées dans la liaison et l'activation du TGF β (Young and Murphy-Ullrich, 2004a; Young and Murphy-Ullrich, 2004b). Dans ce modèle, la séquence LSKL présente dans la région N-terminale du LAP se lie à la séquence RKPK du TGF β actif. Dans la première étape d'activation par la TSP1, la séquence WSHWSPW se lie à la partie VLAL du TGF β actif. Cette interaction positionne le motif RFK de la TSP1 de telle manière qu'il peut se lier au motif LSKL du LAP et donc rentrer en compétition avec le motif RKPK du TGF β actif. Cette liaison de la séquence RFK à la séquence LSKL du LAP, induit un changement de conformation qui rend le TGF β capable de se lier à ces récepteurs et ainsi d'initier sa signalisation (Young and Murphy-Ullrich, 2004a; Young and Murphy-Ullrich, 2004b). Il

existe cependant d'autres protéines capables d'activer le TGF β , comme les MMP2, MMP9, des intégrines (Annes et al., 2003) .

III.3. Récepteurs de la TSP1

Outre les multiples ligands avec lesquels elle interagit, la TSP1 lie également de nombreux récepteurs membranaires. Les principaux récepteurs de la TSP1 sont présentés sur la figure 16.

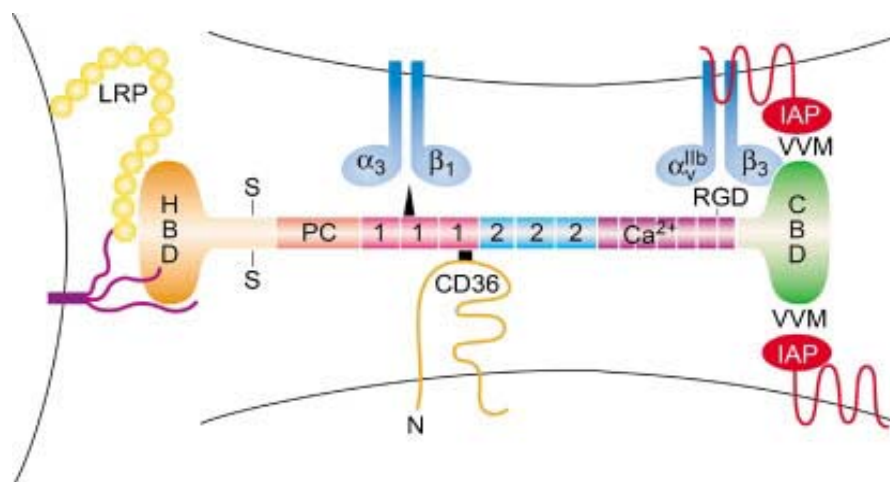


Figure 16 : Représentation schématique d'un monomère de TSP1 avec la localisation des sites de fixation à ses principaux récepteurs. (adapté d'après (Bornstein, 2009)).

III.3.1. Intégrines et CD47/IAP

La TSP1 interagit avec plusieurs récepteurs d'adhésion de type intégrine. Le motif RGD, présent dans 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 $\alpha_4\beta_1$) (Bornstein, 2009). Suivant les récepteurs présents à la surface des cellules, la TSP1 peut réguler de nombreux processus biologiques tels que l'adhésion, la migration cellulaire, l'agrégation plaquettaire ainsi que l'angiogenèse.

La partie C-terminale de la TSP1 contient deux séquences contenant un motif VVM impliqué également dans l'adhésion cellulaire. Cette séquence est reconnue par le CD47, aussi appelé IAP (Integrin Associated Protein) (Frazier et al., 2001; Kosfeld and Frazier, 1993). L'association CD47-TSP1 avec différentes intégrines joue un rôle dans la mobilité des cellules endothéliales. Cette interaction a également été impliquée dans l'inhibition de la

réponse au monoxyde d'azote (NO) des cellules endothéliales par la TSP1 (Isenberg et al., 2006).

III.3.2. CD36 et récepteurs non-intégrines

La diversité du patron d'expression du CD36 montre que ce récepteur a une multiplicité de fonctions cellulaires (Silverstein and Febbraio, 2009). Le CD36 a initialement été décrit comme un récepteur jouant un rôle dans l'athérogenèse. C'est en effet l'un des principaux récepteurs dit « scavenger » (« éboueur »), qui reconnaît les lipoprotéines de faible densité (LDL) oxydées et les internalise par endocytose (Dawson et al., 1997). Le CD36 est le premier récepteur non-intégrine décrit pour la TSP-1 (Asch et al., 1987). Les sites de liaison responsables de l'interaction entre la TSP-1 et le CD36 ont été identifiés sur ces deux protéines. Ce sont les domaines CSVTCG dans les répétitions de type I de la TSP1 qui se lient au CD36 (Asch et al., 1992). Le CD36 représente le médiateur majeur de l'effet anti-angiogénique de la TSP1, et joue donc un rôle dans la croissance tumorale, dans l'inflammation, la réparation tissulaire et d'autres processus pathologiques impliquant la néo-vascularisation (Dawson et al., 1997). Le CD 36 inhibe la prolifération, la migration ainsi que la formation de structure en tube des cellules endothéliales (Dawson et al., 1997). L'action anti-angiogénique passe également par une induction de l'apoptose des cellules endothéliales (Jimenez et al., 2000 ; Rege et al., 2009; Volpert et al., 2002).

Un autre récepteur de la TSP1, nommé CBP, reconnaît spécifiquement la séquence CSVTCG (présente dans la deuxième répétition de type I de la TSP1) (Tuszynski et al., 1993). Des anticorps anti-CBP inhibe l'étalement et l'adhésion des cellules tumorales A549 (Tuszynski and Nicosia, 1994). Ce récepteur a été isolé la première fois dans des cellules tumorales pulmonaires, cependant il a été montré sur-exprimé dans plusieurs types de tumeurs invasives. Son expression serait corrélée à la dissémination métastatique dans différents modèles, comme dans les carcinomes mammaires, pancréatiques, colorectaux et également dans les tumeurs de la tête et du cou (Arnoletti et al., 1994 ; Tuszynski and Nicosia, 1994 ; Wakiyama et al., 2001).

Outres les récepteurs détaillés ici, la TSP1 est également capable de lier des sulfatides, la calréticuline, le LRP1 ainsi que les HSPG (protéoglycanes de type héparane sulfate) (Adams, 2001).

III.4. Régulation de la TSP1

La TSP1 est sous l'influence de multiples régulateurs comme des facteurs de croissance, des cytokines, l'hypoxie, des gènes suppresseurs de tumeurs et des oncogènes. L'expression de la TSP1 est induite par le bFGF, le TGF β ainsi que par le PDGF (Donoviel et al., 1990 ; Majack et al., 1987). Outre son expression dans de nombreuses cellules normales, la TSP1 est également exprimée dans de nombreuses cellules tumorales. Suivant les études et les modèles, l'expression de la TSP1 dans les cellules tumorales est soit exprimée en quantité réduite soit absente par rapport aux cellules normales dont elles dérivent (de Fraipont et al., 2000 ; de Fraipont et al., 2001 ; Oue et al., 2003). Cependant d'autres études ont montré une surexpression de la TSP1 dans les cellules tumorales (Okada et al., 2010 ; Qian and Tuszynski, 1996 ; Tuszynski et al., 1992). En clinique, une surexpression de TSP1, en particulier dans les stades invasifs, a été décrite notamment dans les cancers de la vésicule biliaire, du colon, du sein, de prostate ou du pancréas.

III.4.1. Régulation par des oncogènes et par des gènes suppresseurs de tumeurs

Les fibroblastes de patients atteints du syndrome de Li Fraumeni possèdent un allèle sauvage pour P53 alors que le second est muté. Cette mutation augmente chez ces patients le risque de développer des tumeurs. Le maintien en culture de ces fibroblastes montre qu'ils perdent spontanément l'allèle sauvage (Dameron et al., 1994a ; Dameron et al., 1994b). Parallèlement à cet événement, l'expression de la TSP1 est réprimée. La réexpression de P53 dans ces cellules se traduit par une induction de l'expression de la TSP1. Il a également été montré que dans des échantillons de mélanome, de carcinome de la vessie ou du colon, la diminution de l'expression de la TSP1 est corrélée avec des mutations de P53 (Grant et al., 1998 ; Grossfeld et al., 1997 ; Tokunaga et al., 1998). Cependant, cette régulation n'existe pas dans tous les types cellulaires, comme par exemple dans les glioblastomes ou dans les cancers du poumon où la P53 ne régule pas la TSP1 (Fontanini et al., 1999; Tenan et al., 2000).

Des oncogènes ont également été trouvés comme régulateurs de la TSP1 dans le syndrome de Li Fraumeni. L'introduction de *ras* activé engendre une transformation de ces cellules ainsi qu'une inhibition de l'ARNm de la TSP1 (Volpert et al., 1997). De nombreux autres oncogènes régulent la TSP1 : WT1, v-Myc, v-Src, c-Jun, Her2, Id1 (Dejong et al., 1999 ; Mettouchi et al., 1994 ; Slack and Bornstein, 1994 ; Tikhonenko et al., 1996).

III.4.2. Régulation par l'hypoxie

L'hypoxie est également impliquée dans la régulation de la TSP1. Suivant les modèles cellulaires, la diminution de la pression en oxygène joue un rôle différentiel sur l'expression de la TSP1. En effet 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 fibroblaste 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 sur les fibroblastes de peau ont été observés, l'hypoxie dans ces fibroblastes induit l'expression de la TSP1 et cette induction est dépendante de HIF1 (Distler et al., 2007). Des résultats allant de ce sens ont été observés dans des prélèvements de tissus de muscle ischémiques humain. En effet, l'expression de la TSP1 est augmentée dans ces prélèvements principalement au niveau des cellules endothéliales 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). De plus, dans les cellules endothéliales ainsi que dans les cellules musculaires lisses, l'hypoxie augmente l'expression de la TSP1 et stimulerait ainsi la migration cellulaire (Osada-Oka et al., 2008a; Phelan et al., 1998 ; Suzuma et al., 1999).

III.5. Fonctions de la TSP1

De nombreuses fonctions ont été attribuées à la TSP1, en particulier dans la motilité cellulaire, l'inflammation, la réparation tissulaire, le développement, l'angiogenèse et dans la tumorigenèse. Les fonctions de la TSP1 dans la progression tumorale sont complexes. De nombreuses études montrent que la TSP1 est inhibée au cours de la progression tumorale et qu'une réexpression de la TSP1 diminue la croissance de ces tumeurs montrant ainsi le rôle anti-tumoral de la TSP1. Cependant, d'autres études montrent que la TSP1 augmente la dissémination métastatique ou l'angiogenèse. Ceci montre donc un rôle ambigu de la TSP1 au cours de la progression tumorale, qui peut être soit pro soit anti-tumoral suivant le contexte cellulaire, les partenaires présents et les récepteurs exprimés.

III.5.1. TSP1, une protéine anti-tumorale

La fonction anti-angiogénique de la TSP1 a été mise en évidence près de 20 ans après l'identification initiale de cette protéine (Good et al., 1990). Les effets sur l'angiogenèse de la TSP1 peuvent être classés en deux catégories : directs ou indirects. Les rôles directs de la TSP1 ciblent et modifient les cellules endothéliales en elles-mêmes, alors que les rôles indirects jouent sur l'environnement cellulaire. Les effets directs de la TSP1 sur les cellules endothéliales passent par une répression de la mobilité, une inhibition de la chimotaxie induite par des cytokines, un arrêt du cycle cellulaire ainsi que par une induction de l'apoptose (Guo et al., 1997; Jimenez et al., 2000 ; Ren et al., 2006). Les effets indirects incluent le recrutement des cellules musculaires lisses vasculaires par la TSP1 qui stabilise le remodelage des capillaires et ainsi empêche une future angiogenèse (Isenberg et al., 2005). La TSP1 peut également se lier et séquestrer des facteurs pro-angiogéniques comme le VEGF et le bFGF, sécrétés par les cellules non endothéliales, ce qui diminue la survie et la migration des cellules endothéliales (Gupta et al., 1999 ; Margosio et al., 2003). De plus, la TSP1 est capable d'internaliser le VEGF par des cellules non endothéliales *via* le LRP ce qui diminue le niveau de VEGF (Greenaway et al., 2007). Enfin, la TSP1 a des effets pro-apoptotiques sur les macrophages activés et les lymphocytes T, ce qui réduit le niveau de cytokines inflammatoires qui ont un rôle important dans l'angiogenèse (Johansson et al., 2004 ; Johansson and Londei, 2004 ; Mateo et al., 1999).

La TSP1 a donc été le premier agent anti-angiogénique pour lequel l'apoptose a été décrite comme la voie majeure de son activité anti-angiogénique (Jimenez et al., 2000). Par la suite cette observation a été généralisée pour d'autres inhibiteurs naturels de l'angiogenèse comme l'angiostatine, l'endostatine, la tumstatine et la SPARC (Folkman, 2004). 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 et la troisième répétition de type I de la TSP1 (Dawson et al., 1999; Iruela-Arispe et al., 1999 ; Tolsma et al., 1993). Le fragment anti-angiogénique de la région procollagène inhibe l'angiogenèse *in vivo* cependant sa fonction exacte n'a pas été explorée. Les répétitions de type I de la TSP1 se lient au CD36. Le CD36 est le récepteur majeur médiant les effets anti-angiogéniques et pro-apoptotiques de la TSP1 (Dawson et al., 1997; Jimenez et al., 2000). En effet un anticorps neutralisant ou un fragment du CD36 soluble, qui inhibe la liaison CD36-TSP1, entravent l'inhibition de la migration, de la morphogenèse ainsi que l'apoptose des cellules endothéliales par la TSP1

(Dawson et al., 1997; Jimenez et al., 2000). La TSP1 induit l'apoptose des cellules endothéliales *via* les caspases 3 et 8 (Jimenez et al., 2000 ; Nor et al., 2000). Ce processus est donc médié par le CD36 présent dans les radeaux lipidiques à la surface des membranes où il est associé à la famille de kinase Src, Fyn, Lyn et Yes. La TSP1 augmente l'association CD36-Fyn, conduisant à une activation de la voie de signalisation Fyn/JNK/p38MAPK/caspase 3 (Jimenez et al., 2001 ; Nor et al., 2000). L'interaction CD36-TSP1 augmente également l'apoptose des cellules endothéliales par l'augmentation de l'expression de FasL à leur surface (Volpert et al., 2002). Outre l'activation de l'apoptose des cellules endothéliales, la TSP1 inhibe la survie de ces cellules en régulant négativement la protéine anti-apoptotique Bcl2. Ainsi la TSP1 inhibe les effets positifs du VEGF sur la survie des cellules endothéliales (Nor et al., 2001). Enfin la TSP1 *via* sa liaison au CD36 est capable d'inhiber le cycle cellulaire des cellules endothéliales en inhibant la transition G1/S, par une augmentation de p21 et une déphosphorylation de Rb (Yamauchi et al., 2007).

Le rôle de la TSP1 en tant qu'inhibiteur de l'angiogenèse dans les tumeurs primaires est bien décrit dans la littérature (de Fraipont et al., 2001; Kazerounian et al., 2008 ; Ren et al., 2006). Pour les carcinomes mammaires par exemple, la transfection d'un plasmide codant pour la TSP1 dans des lignées tumorales mammaires inhibe la croissance de la tumeur primaire et inhibe également l'apparition de métastases pulmonaires (Weinstat-Saslow et al., 1994). Cependant dans une étude plus récente, le croisement de souris TSP1^{-/-} et de souris développant spontanément des tumeurs mammaires montre que comme l'étude précédente, les tumeurs primaires sont plus petites dans les souris exprimant la TSP1 que dans les souris invalidées pour la TSP1. Cependant, on observe une diminution du nombre des métastases dans les souris TSP1^{-/-} (Yee et al., 2009).

III.5.2. TSP1, une protéine pro-tumorale

La TSP1 a également été impliqué dans la dissémination métastatique. Après la découverte des propriétés anti-angiogéniques de la TSP1, la plupart des études traitant de cette protéine dans les tumeurs ont considéré la TSP1 comme anti-tumorale. Cependant, il y a aussi toujours eu des travaux démontrant l'inverse. En effet, la TSP1 stimule la croissance et la migration des myofibroblastes qui activent la prolifération des cellules aortiques (Nicosia and Tuszynski, 1994). De plus, il a été montré que la migration ainsi que la formation de

micro-vaisseaux sont augmentées par de faibles quantités de TSP1 dans des cellules aortiques bovines (Qian et al., 1997). La digestion de la TSP1 par la thrombine clive la TSP1 en deux fragments, l'un de 25 kDa contenant la partie N-terminale, l'autre de 140 kDa contenant le reste de la TSP1. La forme entière de la TSP1 ainsi que le fragment de 25kDa augmentent l'angiogenèse induite par le FGF dans des modèles d'angiogenèse sur cornée de lapin, alors que le fragment de 140 kDa l'inhibe (Taraboletti et al., 2000). En outre, l'interaction de l'intégrine $\alpha 3\beta 1$ avec de la TSP1 immobilisée stimule la prolifération des cellules endothéliales (Chandrasekaran et al., 2000). Enfin il a été montré que l'intégrine $\alpha 9\beta 1$ pouvait lier la TSP1 *via* le domaine N-terminale de la TSP1. Cette intégrine est exprimée sur les cellules endothéliales de nombreux organes et cette interaction induit la néo-vascularisation dans différents modèles (Staniszewska et al., 2007).

La TSP1 régule l'attachement, l'adhérence et la migration cellulaire. Divers travaux ont décrit des propriétés adhésives et anti-adhésives de la TSP-1 sur les plaquettes, les fibroblastes, les cellules endothéliales, les cellules musculaires ainsi que de nombreuses lignées cellulaires tumorales (Bonney et al., 2008; Incardona et al., 1993 ; Lahav, 1988 ; Narizhneva et al., 2005 ; Orr et al., 2004 ; Tuszynski and Kowalska, 1991). L'adhésion cellulaire à la MEC joue un rôle crucial dans de nombreuses étapes de la progression tumorale ainsi que dans le développement métastatique. La TSP1 est capable de stimuler la perte des contacts focaux et des fibres de stress dans différents types cellulaires (Murphy-Ullrich, 2001; Murphy-Ullrich and Hook, 1989). Cette action est médiée par une séquence présente en N-terminal de la TSP1 et peut être mimée par un peptide, nommé hepI, comprenant les acides aminés 17 à 35 de la TSP1 (Murphy-Ullrich et al., 1993). De multiples récepteurs sont capables de fixer le domaine N-terminal de la TSP1, cependant l'action de hepI est médiée par la calréticuline (CRT) en association avec le LRP1 (Goicoechea et al., 2002 ; Orr et al., 2003b). La TSP1 en se liant à la CRT stimule les voies de signalisation FAK, ERK et PI3K (Orr et al., 2002). Ces signaux convergent vers une inhibition de l'activité de la protéine kinase Rho, stimulant ainsi la réorganisation du cytosquelette avec une perte des plaques d'adhésion focale et une augmentation de la migration cellulaire (Orr et al., 2003a; Orr et al., 2004). En plus de cette perte des plaques d'adhésion focale, la TSP1 *via* le complexe CRT/LRP1 confère une résistance à l'anoïkis (mort cellulaire par apoptose induite par une diminution de l'adhésion cellulaire) des fibroblastes (Pallero et al., 2008).

La fonction adhésive de TSP-1 est aussi fortement liée à son implication dans la protéolyse péricellulaire associée à l'invasion tumorale. La TSP-1 est capable de lier

différentes protéases, telles que l'uPA, la plasmine, la thrombine, la cathépsine G ou l'élastase neutrophile (Bornstein, 1995; Silverstein et al., 1990). Le système plasminogène/plasmine est un système protéasique majeur impliqué dans la progression tumorale. La TSP-1 inhibe les activités plasmine et urokinase dans des cellules tumorales pulmonaires et stimule ainsi la dissémination métastatique (Hosokawa et al., 1993). Parallèlement, les complexes formés avec ces enzymes peuvent aussi être actifs et être également impliqués dans le développement de métastases. Ainsi, la TSP-1 produite dans les cellules tumorales mammaires induit l'invasion tumorale en stimulant l'expression d'uPA et de son récepteur uPAR (Albo et al., 1997 ; Albo et al., 2000). Des résultats similaires ont été obtenus dans les carcinomes thyroïdiens, dans d'autres modèles de carcinomes mammaires, dans des tumeurs de la tête et du cou ainsi que dans les cancers du pancréas (Albo et al., 1999b; Albo and Tuszynski, 2004 ; Sid et al., 2008 ; Yee et al., 2009).

En parallèle, la TSP-1 peut interagir avec les MMPs, suggérant une activité de régulation de la protéolyse matricielle. La nature inhibitrice de l'interaction de la TSP-1 et des MMP2, 3 et 9 a été démontrée : en effet, il résulte de ces interactions, une diminution de l'activité de ces 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 TSP-1 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 en opposition (Taraboletti et al., 2000). Toutes ces données tendent à classer la TSP-1 comme un promoteur tumoral. Ces différentes études montrent que la TSP1 augmente la dissémination métastatique - soit en augmentant la protéolyse matricielle, ce qui rend les cellules capables de migrer, - soit en inhibant une dégradation excessive de la MEC, afin de préserver un attachement cellule/matrice nécessaire à l'invasion tumorale.

III.5.3. Thérapies basées sur la TSP1 et limites

Vu les effets direct et indirect de la TSP1 sur les cellules endothéliales, il a semblé intéressant d'utiliser la TSP1 comme traitement dans différents cancers. Différentes approches pour augmenter la quantité de TSP1 ont été développées pour le traitement des cancers : injection de protéines recombinantes ou de fragments synthétiques de la TSP1. L'injection de TSP1 recombinantes ou l'expression d'un plasmide codant pour la TSP1 a été montré comme inhibant la croissance tumorale dans différents modèles (Bleuel et al., 1999 ; Hsu et al., 1996 ;

Streit et al., 1999 ; Tenan et al., 2000; Weinstat-Saslow et al., 1994). Cependant l'utilisation de la TSP1 en clinique est limitée par la taille de la TSP1 mais également par la multitude de récepteurs et de fonctions associés à la TSP1. De ce fait, l'utilisation de différents fragments ou de peptides mimétiques semblent être plus appropriée. Différents fragments de la TSP1 ont été étudiés et testés *in vivo* et *in vitro*.

Le fragment N-terminal de la TSP1 n'a pas été testé dans des modèles tumoraux, cependant dans les cultures de cellules épithéliales il permet l'internalisation du VEGF *via* le récepteur LRP1 (Greenaway et al., 2007). Le peptide synthétique dérivé de la première répétition de type I de la TSP1, contenant la partie activatrice du TGF β ainsi que le site de liaison à l'héparine, inhibe la croissance des tumeurs mammaires et des glioblastomes (Bogdanov et al., 1999; Iruela-Arispe et al., 1999). Cependant dans ces études aucun changement de la MVD n'a été observé. Un autre peptide, le TSP1ang, contenant les deux cystéines impliquées dans la trimérisation, le domaine procollagène ainsi que les répétitions de types I, a été testé (de Fraipont et al., 2004). Contrairement au peptide précédemment décrit, le TSP1ang, injecté ou exprimé par les cellules, diminue la vascularisation tumorale. Par contre les tumeurs traitées par ce peptide sont plus agressives et plus invasives que les contrôles (de Fraipont et al., 2004), montrant un effet à la fois antiangiogénique et protumoral. Des peptides contenant les domaines de types I de la TSP1 ont également été testés. Un peptide contenant les trois répétitions de type I de la TSP1 réduit l'angiogenèse ainsi que la croissance de tumeurs pancréatiques en induisant une apoptose des cellules endothéliales associées à la tumeur (Zhang et al., 2005).

Des petits peptides de la TSP1 nommés ABT-510 et ABT-526 dérivés de la séquence anti-angiogénique présente dans la deuxième répétition de type I de la TSP1 ont été développés par la société Abbott (Haviv et al., 2005). Le traitement d'animaux par ces deux peptides stabilise le développement de nombreux modèles tumoraux chez la souris ainsi que des tumeurs spontanées chez le chien (Anderson et al., 2007 ; Greenaway et al., 2009 ; Haviv et al., 2005 ; Rusk et al., 2006). Les essais cliniques de phases I de l'ABT-510 ont montré une bonne tolérance des patients vis-à-vis de ces molécules. Cependant l'utilisation de ce peptide ne démontre pas d'effets bénéfiques dans deux essais cliniques de phase II réalisés chez des patients atteints de mélanome (Markovic et al., 2007) ou de sarcome des tissus mous (Baker et al., 2008).

Ces données montrent que l'utilisation de la TSP1 ou de peptides dérivés de la TSP1 n'a pas les effets escomptés sur les tumeurs. Ceci peut s'expliquer par le rôle complexe de la TSP1 au cours de la progression tumorale. Tout d'abord, des mécanismes de résistance aux effets anti-angiogéniques de la TSP1 ont été décrits dès 2001 (Filleur et al., 2001). Par la suite, les effets de la TSP1 sur la vascularisation et la croissance tumorale ont été étudiés in vivo sur un modèle de carcinome mammaire soumis à une exposition stromale de TSP1. Il a été tout d'abord observé que le niveau de TSP1 était suffisant pour inhiber la néo-vascularisation à un stade précoce (Fontana et al., 2005). Cependant, l'exposition prolongée des tumeurs à la TSP1 était associée à une augmentation de l'expression tumorale de VEGF et entraînait une croissance tumorale équivalente aux tumeurs contrôles, non exposées à la TSP1. Parallèlement, l'étude de l'expression de la TSP1 sur tissu humain mammaire tumoral a montré que l'expression de TSP1, bien qu'associée à une diminution de la vascularisation, était aussi associée à une diminution de la survie sans récurrence. Au niveau du tissu ganglionnaire métastatique, l'expression tumorale de TSP1 n'était plus associée à une diminution de la vascularisation. Ces observations suggèrent donc qu'une forte exposition tumorale à la TSP1 était un facteur de mauvais pronostic sur la survie des patientes. Ce mécanisme de résistance a également été décrit 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. Ces phénomènes de résistance sont donc un inconvénient majeur à l'utilisation de fragments anti-angiogéniques de la TSP1 en thérapie.

Les rôles, décrits précédemment, de la TSP1 dans l'invasion cellulaire sont également un frein dans l'utilisation de la TSP1 en thérapie. La TSP1 est impliquée dans l'adhérence et la migration cellulaire. Suivant les études, comme pour la plupart des rôles attribués à la TSP1, les résultats sont contradictoires. D'un côté des études montrent que la TSP1 inhibe la formation de métastases, de l'autre au contraire la TSP1 favorise leur formation. Encore une fois, la structure complexe de la TSP1 ainsi que les multiples récepteurs capables d'interagir avec cette protéine mais également les modèles et les contextes cellulaires peuvent expliquer les résultats divergeant sur l'implication de la TSP1 dans la formation de métastases. Dans une même tumeur il est ainsi probable que le rôle de la TSP1 change en fonction de son

niveau d'expression, des récepteurs exprimés par les cellules tumorales mais également par les cellules stromales qui se modifient au cours de la progression tumorale. Les propriétés de la TSP1 limitant le développement de la tumeur (inhibition de l'angiogenèse) s'exercent en même temps que celles qui favorisent l'invasion ou la formation de métastases (déadhésion, migration), et qui les contrebalancent.

III.6. TSP1 et carcinomes prostatiques.

La TSP1 joue un rôle important dans l'homéostasie prostatique. En effet, dans les souris invalidées pour la TSP1, on observe une hyperplasie prostatique caractérisée par une augmentation de l'angiogenèse stromale et par une augmentation de la prolifération des cellules épithéliales (Fitchev et al., 2010). Cette augmentation de la vascularisation de la prostate résulte probablement de l'absence des effets anti-angiogéniques de la TSP1 et d'une diminution de l'activation du TGF β , connu pour inhiber la prolifération des cellules épithéliales prostatiques normales (Fitchev et al., 2010; Jones et al., 2009).

Chez le rat, la TSP1 est faiblement exprimée et les androgènes régulent directement son expression dans la prostate. En effet, la castration chez le rat induit une involution de glande prostatique accompagnée d'une diminution de sa vascularisation (Huggins and Hodges, 1941). Cette diminution de la vascularisation s'explique notamment par la diminution du VEGF dont l'expression est positivement régulée par les androgènes. Au bout de quelques jours, l'hypoxie résultant de la castration induit une réexpression du VEGF dont le taux revient à la normale (Burchardt et al., 2000). Cependant, en dépit d'un niveau normal de VEGF, la vascularisation prostatique continue de régresser. La TSP1 étant quant à elle réprimée par les androgènes, la castration déclenche une augmentation de la TSP1 qui persiste pendant au moins 12 jours. Contrairement à ce qui est observé pour le VEGF, il n'y a pas dans ce cas de feed-back créé par l'hypoxie (Huggins and Hodges, 1941). L'ajout d'androgènes chez les rats castrés fait disparaître la TSP1 dans le stroma ainsi que dans les cellules épithéliales. La prostate revient ainsi à son état initial. Les androgènes ainsi que l'hypoxie inhibent donc la synthèse de TSP1 dans la prostate normale (Fitchev et al., 2010 ; Huggins and Hodges, 1941 ; Rudolfsson and Bergh, 2008).

Dans les carcinomes prostatiques, ces régulations semblent être maintenues au moins dans les premiers stades de la maladie. Dans les ADCaP, la MVD est inversement corrélée à l'expression de TSP1. En effet, plusieurs études montrent une augmentation de la

vascularisation et une diminution de l'expression de la TSP1 dans les tumeurs par rapport à la prostate saine (Huggins and Hodges, 1941 ; Kaygusuz et al., 2007; Kung and Evans, 2009 ; Vallbo et al., 2004). Chez des animaux porteurs de tumeurs xénogreffées, l'ablation androgénique augmente l'expression de la TSP1 (Fitchev et al., 2010; Huggins and Hodges, 1941 ; Kung and Evans, 2009) de même que l'utilisation d'un antagoniste d'AR, le bicalutamide (Antonarakis et al., 2009).

Cette corrélation entre la MVD et la TSP1 ne perdure pas au cours de la progression tumorale prostatique et notamment dans les CRCaP. Plusieurs études n'ont en effet pas montré de corrélation entre la vascularisation et l'expression de la TSP1 dans les CRCaP (Grossfeld et al., 2002 ; Huggins and Hodges, 1941; Kaygusuz et al., 2007). La forte expression de la TSP1 dans les CRCaP ne s'accompagne plus d'une diminution de la vascularisation. Ceci peut s'expliquer par différents mécanismes. L'exposition prolongée à la TSP1 peut provoquer un phénomène de résistance aux effets anti-angiogéniques de la TSP1. En effet, dans un modèle de xénogreffe de cellules LNCaP (lignée ADCaP), la TSP1 diminue la prise tumorale ainsi que la vascularisation. Cependant après la prise tumorale, la vitesse de la croissance tumorale est identique en présence ou en absence de TSP1, car les cellules tumorales se sont adaptées à la présence de TSP1 notamment par une surexpression du VEGF, qui contrebalance les effets de la TSP1. De plus, le TGF β augmente la prolifération de ces cellules qui n'étaient pas, avant l'exposition à la TSP1, affectées par ce facteur de croissance (Huggins and Hodges, 1941).

Dans la lignée LNCaP, le promoteur de la TSP1 est méthylé, ce qui réprime son expression et favorise la vascularisation de la tumeur (Cussenot et al., 1994 ; Li et al., 1999). Le passage de tumeurs LNCaP xénogreffées chez des animaux castrés a permis d'obtenir des variants résistants à la castration, en particulier les cellules C4-2 (Muss et al., 1984). Dans ces cellules CRCaP, qui sont plus agressives et invasives, la TSP1 est réexprimée fortement (Trojan et al., 2005). Cette réexpression de la TSP1 dans les tumeurs CRCaP suggère que à ce stade les effets pro-tumoraux de la TSP1 outrepassent ses effets antiangiogéniques ou que ceux-ci soient devenus inactifs. L'étude de cette question fait l'objet de la deuxième partie du travail présenté dans la partie résultats.

IV. L'axe CXCR4 / SDF-1

Le récepteur CXCR4 a été cloné en 1993 par plusieurs équipes en tant que récepteur orphelin aux chimiokines et fut nommé LESTR ou fusin (Loetscher et al., 1994). En 1996, il a été identifié comme un co-facteur essentiel d'entrée du VIH-1 et VIH-2 sur les lymphocytes T CD4⁺ (Deng et al., 1996 ; Doranz et al., 1996 ; Feng et al., 1996). Ce n'est que lorsque son ligand biologique, le SDF1 ou CXCL12, a été identifié, qu'il a été reclassé comme un récepteur de chimiokine et renommé CXCR4 (Bleul et al., 1996a ; Oberlin et al., 1996). Son expression membranaire est décrite sur la plupart des leucocytes (Hori et al., 1998). Cependant, à la différence des autres récepteurs des chimiokines, il est exprimé dans de nombreux autres tissus et aurait notamment un rôle physiologique essentiel dans le développement, l'organogénèse, l'hématopoïèse et la vascularisation (Ma et al., 1998 ; Zhou et al., 1998). Enfin, il est exprimé dans la plupart des cancers (Balkwill, 2004) dont le cancer de la prostate.

IV.1. CXCR4

IV.1.a Structure

Le récepteur CXCR4 est un récepteur à 7 domaines transmembranaires. Il possède 3 boucles extracellulaires (BEC) et un domaine amino-terminal (N-ter) où s'effectue la liaison du ligand (principalement sur le domaine N-ter et la seconde boucle (BEC II)). Les 3 boucles intracellulaires (BIC) sont responsables de l'activation des voies de signalisation (2), et le domaine carboxy-terminal (C-ter) est impliqué dans la désensibilisation du récepteur.

CXCR4 peut s'assembler en homo-complexes et avec d'autres récepteurs aux chimiokines, notamment CCR2. Elle peut aussi se dimériser (Wu et al., 2010), l'interface de dimérisation impliquant le côté extracellulaire des hélices V et VI (figure 17). L'association en dimère serait due majoritairement à des interactions hydrophobes impliquant une dizaine de résidus

dans ces deux TM mais aussi la boucle extracellulaire e2. Cette nouvelle conformation permettrait peut-être la fixation de nouveaux ligands (Wu et al., 2010).

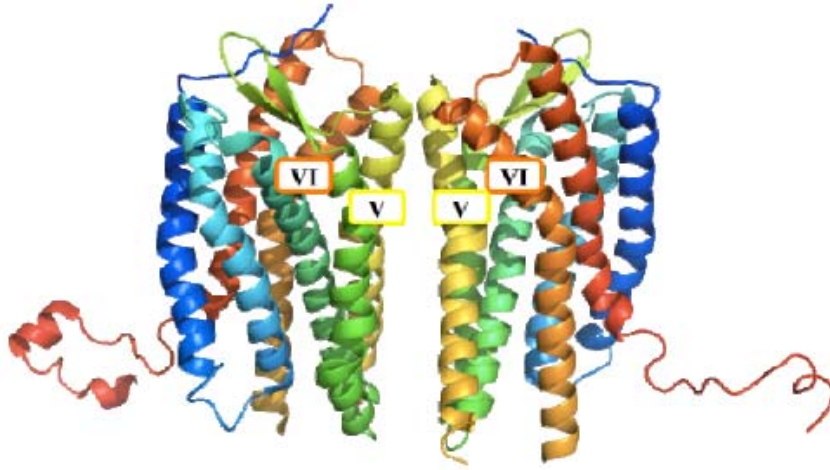


Figure 17 : Représentation schématique du dimère CXCR4 (adapté de Busillo et al, 2010).

IV.1.b Régulation

Régulation transcriptionnelle de CXCR4

Bien que la région promotrice du gène CXCR4 contienne un grand nombre de séquences consensus de régulation, le contrôle de la transcription se fait surtout par l'action opposée de 2 principaux régulateurs : NRF-1 (Nuclear respiratory factor-1) en association avec SP-1 (Specificity protein 1) régule positivement la transcription (Wegner et al., 1998) alors que la régulation négative se fait par le biais de YY1 (Ying Yang 1) (Moriuchi et al., 1999).

L'expression de CXCR4 peut être augmentée par les seconds messagers intracellulaires comme le calcium (Moriuchi et al., 1997), l'AMPc (Cristillo et al., 2002) ou par certaines cytokines (IL-2, IL-4, IL-7, IL-10, IL-15 TGF- β , β FGF, VEGF et EGF). Les cytokines pro-inflammatoires comme le TNF α , l'INF- γ et l'IL-1 β diminuent quant à elles l'expression de ce récepteur (Busillo and Benovic, 2007). L'expression de CXCR4 est aussi induite par HIF-1 (Hirota and Semenza, 2006).

Régulation de l'expression de la protéine CXCR4

De nombreuses modifications post-traductionnelles contribuent à l'expression et à la fonction de CXCR4. Parmi celles-ci, on peut noter la glycosylation (Berson JF et al., 1996). D'autre part, CXCR4 subit la sulfatation de trois tyrosines présentes dans sa partie extracellulaire: Tyr7, Tyr12 et Tyr21 (Tyr21 étant la plus touchée par ce processus (Farzan et al., 2002) (Vila-Coro et al., 1999).

IV.2. Le ligand SDF-1

La chimiokine SDF-1 (CXCL12) est le seul ligand physiologique connu de CXCR4. Elle a été isolée à partir de cellules stromales issues de la moelle osseuse. La fonction qui lui a été à l'époque attribuée était le support de la prolifération des progéniteurs des lymphocytes B en présence d'interleukine-7 (IL7) (Nagasawa et al., 1994).

SDF-1 est exprimée constitutivement dans un nombre élevé de tissus. Son expression ne dépend donc pas de stimuli pro inflammatoires à la différence des autres chimiokines connues (Bleul et al., 1996b ; Nagasawa et al., 1994).

Deux isoformes liant le récepteur CXCR4 avec une affinité similaire d'environ 10nM (Hesseltger and Horuk, 1999) sont classiquement décrites; SDF-1 α est constitué de 68 résidus et SDF-1 β de 72 résidus par extension de 4 résidus sur son extrémité C-terminale (Shirozu et al., 1995).

SDF1 présente une structure tridimensionnelle en clé grecque classique des chimiokines; l'extrémité N-terminale désordonnée est suivie par une longue boucle (boucle N), un feuillet β à trois brins antiparallèles puis un domaine C-terminal en hélice α . Deux ponts disulfures relient la boucle N aux brins β 2 et β 3 (Crump et al., 1997). Les sites de liaison au récepteur se situeraient principalement sur les 17 premiers acides aminés de la portion N-terminale.

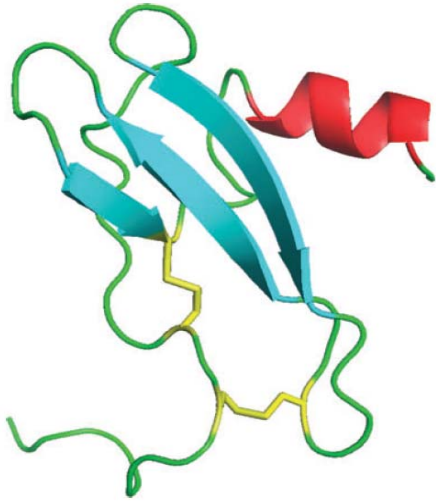


Figure 18: structure tridimensionnelle de SDF-1. Les 2 ponts disulfures (Cys11-Cys50 et Cys9-Cys-34) sont schématisés en jaune.

IV.3. Liaison de SDF-1 par CXCR4 et signalisation intra-cellulaire

IV.3.a Liaison de SDF-1 par CXCR4

La portion N-terminale de CXCR4 est impliquée dans la liaison de SDF-1 selon un mécanisme en deux étapes; l'interaction initiale entre les résidus 12 à 17 de SDF-1 et 2 à 36 de CXCR4 provoquerait un changement de conformation du récepteur (Huang et al., 2003) qui faciliterait l'interaction entre les huit premiers acides aminés de SDF-1 et les boucles extracellulaires e2 (Asp187) et e3 (Glu268) de CXCR4.

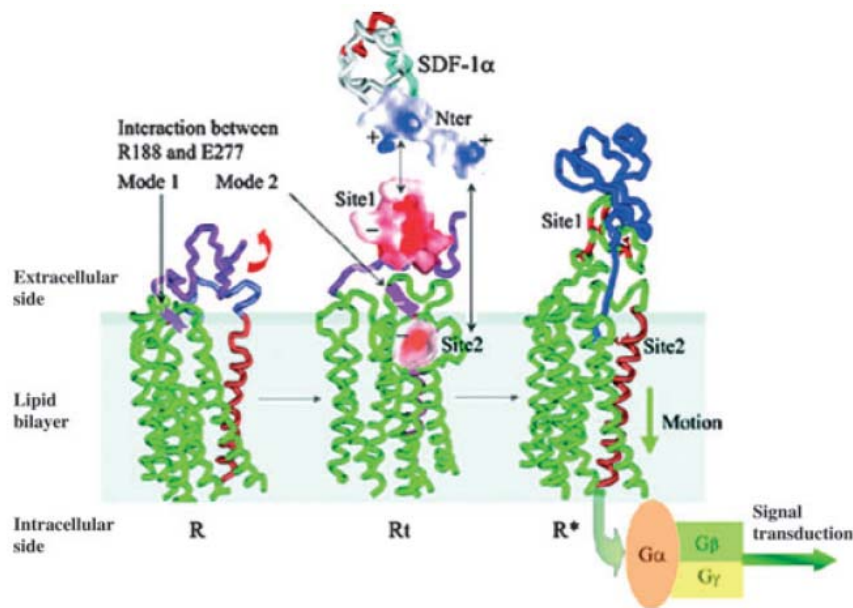


Figure 19: schématisation de l'interaction entre CXCR4 et SDF-1.

(R) CXCR4 à l'état natif avant l'interaction.

(Rt) La portion N-terminale de SDF-1, chargée positivement (en bleu), interagit successivement avec la partie N-terminale de CXCR4, chargée négativement (en rouge) au niveau du site 1, puis avec le domaine transmembranaire chargé négativement au niveau du site 2.

(R*) Cette interaction en 2 temps conduit à une modification conformationnelle de CXCR4, le récepteur étant alors dans un état activé (Huang et al., 2003).

IV.3.b Voies de signalisation

La fixation de SDF-1 à CXCR4 conduit à l'activation de signaux dépendants ou non des protéines G hétérotrimériques. Ces signaux peuvent influencer la cellule à migrer en réponse à la chimiokine, ou à produire d'autres facteurs de transcription permettant sa prolifération et/ou sa survie.

Voies dépendantes des protéines G

Les protéines G sont composées de 3 sous-unités α , β et γ . En absence de fixation de la chimiokine au récepteur, elles sont inactives. La fixation de CXCL12 à son récepteur entraîne

un changement de conformation de la protéine G. Cette protéine se fixe alors au récepteur, ce qui provoque son clivage. Les sous-unités β et γ associées vont ensuite activer la phospholipase C (PLC) (Busillo and Benovic, 2007), premier maillon des voies d'activation dépendantes du calcium, et la voie d'activation de la PI3-kinase (Phosphoinositide-3 kinase) qui passe par les MAPK (Mitogen-activated protein kinase) Erk1 et Erk2 (Ganju et al., 1998 ; Sotsios et al., 1999). De son côté, la sous-unité α active les tyrosines kinases de la famille Src (Busillo and Benovic, 2007).

Voies indépendantes des protéines G

La fixation de SDF-1 sur son récepteur permet la phosphorylation de JAK2 et JAK3, ce qui induit leur association avec CXCR4 et leur activation (Vila-Coro et al., 1999), entraînant l'activation de la voie STAT (Zhang et al., 2001).

Une seconde voie indépendante des protéines G passe par les β -arrestines (β -arr). Les β -arr (β -arr2 et β -arr3) sont impliquées dans l'internalisation du récepteur mais peuvent aussi induire leur propre cascade de signalisation (Fong et al., 2002) : ainsi, la β -arr2 et la β -arr3 améliorent l'activation de CXCR4 qui passe par ERK (Cheng et al., 2000) et la β -arr3 est plus particulièrement impliquée dans l'activation de la kinase p38 MAPK et dans la stimulation de la migration en réponse à SDF-1 (Sun et al., 2002).

IV.4. Autres ligands de CXCR4 – Autres récepteurs de SDF-1

De manière générale, les chimiokines se lient souvent à plusieurs récepteurs et un récepteur lie plusieurs chimiokines. SDF-1 et CXCR4 étaient jusqu'à récemment considérés comme une exception à la règle (Broxmeyer et al., 2005 ; Nagasawa et al., 1996), car spécifiques l'un de l'autre.

Toutefois, CXCR7 a été récemment décrit comme liant SDF-1 (Balabanian et al., 2005). CXCR7 est surtout exprimé par les cellules tumorales et les vaisseaux associés aux tumeurs, en particulier dans le cancer de la prostate (Wang et al., 2008). L'interaction de SDF-1 et CXCR7 a un effet prolifératif. De plus, l'expression de CXCR7 serait associée à l'agressivité tumorale chez les patients ayant un cancer de la prostate (Wang et al., 2008).

Enfin, un autre ligand, le MIF (Migration Inhibitory Factor), lie à la fois CXCR2 et CXCR4, et semble jouer un rôle critique dans l'athérogenèse et certaines maladies inflammatoires (Bernhagen et al., 2007).

IV.4.Fonctions de l'axe CXCR4 / SDF-1

IV.4.1. Fonctions physiologiques

Hématopoïèse

Des modèles de souris invalidées pour CXCR4 ou CXCL12 ont démontré que le couple est très largement impliqué dans l'hématopoïèse. L'invalidation du gène de CXCL12 ou de CXCR4 a mis en évidence que cette chimiokine est un facteur essentiel dans le déroulement de la lymphopoïèse B et de la myélopoïèse anténatale (Ma et al., 1998 ; Takahama, 2006). Le couple CXCL12/CXCR4 est aussi essentiel dans la domiciliation et la rétention des cellules hématopoïétiques dans le foie foetal puis dans la moelle osseuse adulte (Lee et al., 2002 ; Ma et al., 1999).

Trafic leucocytaire

SDF-1 et CXCR4 contribuent à la migration des LT et des LB (Okada et al., 2002), en orchestrant la domiciliation, la maturation et la différenciation des LB dans la rate et les ganglions (Allen et al., 2004 ; Chan et al., 2009 ; Henderson et al., 2010 ; Nie et al., 2004 ; Okada et al., 2002). Ils orientent les cellules productrices d'anticorps vers les tissus lymphoïdes (Hargreaves et al., 2001 ; Kabashima et al., 2006 ; Nakayama et al., 2003) et les LT naïfs vers les ganglions lymphoïdes et les plaques de Peyer (Bai et al., 2009).

IV.4.2. Processus pathologiques

Processus inflammatoires

SDF-1/CXCR4 participe à des processus pathologiques périphériques : il régule, par exemple, l'accumulation de LT dans les tissus rhumatoïdes sinoviaux dans la polyarthrite rhumatoïde (Buckley et al., 2000). Il participe à la formation d'infiltrats inflammatoires de neutrophiles ou de lymphocytes dans le rein en cas du lupus (Wang et al., 2009a), ou dans le foie en cas l'hépatite C (Wald et al., 2004). Le couple SDF-1/CXCR4 pourrait aussi être impliqué dans l'asthme : la neutralisation de CXCR4 diminue significativement l'hyperéosinophilie pulmonaire dans un modèle murin d'allergie des voies respiratoires (Gonzalo et al., 2000).

Infection par le VIH

Le récepteur CXCR4 a été identifié comme un co-facteur essentiel d'entrée du VIH-1 et VIH-2 sur les lymphocytes T ou macrophages CD4+ (Feng et al., 1996). L'interaction du VIH avec la protéine CD4 à la surface de la cellule permet certes l'attachement du virus, mais cette interaction n'est toutefois pas suffisante pour assurer la pénétration/fusion dans la cellule cible. La fusion dépend de l'expression de corécepteurs membranaires, et en particulier des récepteurs CCR5 et CXCR4.

Processus tumoraux

L'axe CXCR4-SDF-1 a été impliqué dans l'invasion locale et à distance de multiples cancers. Plus spécifiquement, CXCR4-SDF-1 jouent un rôle critique dans la détermination de la destination métastatique des cellules tumorales dans de nombreux cancers, et plus particulièrement les cancers du sein (Liotta, 2001) et de la prostate (Akashi et al., 2008).

Localement, dans l'environnement tumoral immédiat, l'activation de CXCR4 stimule la production de métalloprotéases, qui augmentent la capacité des cellules tumorales à sortir du site primaire de tumeur (Fernandis et al., 2004 ; S and S, 2000 ; Samara et al., 2004). De plus, SDF-1 est capable d'améliorer l'activité des intégrines (Campbell et al., 1998) et ainsi de faciliter l'adhésion des cellules tumorales à l'endothélium.

IV.5. CXCR4 et adénocarcinome prostatique

CXCR4 est régulé par le récepteur aux androgènes

Il a été montré que l'expression ARN de CXCR4 était sous le contrôle négatif du récepteur aux androgènes dans la lignée cellulaire de cancer de la prostate DU-145 (Akashi et al., 2006). Les cellules DU-145/AR- exprimaient l'ARNm de CXCR4 à un niveau significativement plus élevé que les cellules DU-145/AR+. De plus, la présence de SDF-1 entraînait une migration des cellules DU-145/AR-, alors qu'elle n'avait pas d'effet sur les cellules DU-145/AR+. Les auteurs ont conclu que ce phénomène de régulation négative pourrait expliquer, du moins en partie, l'augmentation du potentiel invasif des cellules tumorales résistantes à la castration (hormono-indépendantes) n'exprimant pas l'AR. Les cellules exprimant l'AR ont en effet un phénotype plus différencié et un potentiel invasif moins important.

CXCR4 et SDF-1 sont régulés par l'hypoxie

Un mécanisme important régulant le potentiel métastatique des tumeurs en général est l'hypoxie. Chez les patients ayant un cancer de la prostate, l'hypoxie tumorale a été associée à un moins bon pronostic après traitement par radiothérapie externe. La réponse tumorale à l'hypoxie est un phénomène bien documenté, et mis récemment en cause dans les mécanismes potentiels d'échappement tumoral sous traitement antiangiogénique (Ebos et al., 2009 ; Paez-Ribes et al., 2009). Dans une étude récente, Dai et al ont évalué la réponse à l'hypoxie de 3 lignées tumorales de prostate, PC-3, DU145 et LnCaP. L'exposition de ces cellules à une hypoxie (1% d'oxygène) induisait une augmentation de leurs capacités migratoires et invasives (Dai et al., 2011). Les cellules tumorales peuvent en effet échapper aux effets toxiques de l'hypoxie en migrant hors de la zone tumorale. Ce processus a aussi été observé dans d'autres situations que le cancer, notamment dans les lésions athérosclérotiques (Osada-Oka et al., 2008b) ou les sclérodermies systémiques (Distler et al., 2007). Chez les patients ayant un cancer, la progression naturelle du cancer entraîne le développement spontané de zones hypoxiques, ce qui contribue à stimuler la dissémination métastatique. Dans des modèles expérimentaux, il a été montré récemment que le traitement de souris porteuses de tumeurs par différents inhibiteurs de l'angiogenèse conduisait à une augmentation de

l'invasion tumorale et/ou de la dissémination métastatique (Ebos et al., 2009 ; Paez-Ribes et al., 2009) (Loges 2009).

Plusieurs études (Scheurer et al., 2004; Schioppa et al., 2003) réalisées avec des cellules normales ou tumorales ont rapporté que l'hypoxie induisait l'expression de CXCR4. À partir de ces données, une équipe s'est intéressée au rôle du gène VHL dans la régulation de CXCR4 (Staller et al., 2003). Les résultats ont montré que la suppression de VHL induisait l'hyperexpression de CXCR4. Cette hyperexpression était médiée notamment par HIF-1. Une autre étude (Bachelder et al., 2002) a rapporté que l'expression de CXCR4 pourrait être régulée par le VEGF selon une boucle autocrine. Enfin, les capacités migratoires de plusieurs lignées tumorales prostatiques soumises à l'hypoxie sont atténuées après traitement par un inhibiteur de HIF-1 (YC-1) (Dai et al., 2011). Au total, il existe des résultats concordants qui suggèrent que l'expression de CXCR4 est régulée par les gènes impliqués dans la réponse à l'hypoxie, et associée à une augmentation de la migration cellulaire tumorale.

Rôle dans l'invasion locale des tumeurs prostatiques

a) SDF-1 / CXCR4 et dégradation de la matrice extra-cellulaire

Il a été rapporté sur plusieurs modèles tumoraux et non tumoraux que l'axe SDF-1 / CXCR4 régulait positivement l'activité de plusieurs métalloprotéases (Chinni et al., 2006 ; Zhang et al., 2008). Ces enzymes ont une activité de dégradation de la matrice extra-cellulaire et de la membrane basale, participant donc à la migration cellulaire en son sein. En cas de cancer, ces métalloprotéases ont un rôle crucial dans l'invasion du tissu conjonctif par les cellules tumorales.

La régulation des métalloprotéases par l'axe SDF-1/CXCR4 a été étudiée sur les lignées tumorales prostatiques LnCaP et PC3 (Singh et al., 2004). Ces auteurs ont montré que l'interaction de SDF-1 avec CXCR4 entraînait une augmentation de la collagenase-1 (métalloproteinase-1 ou MMP-1) et de la MMP-2 par ces cellules. L'expression de la MMP-9 et de la stromelysin-1 (MMP-3) n'était augmentée que dans les cellules PC3, alors que celle des stromelysin-2 et 3 (MMP-10 et 11) n'était augmentée que dans les cellules LnCaP.

L'ensemble de ces observations souligne donc le rôle pivot de l'axe SDF-1/CXCR4 dans la dégradation de la matrice extra-cellulaire.

b) SDF-1 / CXCR4 et transition épithélio-mésenchymateuse

Dans la plupart des cancers, la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) a été rapportée comme une des étapes initiales de l'invasion tumorale (Cardiff, 2005; Wu and Zhou, 2008). Il s'agit d'un processus dynamique au cours duquel les cellules perdent leurs caractéristiques épithéliales et développent des propriétés mésenchymateuses. Ceci requiert des modifications architecturales et fonctionnelles complexes. La transition d'un phénotype à un autre recouvre un large spectre de modifications inter- et intracellulaires rarement observé en totalité. Les cellules ayant subi la TEM acquièrent de nouvelles capacités, entre autres la motilité et la production de facteurs pro-invasifs. Elles perdent leurs caractéristiques épithéliales telles que les jonctions cellule-cellule, l'organisation du cytosquelette d'actine et la distribution polarisée des organites intracellulaires (Jeanes et al., 2008).

La TEM est associée à un changement du programme génétique conduisant à l'extinction de marqueurs épithéliaux au profit de la synthèse de protéines caractéristiques de cellules mésenchymateuses. Les marqueurs communément utilisés afin de caractériser le processus de TEM dans un tissu ou des cellules en culture incluent :

-la perte de l'E-cadhérine au profit d'une augmentation de la N-cadhérine. La N-cadhérine est impliquée dans la formation des jonctions inter-cellulaires dans le tissu nerveux, mais est aussi spécifique des cellules mésenchymateuses (Cano et al., 2000 ; Vleminckx et al., 1991). La perte de l'E-cadhérine a été associée à l'agressivité tumorale (Cheng et al., 2001; Junghans et al., 2005).

-l'expression de certains facteurs de transcription tels que Snail1, Slug (Snail2), Twist, ZEB1, ZEB2 et E47, qui peuvent inhiber la transcription de l'E-cadhérine (Lee et al., 2006).

-la relocalisation nucléaire de la β -caténine. La fonction de la β -caténine dépend de sa localisation subcellulaire. Dans une cellule épithéliale, elle est sous-membranaire du fait de son interaction physique avec l'E-cadhérine au niveau des jonctions adhérentes. Par contre, dans une cellule mésenchymateuse, elle est dissociée des jonctions par la perte de l'expression

de l'E-cadhérine. Elle se retrouve alors dans le cytoplasme. A ce niveau, la β -caténine peut être soit dégradée suite à sa phosphorylation par la kinase GS3K, soit transloquée dans le noyau, où elle s'associe avec les co-facteurs de transcription LEF/TCF afin d'induire ou de réprimer l'expression des gènes cibles (Luo and Lin, 2004). La dégradation ou la translocation nucléaire de la β -caténine dépendrait de la voie de signalisation Wnt. Cette voie dépend des récepteurs membranaires « frizzled » qui transmettent le signal à une protéine cytoplasmique (Dvl) inhibant l'activité de la kinase GS3K. En présence du signal Wnt, la β -caténine sera donc transloquée dans le noyau. Ainsi, en plus de ses propriétés adhésives, le complexe E-cadhérine/ β -caténine joue un rôle dans la voie de signalisation Wnt, et la transcription de gènes cibles impliqués dans la prolifération cellulaire. Dans le cancer de la prostate, une augmentation de la β -caténine cytoplasmique et /ou nucléaire a été rapportée dans de multiples études (de la Taille et al., 2003), et a été associée à la progression tumorale.

Un lien direct entre l'axe SDF-1/CXCR4, la TEM a été récemment observé in vitro sur des lignées tumorales coliques. Dans une étude récente, Wang et al ont montré sur la lignée HT29 que SDF-1 régula négativement la formation du complexe E-cadhérine/ β -caténine (Wang et al., 2011). En effet, SDF-1 entraînait une diminution de l'expression ARNm de la E-cadhérine et de la β -caténine, ainsi qu'une augmentation de la phosphorylation de la β -caténine, augmentant sa dégradation. Ces effets étaient annulés par AMD3100, qui est un antagoniste de CXCR4. Ces observations suggèrent que l'axe CXCR4 participe à la TEM. Il n'existe pas en revanche à notre connaissance d'observations similaires sur des lignées cellulaires de cancer de la prostate.

Rôle dans la nidation métastatique des tumeurs prostatiques

En plus de son rôle initial dans le processus d'invasion tumorale locale, il a été montré que l'axe CXCR4/SDF-1 jouait un rôle majeur dans les dernières étapes de la prolifération métastatiques dans de nombreux cancers, tels que le cancer du sein (Sacanna et al., 2011) et de la prostate (Taichman et al., 2002), mais aussi le cancer du rein (Pan et al., 2006), de l'ovaire (Scotton et al., 2002) et du poumon (Phillips et al., 2003). Dans ces processus tumoraux, la chimiotaxie permise par l'axe CXCR4-SDF est détournée de son rôle

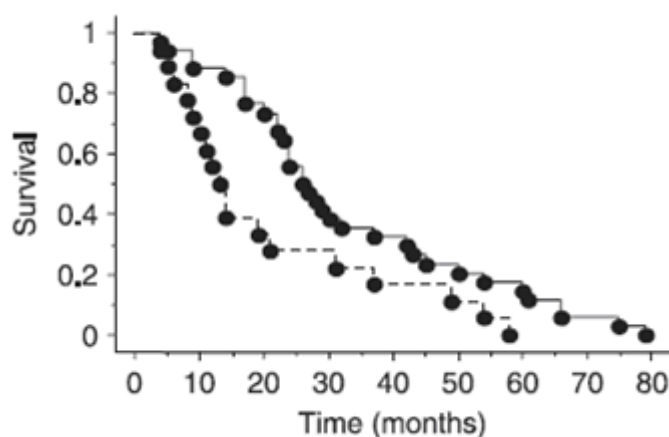
physiologique par les cellules tumorales pour générer des métastases à distance. Les cellules surexprimant CXCR4 vont préférentiellement migrer vers les organes secondaires présentant les plus fortes concentrations de SDF-1 (Muller et al., 2001).

Rôle pronostique de CXCR4 dans le cancer de la prostate

Le rôle de CXCR4 en tant que marqueur tissulaire pronostique a été étudié chez les patients atteints de cancer, notamment en cas de mélanome (Scala et al., 2005), de cancer pulmonaire (Spano et al., 2004), ovarien (Jiang et al., 2006), ou de cancer de l'oesophage (Koishi et al., 2006). Chez les patients ayant un cancer de la prostate, uniquement quelques études (Akashi et al., 2008 ; Okera et al., 2011) ont suggéré que l'expression tissulaire de CXCR4 était associée au pronostic, avec néanmoins des résultats controversés.

-Chez les patients ayant un cancer métastatique (Akashi et al., 2008)

A notre connaissance, une seule étude a évalué l'expression tissulaire tumorale de CXCR4 chez les patients ayant un cancer de la prostate métastatique (Akashi et al., 2008). Dans cette étude, les auteurs ont évalué l'expression tissulaire de CXCR4 par immunohistochimie sur du matériel biopsique de patients ayant un cancer métastatique osseux traité par suppression androgénique. Une expression tissulaire tumorale de CXCR4 a été détectée chez 94% des patients. Elle n'était pas associée au stade tumoral, au score de Gleason, à l'étendue de l'atteinte métastatique osseuse ou à la réponse au traitement hormonale. Néanmoins, les patients ayant un cancer exprimant fortement CXCR4 avaient une survie spécifique significativement plus faible ($p=0,0329$; 95% CI 0,284–0,948).



Survie spécifique en fonction de l'expression tissulaire de CXCR4.
 -Ligne continue: expression faible ou nulle (n=34).
 -Ligne discontinue: expression élevée (n=18).

Figure 20: survie spécifique en fonction de l'expression tumorale de CXCR4 (adapté de (Akashi et al., 2008))

-Chez les patients ayant un cancer localisé (Cookson et al., 2007) :

Dans l'étude d'Okera et al (Okera et al., 2011), les données de 63 patients ayant un cancer localisé ou localement avancé de la prostate traités par prostatectomie radicale ont été rétrospectivement collectées. Parmi eux, 50 patients avaient un cancer de stade T3 et 47 patients avaient un cancer de score de Gleason $>3+3$. Le suivi médian était de 6,4 ans. L'expression tissulaire de CXCR4 sur pièce de prostatectomie radicale a été évaluée par immunohistochimie (score d'intensité allant de 0 à 3). L'intensité du marquage immunohistochimique n'était pas associé au stade tumoral ni au score de Gleason. L'analyse de Kaplan-Meier n'a pas montré de différence significative de survie sans récurrence (HR = 1,08 (0,65-1,79) et $p=0,77$) ou de survie globale (HR = 1,46 (0,85-2,51) et $p=0,17$) entre les patients ayant un marquage tissulaire fort (2 ou 3) et ceux ayant un marquage faible ou une absence de marquage.

Dans l'étude de Jung et al (Jung et al., 2011), 57 patients ayant un cancer cliniquement localisé de la prostate ont été traités par prostatectomie radicale. L'expression tissulaire de CXCR4 a été évaluée de la même manière que dans la précédente étude. L'analyse anatomopathologique des pièces opératoires a montré un stade pT3 chez 8 patients, et un score de Gleason $>3+3$ chez 33 patients. Le suivi moyen était de 39 mois [12-112]. L'intensité du marquage tissulaire pour CXCR4 n'était pas associée au PSA préopératoire, au stade pathologique, au score de Gleason, ou à la récurrence biologique. Néanmoins, les auteurs

ont rapporté une association statistiquement significative avec la récurrence locale ($p=0,040$) et métastatique ($p=0,041$). Dans cette étude, les auteurs n'ont néanmoins pas clairement défini le type de récurrence, ce qui pourrait constituer un biais d'interprétation. En effet, les outils permettant de distinguer récurrence locale et métastatique sont peu fiables, surtout lorsque le suivi est court.

OBJECTIFS

Dans la première partie de ma thèse je me suis intéressé aux mécanismes qui régulent l'activité du récepteur des androgènes dans les cancers prostatiques. J'ai contribué à une étude portant sur l'identification de partenaires protéiques d'AR qui modulent son expression. Nous nous sommes en particulier intéressés à l'interaction entre AR et l'enzyme de biosynthèse de pyrimidines, CAD, cette interaction régulant la localisation nucléaire d'AR.

La deuxième partie de ma thèse a concerné l'étude du rôle de la **TSP1** au cours de la progression tumorale prostatique métastatique. Nous avons voulu explorer le rôle de la TSP1 dans les cancers résistant à la castration. De plus, nous nous sommes intéressés aux mécanismes de régulation de la TSP1 dans ces cancers, notamment par l'hypoxie et par les canaux calciques. Enfin, nous avons évalué la valeur pronostique de la TSP1 chez des patients atteints de cancer de la prostate. Au cours de ce travail, nous avons montré que l'expression de la TSP1 dans les cellules tumorales prostatiques favorise la migration de ces cellules d'une part et est induite par l'hypoxie d'autre part. Ceci nous a ensuite conduits à rechercher d'autres facteurs stimulateurs de la migration qui soient induits par l'hypoxie dans les cancers de la prostate.

La troisième partie de ma thèse a donc concerné l'étude du rôle de l'axe **CXCR4/SDF1** dans la progression locale du cancer de la prostate. Pour mieux comprendre l'implication de CXCR4 et SDF1 dans la progression locale de ce cancer, nous avons évalué leur expression tissulaire prostatique dans différentes localisations intra-glandulaires : au centre des tumeurs, au niveau du front tumoral, du tissu péri-tumoral contigu et du tissu glandulaire distant de la tumeur. Enfin, pour évaluer l'implication de l'axe CXCR4-SDF1 dans la transition épithélio-mésenchymateuse, nous avons évalué la co-expression de la **β-caténine** et de l'**E-cadhérine** au niveau des mêmes localisations tissulaires.

RESULTAT 1

Régulation du récepteur aux androgènes par CAD dans le cancer de la prostate

INTRODUCTION

Parmi les mécanismes de résistance aux thérapies hormonales, il a été proposé que des modifications dans l'expression ou l'interaction des cofacteurs d'AR pourraient permettre l'activation du récepteur en présence de très faibles taux d'hormones, ou en présence d'anti-androgènes (Chmelar et al., 2007).

Nous avons identifié au laboratoire des composants du complexe protéique lié au récepteur des androgènes dans des cellules hormono-résistantes. Afin de reproduire au mieux les voies de signalisation paracrine et endocrines régulant les carcinomes prostatiques *in vivo*, nous avons utilisé une approche originale d'immunopurification sur des tumeurs xénogreffées. Cette technique a permis l'identification de plusieurs nouveaux cofacteurs d'AR, dont l'enzyme multifonctionnelle CAD. Partant de ce résultat, nous avons évalué si la liaison de CAD était nécessaire à l'activité transcriptionnelle d'AR et par quel mécanisme. Enfin, nous avons recherché si l'inhibition de CAD, *in vitro* et *in vivo*, avait un effet sur la croissance des tumeurs prostatiques.

Identification of CAD as an androgen receptor interactant and an early marker of prostate tumor recurrence

Aurélie Morin,^{*} Lauriane Fritsch,[†] Jacques R. R. Mathieu,^{*} Cristèle Gilbert,^{*} Basma Guarmit,[‡] Virginie Firlej,^{*} Catherine Gallou-Kabani,[§] Annick Vieillefond,^{||} Nicolas Barry Delongchamps,^{*,||} and Florence Cabon^{*,§,1}

^{*}Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), FRE3239, University of Paris Sud, Villejuif, France; [†]CNRS, Unité Mixte de Recherche (UMR) 7216, University of Paris Diderot, Paris, France; [‡]Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U895, Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire, Nice, France; [§]SeleXel, Toulouse, France; and ^{||}Department of Urology and Pathology, Cochin Hospital, Paris Descartes University, Paris, France

ABSTRACT Markers of prostate tumor recurrence after radical prostatectomy are lacking and highly demanded. The androgen receptor (AR) is a nuclear receptor that plays a pivotal role in normal and cancerous prostate tissue. AR interacts with a number of proteins modulating its stability, localization, and activity. To test the hypothesis that an increased expression of AR partners might foster tumor development, we immunopurified AR partners in human tumors xenografted into mice. One of the identified AR partners was the multifunctional enzyme carbamoyl-phosphate synthetase II, aspartate transcarbamylase, and dihydroorotase (CAD), which catalyzes the 3 initial steps of pyrimidine biosynthesis. We combined experiments in C4-2, LNCaP, 22RV1, and PC3 human prostate cell lines and analysis of frozen radical prostatectomy samples to study the CAD-AR interaction. We show here that in prostate tumor cells, CAD fosters AR translocation into the nucleus and stimulates its transcriptional activity. Notably, in radical prostatectomy specimens, CAD expression was not correlated with proliferation markers, but a higher CAD mRNA level was associated with local tumor extension ($P=0.049$) and cancer relapse ($P=0.017$). These results demonstrate an unsuspected function for a key metabolic enzyme and identify CAD as a potential predictive marker of cancer relapse.—Morin, A., Fritsch, L., Mathieu, J. R. R., Gilbert, C., Guarmit, B., Firlej, V., Gallou-Kabani, C., Vieillefond, A., Delongchamps, N. B., Cabon, F. Identification of CAD as an androgen receptor interactant and an early marker of prostate tumor recurrence. *FASEB J.* 26, 000–000 (2012). www.fasebj.org

Key Words: *pyrimidine biosynthesis • nuclear translocation*

PROSTATE CANCER IS THE second leading cause of death by cancer in men. The growth of these tumors is initially strictly dependent on androgens that bind to the androgen receptor (AR), a ligand-activated transcription factor belonging to the nuclear receptor superfamily. AR plays a pivotal role in the normal and

cancerous prostate, regulating a large set of genes involved in cell division, apoptosis, migration, and angiogenesis. Whereas the first-line therapy for localized prostate cancer is radical prostatectomy, locally advanced or metastatic cancers are treated with castration and/or administration of AR antagonists. However, most tumors develop the capacity to grow in castration levels of androgens and eventually relapse (1, 2). The prognosis of castration-resistant prostate carcinomas (CRCaPs) is poor. At that stage of the disease, only palliative treatments are available (3). Early markers of disease aggressiveness, predictive of prostate tumor recurrence after surgery, are lacking and highly demanded.

AR interacts with a large number of proteins in the cytoplasm and in the nucleus. These interactions regulate the localization, stability, and transcriptional activity of AR. It has been proposed that alterations in the expression or binding properties of AR-interacting proteins might be involved in tumor progression and in the escape to hormonal ablation (4–7). To test this hypothesis, we purified AR partners in tumors. A variety of methods have been used to identify AR-interacting proteins, but most were performed *in vitro* or in cell culture, and no large-scale analysis of AR partners has been achieved in tumors grown *in vivo*. Yet, autocrine and paracrine signaling pathways might affect the recruitment of coregulators on AR protein (8). To identify proteins interacting with AR in the complex cellular environment of tumors and in the hormonal context of living animals, we used a double immunoprecipitation method to purify AR complexes from prostate xenografts. We identified several partners of AR that had not been previously characterized and further studied

¹ Correspondence: INSERM UMR1037, 1 avenue Jean Poulhes, 31403 Toulouse Cedex 4. E-mail: florence.cabon@inserm.fr

doi: 10.1096/fj.11-191296

This article includes supplemental data. Please visit <http://www.fasebj.org> to obtain this information.

one of them, the multifunctional enzyme carbamoyl-phosphate synthetase II, aspartate transcarbamylase, and dihydroorotase (CAD).

CAD catalyzes the first 3 steps of *de novo* pyrimidine biosynthesis (Supplemental Fig. S1). This pathway transforms glutamine into uridine monophosphate (UMP), the common precursor of all pyrimidine bases, required notably for the synthesis of nucleic acids (9). In resting cells, the basal pyrimidine synthesis mainly occurs in the cytosol. When cells are induced to proliferate, prior to entry into the S phase, a fraction of CAD translocates into the nucleus, where it is phosphorylated on Thr456 by MAP kinase, increasing CAD enzymatic activity and promoting optimal cell growth. As cells emerge from the S phase, CAD Thr456 is dephosphorylated, PKA phosphorylates CAD on Ser1406, and the pathway returns to basal activity (10). The first enzymatic activity of CAD, carbamoyl-phosphate synthetase II (CPS II), is rate limiting and is negatively regulated by UTP. UTP can also be produced independently of CAD, through the uptake of extracellular uridine. In the presence of extracellular uridine, the CPS II activity of CAD is inhibited by 95% (11), and cell proliferation then depends on uridine uptake. Dipyridamole (DPD) specifically inhibits the uridine uptake (12).

CAD expression is increased in several types of cancer (13–16). These results prompted the development of pharmacological inhibitors such as *N*-phosphonacetyl-L-aspartate (PALA), a specific inhibitor of the aspartate transcarbamylase domain of CAD that catalyzes the second reaction in the pyrimidine biosynthesis pathway. We studied here how the CAD-AR interaction affects AR transcriptional activity and analyzed CAD expression in radical prostatectomy specimens.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture and *in vitro* assays

Cells were grown in RPMI (LNCaP and C4-2), MCDB (22RV1), or DMEM (PC-3 and HeLa) medium containing 10% FCS. When stated, cells were treated for 3 d with 0.5 mM DPD (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) or 5 μ M PALA (generous gift from the Developmental Therapeutics Program, National Cancer Institute, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). *In vitro* transfection of plasmids and small interfering (si)RNA was performed using the HiPerfect reagent (Qiagen, Courtaboeuf, France). AR assays were performed as described previously (17). Cell

proliferation and viability were quantified using the MTT assay (WST-1; Roche, Meylan, France). When needed, cells were grown in androgen-free conditions using charcoal-stripped FCS (Hyclone, South Logan, UT, USA). When indicated, R1881, a synthetic specific agonist of the AR was added (0.5 nM).

siRNA

siRNAs were purchased from Sigma-Aldrich. Sequences are indicated in **Table 1**. The cont siRNA does not match any known sequences in human or mouse mRNA data banks.

Tandem affinity purification (TAP) tagging

TAP-tag experiments were achieved as described previously (18, 19). Briefly, AR was immunoprecipitated with anti-FLAG M2 antibody-conjugated agarose (Sigma-Aldrich), eluted with FLAG peptide, further affinity purified with anti-HA antibody-conjugated agarose, and eluted with HA peptide. Electrospray ionization tandem mass spectrometry was performed by the Taplin Biological Mass Spectrometry Facility (Harvard Medical School, Boston, MA, USA).

Immunoprecipitation

Cells were lysed in 50 mM Tris (pH 7.5) containing 300 mM NaCl, 0.4% Nonidet P-40, and 10 mM MgCl₂. NaCl concentration was then adjusted to 140 mM. After a preclearing step using protein G agarose (P4691; Sigma-Aldrich), proteins (10 mg) were incubated overnight with 2 μ g of either rabbit IgG (sc-2027; Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany) or antibodies raised against AR (sc-816; Santa Cruz), HA (clone 3F10; Roche) or CAD (NB100-61614; Novus, Littleton, CO; USA). Immobilized protein A/G (Ultralink 53132; Perbio, Brebières, France), saturated with BSA and salmon sperm DNA, was then added for 2 h at room temperature. Resins were then centrifuged, washed 10 times, and lysed, and denatured proteins were immunoblotted.

Nucleocytoplasmic fractionation

Cells (~8 g) were lysed in hypotonic buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.65; 1.5 mM MgCl₂, and 10 mM KCl), disrupted with a Dounce homogenizer, and centrifuged (7 min, 9000 rpm). The supernatant, representing the cytosolic fraction, was collected. The pellet, resuspended in 0.34 M sucrose buffer, was loaded on top of a 1.37 M sucrose buffer cushion and centrifuged (16,000 g, 1 h). Nuclei were collected under the sucrose cushion.

TABLE 1. Sequences of siRNAs used

siRNA	Target	Target sequence
Cont	No known sequence in human and mouse databanks	5'-UAGCAAUGACGAAUGCGUA-3'
CAD1	CAD	5'-GAUGGUGUGUUACUGACUUUU-3'
CAD2	CAD	5'-CAGCCAAGUGCUAGUAGACAA-3'
ARh	Androgen receptor	5'-UCCCCAAGCCCAUCGUAGA-3'
ARp	Androgen receptor	5'-GACUCAGCUGCCCCAUCCA-3'

Sequence of the passenger strand is shown.

Total RNA was isolated using TRIzol reagent (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). RNA were retrotranscribed using a high-capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). cDNA was quantified by real-time PCR using the Power SYBR Green PCR Master Mix in a 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Primer sequences are indicated in Supplemental Table S4.

Immunodetection

Protein detection by immunoblotting was performed using antibodies raised against AR (sc-816, Santa Cruz; or Ab1, Neomarkers, Fremont, CA, USA), CAD (NB100-61614; Novus), tubulin (DM1A; Sigma-Aldrich), paxilin (sc-5574; Santa Cruz), or HP1 α (2HP-2G9; Euromedex, Souffelweyersheim, France). Chemiluminescence revelation of Western blots was achieved with the SuperSignal west dura or west femto substrates (Perbio). Signal quantification was performed using the Chemismart (Vilber Lourmat, Marne-La-Vallée, France) apparatus and software.

Subjects

Prostate tissue samples were obtained from 38 patients who underwent radical prostatectomy. Written consent was obtained from each patient. Immediately after prostate removal, small pieces of tissues were grossly 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). Histological analysis of a frozen section was performed for each sample by the same pathologist before RNA extraction

RESULTS

CAD interacts with AR in prostate tumor cells

To identify proteins interacting with AR in tumors growing *in vivo*, we stably expressed in castration-resistant 22RV1 cells (20) a wild-type androgen receptor with 2 N-terminal tags: HA and Flag (Supplemental Fig. S2A). These cells were xenografted into nude mice, and we performed a double immunopurification of the tagged AR in tumors in low stringency conditions, as described previously for cells in culture (18, 19). Tagged-AR-interacting protein complexes were analyzed by mass spectrometry. Identified proteins corresponded to already known AR cofactors (Table 2), validating the method, and also to proteins that had never been described as associated with AR. The largest number of peptides identified by mass spectrometry was issued from CAD, a 243-kDa multifunctional enzyme mandatory for the pyrimidine biosynthesis. Coimmunoprecipitation studies confirmed the interaction of CAD with the tagged AR in 22RV1 cells, and we thus further studied the role of CAD in prostate cancer. Coimmunoprecipitation studies showed that CAD interacts with the endogenous AR protein in at least 3 prostate carcinoma cell lines expressing AR: LNCaP, C4-2, and 22RV1 (Fig. 1A). The higher proportion of CAD-AR complexes in 22RV1 as compared with LNCaP cells may result from an increased CAD expression in these cells (Supplemental Fig. S2B).

In addition to its enzymatic function, CAD regulates prostate tumor growth through an AR-dependent mechanism

We next asked whether the interaction between CAD and AR is fortuitous, or if, in addition to its enzymatic

TABLE 2. Proteins identified by mass spectrometry in AR complexes immunopurified by the TAP-tag method

Function	Accession number	Acronym	Description
Enzyme	NM_014225/NM_001009552	PP2A	Serine/threonine-protein phosphatase 2a
	NM_002046	GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
	NM_002574	PRDX1	Peroxiredoxin-1/thioredoxin-dependent peroxide reductase 2/proliferation-associated protein pag
HSP	NM_006597/NM_002155	HSP70	Heat shock protein 70 kDa
	NM_007355/NM_005348	HSP90	Heat shock protein 90 kDa
	L08069	DNJA1/HSP40	Dnaj homolog subfamily a member 1/heat shock 40 kDa protein 4
Cytoskeleton	NM_001614	Actin	Actin family (several polypeptides)
Chromatin	NM_003074	SMARCC1/BAF155	Swi/snf complex 155 kDa subunit/brg1-associated factor 155
	NM_003075	SMARCC2/BAF170	Swi/snf complex 170 kDa subunit/brg1-associated factor 170
	NM_003070	SMARCA2/hBRM	ATP-dependent helicase smarca2/swi/snf-related matrix-associated actin-dependent
	NM_003072	SMARCA4/BRG1	ATP-dependent helicase smarca4/swi/snf-related matrix-associated actin-dependent
	NM_003079	SMARCE1/BAF57	Swi/snf-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily e member 1/brg1-associated factor 57
	NM_001039619.1	PRMT5	Protein arginine n-methyltransferase 5

Only proteins previously identified as interacting with AR are shown.

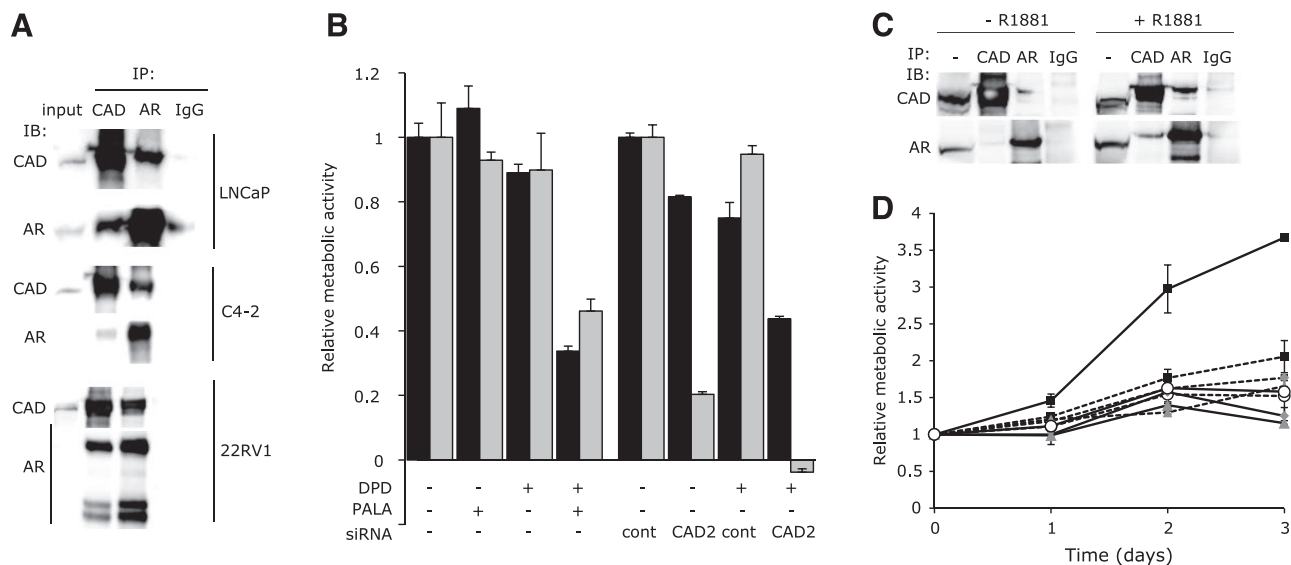


Figure 1. Dual functions of CAD in prostate cells. *A*) Endogenous CAD and AR were immunoprecipitated (IP) in total cell extracts from LNCaP, C4-2, or 22RV1 cells and detected by immunoblotting (IB). Input represents 1/200 of the material involved in the IP reaction. *B*) PC3 (black bars) and C4-2 (gray bars) cells were incubated in medium supplemented with PALA and DPD as indicated and/or transfected with the indicated siRNAs. Metabolic activity was measured on d 0 (D_0) and 3 (D_3) post-transfection in sister wells. $D_3 - D_0$ values are expressed relative to the $D_3 - D_0$ value measured in control conditions (no PALA, no DPD) set to 1 (means $\pm$ SE; $n=3$). Experiment was repeated 3 times with similar results. *C*) LNCaP cells were grown in androgen-depleted medium supplemented or not with R1881. Experience described in *A* was then repeated. *D*) Proliferation of C4-2 cells transfected with either control (solid squares), ARp (shaded diamonds), ARh (shaded triangles), or CAD2 siRNAs (open circles) and grown for 3 d in androgen-depleted medium nonsupplemented (dotted lines) or supplemented (solid lines) with R1881.

role, CAD exerts additional functions in AR-positive cells. For this purpose, we compared the effects on cell proliferation of the inhibition of CAD synthesis using 2 different CAD siRNAs (Supplemental Fig. S2C), on the one hand, and of the inhibition of CAD enzymatic activity with PALA on the other hand. In the absence of DPD, pyrimidine biosynthesis occurs through uridine uptake from the extracellular medium, allowing cell proliferation (Supplemental Fig. S1). We performed this comparison in AR-negative (PC3) and AR-positive (C4-2) prostate cell lines.

Inhibition of CAD enzymatic activity with PALA had only marginal effects on PC3 as well as C4-2 cell proliferation, unless DPD was added to the medium (Fig. 1B). Similarly, in PC3 cells, CAD silencing affected proliferation only in the presence of DPD (Fig. 1B). Similar results were obtained using a second CAD siRNA and in other AR-negative cell lines (Supplemental Fig. S2D). In sharp contrast, even in the absence of DPD, CAD silencing strongly inhibited proliferation of C4-2 cells (Fig. 1B and Supplemental Fig. S2D) as well as LNCaP and 22RV1 cells (Supplemental Fig. S2E). Addition of DPD further inhibited C4-2 cell proliferation (Fig. 1B). These results show that in addition to its enzymatic activity, CAD exerts an AR-dependent function on prostate cell proliferation.

AR-dependent function of CAD is regulated by androgens

The interaction between CAD and AR was weak in LNCaP cells grown in androgen-depleted conditions

and was stimulated by addition of R1881, a synthetic AR-specific agonist (Fig. 1C). Proliferation of C4-2 cells grown in androgen-depleted medium was stimulated by addition of R1881. As expected, cell transfection with 2 different AR siRNAs impaired this stimulation. Similarly, CAD silencing also inhibited the androgen-induced growth stimulation in C4-2 cells (Fig. 1D). These results establish that androgens do regulate the CAD-AR interaction and function.

CAD regulates AR transcriptional activity

We thus hypothesized that CAD could regulate AR transcriptional activity. To test this hypothesis, we transfected C4-2 cells with a reporter construct where a minimal TK promoter flanked by 4 androgen-responsive elements controls the luciferase expression (4xARE-luc). Cells were cotransfected with control, CAD, or AR siRNA. The reporter expression was almost completely impaired by AR silencing. Two different siRNAs targeting CAD significantly reduced AR transcriptional activity, although to a lesser extent than AR siRNA (Fig. 2A). Similar results were obtained in LNCaP, 22RV1, and PC3 cells cotransfected with a wild-type AR-expression vector (Supplemental Fig. S3A).

We then studied whether CAD silencing in C4-2 cells affected the expression of endogenous genes that are positively [prostate-specific antigen (PSA) and TMPRSS2], negatively (SRC3), or not (HP1) regulated by AR. CAD silencing very significantly reduced PSA and TMPRSS2 mRNA levels and stimulated SRC3 transcription, although slightly less efficiently

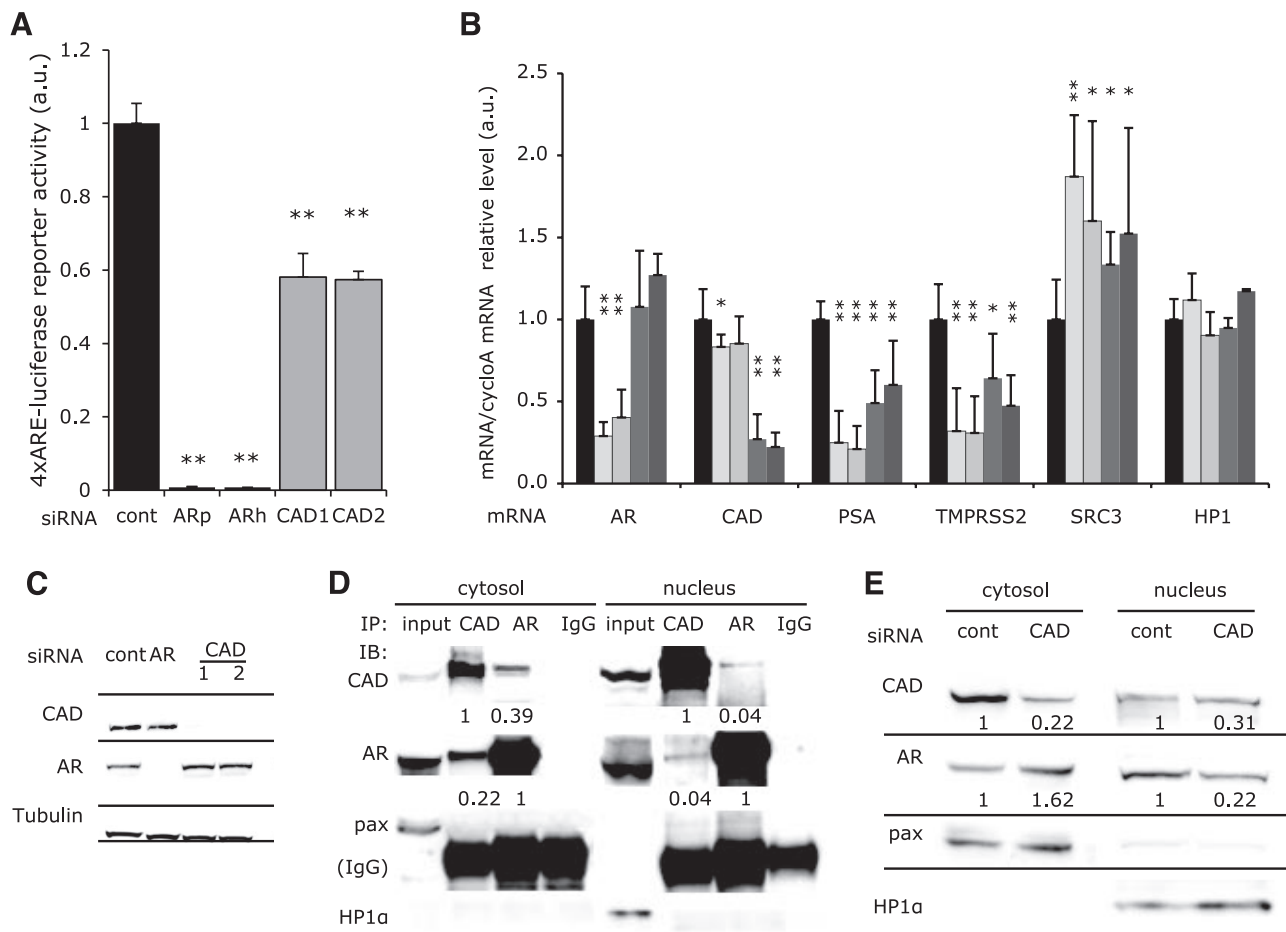


Figure 2. Function and subcellular localization of CAD-AR interactions. *A*) C4-2 cells were cotransfected with a 4xARE-Luc construct and the indicated siRNA. Relative luminometric unit (RLU) values, measured 72 h after transfection, were normalized to protein content (means $\pm$ SE; $n=3$ independent experiments). a.u., arbitrary units. *B*) AR, CAD, PSA, TMPRSS2, SRC3, and HP1 mRNA levels, normalized to cyclophilin A mRNA (means $\pm$ SE; $n=4-6$ independent experiments). Solid bars represent means of 3 different controls performed using 3 different siRNAs targeting no known mRNA; these means were set to 1 for comparison between different experiments. Left to right: bars represent mean values measured in cells transfected with ARp and ARh (light shaded bars) and CAD1 and CAD2 siRNAs (dark shaded bars), respectively. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$. *C*) Immunodetection of AR and CAD proteins in C4-2 cells transfected with ARp, CAD1, or CAD2 siRNA, as indicated. α -Tubulin was used as a loading control. *D*) CAD and AR were immunoprecipitated after a nucleocytoplasmic fractionation of C4-2 cells. Input represents 1/75 of the material involved in the reactions. Blot exposure differs between nuclear and cytosolic fractions. Relative quantification of the signals in each blot is indicated below the corresponding lanes. *E*) C4-2 cells were transfected with cont or CAD1 siRNA. After 2 d, a nucleocytoplasmic fractionation was performed. CAD and AR were immunodetected in each fraction. Quantification of the AR and CAD signals, normalized to paxilin or HP1 α signals in the cytosolic and nucleic fractions, respectively, is indicated below the corresponding lanes.

than AR silencing (Fig. 2*B*). Similar results were observed in LNCaP cells (Supplemental Fig. S3*B*). Silencing CAD or AR had no effect on HP1 mRNA level, indicating that repression of PSA and TMPRSS2 expression did not result from a nonspecific inhibition of transcription (Fig. 2*B*). The combination of PALA and DPD treatments, which inhibits cell proliferation (Fig. 1*B*), did not modify the mRNA levels of AR, CAD, or PSA in C4-2 cells (Supplemental Fig. S3*C*).

Interaction between CAD and AR occurs mainly in the cytosol and is required for AR nuclear translocation

The reduction of AR transcriptional activity in CAD-silenced cells could result from a down-regulation or a destabilization of AR. However, we did not observe a

significant modification of AR expression in CAD-silenced cells at the mRNA (Fig. 2*B*) or protein (Fig. 2*C*) levels, ruling out this hypothesis. Conversely, AR silencing did not modify CAD expression (Fig. 2*B*, *C*).

As both AR and CAD shuttle between the cytosol and the nucleus, we studied where their interaction occurs. We performed a nucleocytoplasmic fractionation of C4-2 cells, using paxilin and HP1 α as cytoplasmic and nuclear markers, respectively. We found CAD-AR complexes both in the cytosol and in the nucleus (Fig. 2*D*). However, analysis of the relative proportions of CAD and AR in the complexes demonstrated that the interaction mainly occurred in the cytosol. This result does not support the hypothesis of CAD being a component of AR complexes bound to promoters of AR-target genes. We then investigated whether CAD was involved

TABLE 3. AR and CAD mRNA levels in radical prostatectomy samples

Criteria	Nb	AR mRNA		CAD mRNA	
		Mean and range	<i>P</i>	Mean and range	<i>P</i>
All patients	38	0.58 (0.01–1.22)		0.62 (0.06–1.67)	
Age					
≥60 (49–60)	19	0.53 (0.07–0.99)	0.170	0.61 (0.06–1.67)	0.442
>60 (61–74)	19	0.62 (0.01–1.22)		0.63 (0.07–1.51)	
Gleason score					
6	7	0.64 (0.11–0.87)	0.287 ^a	0.63 (0.08–0.97)	0.400 ^a
7	25	0.57 (0.07–1.22)		0.58 (0.06–1.67)	
>7	6	0.53 (0.01–0.98)		0.77 (0.45–1.39)	
PSA before surgery (ng/ml)					
<7 (4.16–7.8)	12	0.58 (0.01–1.22)	0.379 ^c	0.66 (0.07–1.67)	0.341 ^c
7–15 (7.7–14)	16	0.55 (0.07–0.98)		0.6 (0.06–1.51)	
>15 (16–50)	10	0.62 (0.11–0.99)		0.61 (0.08–1.2)	
Clinical stage					
pT2	12	0.51 (0.07–0.87)	0.092, ^e 0.125 ^f	0.45 (0.06–0.97)	0.049, ^e 0.477 ^f
pT3a	10	0.53 (0.01–0.99)		0.7 (0.07–1.2)	
pT3b	16	0.66 (0.25–1.22)		0.71 (0.16–1.67)	
Biochemical/clinical relapse					
No; mean follow up: 48 (30–61) mo	20	0.52 (0.01–1.22)	0.105	0.52 (0.06–1.51)	0.017
Yes	9	0.66 (0.52–0.98)		0.88 (0.38–1.67)	

Values are presented as means with range in parentheses. ^aCompared with Gleason 6. ^bCompared with Gleason 7. ^cCompared with PSA < 7 ng/ml. ^dCompared with PSA (7–15). ^eCompared with pT2. ^fCompared with pT3a.

in the translocation of AR to the nucleus. Indeed, when CAD was silenced, we observed a significant reduction of AR in the nucleus and an increase in the cytoplasm (Fig. 2E), showing that CAD facilitates the nuclear translocation of AR. Similar results were observed in 22RV1 cells by immunofluorescence detection (Supplemental Fig. S3D).

CAD, but not AR, is increased in invasive and/or relapsing androgen-dependent tumors

These results prompted us to study CAD expression and localization in radical prostatectomy samples. In low-grade tumors (Gleason 2 and 3), CAD was present in the nuclei of epithelial prostate cells and weakly in the cytosol. In high-grade tumors (Gleason 4 and 5), its expression was reinforced in the nucleus and in the cytosol (Supplemental Fig. S4A). We then used qRT-PCR to quantify CAD expression and analyze whether it was associated with prostate tumor progression. We analyzed AR and CAD mRNA levels in 38 frozen radical prostatectomy specimens from patients who did not receive any radiotherapy and/or hormonal ablation treatment before surgery.

Neither CAD nor AR mRNA levels were statistically correlated with the Gleason score, the age of the patient, or serum PSA level before surgery (Table 3). In contrast, CAD, but not AR, was significantly increased in pT3a and pT3b as compared with pT2 tumors (Table 3 and Fig. 3A).

Notably, among the 38 patients included in this study, 9 experienced PSA relapse after surgery, whereas 20, followed for ≥30 mo, did not show evidence of tumor recurrence. CAD mRNA level was significantly increased in relapsing as compared with nonrelapsing

tumors ($P=0.017$; Table 3 and Fig. 3B). No such association with tumor relapse was observed for AR mRNA.

CAD is a key enzyme in the pyrimidine synthesis pathway, and we thus asked whether its increase in tumors might simply reflect an increased proliferation rate. We analyzed in the same clinical specimens the

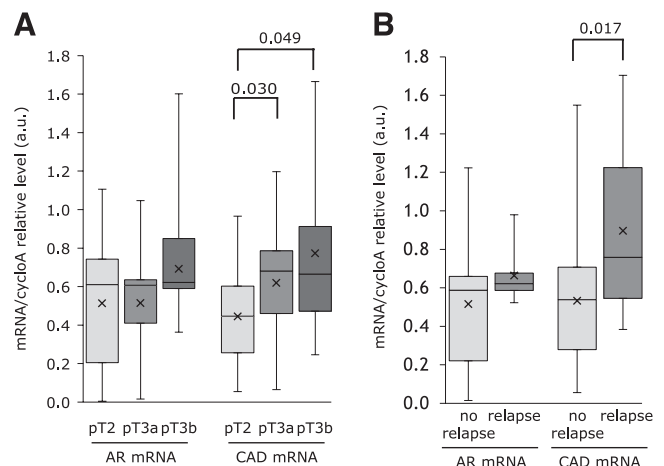


Figure 3. AR and CAD mRNA levels in radical prostatectomy specimens. AR and CAD mRNA levels, normalized to cyclophilin A mRNA level, in tumors from 38 frozen prostatectomy specimens. Error bars indicate lowest and highest value in each group; the 3 horizontal lines indicate the 25th, 50th (median), and 75th percentiles. X indicates mean value. *P* values are indicated when significant. A) mRNA expression in pT2, pT3a, and pT3b tumors. B) mRNA levels in radical prostatectomy samples of patients free of tumor relapse for ≥30 mo after surgery (no relapse) or who eventually experienced tumor recurrence.

expression of 3 different markers of proliferation: KI67, topoisomerase II α , and TPX2 (21). There was no significant association between any of these markers and CAD expression (Supplemental Fig. S4B–G). These results show that the CAD increase in invasive tumors, and in tumors that will eventually relapse, is not associated with proliferation.

These results first establish that the CAD increase in tumors occurs while the AR expression remains unchanged. They also show that a higher CAD expression in tumors is associated with locally advanced and high-grade diseases and with disease recurrence after radical prostatectomy.

DISCUSSION

We sought in this study partners of AR promoting prostate tumor progression. Because the interactions between prostate tumor cells and the stromal compartment, the 3-dimensional structure of a tumor, and the complex hormonal regulations occurring in a living animal cannot be reproduced in cell culture, we chose to perform this analysis in xenografted CRCaP cells, using a TAP-tag protocol. To our knowledge, this is the first report where this method, initially set up to purify protein complexes from cell cultures (18), was used to analyze complexes into tumors grown *in vivo*. In addition to already known AR partners, which validate the technical approach, we identified several proteins that had never been previously characterized as interacting with AR. One of the most represented AR partners in the purified complexes was CAD, a ubiquitous enzyme that catalyzes the first 3 steps of *de novo* biosynthesis of pyrimidines. We confirmed the interaction of CAD with endogenous AR protein in 3 different prostate carcinoma cell lines.

Our data establish that, as in any cell line, CAD is enzymatically active in prostate cell lines. However, in addition to its enzymatic function, its interaction with the endogenous AR protein regulates AR transcriptional activity. We do not know whether the interaction is direct at that stage. CAD expression in breast cancer cells is transcriptionally induced by estradiol (14). We saw no such hormonal regulation of CAD protein level by androgens in prostate cell lines, and conversely, CAD silencing did not affect AR expression. Therefore, regulation of AR transcriptional activity by CAD does not result from an induction of AR expression. However, androgens stimulated the CAD-AR interaction, and in C4-2 cells, CAD silencing impaired the stimulation of proliferation induced by androgens. During the cell cycle, both CAD and AR shuttle between the cytosol and the nucleus. Our nucleocytoplasmic fractionation experiments confirmed the presence of CAD in the 2 compartments, as described previously (10, 22). The major effect of CAD silencing was a delocalization of AR, which was retained in the cytosol, even in the presence of androgens. This cytoplasmic localization accounts for the strong reduction in the transcription of AR target genes and thus for the inhibition of prostate cell proliferation induced by CAD silencing.

AR is a master gene in the prostate, and its key role

in tumors is well established. However, we did not find in radical prostatectomy samples any significant modification of AR expression in patients with locally advanced or high-stage nonmetastatic disease, confirming other studies (23). The moderate increase in the AR mRNA level that was found associated with the transition from androgen-dependent to castration-resistant stages in experimental models (24) thus appears as a tardive marker of aggressiveness, of no use as a prognostic factor in patients with clinically localized cancer. Similarly, and in agreement with other reports (25), the serum level of PSA before surgery was not correlated with the tumor stage. In contrast, a 1.7-fold increase in CAD mRNA level was observed between pT2 and pT3a. This increase thus occurs while the AR mRNA remains unchanged.

The CAD increase during prostate tumor progression could be a direct consequence of an increased proliferation rate. However, the absence of correlation of CAD expression in radical prostatectomy samples with 3 different markers of proliferation rules out this hypothesis. Our *in vitro* results suggest that the CAD increase stimulates AR nuclear translocation, thus fostering AR-dependent proliferation before any increase in AR expression. The interaction between CAD and AR, which at least in part synchronizes their translocation, ensures that the pyrimidine biosynthesis level is upregulated when the AR-dependent proliferative transcription program is activated in prostate tumor cells.

Early markers of disease aggressiveness in patients with prostate cancer are lacking and highly demanded. Notably, we found a statistically higher CAD expression in tumors from patients who experienced tumor recurrence than from patients free of cancer relapse for ≥ 30 mo after surgery. The significantly higher CAD levels in locally advanced (pT3) and/or relapsing tumors thus strongly suggest that CAD is involved in disease aggressiveness. This finding may be of importance: even by combining clinical examination, PSA level, multiparametric prostate MRI, and biopsy pathological findings before treatment, a number of patients are either under- or overstaged preoperatively. With the development of PSA screening, the number of so called clinically insignificant cancers has increased dramatically. These low-stage and low-grade cancers should probably not be managed with radical and possibly morbid treatment, such as radical prostatectomy or radiotherapy. Tumoral CAD mRNA levels on prostate biopsies may have an incremental staging value in clinical practice and improve identification of indolent tumors preoperatively. On radical prostatectomy specimens, CAD mRNA may also be of clinical interest to select patients at risk of PSA relapse and propose additional treatments such as adjuvant radiotherapy. Larger retrospective studies are needed to evaluate whether tumoral CAD mRNA level on prostate biopsies or radical prostatectomy specimens is of staging value in patients with localized prostate cancer.

Altogether, combining biochemical, cell culture, and *in vivo* experiments with retrospective clinical analysis, our results identify CAD as a key and early player in prostate tumors, interacting with AR and regulating its activity. An enhanced CAD expression may help predict

tumor stage and grade, as well as PSA relapse after surgery. **FJ**

The authors gratefully acknowledge Ali Hamiche (CNRS, Strasbourg, France), Slimane Ait-Si-Ali (CNRS, Paris, France), Maya Ameyar-Zazoua (CNRS, Saclay, France), Mohammed Benhamed and Claire Mauduit (INSERM, Nice, France) for helpful discussions, and Myriam Decaussin and Isabelle Metzger for managing prostate tumor specimens and patient files. A.M. was a fellow of Ligue Nationale Contre le Cancer and Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC). J.M. was a fellow of ARC. The authors declare no conflicts of interest.

REFERENCES

- Heinlein, C. A., and Chang, C. (2004) Androgen receptor in prostate cancer. *Endocr. Rev.* **25**, 276–308
- Knudsen, K. E., and Penning, T. M. (2010) Partners in crime: deregulation of AR activity and androgen synthesis in prostate cancer. *Trends Endocrinol Metab.* **21**, 315–324
- Chi, K. N., Bjartell, A., Dearnaley, D., Saad, F., Schroder, F. H., Sternberg, C., Tombal, B., and Visakorpi, T. (2009) Castration-resistant prostate cancer: from new pathophysiology to new treatment targets. *Eur. Urol.* **56**, 594–605
- Linja, M. J., Porkka, K. P., Kang, Z., Savinainen, K. J., Janne, O. A., Tammela, T. L., Vessella, R. L., Palvimo, J. J., Visakorpi, T., Mohler, J. L., Gregory, C. W., Ford, O. H., III, Kim, D., Weaver, C. M., Petrusz, P., Wilson, E. M., and French, F. S. (2004) Expression of androgen receptor coregulators in prostate cancer. The androgen axis in recurrent prostate cancer. *Clin. Cancer Res.* **10**, 1032–1040
- Bettoun, D. J., Scafanas, A., Rutledge, S. J., Hodor, P., Chen, O., Gambone, C., Vogel, R., McElwee-Witmer, S., Bai, C., Freedman, L. P., and Schmidt, A. (2005) Interaction between the androgen receptor and RNaseL mediates a crosstalk between the interferon and androgen signaling pathways. *J. Biol. Chem.* C500324200
- Miyamoto, H., Yeh, S., Wilding, G., and Chang, C. (1998) Promotion of agonist activity of antiandrogens by the androgen receptor coactivator, ARA70, in human prostate cancer DU145 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 7379–7384
- Culig, Z., Steiner, H., Bartsch, G., and Hobisch, A. (2005) Mechanisms of endocrine therapy-responsive and -unresponsive prostate tumours. *Endocr. Relat. Cancer* **12**, 229–244
- Heemers, H. V., Regan, K. M., Schmidt, L. J., Anderson, S. K., Ballman, K. V., and Tindall, D. J. (2009) Androgen modulation of coregulator expression in prostate cancer cells. *Mol. Endocrinol.* **23**, 572–583
- Coleman, P. F., Suttle, D. P., and Stark, G. R. (1977) Purification from hamster cells of the multifunctional protein that initiates de novo synthesis of pyrimidine nucleotides. *J. Biol. Chem.* **252**, 6379–6385
- Sigoillot, F. D., Kotsis, D. H., Serre, V., Sigoillot, S. M., Evans, D. R., and Guy, H. I. (2005) Nuclear localization and mitogen-activated protein kinase phosphorylation of the multifunctional protein CAD. *J. Biol. Chem.* **280**, 25611–25620
- Karle, J. M., Anderson, L. W., and Cysyk, R. L. (1984) Effect of plasma concentrations of uridine on pyrimidine biosynthesis in cultured L1210 cells. *J. Biol. Chem.* **259**, 67–72
- Tessera, L., Mucciolo, E., Berton, L., and Giulotto, E. (1995) Selection of N-(phosphonacetyl)-L-aspartate resistant Chinese hamster mutants in the presence of the uridine uptake inhibitor dipyrindamole. *Anticancer Res.* **15**, 189–192
- Sigoillot, F. D., Sigoillot, S. M., and Guy, H. I. (2004) Breakdown of the regulatory control of pyrimidine biosynthesis in human breast cancer cells. *Int. J. Cancer* **109**, 491–498
- Khan, S., Abdelrahim, M., Samudio, I., and Safe, S. (2003) Estrogen receptor/sp1 complexes are required for induction of cad gene expression by 17 β -estradiol in breast cancer cells. *Endocrinology* **144**, 2325–2335
- Reardon, M. A., Dixon, J. E., and Weber, G. (1987) Increased messenger RNA concentration for carbamoyl-phosphate synthase II in hepatoma 3924A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **147**, 494–500
- Tlsty, T. D., Margolin, B. H., and Lum, K. (1989) Differences in the rates of gene amplification in nontumorigenic and tumorigenic cell lines as measured by Luria-Delbruck fluctuation analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**, 9441–9445
- 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
- Nakatani, Y., and Ogryzko, V. (2003) Immunoaffinity purification of mammalian protein complexes. *Methods Enzymol.* **370**, 430–444
- Ameyar-Zazoua, M., Souidi, M., Fritsch, L., Robin, P., Thomas, A., Hamiche, A., Percipalle, P., Ait-Si-Ali, S., and Harel-Bellan, A. (2009) Physical and functional interaction between heterochromatin protein 1 α and the RNA-binding protein heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U. *J. Biol. Chem.* **284**, 27974–27979
- Sramkoski, R. M., Pretlow, T. G., 2nd, Giaconia, J. M., Pretlow, T. P., Schwartz, S., Sy, M. S., Marengo, S. R., Rhim, J. S., Zhang, D., and Jacobberger, J. W. (1999) A new human prostate carcinoma cell line, 22Rv1. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* **35**, 403–409
- Brizova, H., Kalinova, M., Krskova, L., Mrhalova, M., and Kodet, R. (2010) A novel quantitative PCR of proliferation markers (Ki-67, topoisomerase II α , and TPX2): an immunohistochemical correlation, testing, and optimizing for mantle cell lymphoma. *Virchows Arch.* **456**, 671–679
- Chaparian, M., and Evans, D. (1988) Intracellular location of the multidomain protein CAD in mammalian cells. *FASEB J.* **2**, 2982–2989
- Qiu, Y.-Q., Leuschner, I., and Braun, P. M. (2008) Androgen receptor expression in clinically localized prostate cancer: immunohistochemistry study and literature review. *Asian J. Androl.* **10**, 855–863
- Chen, C. D., Welsbie, D. S., Tran, C., Back, S. H., Chen, R., Vessella, R., Rosenfeld, M. G., and Sawyers, C. L. (2004) Molecular determinants of resistance to antiandrogen therapy. *Nat. Med.* **10**, 33–39
- Borley, N., and Feneley, M. R. (2008) Prostate cancer: diagnosis and staging. *Asian J. Androl.* **11**, 74–80

Received for publication June 30, 2011.

Accepted for publication September 22, 2011.

DISCUSSION

Nous avons montré que CAD se liait à AR, et que cette liaison était nécessaire à son activité transcriptionnelle. D'autre part, nous avons montré que l'inhibition de l'expression de CAD par la technique d'interférence ARN entraînait une diminution de la translocation d'AR vers le noyau et diminuait son activité transcriptionnelle. Enfin, nous avons montré que cette inhibition de CAD par ARN interférence inhibait *in vitro* et *in vivo* la croissance des tumeurs hormono-dépendantes et résistantes, par 2 mécanismes distincts : l'arrêt de la synthèse des pyrimidines, et l'inhibition de la transcription des gènes cibles d'AR. À notre sens, deux questions restent en suspens, le mécanisme d'activation d'AR par CAD d'une part, et la valeur pronostique de l'expression de CAD d'autre part.

Le mécanisme d'activation d'AR par CAD n'est pas encore tout à fait élucidé. Cette régulation n'est pas transcriptionnelle ni traductionnelle puisque l'extinction de CAD ne modifie pas les quantités d'ARN messager ni de protéine AR. CAD semble en revanche réguler la localisation du récepteur, et pourrait aussi réguler directement son activité transcriptionnelle. Bien que CAD soit partiellement nucléaire (Sigoillot et al., 2005), la fraction de la protéine interagissant avec AR dans le noyau est assez faible. Il paraît donc peu probable qu'il soit recruté sur les promoteurs des gènes cible d'AR et agisse comme coactivateur de type 1. Nous avons en revanche montré que CAD régulait la localisation subcellulaire d'AR : l'extinction de CAD par interférence ARN réduisait considérablement le taux d'AR nucléaire. Il est possible que CAD et AR transloquent conjointement dans le noyau, et que la translocation de CAD favorise celle d'AR. Cette hypothèse est compatible avec les faibles fractions de CAD et AR interagissant ensemble dans le noyau, puisque les deux protéines pourraient se dissocier rapidement après la translocation nucléaire.

CAD est surexprimé dans divers cancers (Khan et al., 2003 ; Reardon et al., 1987), mais son expression et son activité enzymatique n'ont jamais été mesurées dans les carcinomes prostatiques. Des résultats préliminaires obtenus au laboratoire sur des prélèvements tissulaires de cancers de la prostate humains ont montré que CAD était plus exprimé au centre qu'en périphérie des foyers tumoraux. De plus, l'immunomarquage du

CAD phosphorylé sur la thréonine 456 (correspondant à la forme active de l'enzyme) présentait un marquage nucléaire plus intense dans les zones tumorales de score de Gleason élevé ($>3+3$). Ces résultats suggèrent que l'expression et la localisation de CAD pourraient avoir un rôle pronostic, mais requièrent cependant d'être confirmés sur un plus grand nombre de tumeurs.

RESULTAT 2

Rôle de la TSP1 dans les carcinomes prostatiques résistants à la castration

INTRODUCTION

Dans les cancers de la prostate hormono-dépendants, on observe une corrélation inverse entre la MVD et l'expression de la TSP1 (Huggins and Hodges, 1941; Kung and Evans, 2009). Cependant, cette corrélation n'est plus retrouvée dans les cancers résistants à la castration (CRCaP), dans lesquels la TSP1 est fortement exprimée (Huggins and Hodges, 1941). De nombreuses protéines, ainsi que des conditions de stress notamment de stress hypoxique, sont impliquées dans la régulation de l'ARNm de la TSP1. Vu le caractère souvent hypoxique des tumeurs, nous avons étudié la régulation de la TSP1 par l'hypoxie dans ces cellules tumorales.

La partie C-Terminale de la TSP1 possède plus de trente sites de fixation pour le calcium (Carlson et al., 2008). C'est le domaine le plus conservé de la famille des thrombospondines. La présence de ces sites suggère un rôle de la TSP1 dans l'homéostasie calcique et/ou une régulation de l'activité de la TSP1 par le calcium. De plus, une étude publiée sur les cancers du rein, montre qu'une diminution de calcium intracellulaire (par une diminution de l'expression du canal calcique TRPC4) inhibe la sécrétion et la maturation de la TSP1 (Veliceasa et al., 2007). Dans les cancers prostatiques, plusieurs travaux ont montré un rôle important des canaux calciques dans la progression tumorale, et notamment des canaux calciques non-voltage dépendant (Lehen'kyi et al., 2007 ; Monet et al., 2010; Prevarskaya et al., 2007a ; Prevarskaya et al., 2007b). Nous avons donc posé l'hypothèse que la régulation du calcium intracellulaire ou des canaux calciques pouvaient avoir un rôle dans la synthèse et la sécrétion de la TSP1.

Les propriétés anti-angiogéniques de la TSP1 passent par une inhibition de la migration, de la survie ainsi que de la prolifération des cellules endothéliales (Good et al., 1990; Jimenez et al., 2000). Cependant, un effet également pro-tumorale de la TSP1 a également été suggéré (Albo et al., 1999a ; de Fraipont et al., 2004 ; Sargiannidou et al.,

2004 ; Zhang and Lawler, 2007). Nous nous sommes donc intéressés à l'effet de la TSP1 dans les tumeurs prostatiques.

Enfin, nous avons cherché à évaluer la valeur pronostique de l'expression tissulaire de TSP1 chez les patients ayant un cancer de la prostate localisé ou localement avancé. Pour cela, nous avons recherché une association statistique entre l'expression tumorale et péritumorale tissulaire de TSP1 et le stade tumorale, le score de Gleason, ainsi que la survenue d'une récurrence biologique après prostatectomie radicale.

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

Virginie Firlej¹, Jacques R.R. Mathieu¹, Cristèle Gilbert¹, Loïc Lemonnier², Jessica Nakhle^{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.

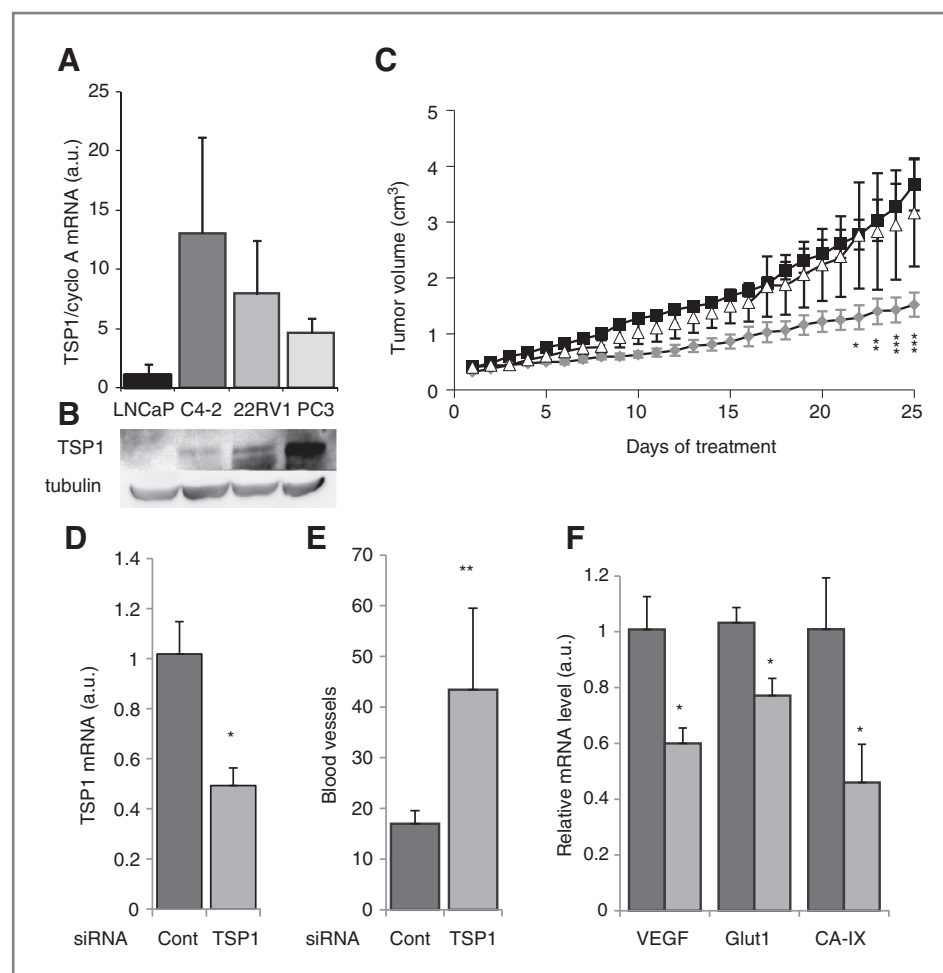


Figure 1. TSP1 is antiangiogenic but fosters tumor development in castration-resistant prostate tumors. **A**, TSP1 mRNA level in androgen-dependent (LNCaP), castration-resistant (C4-2 and 22RV1), or androgen-independent (PC3) prostate tumor cells. Results (mean $\pm$ SEM, $n > 3$) are normalized to 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** were quantified in hot spots of vascularization. **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

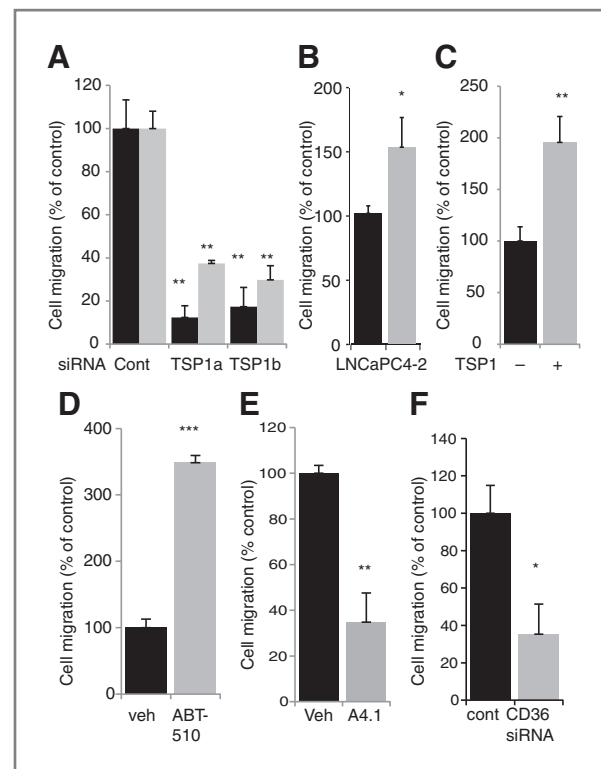


Figure 2. TSP1-stimulated migration of tumor cells requires CD36. A, C4-2 (black bars) or PC3 cells (gray bars) were transfected with the indicated siRNAs and their migration capacity toward culture medium containing 10% FBS measured 3 days later in a Transwell assay. The experiment was repeated 3 times 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

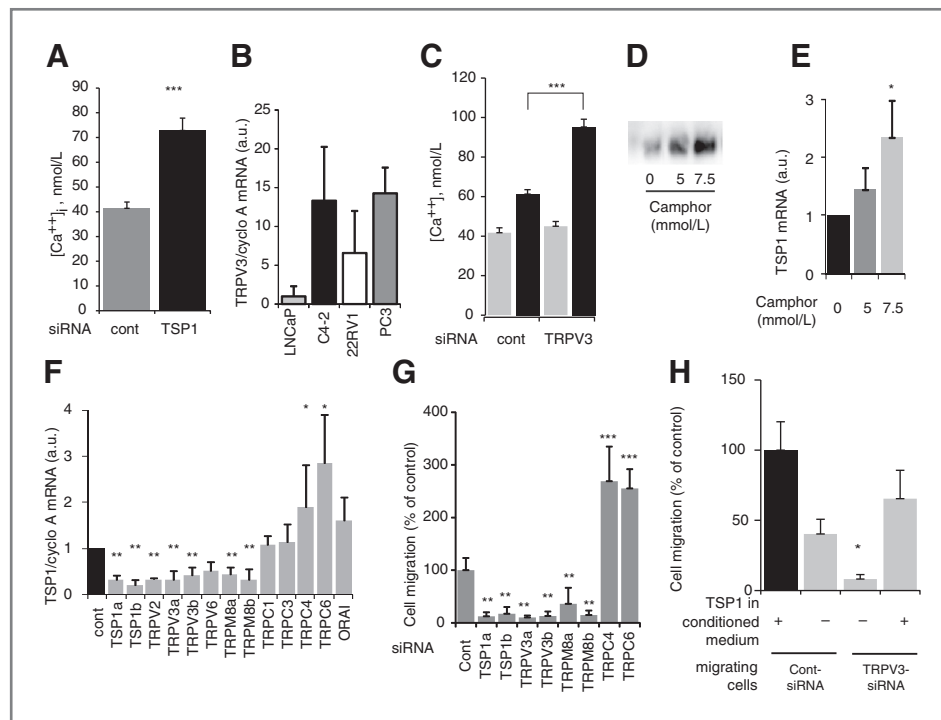


Figure 3. TSP1 regulation by calcium regulators. A, cytosolic calcium concentration in C4-2 cells placed for 5 minutes in calcium-free medium 48 hours after transfection with control- or TSP1-siRNA. B, TRPV3 mRNA level, normalized to cyclophilin A mRNA, in prostate tumor cell lines. Results are expressed 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

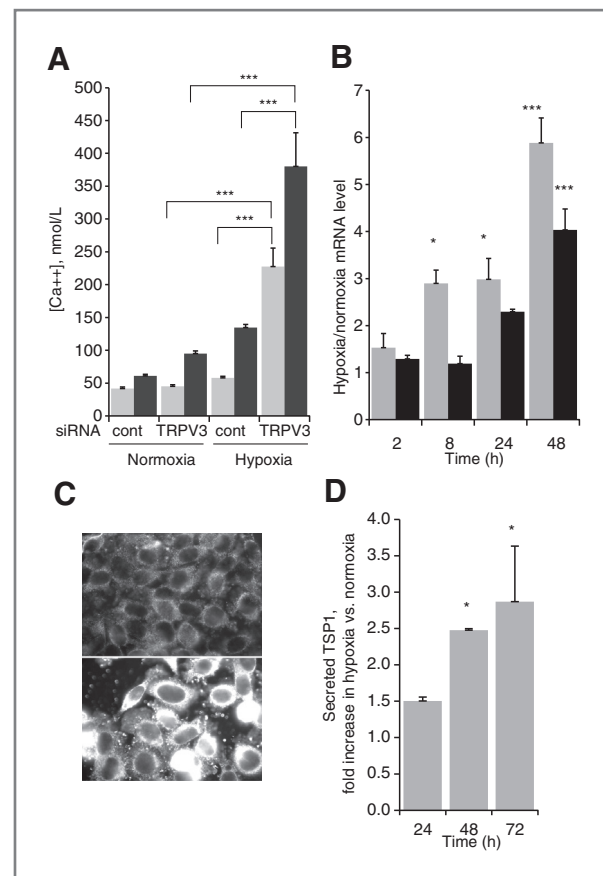


Figure 4. Regulation of calcium homeostasis and TSP1 by hypoxia. **A**, C4-2 cells were transfected with control- or TRPV3-siRNA. Two days later, half of the cells were maintained in normoxia while $COCl_2$ 300 μ mol/L was added to sister plates to mimic hypoxia. Cytosolic calcium concentrations in basal 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

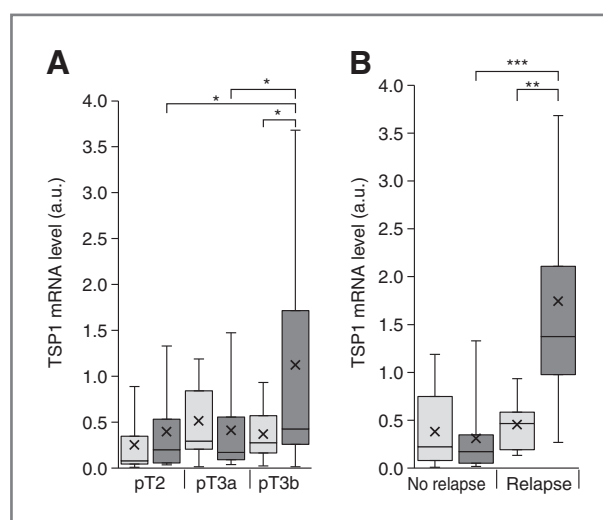


Figure 5. TSP1 mRNA in radical prostatectomy samples. TSP1 mRNA level, normalized to cyclophilin A mRNA level, in peritumoral (PT, gray bars) and tumoral (T, dark gray bars) tissues from frozen radical prostatectomy samples taken before any other treatment. Each box plot is composed of 3 horizontal lines 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 x. 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. Tuszynski 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. Grynkiewicz 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

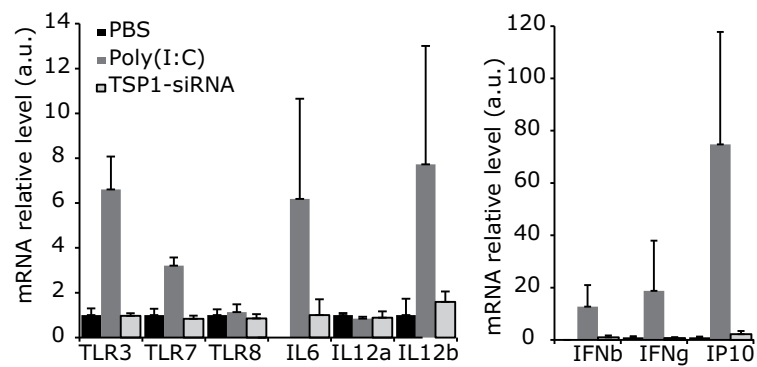
This work was supported by a grant from INCa to F. Cabon and N. Prevarskaya and from ANR BiotecS (Prostima) to F. Cabon. J.R.R. Mathieu was a fellow from ARC.

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.

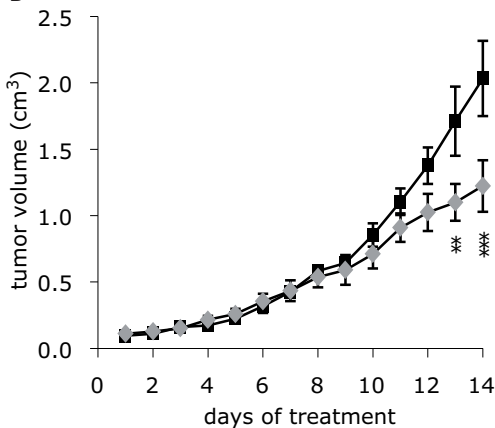
Received March 11, 2011; revised September 13, 2011; accepted September 24, 2011; published OnlineFirst October 28, 2011.

- 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.

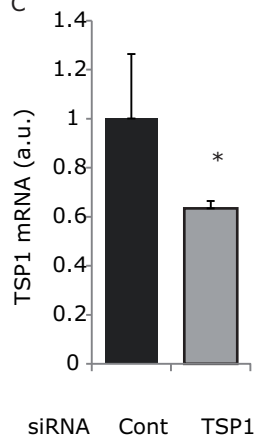
A



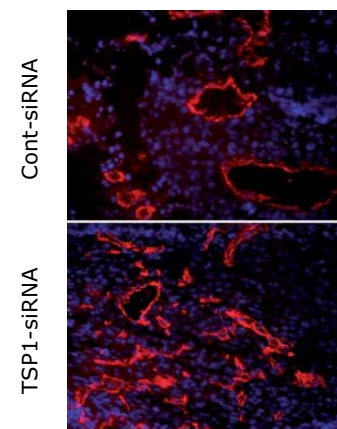
B



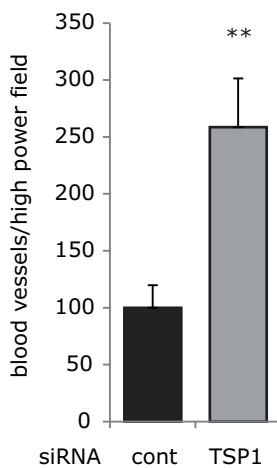
C



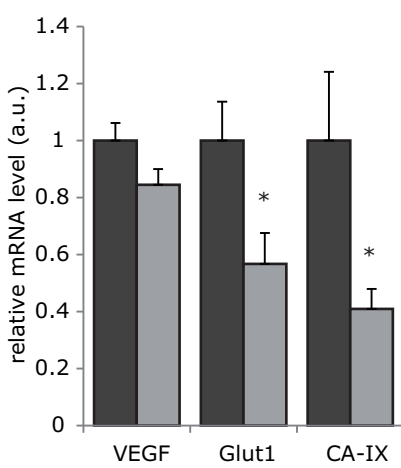
D

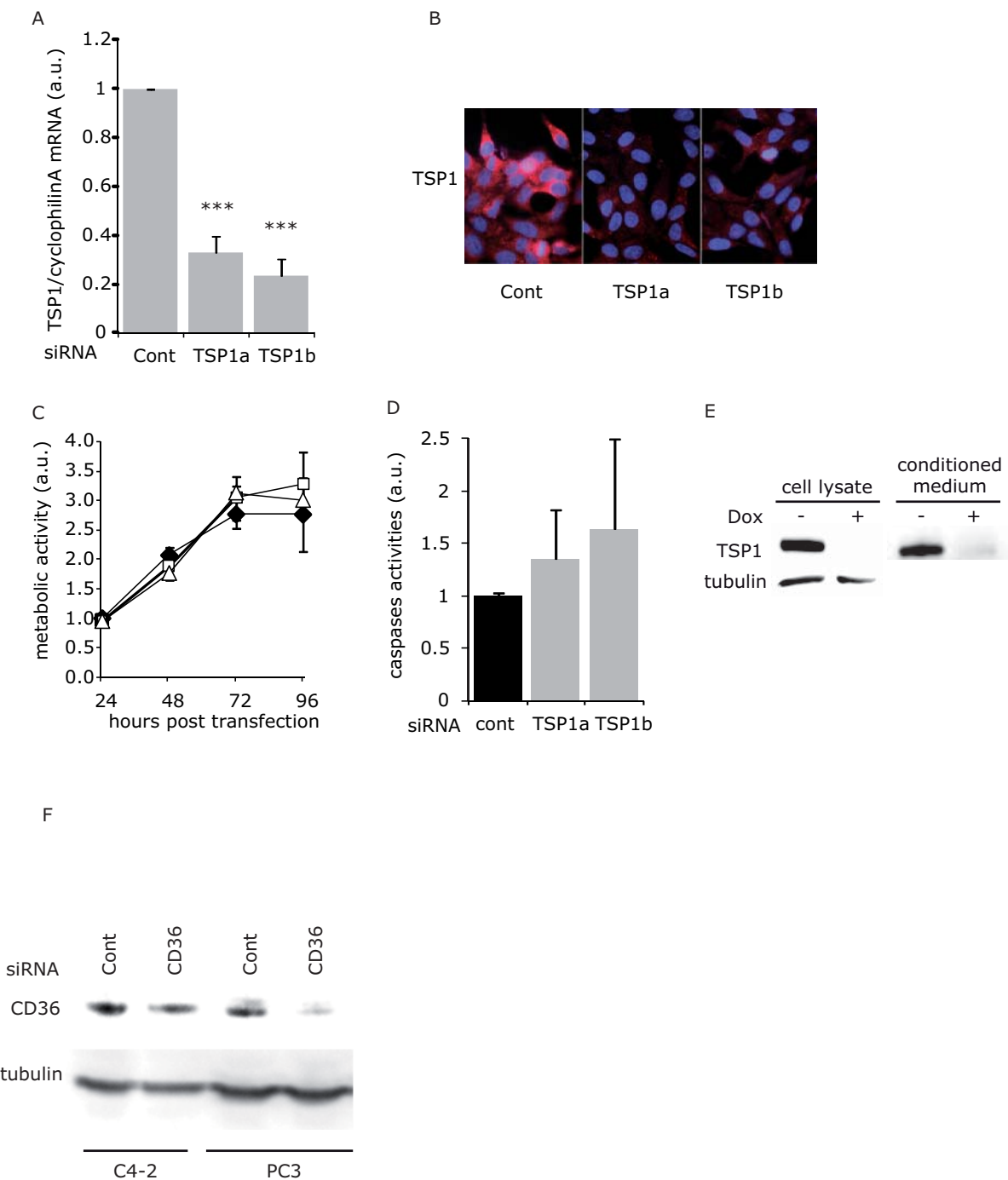


E

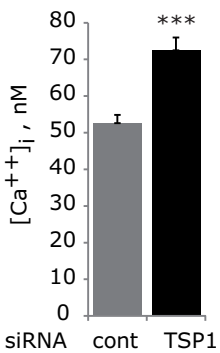


F

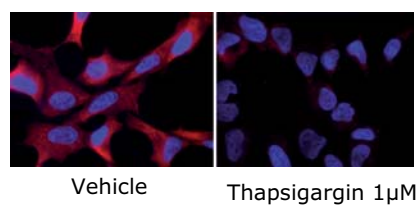




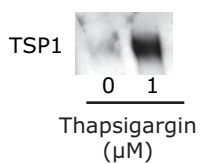
A



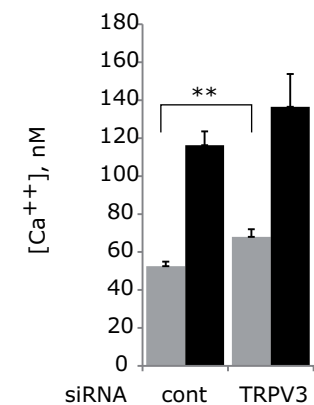
B



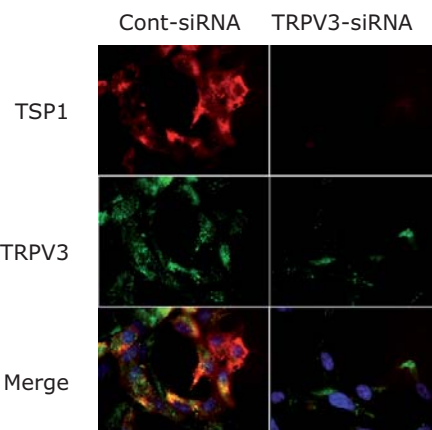
C



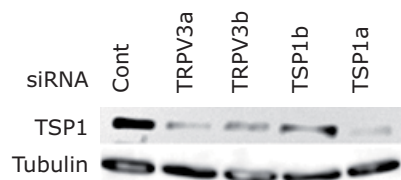
D



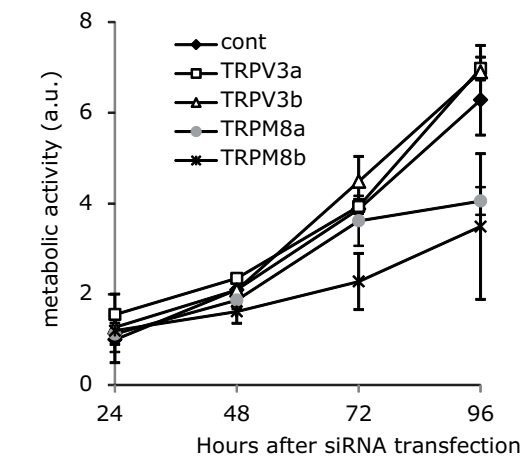
E



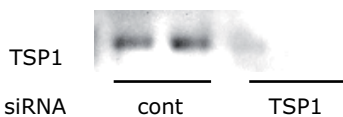
F



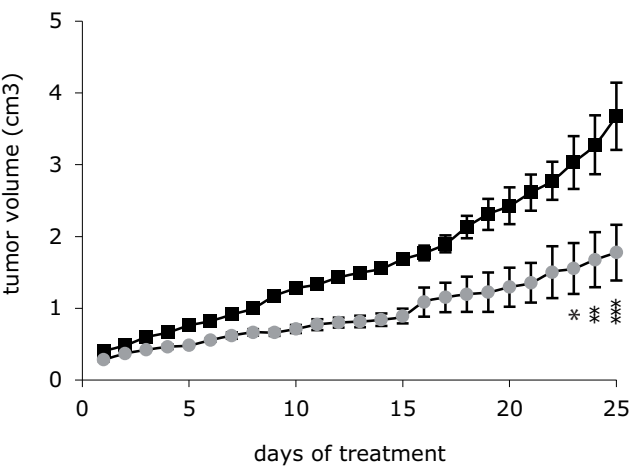
G



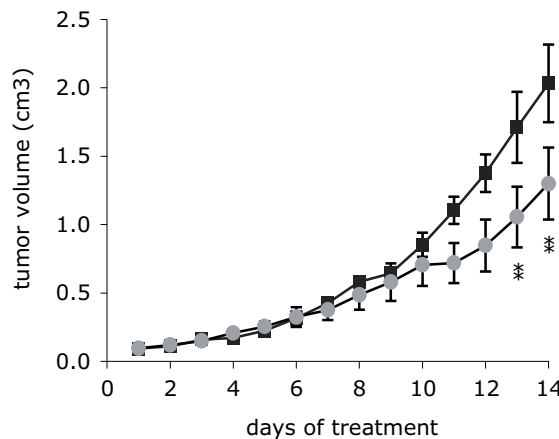
H



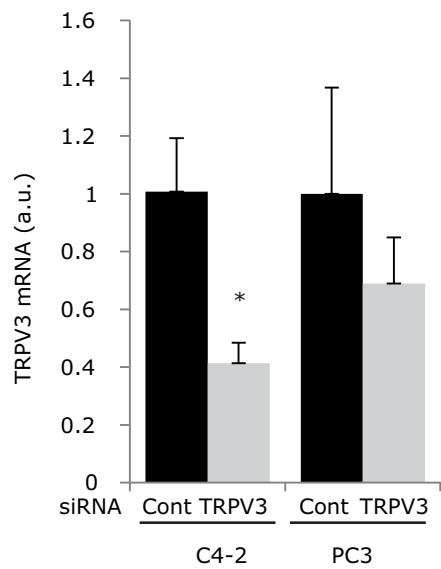
A



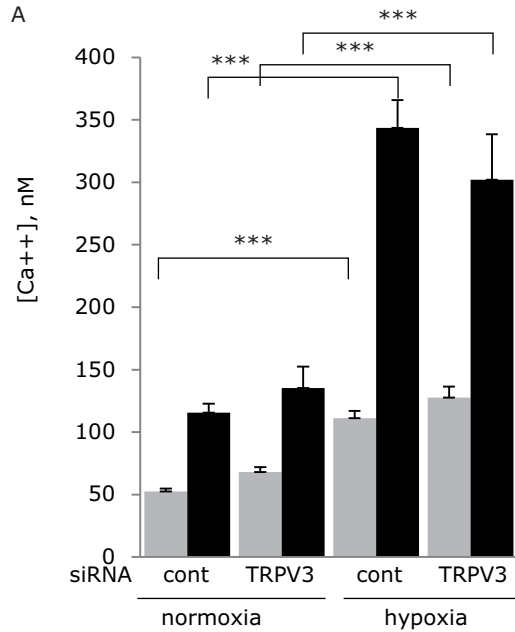
B



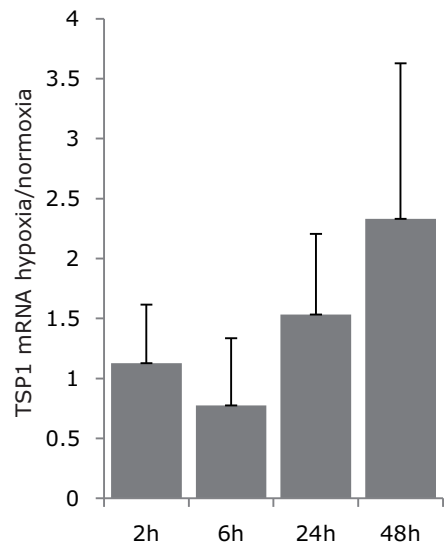
C



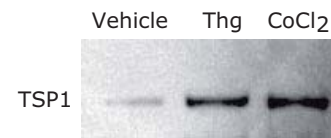
A



B



C



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'

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'

DISCUSSION

In vitro, nous avons montré que la TSP1 stimulait fortement la migration cellulaire sans affecter la prolifération ou l'apoptose des cellules tumorales prostatiques. Dans des modèles expérimentaux in vivo, nous avons montré que l'inhibition de la TSP1 diminuait fortement la croissance tumorale de tumeurs issues de cellules de carcinomes prostatiques résistants à la castration (lignée C4-2) ou indépendante des androgènes (lignée PC3). Il est important de noter que les activités anti-angiogéniques de la TSP1 étaient maintenues au sein de ces tumeurs. En effet, nous avons observé une augmentation de la MVD dans les tumeurs des souris traitées par des siRNA ciblant la TSP1. Cette augmentation de la MVD associée à une inhibition de la croissance tumorale paraît a priori paradoxale. Différentes hypothèses peuvent néanmoins expliquer ces résultats. Plusieurs études ont montré que l'invalidation du facteur anti-angiogénique DLL4 entraînait une augmentation de la vascularisation associée à une réduction de la croissance tumorale (Hu et al., 2009; Noguera-Troise et al., 2006 ; Ridgway et al., 2006). Dans le cas de DLL4, il a été montré que les vaisseaux surnuméraires étaient peu fonctionnels et que leur perfusion était par conséquent moins efficace dans les tumeurs invalidées pour DLL4 que dans les tumeurs contrôles. La situation est ici différente puisque l'inhibition de la TSP1 s'accompagne d'une diminution significative de l'expression de trois gènes induits par l'hypoxie : le VEGF, la CAIX et Glut-1. Les vaisseaux néoformés sont donc fonctionnels puisqu'ils réduisent l'hypoxie. Ce résultat montre qu'une augmentation de la vascularisation tumorale n'est pas nécessairement corrélée à une augmentation du développement des tumeurs. En d'autres termes, la densité vasculaire au sein des tumeurs contrôles n'est pas ici un facteur limitant de leur croissance. Cette observation montre que les propriétés antiangiogéniques et protumorales de la TSP1 s'exercent simultanément dans ces tumeurs, les dernières étant prédominantes dans ce modèle préclinique.

La TSP1 est une protéine composée de nombreux domaines et de qui se lie à de multiples récepteurs. Dans cette étude, nous n'avons cherché à identifier les domaines responsables des activités antiangiogéniques et protumorales. De nombreuses données de la littérature montrent l'implication du CD36 dans l'effet antiangiogénique. Il est intéressant de noter que l'inhibition du CD36, ou de la liaison de la TSP1 au CD36, réduit fortement la capacité de migration des cellules. Le peptide ABT-510 conserve les propriétés

antiangiogéniques de la TSP1 et a été utilisé dans cette optique en clinique. Deux essais de phase II de ce peptide (sarcomes mous et mélanome) ont montré une absence de bénéfice pour les patients et le développement de cette molécule a été interrompu. Nos données montrent que l'ABT-510 stimule fortement la migration des cellules tumorales prostatiques. Il serait intéressant de tester si tel est également le cas dans d'autres types de cancers. L'ensemble de ces données suggère donc que les propriétés antiangiogéniques et promigratoires de la TSP1 sont liées. Des études de mutagenèse réalisées notamment dans les domaines d'activation du TGF β , de la liaison au CD36 devraient permettre d'éclaircir ce point.

La mise en évidence du rôle pro-tumoral de la TSP1 dans les carcinomes prostatiques nous a amené à nous intéresser à ses mécanismes de régulation, et plus particulièrement au rôle de l'hypoxie. Le caractère souvent hypoxique des tumeurs prostatiques nous a amené à étudier les conséquences d'une diminution en pression en oxygène sur l'expression de la TSP1 dans ces cellules tumorales (Carnell et al., 2006 ; Stewart et al., 2010). L'hypoxie a été également décrite comme augmentant la concentration de calcium intracellulaire notamment par une augmentation du nombre des canaux calciques de type TRP (Hon et al., 2002; Jeong et al., 2002). En conditions hypoxiques, nous avons observé une augmentation de l'expression de la TSP1 et de la concentration de calcium intracellulaire. L'hypoxie, via notamment HIF1 α , régule de nombreux gènes (Semenza, 2003), notamment le VEGF. Cette augmentation du VEGF est considérée comme un des facteurs clefs de la néo-angiogenèse tumorale, permettant la vascularisation des tumeurs. Il est généralement proposé que l'angiogenèse résulte à la fois d'une augmentation des facteurs pro angiogéniques et d'une diminution des facteurs anti angiogéniques. Si on observe bien une augmentation du VEGF en réponse à l'hypoxie dans les cellules tumorales prostatiques, on observe de façon à priori paradoxale une augmentation et non une diminution de la TSP1 dans ces mêmes conditions. Cette augmentation de la TSP1 en hypoxie engendre donc une augmentation de la migration des cellules tumorales prostatiques et donc une augmentation de la dissémination métastatique. Plusieurs mécanismes pourraient expliquer l'augmentation de l'expression de la TSP1 en hypoxie. Une première hypothèse serait un rôle direct de l'hypoxie sur la transcription de la TSP1 *via* un mécanisme faisant intervenir les facteurs de transcription classiques de réponse à l'hypoxie HIF1 ou HIF2. Ceci a été montré dans les fibroblastes du derme (Distler et al., 2007). Une seconde hypothèse serait que l'augmentation de la TSP1 en hypoxie soit secondaire à une augmentation du calcium intracellulaire médiée par l'activation

de canaux calciques. Il semblerait donc intéressant d'étudier si l'augmentation de la TSP1 en hypoxie est liée à HIF1 ou HIF2, ou si c'est l'augmentation de calcium intracellulaire qui provoque une augmentation de l'expression de TSP1 dans les cellules tumorales prostatiques en hypoxie.

La présence de sites de liaison du calcium suggère un rôle de la TSP1 dans l'homéostasie calcique et/ou une régulation de l'activité de la TSP1 par le calcium. De plus, une étude réalisée sur un modèle de cancer du rein a montré qu'une diminution du calcium intracellulaire (par une diminution de l'expression du canal calcique TRPC4) inhibait la sécrétion et la maturation de la TSP1 (Narizhneva et al., 2005). Plusieurs travaux sur le cancer de la prostate ont suggéré le rôle important des canaux calciques dans la progression tumorale, et notamment celui des canaux calciques non-voltage dépendants (Lehen'kyi et al., 2007 ; Monet et al., 2010; Prevarskaya et al., 2007a ; Prevarskaya et al., 2007b). Dans notre étude, nous avons montré que l'augmentation de la concentration intracellulaire de calcium stimulait la sécrétion de TSP1 par les cellules tumorales prostatiques. Nous avons montré également que les canaux calciques TRPV2, TRPV3, TRPV6, TRPM8, TRPC4 et TRPC6 régulaient l'expression de la TSP1. L'inhibition de TRPV3 diminuait la migration des cellules tumorales prostatiques CRCaP et AICaP *in vitro*. La migration de ces cellules était ensuite restaurée par l'addition de TSP1 dans le milieu de culture, démontrant que la TSP1 est un des médiateurs majeurs de la fonction stimulatrice du canal TRPV3 sur la migration cellulaire tumorale prostatique. Nous avons également montré que l'inhibition de TRPV3 entraînait une diminution de la taille des tumeurs CRCaP et AICaP xénogreffées. Enfin, nous n'avons pas observé d'effet de TRPV3 sur la prolifération ni sur l'apoptose des cellules tumorales prostatiques. Le rôle de ce canal dans la progression tumorale semblait donc lié à ses propriétés de stimulation de la migration, de façon tout à fait similaire à ce que nous avons observé avec la TSP1. Ces résultats ont donc démontré que le calcium intracellulaire était un régulateur clé de la TSP1 au niveau de son expression, de sa sécrétion ainsi que qu'au niveau de sa capacité à induire la migration cellulaire. Une perspective potentielle pour un travail futur serait d'étudier l'expression des différents canaux calciques au cours de la progression tumorale prostatique. Nous avons en effet montré sur la lignée C4-2 que la stimulation des différents canaux calciques entraînait des effets inverses. La stimulation des canaux calciques TRPV2, TRPV3, TRPV6 et TRPM8 de lignées C4-2 entraînait une augmentation de l'expression ARN et de la sécrétion de TSP1, alors que l'inhibition des canaux TRPC4 et TRPC6 avait le même effet. De même, l'inhibition des canaux TRPC4 et TRPC6 stimulait la

migration cellulaire. L'étude précise des profils d'expression de ces canaux calciques au cours de la progression tumorale prostatique permettrait donc de mieux comprendre leur rôle dans la carcinogenèse prostatique et d'envisager les canaux calciques comme nouveaux marqueurs ou comme de nouvelles cibles thérapeutiques.

Nos résultats sur l'implication de la TSP1 dans la progression tumorale nous ont amené à évaluer sa valeur pronostique chez les patients ayant un cancer de la prostate. Nous avons donc mesuré l'expression tissulaire de la TSP1 sur pièce de prostatectomie radicale chez des patients traités pour un cancer localisé ou localement avancé de la prostate. L'analyse d'association statistique entre le niveau d'expression de TSP1 et les caractéristiques anatomopathologiques des cancers étudiés a montré que la TSP1 était significativement plus exprimée en cas de cancer localement avancé (pT3). Enfin, la survenue d'une récurrence biologique après prostatectomie radicale était associée de manière significative à un niveau d'expression tissulaire élevé de TSP1. Ces résultats sont en accord avec des observations antérieures réalisées chez des patients ayant un cancer du sein. Dans un travail antérieur du laboratoire, il avait en effet été suggéré qu'une forte expression de TSP1 dans les tumeurs du sein était associée à une diminution de la survie globale (Fontana et al., 2005). Ces résultats cliniques renforcent donc nos résultats expérimentaux sur le rôle pro tumoral de la TSP1.

RESULTAT 3

Rôle de l'axe SDF-1/CXCR4 dans l'invasion tumorale prostatique

INTRODUCTION

Plusieurs travaux ont suggéré un rôle majeur du ligand SDF1 et de son récepteur CXCR4 au cours des étapes finales de la progression métastatiques du cancer de la prostate. Des niveaux d'expression osseuse élevée de SDF1 entraîneraient un chimiotactisme des cellules tumorales prostatiques circulantes exprimant CXCR4 (Sun et al., 2005). Néanmoins, CXCR4 et son ligand SDF1 pourraient aussi avoir un rôle au cours des étapes initiales de la progression tumorale, du fait de leur capacité à activer plusieurs métallo protéases de la matrice extra-cellulaire (chapitre IV.5.), et à favoriser la transition épithélio-mésenchymateuse, comme cela a été montré récemment in vitro sur des cellules tumorales coliques HT29 (Wang et al., 2011). Dans cette étude, il a été en effet rapporté que l'axe SDF1/CXCR4 régulait négativement l'expression du complexe E-cadhérine/ β -caténine.

L'expression tissulaire de CXCR4 et SDF1 a été peu étudiée dans les cancers localisés et localement avancés de la prostate. À notre connaissance, seuls 2 travaux récents ont été consacrés à l'expression tissulaire locale de CXCR4 dans les carcinomes prostatiques humains (Jung et al., 2011; Okera et al., 2011). Dans ces études, seule l'expression tissulaire intra-tumorale de CXCR4 était évaluée par immunohistochimie sur pièce de prostatectomie radicale.

Dans un premier temps, nous avons cherché à évaluer si l'expression tissulaire de CXCR4 et SDF1 était différente en fonction de la localisation tissulaire au sein de la glande tumorale de patients ayant un cancer localisé ou localement avancé de la prostate. Pour répondre à cette question, nous avons quantifié les ARNm de CXCR4 et SDF1 sur des tissus distincts prélevés au centre de la tumeur, dans la région du front tumoral ou à distance de la masse tumorale. L'expression protéique de CXCR4 a été ensuite mesurée par immunohistochimie sur des coupes provenant de pièce de prostatectomie radicale.

Dans un deuxième temps, nous avons cherché à évaluer si l'expression protéique tissulaire de CXCR4 était associée à celle de marqueurs de la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM). Pour cela, nous avons évalué l'expression protéique tissulaire de l'E-cadhérine et de la β -caténine par immunohistochimie, sur les mêmes coupes de pièce de prostatectomie radicale.

Enfin, nous avons évalué la valeur pronostique de l'expression tissulaire locale de CXCR4, E-cadhérine et β -caténine en associant leur niveau d'expression à chaque localisation tissulaire aux facteurs pronostiques connus (PSA, stade tumoral, score de Gleason) de même qu'à la survenue d'une récurrence biologique après prostatectomie radicale.

CXCR4, E-cadherin and β -catenin expression at the tumor front in localized prostate tumors

Nicolas Barry Delongchamps^{1,2}, Frédéric Beuvon³, Jacques Matthieu⁴, Stéphanie Delmas⁵,
Isabelle Metzger², Hervé Prats¹, Florence Cabon^{1,5}

1: INSERM UMR 1037, tumor angiogenesis and regulation of gene expression, CRCT, F-31403 Toulouse, France, Université Paul Sabatier, Toulouse, France

2-Department of Urology, Cochin hospital, Paris Descartes University

3-Department of Pathology, Cochin hospital, Paris Descartes University

4-Cochin Institute, INSERM U1016, endocrinology, metabolism and cancer, CNRS UMR 8104, UMR-S 1016, Paris Descartes University.

5- SeleXel, 1 place Pierre Potier, BP50624 Toulouse Cedex 1 France

Correspondence: Dr Florence Cabon, INSERM UMR 1037, 1 avenue Jean Poulhès, 31403 Toulouse cedex 3. Tel : +33 974 762 923 email : florence.cabon@inserm.fr

Abbreviations:

SDF-1 Stromal derived factor 1

T Tumor center

F Tumor front

D Distal Peritumoral tissue

EMT Epithelial mesenchymal transition

Key words: prostate cancer; CXCR4; SDF-1, E-cadherin; β -catenin

Abstract:

Background: To evaluate the expression of CXCR4, SDF-1, β -catenin and E-cadherin throughout the local tumor microenvironment of prostate cancer.

Methods: A total of 64 prostate cancer specimens, 24 frozen and 40 paraffin-embedded sections, were obtained from patients treated with radical prostatectomy for clinically localized cancer. Real-time RT-PCR was used for mRNA quantification of CXCR4 and SDF-1 in the tumor center (T), tumor front (F), distal peritumoral tissue (D). Immunohistochemical analysis was used to investigate the expression patterns of CXCR4, E-cadherin and β -catenin. Clinical records of these patients were studied for follow-up data and the prognostic value of expression of these molecules was statistically assessed.

Results: CXCR4 mRNA and protein were mostly expressed at the tumor front, with a significant increase in protein immunodetection. In comparison, SDF-1 mRNA level gradually increased from the tumor center to the distal peritumoral tissue. High CXCR4 together with low SDF-1 mRNA levels at the tumor front were associated with adverse pathological features and disease recurrence. Moreover, high CXCR4 nuclear staining at the tumor front was associated with a high Gleason score, a decreased β -catenin and increased cytosolic E-cadherin expression in the same location.

Conclusions: Our results show that CXCR4 is over expressed at the tumor front of prostate tumors, where it potentially promotes cell migration towards the SDF-1 centrifugal attracting gradient, as well as epithelial-mesenchymal transition. Measurement of these markers at the tumor front may serve as additional prognostic tools.

Introduction

Many factors have been implicated in the process of prostate cancer invasion and metastasis, but the precise initial molecular transforming events occurring in prostatic epithelial cells and their local microenvironment are unknown (Schioppa et al., 2003; Staller et al., 2003; Sun et al., 2005; Taichman et al., 2002; Wang et al., 2011). SDF-1 ligand and its receptor CXCR4

were reported to play a major role in the final steps of prostate cancer metastatic process. In this setting, high levels of SDF-1 in bones were suggested to direct the metastasis of CXCR4-expressing tumor cells (Sun et al., 2005; Taichman et al., 2002). However, CXCR4 and SDF-1 were also believed to take part locally in the initial steps of cancer progression. In vitro studies showed that SDF-1 / CXCR4 enhanced invasion to extracellular matrix by inducing MMP-9 expression, secretion and activation, as well as down regulating of TMP2 expression (Chinni et al., 2006; Wang et al., 2011). More recently, it was suggested that SDF1 / CXCR4 may also have a pivotal role in the epithelial-mesenchymal transition (EMT) process by regulating the E-cadherin/ β -catenin complex expression. In vitro studies in HT29 colon-derived cells showed that CXCR4 / SDF-1 down-regulated E-cadherin/ β -catenin expression and complex formation (Wang et al., 2011). Also, CXCR4 was shown to be upregulated by hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) (Hirota and Semenza, 2006; Schioppa et al., 2003; Staller et al., 2003; Zagzag et al., 2005) and vascular endothelial growth factor (VEGF), which are increased in the local micro-environment of prostate tumors during progression because of hypoxic conditions (Bachelder et al., 2002; Helbig et al., 2003; Hirota and Semenza, 2006). All these observations suggest that increased levels of hypoxia-induced CXCR4 may contribute to the migration and invasion of cancer cells through the extracellular matrix.

Although recent data suggested an association between CXCR4 nuclear expression and metastatic progression in renal cell carcinoma (Wang et al., 2009b) and colorectal cancer (Speetjens et al., 2009), its expression has been poorly studied in localized and locally advanced prostate cancer (Jung et al., 2011; Okera et al., 2011), and to our knowledge only one report suggested its association with metastatic progression after surgery. More importantly, CXCR4 expression pattern has never been evaluated in distinct tumor and peritumoral areas. Given its potential role in local tumor invasion, CXCR4 expression might differ throughout the prostate gland. The aim of the present study was therefore to evaluate and compare the expression of CXCR4 and its ligand SDF-1 in radical prostatectomy specimen from patients treated for localized or locally advanced prostate cancer, and to assess their value as a prognostic marker of aggressiveness. We compared three zones: tumor center, tumor front and contiguous peritumoral tissue, and distal peritumoral tissue. To evaluate a potential regulation of E-cadherin and β -catenin expressions by the CXCR4 / SDF-1 axis, we further investigated the expression of these adhesion proteins in the same tissue areas.

Patients and methods

Human tissue inclusion and pathological analysis: all human tissues were obtained from the department of Surgical Pathology, Cochin hospital, Paris, France, in accordance with the ethical policy and procedure of the hospital's Institutional Review Board. Written consent was obtained from each patient. Tumor tissues were graded according to the modified Gleason grading system. Pathologic stage was determined according to the 2009 tumor-node-metastasis classification for prostate cancer.

Real-time RT-PCR mRNA analysis: Tissue samples were obtained from 24 patients who underwent radical prostatectomy for clinically localized or locally advanced prostate cancer and 10 patients who underwent transurethral resection of the prostate for benign prostatic hyperplasia (controls). Immediately after surgical removal, small pieces of tissues were gross dissected by the pathologist, snap-frozen and stored in liquid nitrogen. Histological analysis of radical prostatectomy frozen sections was performed by the same pathologist before RNA extraction. Nine samples were fully constituted of cancerous glands and were labeled "tumor center" (T). Twenty three samples were constituted of approximately 40 to 60% of cancerous glands were labeled "tumor front" (F). Finally, 9 samples did not contain any cancerous tissue and were labeled "distal tissue" (D). Total RNA was isolated using TRIzol reagent (Invitrogen, CergyPontoise, France). RNA was retrotranscribed using a High capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). cDNA was quantified by real time PCR using the Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). Human Cyclophilin A was used as an internal control. The sequences of gene-specific primers were 5-TTCCCTTCTGGGCAGTTGAT-3 (forward) and 5-CCAGACGCCAACATAGACCA-3 (reverse) for CXCR4, 5-TCGAAAGCCATGTTGCCA-3 (forward) and 5-TTAAAGCTTTCTCCAGGTACTCCTGA-3 for SDF-1, and 5-GTCAACCCACCGTGTTCTT-3 (forward) and 5-CTGCTGTCTTTGGGACCTTGT-3 (reverse) for Cyclophilin A, respectively.

Immunohistochemistry: we selected 40 cases of patients diagnosed with presumed clinically localized prostate cancer and treated by radical prostatectomy. Fresh-cut sections were selected from Formalin-fixed/paraffin-embedded tissue blocks containing tissue with the highest density of tumor cells and the highest Gleason score. Sections were heated for 20 min at 99°C in Bond Epitope Retrieval Solutions for antigen retrieval (AR9961 Menarini for β -catenin and E-Cadherin and AR9640 Menarini for CXCR4). Slides were then incubated with

CXCR4 (Abnova, clone 2F1, dilution 1/150), E-Cadherin (Tebu-Bio, sc-8426, clone G-10, dilution 1/100) or β -catenin (BD Biosciences, clone 14, dilution 1/400) antibodies for 20 min at room temperature. The labeling was detected with the "Bond Polymer Refine Detection" kit (DS9800, Menarini) Automate Bond-Max (Menarini-Leica). On each slide, BPH cells with known positive expression of E-cadherin and β -catenin, as well as lymphocytes infiltrates with known positive expression of CXCR4, served as positive controls. Two pathologists independently scored the tissue staining for CXCR4, E-cadherin and β -catenin. An ordinate, categorical (semi-quantitative) method was used to assess staining across each area (T, F, and PT). CXCR4, E-cadherin and β -catenin expressions were graded as: 0 = no staining; 1= weak staining; 2= moderate staining; and 3= strong staining and further stratified as absent or weak (0-1) and high (2-3).

Statistical analysis: preoperative characteristics and follow-up data were available for all patients. PSA failure after radical prostatectomy was defined as a rise of serum PSA >0.2 ng/mL on two consecutive measurements. Comparison between proportions was performed using the χ^2 test with Yates continuity correction. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$.

Results

SDF1 and CXCR4 mRNA levels in localized tumors

We observed that SDF1 mRNA level gradually increased from the center of tumor to the tumor front and distal tissue. Still higher SDF1 mRNA levels were observed in BPH (Fig 1B). CXCR4 mRNA level was not statistically different between tumor center, distal peritumoral tissue and BPH, whereas a significant increase ($p=0.04$) was observed in tumor front (F) as compared to tumor center (Fig 1A).

Association of SDF1 and CXCR4 mRNA levels with adverse histological findings and outcomes after RP

CXCR4 and SDF1 mRNA levels were not dependent on patient's age or PSA level at diagnosis. At the tumor front, CXCR4 mRNA level was significantly higher in high grade tumors (Gleason score >6) as compared to low grade tumors (Gleason score 6) (mean: 1.86, range: 0.86-3.78 vs mean: 1.33, range: 0.47-3.17, $p=0.025$). SDF1 mRNA level at the tumor front was lower in PT3 as compared to pT2 tumors (mean: 0.25, range: 0.13-0.41 vs mean:

0.54, range: 0.24-1.18, $p=0.007$). Interestingly, SDF1 mRNA level at the tumor front was also significantly lower in patients who experienced biochemical relapse after RP (mean: 0.23, range: 0.16-0.37 vs mean: 0.45, range 0.24-0.68, $p=0.0015$).

CXCR4, E-Cadherin and β -catenin immunodetection on tumor sections

CXCR4 expression was either negative or weak, cytosolic, nuclear or nucleocytoplasmic (Fig 2). E-cadherin and β -catenin were either negative, localized to the plasma membrane, or cytosolic (Fig 2).

Increased CXCR4 protein expression at the tumor front

CXCR4 expression was detected in distal tissue in only 2 samples (5%), and in tumor in only 6 samples (15%) out of 40. In sharp contrast, 34 samples (85%) were positive for CXCR4 expression at the tumor front, confirming RNA data. In this area, CXCR4 was expressed in the nucleus or in the nucleus and the cytosol in 62% of positive samples.

Increased cytosolic expression of E-cadherin at the tumor front

E-cadherin was more expressed in distal tissues, where 83% of analyzed samples showed a membrane-bound labeling, than in tumors or at tumor fronts. Interestingly, E-cadherin was more present in the cytosol and less associated with the plasma membrane at the front of tumors than in their centers or in distal tissues.

Decreased β -catenin expression at the tumor front

In all samples but one, β -catenin was highly expressed in distal tissues. The labeling was restricted to the plasma membrane in 70% of the cases. Ninety percent of tumors were also β -catenin positive but the expression was strictly associated with the plasma membrane in only 44% of the cases. Significantly less samples exhibited β -catenin at the tumor front than in tumors.

Association between CXCR4, β -catenin and E-cadherin staining patterns and adverse histological findings or outcomes after RP.

CXCR4 expression in the center or at the front of tumors was associated with Gleason score and pathological stage. In these 2 tissue locations, we indeed observed a significant increase of CXCR4 nuclear expression in Gleason score >6 and locally advanced (pT3) cancers (fig 4B and 4C).

E-Cadherin expression in tumors was significantly increased in Gleason score>6 cancers, with no predominant subcellular pattern of expression (fig 4C). The expression of β -catenin was not associated with any adverse pathological finding, whatever the tissue location (fig 4B and 4C).

Discussion

SDF-1 and its receptor CXCR4 may promote tumor progression by multiple mechanisms and at different steps of the dissemination process. During the initial steps of cancer invasion, earlier observations using various in vitro models showed that stromal cells present in the tumor microenvironment expressed high levels of SDF-1, directly stimulating proliferation and migration of CXCR4-expressing cancer cells. These observations were not to our knowledge previously confirmed on human tissues. Our results on radical prostatectomy specimen from patients with localized or locally advanced prostate cancer clearly indicate the presence of an increasing gradient of SDF-1 expression from the center of tumors to the periphery of cancer foci, coexisting with an increased expression of CXCR4 at the tumor front. These observations suggest that tumor cells located at the tumor front may be specifically attracted towards the SDF-1 expression gradient, thus participating to local invasion.

Most clinical studies evaluating potential new tumor markers use tissue microarrays, which allow studying a large number of cases, but are only representative of a small amount of tissue, and most usually the tumor center. Some tumor markers, such as CXCR4, are more expressed in periphery of tumors, likely because they are expressed by cells migrating or undergoing EMT. Our results clearly highlight the importance of studying the tumor front, as well as surrounding peritumoral tissue before starting large assays to avoid biased interpretations. Importantly, while SDF-1 expression in the center of tumors had no prognostic significance, its mRNA level at the tumor front was associated with pathological stage and PSA relapse after radical prostatectomy. Interestingly, high CXCR4 and low SDF-1 levels at tumor front seemed to be both associated with adverse histological features, suggesting a potential higher attraction of CXCR4 expressing cells towards distal tissue when the SDF-1 gradient is higher. The question whether the tissue expression of CXCR4 may serve as a prognostic marker in patients with localized or locally advanced prostate cancer remains poorly documented. To our knowledge, our study is the first evaluating CXCR4

expression at the tumor front and peritumoral tissue. Two other studies evaluated CXCR4 tumor expression in patients with localized disease. Only one of them suggested that a high tumor expression of CXCR4 was associated with disease recurrence after radical prostatectomy (Jung et al., 2011; Okera et al., 2011).

The increased expression of CXCR4 at the tumor front was much more pronounced at the protein level, suggesting a post-transcriptional regulation of this receptor, as previously hypothesized by Sun et al (Sun et al., 2003). These authors found that CXCR4 expression was significantly elevated in localized and metastatic cancer, but only at the protein level. At the RNA level, they did not find any significant difference (Sun et al., 2003). Interestingly, post transcriptional regulation of CXCR4 was reported to be at least partially mediated by estrogens in breast carcinoma (Sengupta et al., 2009). In prostate cancer, androgens were reported to up regulate CXCR4 transcription (Frigo et al., 2009). These data may however not explain the increased CXCR4 protein expression we observed at the tumor front. A recent study suggested that CXCR4 may have a role in the nucleus translocation of the androgen receptor (AR) (Kasina and Macoska, 2012b). The authors showed that SDF-1/CXCR4 axis mediated AR accumulation in the nucleus in prostate cancer cells expressing the wild-type AR or different forms of mutant AR (Kasina and Macoska, 2012b). In our study, we observed a nuclear staining at the tumor front in nearly 2 third of the cases, suggesting that nuclear localization was associated with increased protein expression, as well as with adverse histological features (higher Gleason score and pathological stage). We may thus hypothesize that CXCR4 and AR translocation into the nucleus could be potentially involved in the post-transcriptional regulation of CXCR4. Further studies are needed to elucidate these complex mechanisms.

E-cadherin and β -catenin being two major components of the EMT process, we further evaluated their expression profile. Although these 2 proteins have been thoroughly studied in the normal and cancerous prostate (Kallakury et al., 1999; Wang et al., 2000), their expression with respect to their precise tissue location remains poorly documented. The cadherin family of transmembrane glycoprotein is a major component of cell-cell adhesion. The inter-epithelial binding of E-cadherin mediates lateral cell-cell adhesion in secretory tissues such as the prostate, and results in the formation of adherens junctions that are required for tissue morphogenesis and maintenance of the differentiated phenotype. β -catenin binds to the carboxy-terminal 100 amino acids of the cadherin cytoplasmic region, and α -catenin links β -catenin to actin, which in turn has the ability to promote adherens junctions protein clustering

and stabilization of cell adhesion. At the tumor front, we observed an overall decrease of β -catenin expression, associated with an increased cytosolic expression of E-Cadherin, suggesting a disruption of the E-Cadherin/ β -catenin complex, which has been shown to facilitate EMT (Tian et al., 2011). Tumor front cells are indeed more likely to become detached from the primary tumor site, migrate through the gland and invade lymphovascular system.

Interestingly, β -catenin staining was inversely correlated with that of CXCR4 at the tumor front. These findings are in agreement with those from Wang et al (Wang et al., 2011), who suggested the potential down-regulation of β -catenin by SDF-1/CXCR4 in colon cancer. They showed that treating HT29 colon-derived cells with SDF1 for 48h resulted in a decreased E-cadherin and β -catenin mRNA expression levels. Also, SDF-1 induced significant phosphorylation of β -catenin. They concluded that phosphorylation of β -catenin led to the E-cadherin/ β -catenin complex disruption. Other reports also suggested that the tyrosine 654 phosphorylation of β -catenin by an intracellular signaling event could disrupt the E-cadherin/ β -catenin complex by releasing β -catenin from E-cadherin, leading to decreased cell-cell junction adhesion, and increased cell migration and invasiveness (Behrens et al., 1993; Hulsken et al., 1994; Taddei et al., 2002).

In the tumor center, E-Cadherin expression was statistically associated with Gleason score. While unanticipated and somewhat confusing, this result is in agreement with a recently published study evaluating 13 EMT markers in patients with clinically localized prostate cancer (Behnsawy et al., 2013). The authors evaluated the tissue expression of these proteins by immunohistochemistry on 197 radical prostatectomy specimens. E-Cadherin tumor expression was reported to be associated with Gleason score, whereas β -catenin was not associated with any conventional prognostic marker. Our own results do not however corroborate the fact that E-Cadherin expression in the tumor center could be related to an EMT process.

Conclusions

Our results suggest that CXCR4 is specifically over expressed at the tumor front of prostate tumors, where it promotes cell invasion towards the SDF-1 centrifugal increasing gradient.

The over expression of CXCR4 is associated with a down-regulation of the β -catenin/E-cadherin complex.

References

- Bachelder, R. E., Wendt, M. A., and Mercurio, A. M. (2002). Vascular endothelial growth factor promotes breast carcinoma invasion in an autocrine manner by regulating the chemokine receptor CXCR4. *Cancer Res* 62, 7203-7206.
- Behnsawy, H. M., Miyake, H., Harada, K., and Fujisawa, M. (2013). Expression patterns of epithelial-mesenchymal transition markers in localized prostate cancer: significance in clinicopathological outcomes following radical prostatectomy. *BJU Int* 111, 30-37.
- Behrens, J., Vakaet, L., Friis, R., Winterhager, E., Van Roy, F., Mareel, M. M., and Birchmeier, W. (1993). Loss of epithelial differentiation and gain of invasiveness correlates with tyrosine phosphorylation of the E-cadherin/beta-catenin complex in cells transformed with a temperature-sensitive v-SRC gene. *J Cell Biol* 120, 757-766.
- Chinni, S. R., Sivalogan, S., Dong, Z., Filho, J. C., Deng, X., Bonfil, R. D., and Cher, M. L. (2006). CXCL12/CXCR4 signaling activates Akt-1 and MMP-9 expression in prostate cancer cells: the role of bone microenvironment-associated CXCL12. *Prostate* 66, 32-48.
- Frigo, D. E., Sherk, A. B., Wittmann, B. M., Norris, J. D., Wang, Q., Joseph, J. D., Toner, A. P., Brown, M., and McDonnell, D. P. (2009). Induction of Kruppel-like factor 5 expression by androgens results in increased CXCR4-dependent migration of prostate cancer cells in vitro. *Mol Endocrinol* 23, 1385-1396.
- Helbig, G., Christopherson, K. W., Bhat-Nakshatri, P., Kumar, S., Kishimoto, H., Miller, K. D., Broxmeyer, H. E., and Nakshatri, H. (2003). NF- κ B Promotes Breast Cancer Cell Migration and Metastasis by Inducing the Expression of the Chemokine Receptor CXCR4. *Journal of Biological Chemistry* 278, 21631-21638.
- Hirota, K., and Semenza, G. L. (2006). Regulation of angiogenesis by hypoxia-inducible factor 1. *Crit Rev Oncol Hematol* 59, 15-26.
- Hulsken, J., Birchmeier, W., and Behrens, J. (1994). E-cadherin and APC compete for the interaction with beta-catenin and the cytoskeleton. *J Cell Biol* 127, 2061-2069.
- Jung, S. J., Kim, C. I., Park, C. H., Chang, H. S., Kim, B. H., Choi, M. S., and Jung, H. R. (2011). Correlation between Chemokine Receptor CXCR4 Expression and Prognostic Factors in Patients with Prostate Cancer. *Korean J Urol* 52, 607-611.
- Kallakury, B. V. S., Sheehan, C. E., Rhee, S. J., Fisher, H. A. G., Jr., R. P. K., Rifkin, M. D., and Ross, J. S. (1999). The prognostic significance of proliferation-associated nucleolar protein p120 expression in prostate adenocarcinoma. *Cancer* 85, 1569-1576.
- Kasina, S., and Macoska, J. A. (2012). The CXCL12/CXCR4 axis promotes ligand-independent activation of the androgen receptor. *Molecular and Cellular Endocrinology* 351, 249-263.
- Okera, M., Bae, K., Bernstein, E., Cheng, L., Lawton, C., Wolkov, H., Pollack, A., Dicker, A., Sandler, H., and Sweeney, C. J. (2011). Evaluation of nuclear factor kappaB and chemokine receptor CXCR4 co-expression in patients with prostate cancer in the Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) 8610. *BJU Int* 108, E51-58.
- Schioppa, T., Uranchimeg, B., Saccani, A., Biswas, S. K., Doni, A., Rapisarda, A., Bernasconi, S., Saccani, S., Nebuloni, M., Vago, L., *et al.* (2003). Regulation of the chemokine receptor CXCR4 by hypoxia. *J Exp Med* 198, 1391-1402.

Sengupta, S., Schiff, R., and Katzenellenbogen, B. S. (2009). Post-transcriptional regulation of chemokine receptor CXCR4 by estrogen in HER2 overexpressing, estrogen receptor-positive breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 117, 243-251.

Speetjens, F. M., Liefers, G. J., Korbee, C. J., Mesker, W. E., van de Velde, C. J., van Vlierberghe, R. L., Morreau, H., Tollenaar, R. A., and Kuppen, P. J. (2009). Nuclear localization of CXCR4 determines prognosis for colorectal cancer patients. *Cancer Microenviron* 2, 1-7.

Staller, P., Sulitkova, J., Lisztwan, J., Moch, H., Oakeley, E. J., and Krek, W. (2003). Chemokine receptor CXCR4 downregulated by von Hippel-Lindau tumour suppressor pVHL. *Nature* 425, 307-311.

Sun, Y. X., Schneider, A., Jung, Y., Wang, J., Dai, J., Cook, K., Osman, N. I., Koh-Paige, A. J., Shim, H., Pienta, K. J., *et al.* (2005). Skeletal localization and neutralization of the SDF-1(CXCL12)/CXCR4 axis blocks prostate cancer metastasis and growth in osseous sites in vivo. *J Bone Miner Res* 20, 318-329.

Sun, Y. X., Wang, J., Shelburne, C. E., Lopatin, D. E., Chinnaiyan, A. M., Rubin, M. A., Pienta, K. J., and Taichman, R. S. (2003). Expression of CXCR4 and CXCL12 (SDF-1) in human prostate cancers (PCa) in vivo. *J Cell Biochem* 89, 462-473.

Taddei, M. L., Chiarugi, P., Cirri, P., Buricchi, F., Fiaschi, T., Giannoni, E., Talini, D., Cozzi, G., Formigli, L., Raugei, G., and Ramponi, G. (2002). Beta-catenin interacts with low-molecular-weight protein tyrosine phosphatase leading to cadherin-mediated cell-cell adhesion increase. *Cancer Res* 62, 6489-6499.

Taichman, R. S., Cooper, C., Keller, E. T., Pienta, K. J., Taichman, N. S., and McCauley, L. K. (2002). Use of the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 pathway in prostate cancer metastasis to bone. *Cancer Res* 62, 1832-1837.

Tian, X., Liu, Z., Niu, B., Zhang, J., Tan, T. K., Lee, S. R., Zhao, Y., Harris, D. C., and Zheng, G. (2011). E-cadherin/beta-catenin complex and the epithelial barrier. *J Biomed Biotechnol* 2011, 567305.

Wang, J., Krill, D., Torbenson, M., Wang, Q., Bisceglia, M., Stoner, J., Thomas, A., DeFlavia, P., Dhir, R., and Becich, M. J. (2000). Expression of cadherins and catenins in paired tumor and non-neoplastic primary prostate cultures and corresponding prostatectomy specimens. *Urol Res* 28, 308-315.

Wang, L., Li, C. L., Yu, W. B., Yin, H. P., Zhang, G. Y., Zhang, L. F., Li, S., and Hu, S. Y. (2011). Influence of CXCR4/SDF-1 axis on E-cadherin/beta-catenin complex expression in HT29 colon cancer cells. *World J Gastroenterol* 17, 625-632.

Wang, L., Wang, Z., Yang, B., Yang, Q., and Sun, Y. (2009). CXCR4 nuclear localization follows binding of its ligand SDF-1 and occurs in metastatic but not primary renal cell carcinoma. *Oncol Rep* 22, 1333-1339.

Zagzag, D., Krishnamachary, B., Yee, H., Okuyama, H., Chiriboga, L., Ali, M. A., Melamed, J., and Semenza, G. L. (2005). Stromal cell-derived factor-1alpha and CXCR4 expression in hemangioblastoma and clear cell-renal cell carcinoma: von Hippel-Lindau loss-of-function induces expression of a ligand and its receptor. *Cancer Res* 65, 6178-6188.

Tables

Table 1: SDF1 and CXCR4 mRNA level analysis in RP: patients' demographic and pathological data.

Criteria	Value
All patients (n)	24
Median age (years): median [range]	61 [49-71]
PSA (ng/mL): median [range]	9.2 [4.4-30]
Gleason score	
6 (n, %)	10 (42%)
>6 (n, %)	14 (58%)
Pathological stage	
pT2 (n, %)	13 (54%)
pT3 (n, %)	11 (46%)
Follow up (months): median [range]	43 [19-84]
PSA relapse (n, %)	9 (37%)

Table 2: CXCR4, E-Cadherin and b-Catenin immunodetection: patients' demographic and pathological data.

Criteria	Value
All patients (n)	40
Median age (years): median [range]	63 [(51-75]
PSA (ng/mL): median [range]	10 [2.5-27]
Gleason score	
6 (n, %)	16 (40%)
>6 (n, %)	24 (60%)
Pathological stage	
pT2 (n, %)	19 (47%)
pT3 (n, %)	21 (53%)
Follow up (months): median [range]	52 [6-120]
PSA relapse (n, %)	19 (47%)

Figure Legends:

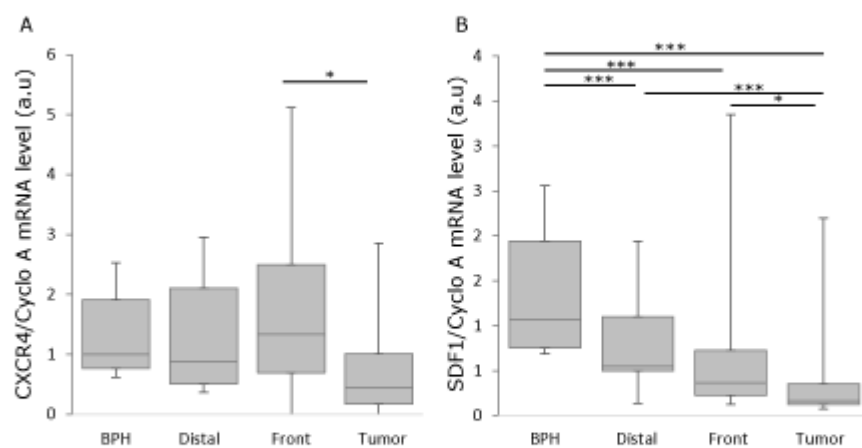
Figure 1: SDF1 and CXCR4 RNA levels in frozen radical prostatectomy samples. RNA in each sample was quantified by real time RT-qPCR and normalized to cyclophilin-A mRNA level using the delta-delta CT method. Horizontal lines in the box plots represent the 25th, 50th and 75th quartiles. Error bars are used to indicate the lowest and highest values in each group. Statistical differences are indicated as follows: *: $p<0.05$; ***: $p<0.001$.

Figure 2: CXCR4, E-cadherin and β -catenin immunodetection on tumor sections. Examples of typical CXCR4 (A, B, C), E-Cadherin (D, E, F) and β -catenin (G, H, I) labelling. Weak cytosolic (A), nucleocytoplasmic (B) and nuclear (C) CXCR4 labelling; Absent (D and G), membrane bound (E and H), or cytosolic and membrane bound (F and I) E-cadherin (D, E, F) and β -catenin (G, H, I) labelling.

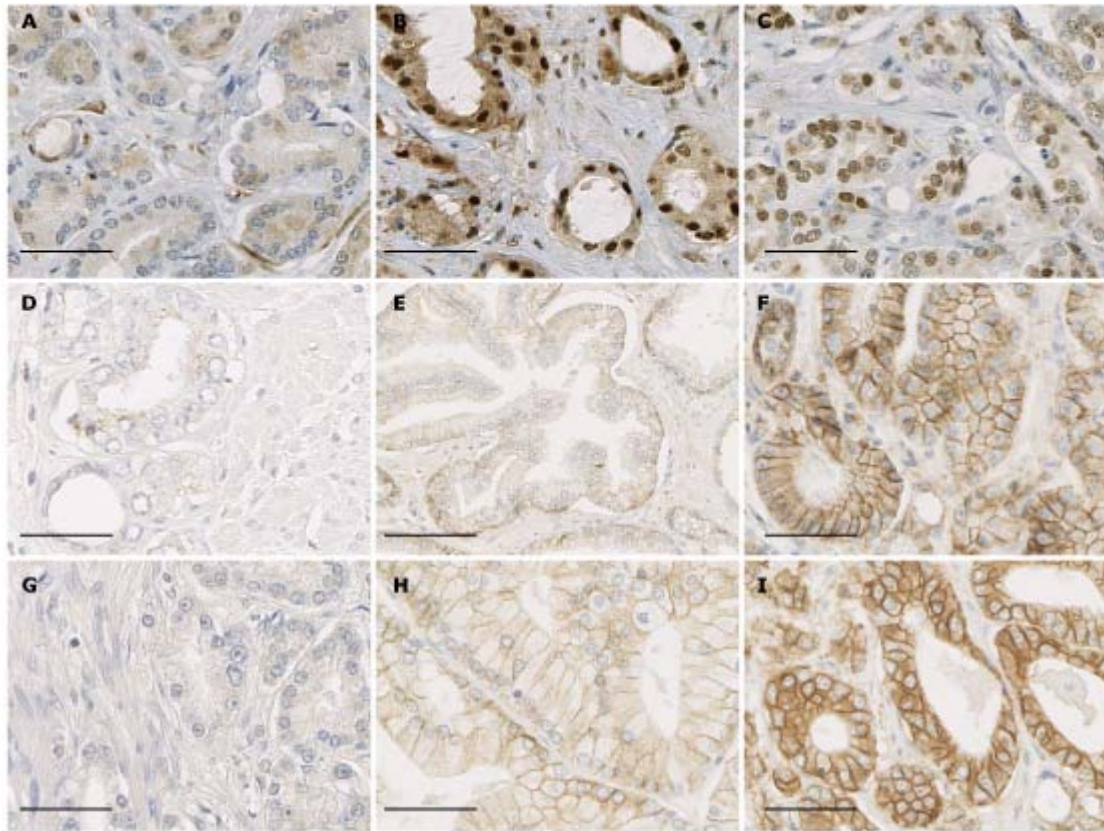
Figure 3: CXCR4 expression at the tumor front.

Figure 4: CXCR4, E-cadherin and β -catenin protein expression and subcellular localization in tumors (T), at tumor fronts (F) and distal tissues (D); Association with tumor stage and Gleason score. Color legend: CXCR4 : blue: no or weak labeling; Green: cytosol; yellow: cytosol and nuclear; orange: nuclear. E-cadherin and β -catenin: blue: no or weak labeling; green: plasma membrane; yellow: plasma membrane and cytosol; orange: cytosol. A: CXCR4, E-Cadherin and β -catenin expressions and subcellular localizations in tumor, front and distal tissue. *: $p<0.05$; **: $p<0.01$; ***: $p<0.001$. Red stars compare T to F, black stars F to D, white stars, T to D. B: Comparison of CXCR4, E-Cadherin and β -catenin expressions and subcellular localizations between pT2 (19 samples) and pT3 (20 samples) tumors and tumor fronts. Black star indicates a statistical difference ($p<0.05$) between groups in the same subcellular localization. C: Comparison of CXCR4, E-Cadherin and β -catenin expressions and subcellular localizations between Gleason 6 (16 samples) and Gleason >6 (24 samples) tumors and tumor fronts. Black star indicates a statistical difference ($p<0.05$) between groups in the same subcellular localization.

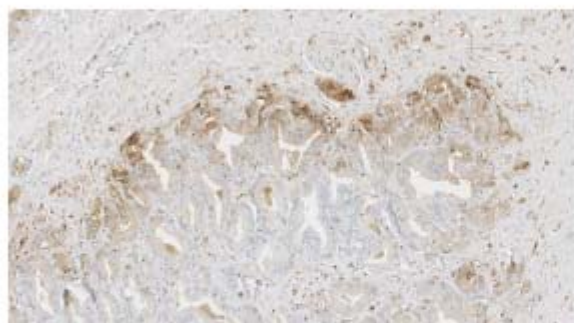
N. Barry Delongchamps et al., Fig 1

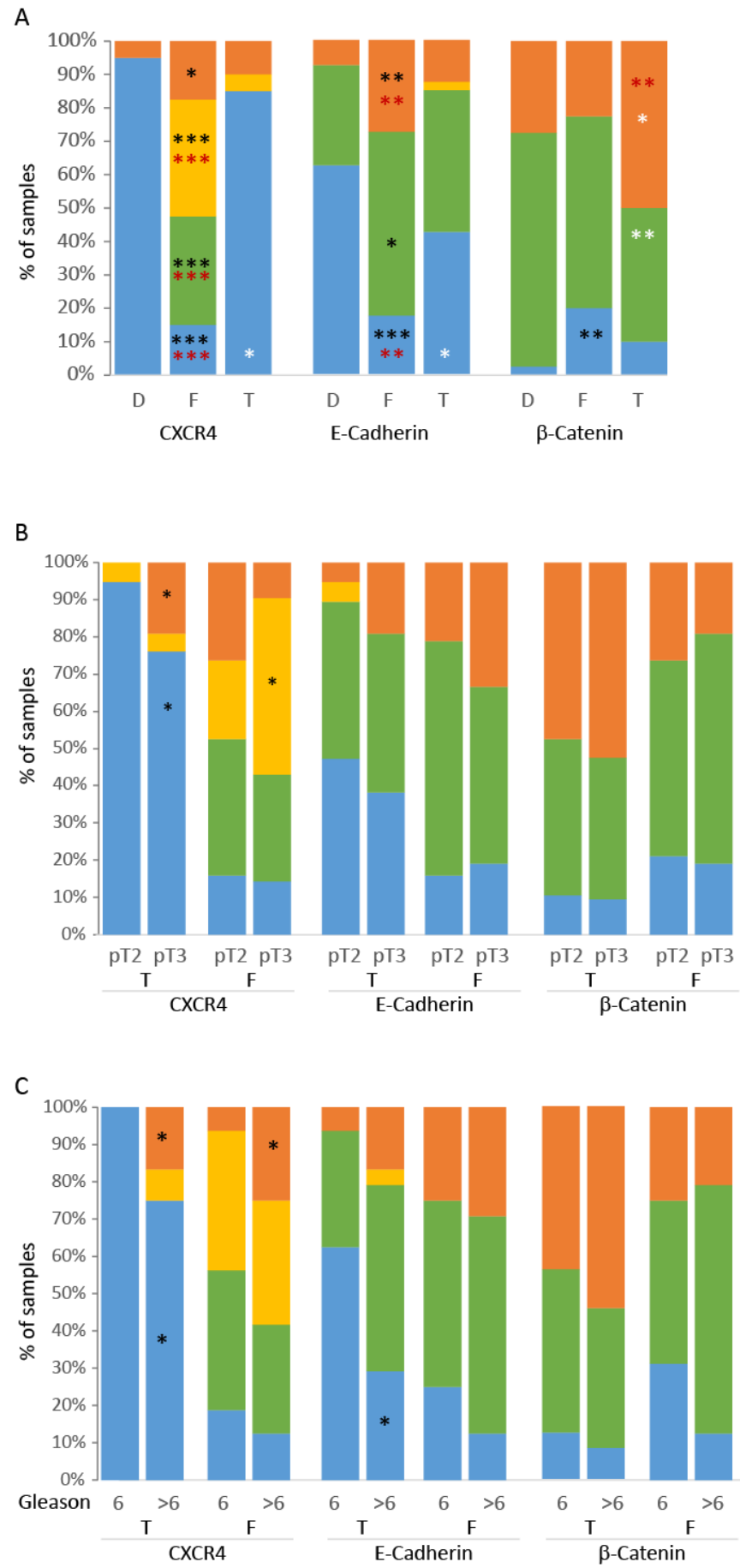


N. Barry Delongchamps et al., Fig. 2



N. Barry DeLongchamps et al., Fig. 3





DISCUSSION

Plusieurs travaux antérieurs ont suggéré que l'axe SDF1/CXCR4 avait un rôle local dans l'invasion tumorale à travers la matrice extra-cellulaire (chapitre IV.5). Pour étudier en détail l'expression de CXCR4 et SDF1 dans l'environnement de la tumeur primaire, il nous a donc semblé important de distinguer différentes localisations tissulaires au sein de la glande prostatique : au centre de la tumeur, au niveau du front tumoral et à distance de la tumeur. A titre de comparaison, nous avons utilisé également du tissu prostatique non tumoral provenant de patients opérés pour une hyperplasie bénigne de prostate symptomatique. Une difficulté de cette approche est de localiser précisément le tissu prélevé sur les tissus congelés. L'élément le plus fiable étant le pourcentage de cellules tumorales détectées dans le prélèvement congelé, nous avons classé les prélèvements en fonction du pourcentage de cellules tumorales qu'ils contenaient :

- 1- Tissu tumoral : 80-100% de cellules tumorales
- 2- Front tumoral : <80% de cellules tumorales
- 3- Tissu non tumoral distant : 0% de cellules tumorales

L'extraction des ARNm directement sur tissu inclus en paraffine, nous aurait potentiellement permis d'augmenter la fiabilité de notre classification. Néanmoins, ce type d'extraction ne permet pas d'obtenir de l'ARN de qualité optimale. L'analyse de l'expression protéique de CXCR4 n'a pas posé de problème de localisation tissulaire, puisqu'elle a été effectuée par immunohistochimie sur tissu inclus en paraffine. Sur chaque coupe sélectionnée, étaient à la fois présent du tissu centrotumoral, du front tumoral et du tissu non tumoral distant. Nous avons donc pu distinguer précisément les 3 localisations d'intérêt. Le fait que nos résultats en ARN et en immunohistochimie soient concordants nous a confortés à *posteriori* dans la validité de notre classification.

Avec cette méthodologie, nous avons observé une surexpression de CXCR4 au niveau du front tumoral, associée à un gradient croissant d'expression de SDF1 du centre des tumeurs vers la périphérie. Notre première hypothèse a été qu'il existait probablement un chimiotactisme local des cellules exprimant CXCR4, les attirant à distance de la tumeur, puis éventuellement vers la capsule prostatique. Cette hypothèse est en accord avec le rôle décrit

précédemment de l'axe SDF1/CXCR4 dans la dissémination et la nidation métastatique (Taichman et al., 2002) (Muller et al., 2001). Néanmoins, cette hypothèse est discutable en raison des limites méthodologiques de notre travail. L'orientation des tissus prélevés et leur localisation macroscopique au sein de la glande n'étaient pas connus. De même, le cancer de la prostate étant dans la majorité des cas multifocal, un tissu considéré comme distant du foyer étudié aurait pu être contigu à un foyer secondaire non détecté sur le prélèvement. Une perspective de travail additionnel serait donc d'étudier plus précisément l'expression de CXCR4 et SDF1 sur la totalité d'une glande. Ce travail serait possible en immunohistochimie sur grandes lames intégrant la totalité d'une section de prostate, après avoir repéré la tumeur index et l'ensemble des foyers tumoraux secondaires sur l'ensemble des coupes, et mesuré l'orientation tridimensionnelle de chaque tumeur.

La surexpression de CXCR4 au niveau du front tumoral était particulièrement bien visible en immunohistochimie, avec une différence significative par rapport aux autres localisations étudiées (centrotumoral et tissu non tumoral distant). En comparaison, l'expression ARNm de CXCR4 au niveau de front tumoral n'était significativement plus élevée que par rapport au tissu centrotumoral. Ce résultat nous a poussé à émettre l'hypothèse d'une éventuelle régulation post-transcriptionnelle de CXCR4, hypothèse déjà évoquée par Sun et al (Sun et al., 2003) dans une publication récente. Ces auteurs ont étudié l'expression ARNm et protéique de CXCR4 sur des TMA provenant de tumeurs primaires et métastatiques de la prostate, et rapportés des niveaux d'expression protéiques supérieurs à ceux en ARNm. Néanmoins, il n'existe pas à notre connaissance d'étude ayant évalué les éventuels mécanismes de régulation post-transcriptionnelle de CXCR4 dans le cancer de la prostate. Nos observations en immunohistochimie nous ont permis néanmoins d'évoquer un mécanisme possible de régulation par la translocation de CXCR4 vers le noyau, induisant possiblement une plus grande stabilité. En effet, nous avons observé que la surexpression de CXCR4 au niveau du front tumoral était associée à un marquage nucléaire de CXCR4 dans environ deux tiers des cas. Cette hypothèse est confortée par les travaux de Kasina et al (Kasina and Macoska, 2012a) effectués sur des lignées tumorales prostatiques et suggérant que CXCR4 aurait un rôle de coactivateur du RA en participant à sa translocation dans le noyau.

Nos résultats, malgré le faible nombre de cas étudiés, suggèrent que l'expression au front tumoral de CXCR4 et SDF1 pourrait avoir une valeur pronostique. En effet, les tumeurs exprimant des niveaux élevés de CXCR4 et des niveaux faibles de SDF1 au front tumoral

étaient celles ayant les caractéristiques histologiques les plus péjoratives. De plus, des niveaux faibles d'expression ARNm de SDF1 au front tumoral étaient associés à la récurrence biologique après prostatectomie radicale. La littérature est pauvre sur le rôle pronostique éventuel de CXCR4 en tant que marqueur tissulaire (chapitre IV.5), avec des résultats controversés. Néanmoins, ces études ont été réalisées sur du tissu tumoral, et non pas au niveau du front. Étant donné les rôles rapportés de CXCR4 et SDF1 dans l'invasion tumorale, il paraissait peu probable de mettre en évidence des modifications d'expression intra-tumorale. Nos résultats soulignent donc l'importance du choix de la localisation tissulaire précise pour évaluer la valeur pronostique des différents marqueurs tumoraux.

La surexpression de CXCR4 au niveau du front tumoral nous a amené à rechercher un lien entre son expression et celle de deux protéines majeures de la TEM : E-cadhérine et β -caténine. Nos résultats sont en concordance avec les mécanismes rapportés de la TEM (chapitre IV-5) puisque nous avons observé une diminution de l'expression de β -caténine au niveau du front tumoral, associée à une augmentation du marquage cytoplasmique de l'E-cadhérine. L'interprétation des différents marquages immunohistochimiques a été néanmoins difficile en raison de la diversité possible des localisations subcellulaires de ces deux protéines. Cette hétérogénéité de marquage était particulièrement marquée au niveau centro-tumoral. A ce niveau, l'immunomarquage a montré principalement une localisation aberrante de l'E-cadhérine et/ou la β -caténine. Le marquage de la β -caténine était souvent diffus, associé ou non à un marquage membranaire de l'E-cadhérine. Cette hétérogénéité, observée par plusieurs auteurs (Aaltomaa et al., 2005; Chen et al., 2004 ; Jaggi et al., 2005), est probablement le reflet d'une multitude d'événements moléculaires complexes engageant plusieurs voies de signalisation différentes. Les mécanismes pro tumoraux multiples impliquant ces deux protéines pourraient expliquer la variabilité des résultats de la littérature concernant leur rôle possiblement pronostique. L'association possible entre l'expression tumorale d'E-cadhérine et le score de Gleason, mise en évidence dans notre étude, a été aussi suggérée par un travail récemment publié (Behnsawy et al., 2013). Ces auteurs ont mesuré l'expression tissulaire tumorale de 13 protéines (dont E-cadhérine et β -caténine) impliquées dans la TEM chez 190 patients opérés d'une prostatectomie radicale pour un cancer de la prostate cliniquement localisé. Ils ont mis en évidence une association statistique entre le score de Gleason et l'immunomarquage intra-tumoral de l'E-cadhérine en analyse multivariée. En revanche, l'expression tumorale de β -caténine n'était associée à aucun critère de mauvais pronostic, ce qui est en accord avec nos résultats. Une autre étude, réalisée sur une

cohorte de 122 patients traités par prostatectomie radicale, n'a pas montré d'association entre l'expression tumorale de la β -caténine et la survenue d'une récurrence biologique (de la Taille et al., 2003).

DISCUSSION GENERALE

L'ensemble de mon travail de thèse s'inscrit dans un même objectif global, la recherche de mécanismes de progression du cancer de la prostate qui permette de disposer de nouveaux marqueurs pronostiques ou diagnostiques et/ou d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

CAD, potentielle cible thérapeutique

Le premier travail exposé dans ce manuscrit démontre que CAD, une enzyme clé de la voie de néosynthèse des pyrimidines, interagit avec AR et régule son activité transcriptionnelle. Ces deux fonctions sont requises pour la croissance des carcinomes prostatiques, y compris au stade résistant à la castration. La surexpression de CAD et/ou l'augmentation de sa phosphorylation et de sa translocation nucléaire dans les carcinomes prostatiques pourrait donner deux avantages prolifératifs aux cellules cancéreuses : la synthèse de grandes quantités de pyrimidines pour suffire aux besoins de cellules se divisant rapidement ; et l'augmentation de l'activité transcriptionnelle d'AR indépendamment des androgènes. Cette dernière fonction pourrait aussi être impliquée dans la résistance à la castration. De ce fait, CAD pourrait représenter une nouvelle cible thérapeutique potentielle chez les patients ayant un cancer de la prostate résistant à la castration.

Plusieurs essais cliniques du PALA, un inhibiteur de l'activité enzymatique de CAD ont été réalisés dans d'autres types de carcinome. Cependant, les résultats des études cliniques menées avec cette drogue ont été décevants, à la fois sur le plan carcinologique et de la toxicité induite (Braasch et al., 2004 ; Hursting et al., 2002 ; Kemeny et al., 1992 ; Langer et al., 1998 ; Muggia et al., 1984 ; Muss et al., 1984 ; Paroo and Corey, 2003; Zhang et al., 2003). Un des mécanismes invoqués pour expliquer la résistance au PALA serait l'accumulation de carbomoyl phosphate (voir figure 8), qui entrerait en compétition avec le PALA et permettrait la restauration de la voie métabolique après un certain délai (Hanahan and Folkman, 1996 #1713; Wu et al., 2005).Le PALA n'a jamais été testé dans les

carcinomes prostatiques. Cependant, notre travail montre que le PALA n'affecte pas la voie androgénique, mais seulement la biosynthèse des pyrimidines. Inhiber l'activité enzymatique de CAD dans ces cancers n'affecterait donc pas sa capacité à co-transloquer avec AR dans le noyau, (Braasch et al., 2004 ; Hanahan and Folkman, 1996 #1713; Hursting et al., 2002 ; Kemeny et al., 1992 ; Langer et al., 1998 ; Muggia et al., 1984 ; Muss et al., 1984 ; Paroo and Corey, 2003; Wu et al., 2005 ; Zhang et al., 2003). En revanche, l'extinction de CAD par interférence ARN in vivo pourrait ouvrir de nouvelles perspectives sur le plan thérapeutique, en permettant d'inhiber en même temps la voie de biosynthèse des pyrimidines, et la translocation d'AR, deux processus essentiels pour la croissance des tumeurs prostatiques, y compris en absence de ligands d'AR dans les tumeurs résistantes à la castration.

Plusieurs antagonistes d'AR, dits de nouvelle génération, sont en cours de développement. Le plus abouti sur le plan clinique est l'enzalutamide (MDV3100), qui a fait la preuve de son efficacité en cas de résistance à la castration (Scher et al., 2012). L'enzalutamide a une affinité cinq fois supérieure pour AR que le bicalutamide, et seulement deux fois inférieure à celle de la DHT, son ligand naturel (Tran et al., 2009). À la différence du bicalutamide, il limite la translocation nucléaire du complexe ligand-AR, et empêche sa fixation sur l'ADN et le recrutement des co-activateurs de la machinerie transcriptionnelle (Tran et al., 2009). Sa tolérance, à la posologie habituelle de 160 mg, est en pratique quotidienne excellente ; les principales toxicités (asthénie, troubles du transit, crises convulsives) ayant été observées dans les essais de phase I pour des doses élevées (240 mg/j). Dans ce contexte, une perspective de travail ultérieur au laboratoire serait d'évaluer si l'enzalutamide a un effet sur la fixation de CAD sur AR.

Réévaluation des effets des drogues antiangiogéniques et perspectives

L'angiogenèse est considérée comme une cible thérapeutique dans de nombreux cancers. Deux types de traitements visant à inhiber l'angiogenèse ont été développés : l'inhibition des voies pro-angiogéniques, avec en majorité des traitements ciblant la voie VEGF/VEGFR ; la stimulation des voies anti-angiogéniques, avec l'utilisation de fragments de la TSP1. De nombreux traitements ciblant la voie VEGF/VEGFR ont été évalués par des études contrôlées, notamment chez les patients ayant un cancer de la prostate métastatique

résistant à la castration (Aragon-Ching and Dahut, 2009). Le bénéfice rapporté sur la survie globale était très modeste. Un nombre important d'effets secondaires inattendus et de nombreux mécanismes de résistances ont été observés (Azam et al., 2010; Chen and Cleck, 2009). Dans des modèles expérimentaux, plusieurs auteurs ont observé une augmentation de la dissémination métastatique secondaire à l'utilisation des voies de transduction du VEGF (Ebos et al., 2009 ; Paez-Ribes et al., 2009). En clinique la seule démonstration d'un effet proinvasif des inhibiteurs pharmacologiques de l'angiogenèse n'a cependant à ce jour été faite que dans le cas des glioblastomes (de Groot et al., 2010; Norden et al., 2008; Thompson et al., 2011; Wick et al., 2011).

La stimulation des voies anti-angiogéniques a été testée avec un peptide dérivé de la TSP1 (ABT-510). Ce peptide a été évalué dans le traitement de sarcomes des tissus mous et dans les mélanomes lors de deux études cliniques de phase II. Bien que conservant les propriétés anti-angiogéniques de la TSP1, l'ABT-510 n'a pas produit de bénéfice clinique (Baker et al., 2008; Markovic et al., 2007).

Le rôle de l'hypoxie est considéré comme central dans les mécanismes d'échappement des tumeurs aux antiangiogéniques (De Bock et al., 2011). L'ensemble de ces résultats nous a conduits à réévaluer l'effet sur la croissance tumorale d'un inhibiteur endogène de l'angiogenèse, la TSP1, du fait de sa capacité à augmenter l'hypoxie tumorale, et à étudier l'expression de CXCR4 et de SDF1 dans les carcinomes prostatiques, cet axe étant connu pour être régulé par l'hypoxie.

TSP1

Les souris pyT développent spontanément des tumeurs dans la glande mammaire qui métastasent dans le poumon. Le croisement de ces souris avec des animaux KO pour la TSP1 a permis au groupe de J. Lawler de montrer que la TSP1 inhibe la croissance des tumeurs primaires mais stimule le développement des métastases. Ce travail met en évidence la complexité du rôle de la TSP1 mais ne fournit pas de mécanisme pour expliquer ces données.

Dans notre étude, nous avons montré que la TSP1 était effectivement un puissant inhibiteur de l'angiogenèse tumorale, mais qu'elle induisait également la migration des

cellules tumorales prostatiques : La TSP1 aurait donc deux actions sur les tumeurs prostatiques: une action de stimulation de la migration et de la dissémination métastatique et un effet anti-angiogénique. En effet, l'inhibition de l'expression de la TSP1 par ARN interférence entraînait une diminution de la migration des cellules tumorales prostatiques à travers une membrane microporeuse. De plus, l'inhibition de l'expression de deux récepteurs de la TSP1, le CD36 et l'intégrine $\beta 3$, diminuait également la migration des cellules tumorales prostatiques. Des expériences complémentaires effectuées au laboratoire, utilisant un anticorps anti-TSP1 inhibant spécifiquement l'interaction TSP1/CD36, ont confirmé l'implication de la liaison de la TSP1 au CD36 dans l'induction de la migration des cellules tumorales prostatiques. De façon intéressante, nous avons récemment montré que l'heptapeptide anti-angiogénique ABT-510 dérivé de la TSP1 était également un puissant stimulateur de la migration des cellules tumorales prostatiques *in vitro*. L'implication du CD36, déjà connu pour son rôle dans l'inhibition de l'angiogenèse, dans la migration des cellules tumorales d'une part et l'effet pro-migratoire de peptide ABT-510 d'autre part suggèrent que les fonctions de la TSP1 sur la migration et sur l'inhibition de l'angiogenèse sont proches : portées par des régions communes de la protéine qui utilisent les mêmes voies de transduction. Des études de mutagenèse de la protéine seraient intéressantes à conduire pour déterminer si l'on peut inhiber l'action antiangiogénique sans affecter l'effet sur la migration et réciproquement.

Nos résultats sur la valeur pronostique de l'expression tissulaire de la TSP1 ne portent que sur un nombre restreint de patients (38 dont 9 ayant rechuté après la chirurgie) et nécessitent d'être confirmés par l'étude d'une plus large cohorte. Or, la quantification des ARNm de la TSP1 sur des pièces de prostatectomies radicales congelées n'est pas une méthode compatible avec l'étude d'un grand nombre de cas et moins encore avec un dépistage en routine. L'expression tissulaire de la TSP1 ne peut en effet être évaluée en pratique clinique qu'après un geste invasif (biopsies de la prostate, prostatectomie radicale). La TSP1 est une protéine sécrétée et quantifiable par ELISA dans le sang. Une étude conduite dans les cancers du sein a montré une augmentation significative de la TSP1 plasmatique chez les patientes ayant un cancer localisé par rapport à des contrôles sains, et une augmentation plus importante encore lorsque le cancer était métastatique (Byrne et al., 2007). Nous avons entrepris de réaliser une étude du même type sur une cohorte de 400 patients (CHU de Toulouse). Ces patients ont eu une série de biopsies de la prostate en raison d'une élévation de

leur PSA sérique. Avant les biopsies, un échantillon plasmatique a été prélevé et congelé de manière prospective chez tous les patients. Plusieurs groupes de patients ont été individualisés, en fonction de la présence ou non de cancer sur les biopsies, du stade et du score de Gleason. Les premiers résultats, à confirmer sur l'ensemble de la cohorte, ont indiqué que les patients ayant un cancer diagnostiqué sur les biopsies avaient une TSP1 plasmatique significativement augmentée par rapport aux patients ayant des biopsies normales. De même, le taux de TSP1 plasmatique était associé de manière statistiquement significative au stade tumoral.

Puisque la TSP1 est régulée par l'hypoxie, son expression plasmatique pourrait aussi être utilisée comme marqueur prédictif d'efficacité des traitements anti-angiogéniques. Pour tester cette hypothèse, nous réalisons actuellement le dosage de la TSP1 plasmatique de patients ayant un cancer de la prostate métastatique résistant à la castration et traités par Sunitinib dans le cadre de l'essai PROSUT. Dans cet essai clinique, tous les patients ont eu un premier plasmatique au moment de l'inclusion puis après 3 mois de traitement continu par Sunitinib à demi-dose (37,5 mg/jour). Plusieurs groupes de patients ont été identifiés en fonction de la réponse au traitement et de leur survie sans progression. Notre objectif est d'évaluer l'évolution des taux plasmatiques de TSP1 au cours du traitement anti-angiogénique et de rechercher une association statistique entre la TSP1 pré-thérapeutique et la réponse au traitement. Cette recherche est effectuée en collaboration avec le service d'oncologie de l'hôpital européen Georges Pompidou (Pr Oudard).

Enfin les implications cliniques potentielles de nos résultats, en plus des aspects diagnostics et pronostics discutés précédemment, pourraient être importants pour le traitement du cancer de la prostate métastatique. La castration, stratégie thérapeutique de première ligne, induit une involution tumorale, une diminution de la vascularisation provoquée par une diminution de l'expression du VEGF, ainsi qu'une augmentation de l'expression de TSP1 (Huggins and Hodges, 1941 ; Johnson et al., 2008; Mattila et al., 2006). L'hypoxie induite par la castration participerait donc potentiellement à l'émergence de la résistance à la castration. Nos résultats suggèrent donc qu'un traitement associant castration et inhibition de TSP1 pourrait repousser le délai avant l'échappement thérapeutique.

L'axe SDF1/CXCR4

Nos travaux sur la TSP1 et son action sur la migration des cellules tumorales nous a conduit naturellement à nous intéresser à l'axe SDF1/CXCR4, impliqué lui aussi dans l'invasion locale des cellules tumorales (chapitre IV-5).

En réalité, CXCR4 et son ligand SDF1 participeraient à la progression tumorale par différents mécanismes et à différentes étapes de la progression tumorale. Dans notre travail, nous avons étudié l'expression de ces protéines au moment des étapes initiales de la progression tumorale, chez des patients ayant un cancer non métastatique localisé ou localement avancé.

Plusieurs travaux expérimentaux ont montré que l'axe CXCR4/SDF-1 jouait un rôle majeur dans les dernières étapes de la prolifération métastatique dans de nombreux cancers (chapitre IV.5). Ces modèles expérimentaux ont suggéré que les cellules exprimant CXCR4 allaient préférentiellement migrer vers les organes secondaires présentant les plus fortes concentrations de SDF-1 (Muller et al., 2001). La présence d'un gradient d'expression de SDF1 exercerait un effet chimiotactique sur les cellules tumorales, entraînant migration et dissémination. Ces observations n'avaient pas à notre connaissance été confirmées sur tissu humain, et surtout localement, au sein même de la glande prostatique. Notre analyse a en effet montré l'existence de ce même gradient d'expression au sein des glandes prostatiques envahies. Une expression croissante de SDF1 a été observée du centre des tumeurs vers leur front puis vers le tissu sain distant. Ce gradient de SDF1 était associé à une surexpression de CXCR4 au niveau du front tumoral, confortant donc l'hypothèse d'un chimiotactisme SDF1/CXCR4 du front tumoral vers le tissu environnant. D'après nos observations, plus le gradient de SDF1 était important (plus son expression était basse au niveau du front tumorale), et plus le risque de récurrence biologique après prostatectomie radicale était important. De même, plus l'expression de CXCR4 était élevée au niveau du front tumoral, plus les caractéristiques histologiques (score de Gleason et stade pathologique) étaient péjoratives. Toutes ces observations concordantes suggèrent que l'étude de l'environnement périphérique de la tumeur a une importance majeure dans la compréhension des mécanismes de progression tumorale, de même que pour le développement de nouveaux marqueurs pronostiques. Peu d'études cliniques se sont intéressées au front tumoral pour étudier la valeur

pronostique de nouveaux marqueurs. Pour des raisons évidentes d'efficacité, les profils d'expression tissulaire s'étudient sur TMA. Pourtant, cette méthodologie peut conduire à des résultats biaisés, ou au minimum à de mauvaises interprétations. Dans un travail récent, Behnsawy et al (Behnsawy et al., 2013) ont évalué par immunohistochimie les profils d'expression tissulaire de 13 protéines impliquées dans la TEM sur des pièces de prostatectomie radicale provenant de 190 patients opérés pour un cancer cliniquement localisé de la prostate. Il s'agissait de l'E-cadhérine, la N-cadhérine, β -caténine, γ -caténine, fibronectine, MMP2, MMP9, Slug, Snail, Twist, la Vimentine, ZEB1 et ZEB2. L'ensemble de ces protéines étant impliqués dans des phénomènes survenant à la périphérie des tumeurs, l'analyse des profils d'expression à ce niveau aurait pu sembler logique. Or, ces auteurs se sont intéressés exclusivement au tissu tumoral, sans rapporter leurs observations éventuelles par rapport au front des tumeurs et au tissu non tumoral adjacent. Ils ont rapportés que seuls les niveaux d'expression de Twist et de la Vimentine étaient associés à la récurrence biologique. Ces résultats ne permettent néanmoins pas d'éliminer la valeur pronostique éventuelle de l'ensemble de ces marqueurs, s'ils étaient évalués au niveau du front tumoral.

L'implication de CXCR4 dans la TEM avait déjà été suggérée par plusieurs études (chapitre IV.5), en particulier récemment sur un modèle *in vitro* de cancer du colon (lignée HT29) (Wang et al., 2011). Wang et al (Wang et al., 2011) ont en effet suggéré que l'axe CXCR4/SDF1, en plus de son rôle chimiotactique, régulerait négativement le complexe E-cadhérine/ β -caténine, en entraînant sa décomposition. Or, l'E-cadhérine est un composant majeur des liaisons inter-cellulaires dans la prostate comme dans toutes les glandes, responsable des jonctions adhérentes permettant de maintenir un phénotype différencié (chapitre IV.5). La β -caténine se lie à la région C-terminale cytoplasmique de l'E-cadhérine, de même qu'à l'actine, stabilisant l'adhésion cellulaire. La décomposition du complexe faciliterait la TEM (Tian et al., 2011). De plus, la β -caténine serait un effecteur de la voie Wnt/wg, impliquée dans de nombreux processus prolifératifs tumoraux (Mimeault and Batra, 2011). Dans l'étude de Wang et al, les auteurs ont montré une diminution de l'expression ARNm d'E-cadhérine et de β -caténine après incubation des cellules HT29 en présence de SDF1. Enfin, ils ont montré que SDF1 induisait une phosphorylation de la β -caténine, ce qui entraînait la dislocation du complexe E-cadhérine/ β -caténine. Sur pièce de prostatectomie radicale, nous avons observé une diminution de l'expression de la β -caténine au niveau du front tumoral. A ce niveau, l'immunomarquage de la β -caténine était significativement plus

faible ou absent, alors que celui de CXCR4 était intense. Nos résultats sont donc en accord avec ceux de Wang (Wang et al., 2011), et suggèrent que l'action régulatrice de l'axe SDF1/CXCR4 sur le complexe E-cadhérine/ β -caténine se joue au niveau du front tumoral.

En conclusion, nos résultats suggèrent que l'axe SDF1/CXCR4 pourrait avoir un rôle double au sein des glandes prostatiques tumorales : Un rôle chimiotactique local induit par le gradient de SDF1 sur les cellules du front tumoral exprimant CXCR4, facilité par la dislocation du complexe E-cadhérine/ β -caténine secondaire à l'action du même couple SDF1/CXCR4. La perte consécutive des jonctions adhérents permettrait donc aux cellules tumorales de migrer vers le gradient de SDF1. Etant donné la régulation de CXCR4 par HIF-1 et le VEGF, eux-mêmes augmentés dans l'environnement tumoral immédiat des cancers de la prostate, il semblerait que la voie SDF1/CXCR4 participe également à la migration cellulaire et à la progression tumorale induite par l'hypoxie.

CONCLUSIONS

Nous présentons dans ce manuscrit deux cibles thérapeutiques potentielles dans la prise en charge du cancer de la prostate résistant à la castration, la protéine CAD et la TSP1. Enfin, nous présentons un travail observationnel sur l'expression tissulaire de CXCR4 et SDF1, deux protéines impliquées dans la progression locale et métastatique, potentiellement induite, en partie du moins, par l'hypoxie.

Nos travaux ont permis d'identifier un nouveau cofacteur du récepteur aux androgènes, la protéine CAD, impliquée dans la translocation du récepteur vers le noyau. Ce nouveau cofacteur ouvre des perspectives thérapeutiques, en particulier par interférence ARN.

Nos travaux ont montré par ailleurs que la TSP1, malgré son effet anti-angiogénique, a un rôle pro-tumoral dans les cellules de carcinome prostatique, en régulant la migration cellulaire. Les thérapies visant à inhiber totalement la vascularisation ne semblent donc pas être appropriées dans les traitements des carcinomes prostatiques. En effet, l'hypoxie excessive induite par ces traitements est effectivement efficace sur la tumeur primaire mais induit une dissémination métastatique accrue.

Enfin, nos travaux sur CXCR4 et SDF1 s'inscrivent dans la recherche des mécanismes multiples de progression tumorale liée à l'hypoxie. Il semblerait que l'axe SDF1/CXCR4, possiblement en réponse à l'hypoxie, agisse non seulement par chimiotactisme cellulaire, mais participe aussi à la régulation de la TEM au niveau du front tumoral.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aaltomaa, S., Karja, V., Lipponen, P., Isotalo, T., Kankkunen, J. P., Talja, M., and Mokka, R. (2005). Reduced alpha- and beta-catenin expression predicts shortened survival in local prostate cancer. *Anticancer Res* 25, 4707-4712.
- Abate-Shen, C., and Shen, M. M. (2000). Molecular genetics of prostate cancer. *Genes Dev* 14, 2410-2434.
- Abrahamsson, P. A. (1996). Neuroendocrine differentiation and hormone-refractory prostate cancer. *Prostate Suppl* 6, 3-8.
- Abrahamsson, P. A. (1999). Neuroendocrine cells in tumour growth of the prostate. *Endocr Relat Cancer* 6, 503-519.
- Adams, J. C. (2001). Thrombospondins: multifunctional regulators of cell interactions. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17, 25-51.
- Akashi, T., Koizumi, K., Nagakawa, O., Fuse, H., and Saiki, I. (2006). Androgen receptor negatively influences the expression of chemokine receptors (CXCR4, CCR1) and ligand-mediated migration in prostate cancer DU-145. *Oncol Rep* 16, 831-836.
- Akashi, T., Koizumi, K., Tsuneyama, K., Saiki, I., Takano, Y., and Fuse, H. (2008). Chemokine receptor CXCR4 expression and prognosis in patients with metastatic prostate cancer. *Cancer Sci* 99, 539-542.
- Albo, D., Berger, D. H., Rothman, V. L., and Tuszynski, G. P. (1999a). Role of urokinase plasminogen activator receptor in thrombospondin 1-mediated tumor cell invasion. *J Surg Res* 82, 331-338.
- Albo, D., Berger, D. H., Vogel, J., and Tuszynski, G. P. (1999b). Thrombospondin-1 and transforming growth factor beta-1 upregulate plasminogen activator inhibitor type 1 in pancreatic cancer. *J Gastrointest Surg* 3, 411-417.
- Albo, D., Berger, D. H., Wang, T. N., Hu, X., Rothman, V., and Tuszynski, G. P. (1997). Thrombospondin-1 and transforming growth factor-beta 1 promote breast tumor cell invasion through up-regulation of the plasminogen/plasmin system. *Surgery* 122, 493-499; discussion 499-500.
- Albo, D., Rothman, V. L., Roberts, D. D., and Tuszynski, G. P. (2000). Tumour cell thrombospondin-1 regulates tumour cell adhesion and invasion through the urokinase plasminogen activator receptor. *Br J Cancer* 83, 298-306.
- 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.
- Allen, C. D., Ansel, K. M., Low, C., Lesley, R., Tamamura, H., Fujii, N., and Cyster, J. G. (2004). Germinal center dark and light zone organization is mediated by CXCR4 and CXCR5. *Nat Immunol* 5, 943-952.
- 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.
- Angeletti, P. C., and Engler, J. A. (1998). Adenovirus preterminal protein binds to the CAD enzyme at active sites of viral DNA replication on the nuclear matrix. *J Virol* 72, 2896-2904.
- Annes, J. P., Munger, J. S., and Rifkin, D. B. (2003). Making sense of latent TGFbeta activation. *J Cell Sci* 116, 217-224.
- Antonarakis, E. S., Heath, E. I., Walczak, J. R., Nelson, W. G., Fedor, H., De Marzo, A. M., Zahurak, M. L., Piantadosi, S., Dannenberg, A. J., Gurganus, R. T., *et al.* (2009). Phase II,

randomized, placebo-controlled trial of neoadjuvant celecoxib in men with clinically localized prostate cancer: evaluation of drug-specific biomarkers. *J Clin Oncol* 27, 4986-4993.

Aoki, T., Oya, H., Mori, M., and Tatibana, M. (1980). Control of pyrimidine biosynthesis in the *Ascaris* ovary: regulatory properties of glutamine-dependent carbamoyl-phosphate synthetase and copurification of the enzyme with aspartate carbamoyltransferase and dihydroorotase. *Mol Biochem Parasitol* 1, 55-68.

Aoki, T., Sebolt, J., and Weber, G. (1982). In vivo inactivation by acivicin of carbamoyl-phosphate synthetase II in rat hepatoma. *Biochem Pharmacol* 31, 927-932.

Aragon-Ching, J. B., and Dahut, W. L. (2009). VEGF inhibitors and prostate cancer therapy. *Curr Mol Pharmacol* 2, 161-168.

Arnoletti, J. P., Albo, D., Jhala, N., Granick, M. S., Solomon, M. P., Atkinson, B., Rothman, V. L., and Tuszynski, G. P. (1994). Computer-assisted image analysis of tumor sections for a new thrombospondin receptor. *Am J Surg* 168, 433-436.

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.

Asch, A. S., Silbiger, S., Heimer, E., and Nachman, R. L. (1992). Thrombospondin sequence motif (CSVTCG) is responsible for CD36 binding. *Biochem Biophys Res Commun* 182, 1208-1217.

Aus, G., Abbou, C. C., Bolla, M., Heidenreich, A., Schmid, H. P., van Poppel, H., Wolff, J., and Zattoni, F. (2005). EAU guidelines on prostate cancer. *Eur Urol* 48, 546-551.

Avila, D. M., Zoppi, S., and McPhaul, M. J. (2001). The androgen receptor (AR) in syndromes of androgen insensitivity and in prostate cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 76, 135-142.

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

Bachelder, R. E., Wendt, M. A., and Mercurio, A. M. (2002). Vascular endothelial growth factor promotes breast carcinoma invasion in an autocrine manner by regulating the chemokine receptor CXCR4. *Cancer Res* 62, 7203-7206.

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.

Bai, Z., Hayasaka, H., Kobayashi, M., Li, W., Guo, Z., Jang, M. H., Kondo, A., Choi, B. I., Iwakura, Y., and Miyasaka, M. (2009). CXC chemokine ligand 12 promotes CCR7-dependent naive T cell trafficking to lymph nodes and Peyer's patches. *J Immunol* 182, 1287-1295.

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.

Balabanian, K., Lagane, B., Infantino, S., Chow, K. Y., Harriague, J., Moepps, B., Arenzana-Seisdedos, F., Thelen, M., and Bachelier, F. (2005). The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes. *J Biol Chem* 280, 35760-35766.

Balkwill, F. (2004). The significance of cancer cell expression of the chemokine receptor CXCR4. *Semin Cancer Biol* 14, 171-179.

Behnsawy, H. M., Miyake, H., Harada, K., and Fujisawa, M. (2013). Expression patterns of epithelial-mesenchymal transition markers in localized prostate cancer: significance in clinicopathological outcomes following radical prostatectomy. *BJU Int* 111, 30-37.

Behrens, J., Vakaet, L., Friis, R., Winterhager, E., Van Roy, F., Mareel, M. M., and Birchmeier, W. (1993). Loss of epithelial differentiation and gain of invasiveness correlates with tyrosine phosphorylation of the E-cadherin/beta-catenin complex in cells transformed with a temperature-sensitive v-SRC gene. *J Cell Biol* 120, 757-766.

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.

Belanger, B., Belanger, A., Labrie, F., Dupont, A., Cusan, L., and Monfette, G. (1989). Comparison of residual C-19 steroids in plasma and prostatic tissue of human, rat and guinea pig after castration: unique importance of extratesticular androgens in men. *J Steroid Biochem* 32, 695-698.

Berger, P., Gruschwitz, M., Spoettl, G., Dirnhofer, S., Madersbacher, S., Gerth, R., Merz, W. E., Plas, E., and Sampson, N. (2007). Human chorionic gonadotropin (hCG) in the male reproductive tract. *Mol Cell Endocrinol* 260-262, 190-196.

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

Bernhagen, J., Krohn, R., Lue, H., Gregory, J. L., Zernecke, A., Koenen, R. R., Dewor, M., Georgiev, I., Schober, A., Leng, L., *et al.* (2007). MIF is a noncognate ligand of CXC chemokine receptors in inflammatory and atherogenic cell recruitment. *Nat Med* 13, 587-596.

Bigler, S. A., Deering, R. E., and Brawer, M. K. (1993). Comparison of microscopic vascularity in benign and malignant prostate tissue. *Hum Pathol* 24, 220-226.

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.

Bleul, C. C., Farzan, M., Choe, H., Parolin, C., Clark-Lewis, I., Sodroski, J., and Springer, T. A. (1996a). The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature* 382, 829-833.

Bleul, C. C., Fuhlbrigge, R. C., Casasnovas, J. M., Aiuti, A., and Springer, T. A. (1996b). A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1). *J Exp Med* 184, 1101-1109.

Boccon-Gibod, L. M., de Longchamps, N. B., Toubanc, M., Boccon-Gibod, L. A., and Ravery, V. (2006). Prostate saturation biopsy in the reevaluation of microfocal prostate cancer. *J Urol* 176, 961-963; discussion 963-964.

Boehm, T., Folkman, J., Browder, T., and O'Reilly, M. S. (1997). Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance. *Nature* 390, 404-407.

Bogdanov, A., Jr., Marecos, E., Cheng, H. C., Chandrasekaran, L., Krutzsch, H. C., Roberts, D. D., and Weissleder, R. (1999). Treatment of experimental brain tumors with thrombospondin-1 derived peptides: an in vivo imaging study. *Neoplasia* 1, 438-445.

Bologna, M., Festuccia, C., Muzi, P., Biordi, L., and Ciomei, M. (1989). Bombesin stimulates growth of human prostatic cancer cells in vitro. *Cancer* 63, 1714-1720.

Bonkhoff, H. (2001). Neuroendocrine differentiation in human prostate cancer. Morphogenesis, proliferation and androgen receptor status. *Ann Oncol* 12 Suppl 2, S141-144.

Bonkhoff, H., Stein, U., and Remberger, K. (1994). Multidirectional differentiation in the normal, hyperplastic, and neoplastic human prostate: simultaneous demonstration of cell-specific epithelial markers. *Hum Pathol* 25, 42-46.

Bonnefoy, A., Moura, R., and Hoylaerts, M. F. (2008). The evolving role of thrombospondin-1 in hemostasis and vascular biology. *Cell Mol Life Sci* 65, 713-727.

Bornstein, P. (1995). Diversity of function is inherent in matricellular proteins: an appraisal of thrombospondin 1. *J Cell Biol* 130, 503-506.

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

Borre, M., Bentzen, S. M., Nerstrom, B., and Overgaard, J. (1998). Tumor cell proliferation and survival in patients with prostate cancer followed expectantly. *J Urol* 159, 1609-1614.

Boyd, K. E., and Farnham, P. J. (1997). Myc versus USF: discrimination at the cad gene is determined by core promoter elements. *Mol Cell Biol* 17, 2529-2537.

Braasch, D. A., Paroo, Z., Constantinescu, A., Ren, G., Oz, O. K., Mason, R. P., and Corey, D. R. (2004). Biodistribution of phosphodiester and phosphorothioate siRNA. *Bioorg Med Chem Lett* 14, 1139-1143.

Broxmeyer, H. E., Orschell, C. M., Clapp, D. W., Hangoc, G., Cooper, S., Plett, P. A., Liles, W. C., Li, X., Graham-Evans, B., Campbell, T. B., *et al.* (2005). Rapid mobilization of murine and human hematopoietic stem and progenitor cells with AMD3100, a CXCR4 antagonist. *J Exp Med* 201, 1307-1318.

Bruchovsky, N., Lesser, B., Van Doorn, E., and Craven, S. (1975). Hormonal effects on cell proliferation in rat prostate. *Vitam Horm* 33, 61-102.

Bruggenwirth, H. T., Boehmer, A. L., Ramnarain, S., Verleun-Mooijman, M. C., Satijn, D. P., Trapman, J., Grootegoed, J. A., and Brinkmann, A. O. (1997). Molecular analysis of the androgen-receptor gene in a family with receptor-positive partial androgen insensitivity: an unusual type of intronic mutation. *Am J Hum Genet* 61, 1067-1077.

Buckley, C. D., Amft, N., Bradfield, P. F., Pilling, D., Ross, E., Arenzana-Seisdedos, F., Amara, A., Curnow, S. J., Lord, J. M., Scheel-Toellner, D., and Salmon, M. (2000). Persistent induction of the chemokine receptor CXCR4 by TGF-beta 1 on synovial T cells contributes to their accumulation within the rheumatoid synovium. *J Immunol* 165, 3423-3429.

Burchardt, M., Burchardt, T., Chen, M. W., Hayek, O. R., Knight, C., Shabsigh, A., de La Taille, A., and Buttyan, R. (2000). Vascular endothelial growth factor-A expression in the rat ventral prostate gland and the early effects of castration. *Prostate* 43, 184-194.

Bush, A., Mateyak, M., Dugan, K., Obaya, A., Adachi, S., Sedivy, J., and Cole, M. (1998). c-myc null cells misregulate cad and gadd45 but not other proposed c-Myc targets. *Genes Dev* 12, 3797-3802.

Busillo, J. M., and Benovic, J. L. (2007). Regulation of CXCR4 signaling. *Biochim Biophys Acta* 1768, 952-963.

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.

Campbell, J. J., Hedrick, J., Zlotnik, A., Siani, M. A., Thompson, D. A., and Butcher, E. C. (1998). Chemokines and the arrest of lymphocytes rolling under flow conditions. *Science* 279, 381-384.

Cano, A., Perez-Moreno, M. A., Rodrigo, I., Locascio, A., Blanco, M. J., del Barrio, M. G., Portillo, F., and Nieto, M. A. (2000). The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol* 2, 76-83.

Cardiff, R. D. (2005). Epithelial to Mesenchymal Transition Tumors: Fallacious or Snail's Pace? *Clin Cancer Res* 11, 8534-8537.

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

Carnell, D. M., Smith, R. E., Daley, F. M., Saunders, M. I., Bentzen, S. M., and Hoskin, P. J. (2006). An immunohistochemical assessment of hypoxia in prostate carcinoma using pimonidazole: implications for radioresistance. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 65, 91-99.

Carrey, E. A. (1993). Phosphorylation, allosteric effectors and inter-domain contacts in CAD; their role in regulation of early steps of pyrimidine biosynthesis. *Biochem Soc Trans* 21, 191-195.

Carrey, E. A. (1995). Key enzymes in the biosynthesis of purines and pyrimidines: their regulation by allosteric effectors and by phosphorylation. *Biochem Soc Trans* 23, 899-902.

Cato, A. C., Henderson, D., and Ponta, H. (1987). The hormone response element of the mouse mammary tumour virus DNA mediates the progestin and androgen induction of transcription in the proviral long terminal repeat region. *EMBO J* 6, 363-368.

Chan, T. D., Gatto, D., Wood, K., Camidge, T., Basten, A., and Brink, R. (2009). Antigen affinity controls rapid T-dependent antibody production by driving the expansion rather than the differentiation or extrafollicular migration of early plasmablasts. *J Immunol* 183, 3139-3149.

Chandrasekaran, L., He, C. Z., Al-Barazi, H., Kruttsch, H. C., Iruela-Arispe, M. L., and Roberts, D. D. (2000). Cell contact-dependent activation of $\alpha 3\beta 1$ integrin modulates endothelial cell responses to thrombospondin-1. *Mol Biol Cell* 11, 2885-2900.

Chaparian, M. G., and Evans, D. R. (1988). Intracellular location of the multidomain protein CAD in mammalian cells. *FASEB J* 2, 2982-2989.

Chen, G., Shukeir, N., Potti, A., Sircar, K., Aprikian, A., Goltzman, D., and Rabbani, S. A. (2004). Up-regulation of Wnt-1 and beta-catenin production in patients with advanced metastatic prostate carcinoma: potential pathogenetic and prognostic implications. *Cancer* 101, 1345-1356.

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.

Chen, K. C., Vannais, D. B., Jones, C., Patterson, D., and Davidson, J. N. (1989). Mapping of the gene encoding the multifunctional protein carrying out the first three steps of pyrimidine biosynthesis to human chromosome 2. *Hum Genet* 82, 40-44.

Chen, K. F., Lai, Y. Y., Sun, H. S., and Tsai, S. J. (2005). Transcriptional repression of human cad gene by hypoxia inducible factor-1 α . *Nucleic Acids Res* 33, 5190-5198.

Chen, Y., Sawyers, C. L., and Scher, H. I. (2008). Targeting the androgen receptor pathway in prostate cancer. *Curr Opin Pharmacol* 8, 440-448.

Cheng, C. W., Wu, P. E., Yu, J. C., Huang, C. S., Yue, C. T., Wu, C. W., and Shen, C. Y. (2001). Mechanisms of inactivation of E-cadherin in breast carcinoma: modification of the two-hit hypothesis of tumor suppressor gene. *Oncogene* 20, 3814-3823.

Cheng, Z. J., Zhao, J., Sun, Y., Hu, W., Wu, Y. L., Cen, B., Wu, G. X., and Pei, G. (2000). beta-arrestin differentially regulates the chemokine receptor CXCR4-mediated signaling and receptor internalization, and this implicates multiple interaction sites between beta-arrestin and CXCR4. *J Biol Chem* 275, 2479-2485.

Chernova, O. B., Chernov, M. V., Ishizaka, Y., Agarwal, M. L., and Stark, G. R. (1998). MYC abrogates p53-mediated cell cycle arrest in N-(phosphonacetyl)-L-aspartate-treated cells, permitting CAD gene amplification. *Mol Cell Biol* 18, 536-545.

Chi, K. N., Bjartell, A., Dearnaley, D., Saad, F., Schroder, F. H., Sternberg, C., Tombal, B., and Visakorpi, T. (2009). Castration-resistant prostate cancer: from new pathophysiology to new treatment targets. *Eur Urol* 56, 594-605.

Chinni, S. R., Sivalogan, S., Dong, Z., Filho, J. C., Deng, X., Bonfil, R. D., and Cher, M. L. (2006). CXCL12/CXCR4 signaling activates Akt-1 and MMP-9 expression in prostate cancer cells: the role of bone microenvironment-associated CXCL12. *Prostate* 66, 32-48.

Chmelar, R., Buchanan, G., Need, E. F., Tilley, W., and Greenberg, N. M. (2007). Androgen receptor coregulators and their involvement in the development and progression of prostate cancer. *Int J Cancer* 120, 719-733.

Cleutjens, K. B., van Eekelen, C. C., van der Korput, H. A., Brinkmann, A. O., and Trapman, J. (1996). Two androgen response regions cooperate in steroid hormone regulated activity of the prostate-specific antigen promoter. *J Biol Chem* 271, 6379-6388.

Coffey, D. (1992). The molecular biology, endocrinology and physiology of the prostate and seminal vesicles. Philadelphia.

Coffey, D. S., Shimazaki, J., and Williams-Ashman, H. G. (1968). Polymerization of deoxyribonucleotides in relation to androgen-induced prostatic growth. *Arch Biochem Biophys* 124, 184-198.

Collins, K. D., and Stark, G. R. (1971). Aspartate transcarbamylase. Interaction with the transition state analogue N-(phosphonacetyl)-L-aspartate. *J Biol Chem* 246, 6599-6605.

Colombel, M., Olsson, C. A., Ng, P. Y., and Buttyan, R. (1992). Hormone-regulated apoptosis results from reentry of differentiated prostate cells onto a defective cell cycle. *Cancer Res* 52, 4313-4319.

Colombel, M., Symmans, F., Gil, S., O'Toole, K. M., Chopin, D., Benson, M., Olsson, C. A., Korsmeyer, S., and Buttyan, R. (1993). Detection of the apoptosis-suppressing oncoprotein bcl-2 in hormone-refractory human prostate cancers. *Am J Pathol* 143, 390-400.

Compagno, D., Merle, C., Morin, A., Gilbert, C., Mathieu, J. R., Bozec, A., Mauduit, C., Benahmed, 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.

Condon, M. S., and Bosland, M. C. (1999). The role of stromal cells in prostate cancer development and progression. *In Vivo* 13, 61-65.

Cookson, M. S., Aus, G., Burnett, A. L., Canby-Hagino, E. D., D'Amico, A. V., Dmochowski, R. R., Eton, D. T., Forman, J. D., Goldenberg, S. L., Hernandez, J., *et al.* (2007). Variation in the definition of biochemical recurrence in patients treated for localized prostate cancer: the American Urological Association Prostate Guidelines for Localized Prostate Cancer Update Panel report and recommendations for a standard in the reporting of surgical outcomes. *J Urol* 177, 540-545.

Cornud, F., Flam, T., Chauveinc, L., Hamida, K., Chretien, Y., Vieillefond, A., Helenon, O., and Moreau, J. F. (2002). Extraprostatic spread of clinically localized prostate cancer: factors predictive of pT3 tumor and of positive endorectal MR imaging examination results. *Radiology* 224, 203-210.

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.

Cristillo, A. D., Highbarger, H. C., Dewar, R. L., Dimitrov, D. S., Golding, H., and Bierer, B. E. (2002). Up-regulation of HIV coreceptor CXCR4 expression in human T lymphocytes is mediated in part by a cAMP-responsive element. *FASEB J* 16, 354-364.

Crump, M. P., Gong, J. H., Loetscher, P., Rajarathnam, K., Amara, A., Arenzana-Seisdedos, F., Virelizier, J. L., Baggiolini, M., Sykes, B. D., and Clark-Lewis, I. (1997). Solution structure and basis for functional activity of stromal cell-derived factor-1; dissociation of CXCR4 activation from binding and inhibition of HIV-1. *EMBO J* 16, 6996-7007.

Culig, Z., Hobisch, A., Hittmair, A., Peterziel, H., Radmayr, C., Bartsch, G., Cato, A. C., and Klocker, H. (1997). Hyperactive androgen receptor in prostate cancer: what does it mean for new therapy concepts? *Histol Histopathol* 12, 781-786.

Culig, Z., Hoffmann, J., Erdel, M., Eder, I. E., Hobisch, A., Hittmair, A., Bartsch, G., Utermann, G., Schneider, M. R., Parczyk, K., and Klocker, H. (1999). Switch from antagonist to agonist of the androgen receptor bicalutamide is associated with prostate tumour progression in a new model system. *Br J Cancer* 81, 242-251.

Cussenot, O., Berthon, P., Cochand-Priollet, B., Maitland, N. J., and Le Duc, A. (1994). Immunocytochemical comparison of cultured normal epithelial prostatic cells with prostatic tissue sections. *Exp Cell Res* 214, 83-92.

D'Amico, A. V., Schultz, D., Silver, B., Henry, L., Hurwitz, M., Kaplan, I., Beard, C. J., and Renshaw, A. A. (2001). The clinical utility of the percent of positive prostate biopsies in predicting biochemical outcome following external-beam radiation therapy for patients with clinically localized prostate cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 49, 679-684.

D'Amico, A. V., Whittington, R., Malkowicz, S. B., Schultz, D., Blank, K., Broderick, G. A., Tomaszewski, J. E., Renshaw, A. A., Kaplan, I., Beard, C. J., and Wein, A. (1998). Biochemical outcome after radical prostatectomy, external beam radiation therapy, or interstitial radiation therapy for clinically localized prostate cancer. *JAMA* 280, 969-974.

Dai, Y., Bae, K., and Siemann, D. W. (2011). Impact of hypoxia on the metastatic potential of human prostate cancer cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 81, 521-528.

Dalsgaard, C. J., Hultgardh-Nilsson, A., Haegerstrand, A., and Nilsson, J. (1989). Neuropeptides as growth factors. Possible roles in human diseases. *Regul Pept* 25, 1-9.

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

Dameron, K. M., Volpert, O. V., Tainsky, M. A., and Bouck, N. (1994b). The p53 tumor suppressor gene inhibits angiogenesis by stimulating the production of thrombospondin. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 59, 483-489.

Davidson, J. N., Rumsby, P. C., and Tamaren, J. (1981). Organization of a multifunctional protein in pyrimidine biosynthesis. Analyses of active, tryptic fragments. *J Biol Chem* 256, 5220-5225.

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 Bono, J. S., Logothetis, C. J., Molina, A., Fizazi, K., North, S., Chu, L., Chi, K. N., Jones, R. J., Goodman, O. B., Jr., Saad, F., *et al.* (2011). Abiraterone and increased survival in metastatic prostate cancer. *N Engl J Med* 364, 1995-2005.

de Fraipont, F., El Atifi, M., Gicquel, C., Bertagna, X., Chambaz, E. M., and Feige, J. J. (2000). Expression of the angiogenesis markers vascular endothelial growth factor-A, thrombospondin-1, and platelet-derived endothelial cell growth factor in human sporadic adrenocortical tumors: correlation with genotypic alterations. *J Clin Endocrinol Metab* 85, 4734-4741.

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 Fraipont, F., Nicholson, A. C., Feige, J. J., and Van Meir, E. G. (2001). Thrombospondins and tumor angiogenesis. *Trends Mol Med* 7, 401-407.

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.

de la Taille, A., Rubin, M. A., Chen, M. W., Vacherot, F., de Medina, S. G., Burchardt, M., Buttyan, R., and Chopin, D. (2003). Beta-catenin-related anomalies in apoptosis-resistant and hormone-refractory prostate cancer cells. *Clin Cancer Res* 9, 1801-1807.

Dejong, V., Degeorges, A., Filleur, S., Ait-Si-Ali, S., Mettouchi, A., Bornstein, P., Binetruy, B., and Cabon, F. (1999). The Wilms' tumor gene product represses the transcription of thrombospondin 1 in response to overexpression of c-Jun. *Oncogene* 18, 3143-3151.

Delongchamps, N. B., Singh, A., and Haas, G. P. (2006). The role of prevalence in the diagnosis of prostate cancer. *Cancer Control* 13, 158-168.

Deng, H., Liu, R., Ellmeier, W., Choe, S., Unutmaz, D., Burkhart, M., Di Marzio, P., Marmon, S., Sutton, R. E., Hill, C. M., *et al.* (1996). Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* 381, 661-666.

Denis-Duphil, M., Lecaer, J. P., Hardie, D. G., and Carrey, E. A. (1990). Yeast carbamoyl-phosphate-synthetase--aspartate-transcarbamylase multidomain protein is phosphorylated in vitro by cAMP-dependent protein kinase. *Eur J Biochem* 193, 581-587.

Dini, G., Funghini, S., Witort, E., Magnelli, L., Fanti, E., Rifkin, D. B., and Del Rosso, M. (2002). Overexpression of the 18 kDa and 22/24 kDa FGF-2 isoforms results in differential drug resistance and amplification potential. *J Cell Physiol* 193, 64-72.

Distler, J. H., Jungel, A., Pilecky, M., Zwerina, J., Michel, B. A., Gay, R. E., Kowal-Bielecka, O., Matucci-Cerinic, M., Schett, G., Marti, H. H., *et al.* (2007). Hypoxia-induced increase in the production of extracellular matrix proteins in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 56, 4203-4215.

Doll, J. A., Stellmach, V. M., Bouck, N. P., Bergh, A. R., Lee, C., Abramson, L. P., Cornwell, M. L., Pins, M. R., Borensztajn, J., and Crawford, S. E. (2003). Pigment epithelium-derived factor regulates the vasculature and mass of the prostate and pancreas. *Nat Med* 9, 774-780.

Donoviel, D. B., Amacher, S. L., Judge, K. W., and Bornstein, P. (1990). Thrombospondin gene expression is associated with mitogenesis in 3T3 cells: induction by basic fibroblast growth factor. *J Cell Physiol* 145, 16-23.

Doranz, B. J., Rucker, J., Yi, Y., Smyth, R. J., Samson, M., Peiper, S. C., Parmentier, M., Collman, R. G., and Doms, R. W. (1996). A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the beta-chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors. *Cell* 85, 1149-1158.

Draisma, G., Boer, R., Otto, S. J., van der Crujisen, I. W., Damhuis, R. A., Schroder, F. H., and de Koning, H. J. (2003). Lead times and overdetection due to prostate-specific antigen screening: estimates from the European Randomized Study of Screening for Prostate Cancer. *J Natl Cancer Inst* 95, 868-878.

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.

English, H. F., Drago, J. R., and Santen, R. J. (1985). Cellular response to androgen depletion and repletion in the rat ventral prostate: autoradiography and morphometric analysis. *Prostate* 7, 41-51.

Ettinger, D. S., Trichtler, D., Earhart, R., and Creech, R. H. (1984). Phase II study of PALA and PCNU in the treatment of non-small cell lung cancer (EST 2580): an Eastern Cooperative Oncology Group study. *Cancer Treat Rep* 68, 1297-1298.

Etzioni, R., Penson, D. F., Legler, J. M., di Tommaso, D., Boer, R., Gann, P. H., and Feuer, E. J. (2002). Overdiagnosis due to prostate-specific antigen screening: lessons from U.S. prostate cancer incidence trends. *J Natl Cancer Inst* 94, 981-990.

Evans, D. R., Bein, K., Guy, H. I., Liu, X., Molina, J. A., and Zimmermann, B. H. (1993). CAD gene sequence and the domain structure of the mammalian multifunctional protein CAD. *Biochem Soc Trans* 21, 186-191.

Fan, C. Y., Ren, H. Y., Lee, P., Caplan, A. J., and Cyr, D. M. (2005). The type I Hsp40 zinc finger-like region is required for Hsp70 to capture non-native polypeptides from Ydj1. *J Biol Chem* 280, 695-702.

Farnham, P. J., and Kollmar, R. (1990). Characterization of the 5' end of the growth-regulated Syrian hamster CAD gene. *Cell Growth Differ* 1, 179-189.

Farzan, M., Babcock, G. J., Vasilieva, N., Wright, P. L., Kiprilov, E., Mirzabekov, T., and Choe, H. (2002). The role of post-translational modifications of the CXCR4 amino terminus

in stromal-derived factor 1 alpha association and HIV-1 entry. *J Biol Chem* 277, 29484-29489.

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.

Feldman, B. J., and Feldman, D. (2001). The development of androgen-independent prostate cancer. *Nat Rev Cancer* 1, 34-45.

Feng, Y., Broder, C. C., Kennedy, P. E., and Berger, E. A. (1996). HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* 272, 872-877.

Fernandis, A. Z., Prasad, A., Band, H., Klosel, R., and Ganju, R. K. (2004). Regulation of CXCR4-mediated chemotaxis and chemoinvasion of breast cancer cells. *Oncogene* 23, 157-167.

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.

Fitchev, P. P., Weislak, 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. (2004). Endogenous angiogenesis inhibitors. *APMIS* 112, 496-507.

Folkman, J., Browder, T., and Palmblad, J. (2001). Angiogenesis research: guidelines for translation to clinical application. *Thromb Haemost* 86, 23-33.

Fong, A. M., Premont, R. T., Richardson, R. M., Yu, Y. R., Lefkowitz, R. J., and Patel, D. D. (2002). Defective lymphocyte chemotaxis in beta-arrestin2- and GRK6-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 7478-7483.

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.

Fontanini, G., Boldrini, L., Calcinai, A., Chine, S., Lucchi, M., Mussi, A., Angeletti, C. A., Basolo, F., and Bevilacqua, G. (1999). Thrombospondins I and II messenger RNA expression in lung carcinoma: relationship with p53 alterations, angiogenic growth factors, and vascular density. *Clin Cancer Res* 5, 155-161.

Frazier, B. L., Larmour, P., and Riley, M. R. (2001). Noninvasive measurement of effective diffusivities in cell immobilization gels through use of near-infrared spectroscopy. *Biotechnol Bioeng* 72, 364-368.

Frigo, D. E., Sherk, A. B., Wittmann, B. M., Norris, J. D., Wang, Q., Joseph, J. D., Toner, A. P., Brown, M., and McDonnell, D. P. (2009). Induction of Kruppel-like factor 5 expression by androgens results in increased CXCR4-dependent migration of prostate cancer cells in vitro. *Mol Endocrinol* 23, 1385-1396.

Fukasawa, K., Wiener, F., Vande Woude, G. F., and Mai, S. (1997). Genomic instability and apoptosis are frequent in p53 deficient young mice. *Oncogene* 15, 1295-1302.

Ganju, R. K., Dutt, P., Wu, L., Newman, W., Avraham, H., Avraham, S., and Groopman, J. E. (1998). Beta-chemokine receptor CCR5 signals via the novel tyrosine kinase RAFTK. *Blood* 91, 791-797.

Gelmann, E. P. (2002). Molecular biology of the androgen receptor. *J Clin Oncol* 20, 3001-3015.

Gettman, M. T., Bergstralh, E. J., Blute, M., Zincke, H., and Bostwick, D. G. (1998). Prediction of patient outcome in pathologic stage T2 adenocarcinoma of the prostate: lack of significance for microvessel density analysis. *Urology* 51, 79-85.

Gettman, M. T., Pacelli, A., Slezak, J., Bergstralh, E. J., Blute, M., Zincke, H., and Bostwick, D. G. (1999). Role of microvessel density in predicting recurrence in pathologic Stage T3 prostatic adenocarcinoma. *Urology* 54, 479-485.

Gioeli, D., Ficarro, S. B., Kwiek, J. J., Aaronson, D., Hancock, M., Catling, A. D., White, F. M., Christian, R. E., Settlege, R. E., Shabanowitz, J., *et al.* (2002). Androgen receptor phosphorylation. Regulation and identification of the phosphorylation sites. *J Biol Chem* 277, 29304-29314.

Gleave, M., Hsieh, J. T., Gao, C. A., von Eschenbach, A. C., and Chung, L. W. (1991). Acceleration of human prostate cancer growth in vivo by factors produced by prostate and bone fibroblasts. *Cancer Res* 51, 3753-3761.

Gleave, M. E., Miyake, H., Goldie, J., Nelson, C., and Tolcher, A. (1999). Targeting bcl-2 gene to delay androgen-independent progression and enhance chemosensitivity in prostate cancer using antisense bcl-2 oligodeoxynucleotides. *Urology* 54, 36-46.

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.

Goicoechea, S., Pallero, M. A., Eggleton, P., Michalak, M., and Murphy-Ullrich, J. E. (2002). The anti-adhesive activity of thrombospondin is mediated by the N-terminal domain of cell surface calreticulin. *J Biol Chem* 277, 37219-37228.

Gonzalo, J. A., Lloyd, C. M., Peled, A., Delaney, T., Coyle, A. J., and Gutierrez-Ramos, J. C. (2000). Critical involvement of the chemotactic axis CXCR4/stromal cell-derived factor-1 alpha in the inflammatory component of allergic airway disease. *J Immunol* 165, 499-508.

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.

Gottlieb, B., Beitel, L. K., Wu, J. H., and Trifiro, M. (2004). The androgen receptor gene mutations database (ARDB): 2004 update. *Hum Mutat* 23, 527-533.

Grant, S. W., Kyshtoobayeva, A. S., Kurosaki, T., Jakowatz, J., and Fruehauf, J. P. (1998). Mutant p53 correlates with reduced expression of thrombospondin-1, increased angiogenesis, and metastatic progression in melanoma. *Cancer Detect Prev* 22, 185-194.

Grayson, D. R., and Evans, D. R. (1983). The isolation and characterization of the aspartate transcarbamylase domain of the multifunctional protein, CAD. *J Biol Chem* 258, 4123-4129.

Grayson, D. R., Lee, L., and Evans, D. R. (1985). Immunochemical analysis of the domain structure of CAD, the multifunctional protein that initiates pyrimidine biosynthesis in mammalian cells. *J Biol Chem* 260, 15840-15849.

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.

Grossfeld, G. D., Carroll, P. R., Lindeman, N., Meng, M., Groshen, S., Feng, A. C., Hawes, D., and Cote, R. J. (2002). Thrombospondin-1 expression in patients with pathologic stage T3 prostate cancer undergoing radical prostatectomy: association with p53 alterations, tumor angiogenesis, and tumor progression. *Urology* 59, 97-102.

Grossfeld, G. D., Ginsberg, D. A., Stein, J. P., Bochner, B. H., Esrig, D., Groshen, S., Dunn, M., Nichols, P. W., Taylor, C. R., Skinner, D. G., and Cote, R. J. (1997). Thrombospondin-1

expression in bladder cancer: association with p53 alterations, tumor angiogenesis, and tumor progression. *J Natl Cancer Inst* 89, 219-227.

Guo, N., Krutzsch, 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.

Gupta, C., Chandorkar, A., and Nguyen, A. P. (1996). Activation of androgen receptor in epidermal growth factor modulation of fetal mouse sexual differentiation. *Mol Cell Endocrinol* 123, 89-95.

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.

Haas, G. P., Delongchamps, N. B., Jones, R. F., Chandan, V., Serio, A. M., Vickers, A. J., Jumbelic, M., Threatte, G., Korets, R., Lilja, H., and de la Roza, G. (2007). Needle biopsies on autopsy prostates: sensitivity of cancer detection based on true prevalence. *J Natl Cancer Inst* 99, 1484-1489.

Hager, S. E., and Jones, M. E. (1967). Initial steps in pyrimidine synthesis in Ehrlich ascites carcinoma in vitro. II. The synthesis of carbamyl phosphate by a soluble, glutamine-dependent carbamyl phosphate synthetase. *J Biol Chem* 242, 5667-5673.

Halin, S., Hammarsten, P., Wikstrom, P., and Bergh, A. (2007). Androgen-insensitive prostate cancer cells transiently respond to castration treatment when growing in an androgen-dependent prostate environment. *Prostate* 67, 370-377.

Ham, J., Thomson, A., Needham, M., Webb, P., and Parker, M. (1988). Characterization of response elements for androgens, glucocorticoids and progestins in mouse mammary tumour virus. *Nucleic Acids Res* 16, 5263-5276.

Hanahan, D., and Folkman, J. (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86, 353-364.

Hargreaves, D. C., Hyman, P. L., Lu, T. T., Ngo, V. N., Bidgol, A., Suzuki, G., Zou, Y. R., Littman, D. R., and Cyster, J. G. (2001). A coordinated change in chemokine responsiveness guides plasma cell movements. *J Exp Med* 194, 45-56.

Haviv, F., Bradley, M. F., Kalvin, D. M., Schneider, A. J., Davidson, D. J., Majest, S. M., McKay, L. M., Haskell, C. J., Bell, R. L., Nguyen, B., *et al.* (2005). Thrombospondin-1 mimetic peptide inhibitors of angiogenesis and tumor growth: design, synthesis, and optimization of pharmacokinetics and biological activities. *J Med Chem* 48, 2838-2846.

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.

Hayward, S. W., Del Buono, R., Deshpande, N., and Hall, P. A. (1992). A functional model of adult human prostate epithelium. The role of androgens and stroma in architectural organisation and the maintenance of differentiated secretory function. *J Cell Sci* 102 (Pt 2), 361-372.

Heemers, H. V., and Tindall, D. J. (2007). Androgen receptor (AR) coregulators: a diversity of functions converging on and regulating the AR transcriptional complex. *Endocr Rev* 28, 778-808.

Heinlein, C. A., and Chang, C. (2002). Androgen receptor (AR) coregulators: an overview. *Endocr Rev* 23, 175-200.

Helbig, G., Christopherson, K. W., Bhat-Nakshatri, P., Kumar, S., Kishimoto, H., Miller, K. D., Broxmeyer, H. E., and Nakshatri, H. (2003). NF- κ B Promotes Breast Cancer Cell Migration and Metastasis by Inducing the Expression of the Chemokine Receptor CXCR4. *Journal of Biological Chemistry* 278, 21631-21638.

- Henderson, R. B., Grys, K., Vehlow, A., de Bettignies, C., Zachacz, A., Henley, T., Turner, M., Batista, F., and Tybulewicz, V. L. (2010). A novel Rac-dependent checkpoint in B cell development controls entry into the splenic white pulp and cell survival. *J Exp Med* 207, 837-853.
- Hesselgesser, J., and Horuk, R. (1999). Chemokine and chemokine receptor expression in the central nervous system. *J Neurovirol* 5, 13-26.
- Hirota, K., and Semenza, G. L. (2006). Regulation of angiogenesis by hypoxia-inducible factor 1. *Crit Rev Oncol Hematol* 59, 15-26.
- Hobisch, A., Eder, I. E., Putz, T., Horninger, W., Bartsch, G., Klocker, H., and Culig, Z. (1998). Interleukin-6 regulates prostate-specific protein expression in prostate carcinoma cells by activation of the androgen receptor. *Cancer Res* 58, 4640-4645.
- Hodge, K. K., McNeal, J. E., Terris, M. K., and Stamey, T. A. (1989). Random systematic versus directed ultrasound guided transrectal core biopsies of the prostate. *J Urol* 142, 71-74; discussion 74-75.
- Hogg, P. J. (1994). Thrombospondin 1 as an enzyme inhibitor. *Thromb Haemost* 72, 787-792.
- Hon, W. C., Wilson, M. I., Harlos, K., Claridge, T. D., Schofield, C. J., Pugh, C. W., Maxwell, P. H., Ratcliffe, P. J., Stuart, D. I., and Jones, E. Y. (2002). Structural basis for the recognition of hydroxyproline in HIF-1 alpha by pVHL. *Nature* 417, 975-978.
- Hori, T., Sakaida, H., Sato, A., Nakajima, T., Shida, H., Yoshie, O., and Uchiyama, T. (1998). Detection and delineation of CXCR-4 (fusin) as an entry and fusion cofactor for T-tropic [correction of T cell-tropic] HIV-1 by three different monoclonal antibodies. *J Immunol* 160, 180-188.
- Hosokawa, T., Muraishi, A., Rothman, V. L., Papale, M., and Tuszynski, G. P. (1993). The effect of thrombospondin on invasion of fibrin gels by human A549 lung carcinoma. *Oncol Res* 5, 183-189.
- Hsu, S. C., Volpert, O. V., Steck, P. A., Mikkelsen, T., Polverini, P. J., Rao, S., Chou, P., and Bouck, N. P. (1996). Inhibition of angiogenesis in human glioblastomas by chromosome 10 induction of thrombospondin-1. *Cancer Res* 56, 5684-5691.
- Hu, X. B., Feng, F., Wang, Y. C., Wang, L., He, F., Dou, G. R., Liang, L., Zhang, H. W., Liang, Y. M., and Han, H. (2009). Blockade of Notch signaling in tumor-bearing mice may lead to tumor regression, progression, or metastasis, depending on tumor cell types. *Neoplasia* 11, 32-38.
- Huang, M., and Graves, L. M. (2003). De novo synthesis of pyrimidine nucleotides; emerging interfaces with signal transduction pathways. *Cell Mol Life Sci* 60, 321-336.
- Huang, X., Shen, J., Cui, M., Shen, L., Luo, X., Ling, K., Pei, G., Jiang, H., and Chen, K. (2003). Molecular dynamics simulations on SDF-1alpha: binding with CXCR4 receptor. *Biophys J* 84, 171-184.
- Hudson, D. L., Guy, A. T., Fry, P., O'Hare, M. J., Watt, F. M., and Masters, J. R. (2001). Epithelial cell differentiation pathways in the human prostate: identification of intermediate phenotypes by keratin expression. *J Histochem Cytochem* 49, 271-278.
- Huggins, C., and Hodges, C. (1941). Studies on prostatic cancer: the effect of castration, of estrogen and of androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate. *Cancer Res* 1, 293-297.
- Hulsken, J., Birchmeier, W., and Behrens, J. (1994). E-cadherin and APC compete for the interaction with beta-catenin and the cytoskeleton. *J Cell Biol* 127, 2061-2069.
- Hursting, S. D., Shen, J. C., Sun, X. Y., Wang, T. T., Phang, J. M., and Perkins, S. N. (2002). Modulation of cyclophilin gene expression by N-4-(hydroxyphenyl)retinamide: association with reactive oxygen species generation and apoptosis. *Mol Carcinog* 33, 16-24.
- Hwang, C., and Heath, E. I. (2010). Angiogenesis inhibitors in the treatment of prostate cancer. *J Hematol Oncol* 3, 26.

Incardona, F., Calvo, F., Fauvel-Lafeve, F., Legrand, Y., and Legrand, C. (1993). Involvement of thrombospondin in the adherence of human breast-adenocarcinoma cells: a possible role in the metastatic process. *Int J Cancer* 55, 471-477.

Iruela-Arispe, M. L., Lombardo, M., Krutzsch, 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.

Isaacs, J. T. (1984a). The aging ACI/Seg versus Copenhagen male rat as a model system for the study of prostatic carcinogenesis. *Cancer Res* 44, 5785-5796.

Isaacs, J. T. (1984b). Antagonistic effect of androgen on prostatic cell death. *Prostate* 5, 545-557.

Isaacs, J. T. (1984c). The timing of androgen ablation therapy and/or chemotherapy in the treatment of prostatic cancer. *Prostate* 5, 1-17.

Isaacs, J. T., and Coffey, D. S. (1989). Etiology and disease process of benign prostatic hyperplasia. *Prostate Suppl* 2, 33-50.

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., Ridnour, L. A., Dimitry, J., Frazier, W. A., Wink, D. A., and Roberts, D. D. (2006). CD47 is necessary for inhibition of nitric oxide-stimulated vascular cell responses by thrombospondin-1. *J Biol Chem* 281, 26069-26080.

Iwahana, H., Fujimura, M., Ii, S., Kondo, M., Moritani, M., Takahashi, Y., Yamaoka, T., Yoshimoto, K., and Itakura, M. (1996). Molecular cloning of a human cDNA encoding a trifunctional enzyme of carbamoyl-phosphate synthetase-aspartate transcarbamoylase-dihydroorotase in de Novo pyrimidine synthesis. *Biochem Biophys Res Commun* 219, 249-255.

Jager, G. J., Ruijter, E. T., van de Kaa, C. A., de la Rosette, J. J., Oosterhof, G. O., Thornbury, J. R., and Barentsz, J. O. (1996). Local staging of prostate cancer with endorectal MR imaging: correlation with histopathology. *AJR Am J Roentgenol* 166, 845-852.

Jaggi, M., Johansson, S. L., Baker, J. J., Smith, L. M., Galich, A., and Balaji, K. C. (2005). Aberrant expression of E-cadherin and beta-catenin in human prostate cancer. *Urol Oncol* 23, 402-406.

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

Jarry, B. (1976). Isolation of a multifunctional complex containing the first three enzymes of pyrimidine biosynthesis in drosophila melanogaster. *FEBS Lett* 70, 71-75.

Jeanes, A., Gottardi, C. J., and Yap, A. S. (2008). Cadherins and cancer: how does cadherin dysfunction promote tumor progression? *Oncogene* 27, 6920-6929.

Jemal, A., Siegel, R., Xu, J., and Ward, E. (2010). Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin* 60, 277-300.

Jennbacken, K., Gustavsson, H., Tesan, T., Horn, M., Vallbo, C., Welen, K., and Damber, J. E. (2009). The prostatic environment suppresses growth of androgen-independent prostate cancer xenografts: an effect influenced by testosterone. *Prostate* 69, 1164-1175.

Jenster, G., de Ruiter, P. E., van der Korput, H. A., Kuiper, G. G., Trapman, J., and Brinkmann, A. O. (1994). Changes in the abundance of androgen receptor isoforms: effects of ligand treatment, glutamine-stretch variation, and mutation of putative phosphorylation sites. *Biochemistry* 33, 14064-14072.

Jeong, J. W., Bae, M. K., Ahn, M. Y., Kim, S. H., Sohn, T. K., Bae, M. H., Yoo, M. A., Song, E. J., Lee, K. J., and Kim, K. W. (2002). Regulation and destabilization of HIF-1 α by ARD1-mediated acetylation. *Cell* 111, 709-720.

Jiang, Y. P., Wu, X. H., Shi, B., Wu, W. X., and Yin, G. R. (2006). Expression of chemokine CXCL12 and its receptor CXCR4 in human epithelial ovarian cancer: an independent prognostic factor for tumor progression. *Gynecol Oncol* 103, 226-233.

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.

Jimenez, B., Volpert, O. V., Reiher, F., Chang, L., Munoz, A., Karin, M., and Bouck, N. (2001). c-Jun N-terminal kinase activation is required for the inhibition of neovascularization by thrombospondin-1. *Oncogene* 20, 3443-3448.

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.

Johansson, U., and Londei, M. (2004). Ligation of CD47 during monocyte differentiation into dendritic cells results in reduced capacity for interleukin-12 production. *Scand J Immunol* 59, 50-57.

Johnson, A. M., O'Connell, M. J., Miyamoto, H., Huang, J., Yao, J. L., Messing, E. M., and Reeder, J. E. (2008). Androgenic dependence of exophytic tumor growth in a transgenic mouse model of bladder cancer: a role for thrombospondin-1. *BMC Urol* 8, 7.

Johnson, R. K., Inouye, T., Goldin, A., and Stark, G. R. (1976). Antitumor activity of N-(phosphonacetyl)-L-aspartic acid, a transition-state inhibitor of aspartate transcarbamylase. *Cancer Res* 36, 2720-2725.

Jones, E., Pu, H., and Kyprianou, N. (2009). Targeting TGF-beta in prostate cancer: therapeutic possibilities during tumor progression. *Expert Opin Ther Targets* 13, 227-234.

Jung, S. J., Kim, C. I., Park, C. H., Chang, H. S., Kim, B. H., Choi, M. S., and Jung, H. R. (2011). Correlation between Chemokine Receptor CXCR4 Expression and Prognostic Factors in Patients with Prostate Cancer. *Korean J Urol* 52, 607-611.

Junghans, D., Haas, I. G., and Kemler, R. (2005). Mammalian cadherins and protocadherins: about cell death, synapses and processing. *Curr Opin Cell Biol* 17, 446-452.

Kabalin, J. N., Peehl, D. M., and Stamey, T. A. (1989). Clonal growth of human prostatic epithelial cells is stimulated by fibroblasts. *Prostate* 14, 251-263.

Kabashima, K., Haynes, N. M., Xu, Y., Nutt, S. L., Allende, M. L., Proia, R. L., and Cyster, J. G. (2006). Plasma cell S1P1 expression determines secondary lymphoid organ retention versus bone marrow tropism. *J Exp Med* 203, 2683-2690.

Kallakury, B. V. S., Sheehan, C. E., Rhee, S. J., Fisher, H. A. G., Jr., R. P. K., Rifkin, M. D., and Ross, J. S. (1999). The prognostic significance of proliferation-associated nucleolar protein p120 expression in prostate adenocarcinoma. *Cancer* 85, 1569-1576.

Karle, J. M., and Cysyk, R. L. (1984). Regulation of pyrimidine biosynthesis in cultured L1210 cells by 3-deazauridine. *Biochem Pharmacol* 33, 3739-3742.

Kasina, S., and Macoska, J. A. (2012a). The CXCL12/CXCR4 axis promotes ligand-independent activation of the androgen receptor. *Mol Cell Endocrinol* 351, 249-263.

Kasina, S., and Macoska, J. A. (2012b). The CXCL12/CXCR4 axis promotes ligand-independent activation of the androgen receptor. *Molecular and Cellular Endocrinology* 351, 249-263.

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.

Kemeny, N., Conti, J. A., Seiter, K., Niedzwiecki, D., Botet, J., Martin, D., Costa, P., Wiseberg, J., and McCulloch, W. (1992). Biochemical modulation of bolus fluorouracil by PALA in patients with advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol* 10, 747-752.

Kempe, T. D., Swyryd, E. A., Bruist, M., and Stark, G. R. (1976). Stable mutants of mammalian cells that overproduce the first three enzymes of pyrimidine nucleotide biosynthesis. *Cell* 9, 541-550.

Khan, S., Abdelrahim, M., Samudio, I., and Safe, S. (2003). Estrogen receptor/Sp1 complexes are required for induction of cad gene expression by 17beta-estradiol in breast cancer cells. *Endocrinology* 144, 2325-2335.

Kim, H., Kelly, R. E., and Evans, D. R. (1992). The structural organization of the hamster multifunctional protein CAD. Controlled proteolysis, domains, and linkers. *J Biol Chem* 267, 7177-7184.

Koishi, K., Yoshikawa, R., Tsujimura, T., Hashimoto-Tamaoki, T., Kojima, S., Yanagi, H., Yamamura, T., and Fujiwara, Y. (2006). Persistent CXCR4 expression after preoperative chemoradiotherapy predicts early recurrence and poor prognosis in esophageal cancer. *World J Gastroenterol* 12, 7585-7590.

Kolvenbag, G. J., Blackledge, G. R., and Gotting-Smith, K. (1998). Bicalutamide (Casodex) in the treatment of prostate cancer: history of clinical development. *Prostate* 34, 61-72.

Kosfeld, M. D., and Frazier, W. A. (1993). Identification of a new cell adhesion motif in two homologous peptides from the COOH-terminal cell binding domain of human thrombospondin. *J Biol Chem* 268, 8808-8814.

Kuiper, G. G., and Brinkmann, A. O. (1995). Phosphotryptic peptide analysis of the human androgen receptor: detection of a hormone-induced phosphopeptide. *Biochemistry* 34, 1851-1857.

Kung, H. J., and Evans, C. P. (2009). Oncogenic activation of androgen receptor. *Urol Oncol* 27, 48-52.

Kyprianou, N., and Isaacs, J. T. (1988). Activation of programmed cell death in the rat ventral prostate after castration. *Endocrinology* 122, 552-562.

Labrie, F., Belanger, A., Dupont, A., Luu-The, V., Simard, J., and Labrie, C. (1993). Science behind total androgen blockade: from gene to combination therapy. *Clin Invest Med* 16, 475-492.

Labrie, F., Dupont, A., and Belanger, A. (1985). Complete androgen blockade for the treatment of prostate cancer. *Important Adv Oncol*, 193-217.

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. (1988). Thrombospondin inhibits adhesion of platelets to glass and protein-covered substrata. *Blood* 71, 1096-1099.

Lamb, D. J., Weigel, N. L., and Marcelli, M. (2001). Androgen receptors and their biology. *Vitam Horm* 62, 199-230.

Lamont, K. R., and Tindall, D. J. (2010). Androgen regulation of gene expression. *Adv Cancer Res* 107, 137-162.

Lange, P. H., Ercole, C. J., Lightner, D. J., Fraley, E. E., and Vessella, R. (1989). The value of serum prostate specific antigen determinations before and after radical prostatectomy. *J Urol* 141, 873-879.

- Langer, C. J., Schaebler, D., Sauter, E., DeMaria, D., Johnson, C., Reilly, D. M., Clark, J., Leighton, J., Aks, C., Litwin, S., and Ridge, J. A. (1998). Phase II study of N-phosphonacetyl-L-aspartate, recombinant interferon-alpha, and fluorouracil infusion in advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head Neck* 20, 385-391.
- Lawler, J. (1986). The structural and functional properties of thrombospondin. *Blood* 67, 1197-1209.
- 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.
- Lawson, D. A., Zong, Y., Memarzadeh, S., Xin, L., Huang, J., and Witte, O. N. (2010). Basal epithelial stem cells are efficient targets for prostate cancer initiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 2610-2615.
- Leader, J. E., Wang, C., Fu, M., and Pestell, R. G. (2006). Epigenetic regulation of nuclear steroid receptors. *Biochem Pharmacol* 72, 1589-1596.
- Lee, J. M., Dedhar, S., Kalluri, R., and Thompson, E. W. (2006). The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *J Cell Biol* 172, 973-981.
- Lee, L. F., Guan, J., Qiu, Y., and Kung, H. J. (2001). Neuropeptide-induced androgen independence in prostate cancer cells: roles of nonreceptor tyrosine kinases Etk/Bmx, Src, and focal adhesion kinase. *Mol Cell Biol* 21, 8385-8397.
- Lee, Y., Gotoh, A., Kwon, H. J., You, M., Kohli, L., Mantel, C., Cooper, S., Hangoc, G., Miyazawa, K., Ohyashiki, K., and Broxmeyer, H. E. (2002). Enhancement of intracellular signaling associated with hematopoietic progenitor cell survival in response to SDF-1/CXCL12 in synergy with other cytokines. *Blood* 99, 4307-4317.
- Legrand, C., Thibert, V., Dubernard, V., Begault, B., and Lawler, J. (1992). Molecular requirements for the interaction of thrombospondin with thrombin-activated human platelets: modulation of platelet aggregation. *Blood* 79, 1995-2003.
- 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.
- Lesser, B., and Bruchovsky, N. (1973). The effects of testosterone, 5 -dihydrotestosterone and adenosine 3',5'-monophosphate on cell proliferation and differentiation in rat prostate. *Biochim Biophys Acta* 308, 426-437.
- Levine, R. L., Hoogenraad, N. J., and Kretchmer, N. (1971). Regulation of activity of carbamoyl phosphate synthetase from mouse spleen. *Biochemistry* 10, 3694-3699.
- 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, D. D., Schultz, D., Renshaw, A. A., Rubin, M. A., Richie, J. P., and D'Amico, A. V. (2005). Predictors of short postoperative prostate-specific antigen doubling time for patients diagnosed during PSA era. *Urology* 65, 528-532.
- 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.
- Linja, M. J., Savinainen, K. J., Saramaki, O. R., Tammela, T. L., Vessella, R. L., and Visakorpi, T. (2001). Amplification and overexpression of androgen receptor gene in hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Res* 61, 3550-3555.
- Liotta, L. A. (2001). An attractive force in metastasis. *Nature* 410, 24-25.
- Locke, J. A., Guns, E. S., Lubik, A. A., Adomat, H. H., Hendy, S. C., Wood, C. A., Ettinger, S. L., Gleave, M. E., and Nelson, C. C. (2008). Androgen levels increase by intratumoral de

novo steroidogenesis during progression of castration-resistant prostate cancer. *Cancer Res* 68, 6407-6415.

Loetscher, M., Geiser, T., O'Reilly, T., Zwahlen, R., Baggiolini, M., and Moser, B. (1994). Cloning of a human seven-transmembrane domain receptor, LESTR, that is highly expressed in leukocytes. *J Biol Chem* 269, 232-237.

Lucia, M. S., Darke, A. K., Goodman, P. J., La Rosa, F. G., Parnes, H. L., Ford, L. G., Coltman, C. A., Jr., and Thompson, I. M. (2008). Pathologic characteristics of cancers detected in The Prostate Cancer Prevention Trial: implications for prostate cancer detection and chemoprevention. *Cancer Prev Res (Phila)* 1, 167-173.

Luo, W., and Lin, S. C. (2004). Axin: a master scaffold for multiple signaling pathways. *Neurosignals* 13, 99-113.

Ma, C., Yoshioka, M., Boivin, A., Gan, L., Takase, Y., Labrie, F., and St-Amand, J. (2009). Atlas of dihydrotestosterone actions on the transcriptome of prostate in vivo. *Prostate* 69, 293-316.

Ma, Q., Jones, D., Borghesani, P. R., Segal, R. A., Nagasawa, T., Kishimoto, T., Bronson, R. T., and Springer, T. A. (1998). Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 9448-9453.

Ma, Q., Jones, D., and Springer, T. A. (1999). The chemokine receptor CXCR4 is required for the retention of B lineage and granulocytic precursors within the bone marrow microenvironment. *Immunity* 10, 463-471.

Maitland, N. J., and Collins, A. T. (2008). Prostate cancer stem cells: a new target for therapy. *J Clin Oncol* 26, 2862-2870.

Majack, R. A., Mildbrandt, J., and Dixit, V. M. (1987). Induction of thrombospondin messenger RNA levels occurs as an immediate primary response to platelet-derived growth factor. *J Biol Chem* 262, 8821-8825.

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.

Mateo, V., Lagneaux, L., Bron, D., Biron, G., Armant, M., Delespesse, G., and Sarfati, M. (1999). CD47 ligation induces caspase-independent cell death in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Med* 5, 1277-1284.

Mattila, M. M., Tarkkonen, K. M., Seppanen, J. A., Ruohola, J. K., Valve, E. M., and Harkonen, P. L. (2006). Androgen and fibroblast growth factor 8 (FGF8) downregulation of thrombospondin 1 (TSP1) in mouse breast cancer cells. *Mol Cell Endocrinol* 253, 36-43.

McDonald, S., Brive, L., Agus, D. B., Scher, H. I., and Ely, K. R. (2000). Ligand responsiveness in human prostate cancer: structural analysis of mutant androgen receptors from LNCaP and CWR22 tumors. *Cancer Res* 60, 2317-2322.

Mettouchi, A., Cabon, F., Montreau, N., Vernier, P., Mercier, G., Blangy, D., Tricoire, H., Vigier, P., and Binetruy, B. (1994). SPARC and thrombospondin genes are repressed by the c-jun oncogene in rat embryo fibroblasts. *EMBO J* 13, 5668-5678.

Miltenberger, R. J., Sukow, K. A., and Farnham, P. J. (1995). An E-box-mediated increase in cad transcription at the G1/S-phase boundary is suppressed by inhibitory c-Myc mutants. *Mol Cell Biol* 15, 2527-2535.

Mimeault, M., and Batra, S. K. (2011). Frequent gene products and molecular pathways altered in prostate cancer- and metastasis-initiating cells and their progenies and novel promising multitargeted therapies. *Mol Med* 17, 949-964.

Mizokami, A., Koh, E., Izumi, K., Narimoto, K., Takeda, M., Honma, S., Dai, J., Keller, E. T., and Namiki, M. (2009). Prostate cancer stromal cells and LNCaP cells coordinately activate the androgen receptor through synthesis of testosterone and dihydrotestosterone from dehydroepiandrosterone. *Endocr Relat Cancer* 16, 1139-1155.

Mohler, J. L., Gregory, C. W., Ford, O. H., 3rd, Kim, D., Weaver, C. M., Petrusz, P., Wilson, E. M., and French, F. S. (2004). The androgen axis in recurrent prostate cancer. *Clin Cancer Res* 10, 440-448.

Monet, M., Lehen'kyi, V., Gackiere, F., Firlej, V., Vandenberghe, M., Roudbaraki, M., Gkika, D., Pourtier, A., Bidaux, G., Slomianny, C., *et al.* (2010). Role of cationic channel TRPV2 in promoting prostate cancer migration and progression to androgen resistance. *Cancer Res* 70, 1225-1235.

Moriuchi, M., Moriuchi, H., Margolis, D. M., and Fauci, A. S. (1999). USF/c-Myc enhances, while Yin-Yang 1 suppresses, the promoter activity of CXCR4, a coreceptor for HIV-1 entry. *J Immunol* 162, 5986-5992.

Moriuchi, M., Moriuchi, H., Turner, W., and Fauci, A. S. (1997). Cloning and analysis of the promoter region of CXCR4, a coreceptor for HIV-1 entry. *J Immunol* 159, 4322-4329.

Mostaghel, E. A., Montgomery, B., and Nelson, P. S. (2009). Castration-resistant prostate cancer: targeting androgen metabolic pathways in recurrent disease. *Urol Oncol* 27, 251-257.

Mottet, N., Bellmunt, J., Bolla, M., Joniau, S., Mason, M., Matveev, V., Schmid, H.-P., Van der Kwast, T., Wiegel, T., Zattoni, F., and Heidenreich, A. (2011). EAU Guidelines on Prostate Cancer. Part II: Treatment of Advanced, Relapsing, and Castration-Resistant Prostate Cancer. *European Urology* 59, 572-583.

Mozer, P., Baumann, M., Chevreau, G., Moreau-Gaudry, A., Bart, S., Renard-Penna, R., Comperat, E., Conort, P., Bitker, M. O., Chartier-Kastler, E., *et al.* (2009). Mapping of transrectal ultrasonographic prostate biopsies: quality control and learning curve assessment by image processing. *J Ultrasound Med* 28, 455-460.

Muggia, F. M., Tsiatis, A. A., O'Connell, M. J., Glick, J. H., Opfell, R. W., and Coren, A. (1984). Phase II trial of PALA in lymphoma: an Eastern Cooperative Oncology Group study. *Cancer Treat Rep* 68, 551-553.

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.

Murphy-Ullrich, J. E. (2001). The de-adhesive activity of matricellular proteins: is intermediate cell adhesion an adaptive state? *J Clin Invest* 107, 785-790.

Murphy-Ullrich, J. E., Gurusiddappa, S., Frazier, W. A., and Hook, M. (1993). Heparin-binding peptides from thrombospondins 1 and 2 contain focal adhesion-labilizing activity. *J Biol Chem* 268, 26784-26789.

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

Muss, H. B., Bundy, B., DiSaia, P. J., Stehman, F. B., and Beecham, J. (1984). PALA (NSC-224131) in advanced carcinoma of the cervix. A phase II study of the Gynecologic Oncology Group. *Am J Clin Oncol* 7, 741-744.

Nagasawa, T., Hirota, S., Tachibana, K., Takakura, N., Nishikawa, S., Kitamura, Y., Yoshida, N., Kikutani, H., and Kishimoto, T. (1996). Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature* 382, 635-638.

Nagasawa, T., Kikutani, H., and Kishimoto, T. (1994). Molecular cloning and structure of a pre-B-cell growth-stimulating factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 2305-2309.

Nagy, M., Le Gouar, M., Potier, S., Souciet, J. L., and Herve, G. (1989). The primary structure of the aspartate transcarbamylase region of the URA2 gene product in *Saccharomyces cerevisiae*. Features involved in activity and nuclear localization. *J Biol Chem* 264, 8366-8374.

Nakayama, T., Hieshima, K., Izawa, D., Tatsumi, Y., Kanamaru, A., and Yoshie, O. (2003). Cutting edge: profile of chemokine receptor expression on human plasma cells accounts for their efficient recruitment to target tissues. *J Immunol* 170, 1136-1140.

Nantermet, P. V., Xu, J., Yu, Y., Hodor, P., Holder, D., Adamski, S., Gentile, M. A., Kimmel, D. B., Harada, S., Gerhold, D., *et al.* (2004). Identification of genetic pathways activated by the androgen receptor during the induction of proliferation in the ventral prostate gland. *J Biol Chem* 279, 1310-1322.

Narizhneva, N. V., Razorenova, O. V., Podrez, E. A., Chen, J., Chandrasekharan, U. M., DiCorleto, P. E., Plow, E. F., Topol, E. J., and Byzova, T. V. (2005). Thrombospondin-1 up-regulates expression of cell adhesion molecules and promotes monocyte binding to endothelium. *FASEB J* 19, 1158-1160.

Nelson, E. C., Cambio, A. J., Yang, J. C., Ok, J. H., Lara, P. N., Jr., and Evans, C. P. (2007). Clinical implications of neuroendocrine differentiation in prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 10, 6-14.

Nicosia, R. F., and Tuszynski, G. P. (1994). Matrix-bound thrombospondin promotes angiogenesis in vitro. *J Cell Biol* 124, 183-193.

Nie, Y., Waite, J., Brewer, F., Sunshine, M. J., Littman, D. R., and Zou, Y. R. (2004). The role of CXCR4 in maintaining peripheral B cell compartments and humoral immunity. *J Exp Med* 200, 1145-1156.

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.

Nor, J. E., Christensen, J., Liu, J., Peters, M., Mooney, D. J., Strieter, R. M., and Polverini, P. J. (2001). Up-Regulation of Bcl-2 in microvascular endothelial cells enhances intratumoral angiogenesis and accelerates tumor growth. *Cancer Res* 61, 2183-2188.

Nor, J. E., Mitra, R. S., Sutorik, M. M., Mooney, D. J., Castle, V. P., and Polverini, P. J. (2000). Thrombospondin-1 induces endothelial cell apoptosis and inhibits angiogenesis by activating the caspase death pathway. *J Vasc Res* 37, 209-218.

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.

Oberlin, E., Amara, A., Bachelier, F., Bessia, C., Virelizier, J. L., Arenzana-Seisdedos, F., Schwartz, O., Heard, J. M., Clark-Lewis, I., Legler, D. F., *et al.* (1996). The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1. *Nature* 382, 833-835.

Oesterling, J. E. (1993). Using PSA to eliminate the staging radionuclide bone scan. Significant economic implications. *Urol Clin North Am* 20, 705-711.

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.

Okada, T., Ngo, V. N., Ekland, E. H., Forster, R., Lipp, M., Littman, D. R., and Cyster, J. G. (2002). Chemokine requirements for B cell entry to lymph nodes and Peyer's patches. *J Exp Med* 196, 65-75.

Okeru, M., Bae, K., Bernstein, E., Cheng, L., Lawton, C., Wolkov, H., Pollack, A., Dicker, A., Sandler, H., and Sweeney, C. J. (2011). Evaluation of nuclear factor kappaB and chemokine receptor CXCR4 co-expression in patients with prostate cancer in the Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) 8610. *BJU Int* 108, E51-58.

Orr, A. W., Elzie, C. A., Kucik, D. F., and Murphy-Ullrich, J. E. (2003a). Thrombospondin signaling through the calreticulin/LDL receptor-related protein co-complex stimulates random and directed cell migration. *J Cell Sci* 116, 2917-2927.

Orr, A. W., Pallero, M. A., and Murphy-Ullrich, J. E. (2002). Thrombospondin stimulates focal adhesion disassembly through Gi- and phosphoinositide 3-kinase-dependent ERK activation. *J Biol Chem* 277, 20453-20460.

Orr, A. W., Pallero, M. A., Xiong, W. C., and Murphy-Ullrich, J. E. (2004). Thrombospondin induces RhoA inactivation through FAK-dependent signaling to stimulate focal adhesion disassembly. *J Biol Chem* 279, 48983-48992.

Orr, A. W., Pedraza, C. E., Pallero, M. A., Elzie, C. A., Goicoechea, S., Strickland, D. K., and Murphy-Ullrich, J. E. (2003b). Low density lipoprotein receptor-related protein is a calreticulin coreceptor that signals focal adhesion disassembly. *J Cell Biol* 161, 1179-1189.

Osada-Oka, M., Ikeda, T., Akiba, S., and Sato, T. (2008a). Hypoxia stimulates the autocrine regulation of migration of vascular smooth muscle cells via HIF-1alpha-dependent expression of thrombospondin-1. *J Cell Biochem* 104, 1918-1926.

Osada-Oka, M., Ikeda, T., Imaoka, S., Akiba, S., and Sato, T. (2008b). VEGF-enhanced proliferation under hypoxia by an autocrine mechanism in human vascular smooth muscle cells. *J Atheroscler Thromb* 15, 26-33.

Oue, N., Matsumura, S., Nakayama, H., Kitadai, Y., Taniyama, K., Matsusaki, K., and Yasui, W. (2003). Reduced expression of the TSP1 gene and its association with promoter hypermethylation in gastric carcinoma. *Oncology* 64, 423-429.

Padgett, R. A., Wahl, G. M., and Stark, G. R. (1982a). Properties of dispersed, highly repeated DNA within and near the hamster CAD gene. *Mol Cell Biol* 2, 302-307.

Padgett, R. A., Wahl, G. M., and Stark, G. R. (1982b). Structure of the gene for CAD, the multifunctional protein that initiates UMP synthesis in Syrian hamster cells. *Mol Cell Biol* 2, 293-301.

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.

Pallero, M. A., Elzie, C. A., Chen, J., Mosher, D. F., and Murphy-Ullrich, J. E. (2008). Thrombospondin 1 binding to calreticulin-LRP1 signals resistance to anoikis. *FASEB J* 22, 3968-3979.

Pan, J., Mestas, J., Burdick, M. D., Phillips, R. J., Thomas, G. V., Reckamp, K., Belperio, J. A., and Strieter, R. M. (2006). Stromal derived factor-1 (SDF-1/CXCL12) and CXCR4 in renal cell carcinoma metastasis. *Mol Cancer* 5, 56.

Paroo, Z., and Corey, D. R. (2003). Imaging gene expression using oligonucleotides and peptide nucleic acids. *J Cell Biochem* 90, 437-442.

Partin, A. W., and Oesterling, J. E. (1994). The clinical usefulness of prostate specific antigen: update 1994. *J Urol* 152, 1358-1368.

Patterson, D., and Carnright, D. V. (1977). Biochemical genetic analysis of pyrimidine biosynthesis in mammalian cells: I. Isolation of a mutant defective in the early steps of de novo pyrimidine synthesis. *Somatic Cell Genet* 3, 483-495.

Phelan, M. W., Forman, L. W., Perrine, S. P., and Faller, D. V. (1998). Hypoxia increases thrombospondin-1 transcript and protein in cultured endothelial cells. *J Lab Clin Med* 132, 519-529.

Phillips, R. J., Burdick, M. D., Lutz, M., Belperio, J. A., Keane, M. P., and Strieter, R. M. (2003). The stromal derived factor-1/CXCL12-CXC chemokine receptor 4 biological axis in non-small cell lung cancer metastases. *Am J Respir Crit Care Med* 167, 1676-1686.

Pili, R., Haggman, M., Stadler, W. M., Gingrich, J. R., Assikis, V. J., Bjork, A., Nordle, O., Forsberg, G., Carducci, M. A., and Armstrong, A. J. (2011). Phase II randomized, double-blind, placebo-controlled study of tasquinimod in men with minimally symptomatic metastatic castrate-resistant prostate cancer. *J Clin Oncol* 29, 4022-4028.

Pinski, J., Yano, T., Miller, G., and Schally, A. V. (1992). Blockade of the LH response induced by the agonist D-Trp-6-LHRH in rats by a highly potent LH-RH antagonist SB-75. *Prostate* 20, 213-224.

Potter, G. A., Barrie, S. E., Jarman, M., and Rowlands, M. G. (1995). Novel steroidal inhibitors of human cytochrome P45017 alpha (17 alpha-hydroxylase-C17,20-lyase): potential agents for the treatment of prostatic cancer. *J Med Chem* 38, 2463-2471.

Presant, C. A., Ardalan, B., Multhaupt, P., Chan, C., Staples, R., Green, L., Browning, S., Carr, B. I., Chang, F. F., and Thayer, W. (1983). Continuous five-day infusion of PALA and 5FU: a pilot phase II trial. *Med Pediatr Oncol* 11, 162-163.

Prescott, J., and Coetzee, G. A. (2006). Molecular chaperones throughout the life cycle of the androgen receptor. *Cancer Lett* 231, 12-19.

Prevarskaya, N., Flourakis, M., Bidaux, G., Thebault, S., and Skryma, R. (2007a). Differential role of TRP channels in prostate cancer. *Biochem Soc Trans* 35, 133-135.

Prevarskaya, N., Skryma, R., Bidaux, G., Flourakis, M., and Shuba, Y. (2007b). Ion channels in death and differentiation of prostate cancer cells. *Cell Death Differ* 14, 1295-1304.

Qian, X., and Tuszynski, G. P. (1996). Expression of thrombospondin-1 in cancer: a role in tumor progression. *Proc Soc Exp Biol Med* 212, 199-207.

Qian, X., Wang, T. N., Rothman, V. L., Nicosia, R. F., and Tuszynski, G. P. (1997). Thrombospondin-1 modulates angiogenesis in vitro by up-regulation of matrix metalloproteinase-9 in endothelial cells. *Exp Cell Res* 235, 403-412.

Qiu, Y., and Davidson, J. N. (2000). Substitutions in the aspartate transcarbamoylase domain of hamster CAD disrupt oligomeric structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 97-102.

Rajender, S., Singh, L., and Thangaraj, K. (2007). Phenotypic heterogeneity of mutations in androgen receptor gene. *Asian J Androl* 9, 147-179.

Ravery, V., Goldblatt, L., Royer, B., Blanc, E., Toubanc, M., and Boccon-Gibod, L. (2000). Extensive biopsy protocol improves the detection rate of prostate cancer. *J Urol* 164, 393-396.

Reardon, M. A., Dixon, J. E., and Weber, G. (1987). Increased messenger RNA concentration for carbamoyl-phosphate synthase II in hepatoma 3924A. *Biochem Biophys Res Commun* 147, 494-500.

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.

Reiter, R. E., Gu, Z., Watabe, T., Thomas, G., Szigeti, K., Davis, E., Wahl, M., Nisitani, S., Yamashiro, J., Le Beau, M. M., *et al.* (1998). Prostate stem cell antigen: a cell surface marker overexpressed in prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 1735-1740.

Ren, B., Yee, K. O., Lawler, J., and Khosravi-Far, R. (2006). Regulation of tumor angiogenesis by thrombospondin-1. *Biochim Biophys Acta* 1765, 178-188.

Ridgway, J., Zhang, G., Wu, Y., Stawicki, S., Liang, W. C., Chantry, Y., Kowalski, J., Watts, R. J., Callahan, C., Kasman, I., *et al.* (2006). Inhibition of Dll4 signalling inhibits tumour growth by deregulating angiogenesis. *Nature* 444, 1083-1087.

Rudolfsson, S. H., and Bergh, A. (2008). Testosterone-stimulated growth of the rat prostate may be driven by tissue hypoxia and hypoxia-inducible factor-1alpha. *J Endocrinol* 196, 11-19.

Rusk, A., McKeegan, E., Haviv, F., Majest, S., Henkin, J., and Khanna, C. (2006). Preclinical evaluation of antiangiogenic thrombospondin-1 peptide mimetics, ABT-526 and ABT-510, in companion dogs with naturally occurring cancers. *Clin Cancer Res* 12, 7444-7455.

S, J. W., and S, T. H. (2000). Immunohistochemical analysis of adhesion molecules in airway biopsies. *Methods Mol Med* 44, 227-240.

Sacanna, E., Ibrahim, T., Gaudio, M., Mercatali, L., Scarpi, E., Zoli, W., Serra, P., Bravaccini, S., Ricci, R., Serra, L., and Amadori, D. (2011). The role of CXCR4 in the prediction of bone metastases from breast cancer: a pilot study. *Oncology* 80, 225-231.

Sahay, N., Guy, H. I., Liu, X., and Evans, D. R. (1998). Regulation of an Escherichia coli/mammalian chimeric carbamoyl-phosphate synthetase. *J Biol Chem* 273, 31195-31202.

Sakr, W. A., Grignon, D. J., Crissman, J. D., Heilbrun, L. K., Cassin, B. J., Pontes, J. J., and Haas, G. P. (1994). High grade prostatic intraepithelial neoplasia (HGPIN) and prostatic adenocarcinoma between the ages of 20-69: an autopsy study of 249 cases. *In Vivo* 8, 439-443.

Salm, S. N., Burger, P. E., Coetzee, S., Goto, K., Moscatelli, D., and Wilson, E. L. (2005). TGF- β maintains dormancy of prostatic stem cells in the proximal region of ducts. *J Cell Biol* 170, 81-90.

Salomon, L., Azria, D., Bastide, C., Beuzeboc, P., Cormier, L., Cornud, F., Eiss, D., Eschwège, P., Gaschignard, N., Hennequin, C., *et al.* (2010). Recommandations en Onco-Urologie 2010 : Cancer de la prostate. *Progrès en Urologie* 20, *Supplement 4*, S217-S251.

Samara, G. J., Lawrence, D. M., Chiarelli, C. J., Valentino, M. D., Lyubsky, S., Zucker, S., and Vaday, G. G. (2004). CXCR4-mediated adhesion and MMP-9 secretion in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Lett* 214, 231-241.

Sanchez-Chapado, M., Olmedilla, G., Cabeza, M., Donat, E., and Ruiz, A. (2003). Prevalence of prostate cancer and prostatic intraepithelial neoplasia in Caucasian Mediterranean males: an autopsy study. *Prostate* 54, 238-247.

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

Scala, S., Ottaiano, A., Ascierto, P. A., Cavalli, M., Simeone, E., Giuliano, P., Napolitano, M., Franco, R., Botti, G., and Castello, G. (2005). Expression of CXCR4 predicts poor prognosis in patients with malignant melanoma. *Clin Cancer Res* 11, 1835-1841.

Scher, H. I., Fizazi, K., Saad, F., Taplin, M. E., Sternberg, C. N., Miller, K., de Wit, R., Mulders, P., Chi, K. N., Shore, N. D., *et al.* (2012). Increased survival with enzalutamide in prostate cancer after chemotherapy. *N Engl J Med* 367, 1187-1197.

Scheurer, S. B., Rybak, J. N., Rosli, C., Neri, D., and Elia, G. (2004). Modulation of gene expression by hypoxia in human umbilical cord vein endothelial cells: A transcriptomic and proteomic study. *Proteomics* 4, 1737-1760.

Schioppa, T., Uranchimeg, B., Saccani, A., Biswas, S. K., Doni, A., Rapisarda, A., Bernasconi, S., Saccani, S., Nebuloni, M., Vago, L., *et al.* (2003). Regulation of the chemokine receptor CXCR4 by hypoxia. *J Exp Med* 198, 1391-1402.

Schroder, F. H. (1993). Cyproterone acetate--mechanism of action and clinical effectiveness in prostate cancer treatment. *Cancer* 72, 3810-3815.

Schuur, E. R., Henderson, G. A., Kmetec, L. A., Miller, J. D., Lamparski, H. G., and Henderson, D. R. (1996). Prostate-specific antigen expression is regulated by an upstream enhancer. *J Biol Chem* 271, 7043-7051.

Scotton, C. J., Wilson, J. L., Scott, K., Stamp, G., Wilbanks, G. D., Fricker, S., Bridger, G., and Balkwill, F. R. (2002). Multiple actions of the chemokine CXCL12 on epithelial tumor cells in human ovarian cancer. *Cancer Res* 62, 5930-5938.

Semenza, G. L. (2003). Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 3, 721-732.

Sengupta, S., Schiff, R., and Katzenellenbogen, B. S. (2009). Post-transcriptional regulation of chemokine receptor CXCR4 by estrogen in HER2 overexpressing, estrogen receptor-positive breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 117, 243-251.

Serre, V., Penverne, B., Souciet, J. L., Potier, S., Guy, H., Evans, D., Vicart, P., and Herve, G. (2004). Integrated allosteric regulation in the *S. cerevisiae* carbamylphosphate synthetase - aspartate transcarbamylase multifunctional protein. *BMC Biochem* 5, 6.

Seuwen, K., and Pouyssegur, J. (1990). Serotonin as a growth factor. *Biochem Pharmacol* 39, 985-990.

Sezaki, S., Hirohata, S., Iwabu, 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.

Shigemura, K., Isotani, S., Wang, R., Fujisawa, M., Gotoh, A., Marshall, F. F., Zhau, H. E., and Chung, L. W. (2009). Soluble factors derived from stroma activated androgen receptor phosphorylation in human prostate LNCaP cells: roles of ERK/MAP kinase. *Prostate* 69, 949-955.

Shirozu, M., Nakano, T., Inazawa, J., Tashiro, K., Tada, H., Shinohara, T., and Honjo, T. (1995). Structure and chromosomal localization of the human stromal cell-derived factor 1 (SDF1) gene. *Genomics* 28, 495-500.

Sid, B., Langlois, B., Sartelet, H., Bellon, G., Dedieu, S., and Martiny, L. (2008). Thrombospondin-1 enhances human thyroid carcinoma cell invasion through urokinase activity. *Int J Biochem Cell Biol* 40, 1890-1900.

Sigoillot, F. D., Evans, D. R., and Guy, H. I. (2002a). Autophosphorylation of the mammalian multifunctional protein that initiates de novo pyrimidine biosynthesis. *J Biol Chem* 277, 24809-24817.

Sigoillot, F. D., Evans, D. R., and Guy, H. I. (2002b). Growth-dependent regulation of mammalian pyrimidine biosynthesis by the protein kinase A and MAPK signaling cascades. *J Biol Chem* 277, 15745-15751.

Sigoillot, F. D., Kotsis, D. H., Serre, V., Sigoillot, S. M., Evans, D. R., and Guy, H. I. (2005). Nuclear localization and mitogen-activated protein kinase phosphorylation of the multifunctional protein CAD. *J Biol Chem* 280, 25611-25620.

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

Silverstein, R. L., Nachman, R. L., Pannell, R., Gurewich, V., and Harpel, P. C. (1990). Thrombospondin forms complexes with single-chain and two-chain forms of urokinase. *J Biol Chem* 265, 11289-11294.

Singh, S., Singh, U. P., Grizzle, W. E., and Lillard, J. W., Jr. (2004). CXCL12-CXCR4 interactions modulate prostate cancer cell migration, metalloproteinase expression and invasion. *Lab Invest* 84, 1666-1676.

Slack, J. L., and Bornstein, P. (1994). Transformation by v-src causes transient induction followed by repression of mouse thrombospondin-1. *Cell Growth Differ* 5, 1373-1380.

Smith, K. A., Agarwal, M. L., Chernov, M. V., Chernova, O. B., Deguchi, Y., Ishizaka, Y., Patterson, T. E., Poupon, M. F., and Stark, G. R. (1995). Regulation and mechanisms of gene amplification. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 347, 49-56.

Snoek, R., Cheng, H., Margiotti, K., Wafa, L. A., Wong, C. A., Wong, E. C., Fazli, L., Nelson, C. C., Gleave, M. E., and Rennie, P. S. (2009). In vivo knockdown of the androgen receptor results in growth inhibition and regression of well-established, castration-resistant prostate tumors. *Clin Cancer Res* 15, 39-47.

Sonpavde, G., Attard, G., Bellmunt, J., Mason, M. D., Malavaud, B., Tombal, B., and Sternberg, C. N. (2011). The role of abiraterone acetate in the management of prostate cancer: a critical analysis of the literature. *Eur Urol* 60, 270-278.

Sonpavde, G., Periman, P. O., Bernold, D., Weckstein, D., Fleming, M. T., Galsky, M. D., Berry, W. R., Zhan, F., Boehm, K. A., Asmar, L., and Hutson, T. E. (2010). Sunitinib malate for metastatic castration-resistant prostate cancer following docetaxel-based chemotherapy. *Ann Oncol* 21, 319-324.

Soos, G., Tsakiris, I., Szanto, J., Turzo, C., Haas, P. G., and Dezso, B. (2005). The prevalence of prostate carcinoma and its precursor in Hungary: an autopsy study. *Eur Urol* 48, 739-744.

Sotsios, Y., Whittaker, G. C., Westwick, J., and Ward, S. G. (1999). The CXC chemokine stromal cell-derived factor activates a Gi-coupled phosphoinositide 3-kinase in T lymphocytes. *J Immunol* 163, 5954-5963.

Spano, J. P., Andre, F., Morat, L., Sabatier, L., Besse, B., Combadiere, C., Deterre, P., Martin, A., Azorin, J., Valeyre, D., *et al.* (2004). Chemokine receptor CXCR4 and early-stage non-small cell lung cancer: pattern of expression and correlation with outcome. *Ann Oncol* 15, 613-617.

Speetjens, F. M., Liefers, G. J., Korbee, C. J., Mesker, W. E., van de Velde, C. J., van Vlierberghe, R. L., Morreau, H., Tollenaar, R. A., and Kuppen, P. J. (2009). Nuclear localization of CXCR4 determines prognosis for colorectal cancer patients. *Cancer Microenviron* 2, 1-7.

Staller, P., Sulitkova, J., Lisztwan, J., Moch, H., Oakeley, E. J., and Krek, W. (2003). Chemokine receptor CXCR4 downregulated by von Hippel-Lindau tumour suppressor pVHL. *Nature* 425, 307-311.

Stanbrough, M., Bubley, G. J., Ross, K., Golub, T. R., Rubin, M. A., Penning, T. M., Febbo, P. G., and Balk, S. P. (2006). Increased expression of genes converting adrenal androgens to testosterone in androgen-independent prostate cancer. *Cancer Res* 66, 2815-2825.

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.

Stewart, G. D., Ross, J. A., McLaren, D. B., Parker, C. C., Habib, F. K., and Riddick, A. C. (2010). The relevance of a hypoxic tumour microenvironment in prostate cancer. *BJU Int* 105, 8-13.

Streit, M., Velasco, P., Brown, L. F., Skobe, M., Richard, L., Riccardi, L., Lawler, J., and Detmar, M. (1999). Overexpression of thrombospondin-1 decreases angiogenesis and inhibits the growth of human cutaneous squamous cell carcinomas. *Am J Pathol* 155, 441-452.

Strohmeyer, D., Rossing, C., Strauss, F., Bauerfeind, A., Kaufmann, O., and Loening, S. (2000). Tumor angiogenesis is associated with progression after radical prostatectomy in pT2/pT3 prostate cancer. *Prostate* 42, 26-33.

Sun, Y., Cheng, Z., Ma, L., and Pei, G. (2002). Beta-arrestin2 is critically involved in CXCR4-mediated chemotaxis, and this is mediated by its enhancement of p38 MAPK activation. *J Biol Chem* 277, 49212-49219.

Sun, Y. X., Schneider, A., Jung, Y., Wang, J., Dai, J., Cook, K., Osman, N. I., Koh-Paige, A. J., Shim, H., Pienta, K. J., *et al.* (2005). Skeletal localization and neutralization of the SDF-1(CXCL12)/CXCR4 axis blocks prostate cancer metastasis and growth in osseous sites in vivo. *J Bone Miner Res* 20, 318-329.

Sun, Y. X., Wang, J., Shelburne, C. E., Lopatin, D. E., Chinnaiyan, A. M., Rubin, M. A., Pienta, K. J., and Taichman, R. S. (2003). Expression of CXCR4 and CXCL12 (SDF-1) in human prostate cancers (PCa) in vivo. *J Cell Biochem* 89, 462-473.

Suzuma, K., Takagi, H., Otani, A., Oh, H., and Honda, Y. (1999). Expression of thrombospondin-1 in ischemia-induced retinal neovascularization. *Am J Pathol* 154, 343-354.

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*.

Swyryd, E. A., Seaver, S. S., and Stark, G. R. (1974). N-(phosphonacetyl)-L-aspartate, a potent transition state analog inhibitor of aspartate transcarbamylase, blocks proliferation of mammalian cells in culture. *J Biol Chem* 249, 6945-6950.

Taddei, M. L., Chiarugi, P., Cirri, P., Buricchi, F., Fiaschi, T., Giannoni, E., Talini, D., Cozzi, G., Formigli, L., Raugei, G., and Ramponi, G. (2002). Beta-catenin interacts with low-molecular-weight protein tyrosine phosphatase leading to cadherin-mediated cell-cell adhesion increase. *Cancer Res* 62, 6489-6499.

Taichman, R. S., Cooper, C., Keller, E. T., Pienta, K. J., Taichman, N. S., and McCauley, L. K. (2002). Use of the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 pathway in prostate cancer metastasis to bone. *Cancer Res* 62, 1832-1837.

Takahama, Y. (2006). Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection. *Nat Rev Immunol* 6, 127-135.

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.

Tatibana, M., and Ito, K. (1969). Control of pyrimidine biosynthesis in mammalian tissues. I. Partial purification and characterization of glutamine-utilizing carbamyl phosphate synthetase of mouse spleen and its tissue distribution. *J Biol Chem* 244, 5403-5413.

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.

Terada, K. (2005). [Role of mammalian HSP70-based chaperone system in cytosol]. *Seikagaku* 77, 101-112.

Tessera, L., Mucciolo, E., Bertoni, L., and Giulotto, E. (1995). Selection of N-(phosphonacetyl)-L-aspartate resistant Chinese hamster mutants in the presence of the uridine uptake inhibitor dipyrindamole. *Anticancer Res* 15, 189-192.

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.

Tian, X., Liu, Z., Niu, B., Zhang, J., Tan, T. K., Lee, S. R., Zhao, Y., Harris, D. C., and Zheng, G. (2011). E-cadherin/beta-catenin complex and the epithelial barrier. *J Biomed Biotechnol* 2011, 567305.

Tikhonenko, A. T., Black, D. J., and Linial, M. L. (1996). Viral Myc oncoproteins in infected fibroblasts down-modulate thrombospondin-1, a possible tumor suppressor gene. *J Biol Chem* 271, 30741-30747.

Tokunaga, T., Nakamura, M., Oshika, Y., Tsuchida, T., Kazuno, M., Fukushima, Y., Kawai, K., Abe, Y., Kijima, H., Yamazaki, H., *et al.* (1998). Alterations in tumour suppressor gene p53 correlate with inhibition of thrombospondin-1 gene expression in colon cancer cells. *Virchows Arch* 433, 415-418.

Tolsma, S. S., Volpert, O. V., Good, D. J., Frazier, W. A., Poverini, 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.

Tran, C., Ouk, S., Clegg, N. J., Chen, Y., Watson, P. A., Arora, V., Wongvipat, J., Smith-Jones, P. M., Yoo, D., Kwon, A., *et al.* (2009). Development of a second-generation antiandrogen for treatment of advanced prostate cancer. *Science* 324, 787-790.

Tran, C. P., Lin, C., Yamashiro, J., and Reiter, R. E. (2002). Prostate stem cell antigen is a marker of late intermediate prostate epithelial cells. *Mol Cancer Res* 1, 113-121.

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.

Tuszynski, G. P., and Kowalska, M. A. (1991). Thrombospondin-induced adhesion of human platelets. *J Clin Invest* 87, 1387-1394.

Tuszynski, G. P., and Nicosia, R. F. (1994). Localization of thrombospondin and its cysteine-serine-valine-threonine-cysteine-glycine-specific receptor in human breast carcinoma. *Lab Invest* 70, 228-233.

Tuszynski, G. P., Rothman, V. L., Papale, M., Hamilton, B. K., and Eyal, J. (1993). Identification and characterization of a tumor cell receptor for CSVTCG, a thrombospondin adhesive domain. *J Cell Biol* 120, 513-521.

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. *Thromb Haemost* 67, 607-611.

Udayakumar, T. S., Bair, E. L., Nagle, R. B., and Bowden, G. T. (2003). Pharmacological inhibition of FGF receptor signaling inhibits LNCaP prostate tumor growth, promatrilysin, and PSA expression. *Mol Carcinog* 38, 70-77.

Vallbo, C., Wang, W., and Damber, J. E. (2004). The expression of thrombospondin-1 in benign prostatic hyperplasia and prostatic intraepithelial neoplasia is decreased in prostate cancer. *BJU Int* 93, 1339-1343.

Van der Veldt, A. A., Lubberink, M., Bahce, I., Walraven, M., de Boer, M. P., Greuter, H. N., Hendrikse, N. H., Eriksson, J., Windhorst, A. D., Postmus, P. E., *et al.* (2012). Rapid decrease in delivery of chemotherapy to tumors after anti-VEGF therapy: implications for scheduling of anti-angiogenic drugs. *Cancer Cell* 21, 82-91.

van Leenders, G. J., and Schalken, J. A. (2003). Epithelial cell differentiation in the human prostate epithelium: implications for the pathogenesis and therapy of prostate cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 46 Suppl, S3-10.

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.

Vila-Coro, A. J., Rodriguez-Frade, J. M., Martin De Ana, A., Moreno-Ortiz, M. C., Martinez, A. C., and Mellado, M. (1999). The chemokine SDF-1 α triggers CXCR4 receptor dimerization and activates the JAK/STAT pathway. *FASEB J* 13, 1699-1710.

Vleminckx, K., Vakaet, L., Jr., Mareel, M., Fiers, W., and van Roy, F. (1991). Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role. *Cell* 66, 107-119.

Volpert, O. V., Dameron, K. M., and Bouck, N. (1997). Sequential development of an angiogenic phenotype by human fibroblasts progressing to tumorigenicity. *Oncogene* 14, 1495-1502.

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.

Wahl, G. M., Padgett, R. A., and Stark, G. R. (1979). Gene amplification causes overproduction of the first three enzymes of UMP synthesis in N-(phosphonacetyl)-L-aspartate-resistant hamster cells. *J Biol Chem* 254, 8679-8689.

Wahl, G. M., Vitto, L., Padgett, R. A., and Stark, G. R. (1982). Single-copy and amplified CAD genes in Syrian hamster chromosomes localized by a highly sensitive method for in situ hybridization. *Mol Cell Biol* 2, 308-319.

Wakiyama, T., Shinohara, T., Shirakusa, T., John, A. S., and Tuszynski, G. P. (2001). The localization of thrombospondin-1 (TSP-1), cysteine-serine-valine-threonine-cysteine-glycine (CSVTCG) TSP receptor, and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in colorectal cancer. *Histol Histopathol* 16, 345-351.

Wald, O., Pappo, O., Ari, Z. B., Azzaria, E., Wiess, I. D., Gafnovitch, I., Wald, H., Spengler, U., Galun, E., and Peled, A. (2004). The CCR5Delta32 allele is associated with reduced liver inflammation in hepatitis C virus infection. *Eur J Immunogenet* 31, 249-252.

Wang, A., Fairhurst, A. M., Tus, K., Subramanian, S., Liu, Y., Lin, F., Igarashi, P., Zhou, X. J., Batteux, F., Wong, D., *et al.* (2009a). CXCR4/CXCL12 hyperexpression plays a pivotal role in the pathogenesis of lupus. *J Immunol* 182, 4448-4458.

Wang, J., Krill, D., Torbenson, M., Wang, Q., Bisceglia, M., Stoner, J., Thomas, A., DeFlavia, P., Dhir, R., and Becich, M. J. (2000). Expression of cadherins and catenins in paired tumor and non-neoplastic primary prostate cultures and corresponding prostatectomy specimens. *Urol Res* 28, 308-315.

Wang, J., Shiozawa, Y., Wang, Y., Jung, Y., Pienta, K. J., Mehra, R., Loberg, R., and Taichman, R. S. (2008). The role of CXCR7/RDC1 as a chemokine receptor for CXCL12/SDF-1 in prostate cancer. *J Biol Chem* 283, 4283-4294.

Wang, L., Li, C. L., Yu, W. B., Yin, H. P., Zhang, G. Y., Zhang, L. F., Li, S., and Hu, S. Y. (2011). Influence of CXCR4/SDF-1 axis on E-cadherin/beta-catenin complex expression in HT29 colon cancer cells. *World J Gastroenterol* 17, 625-632.

Wang, L., Wang, Z., Yang, B., Yang, Q., and Sun, Y. (2009b). CXCR4 nuclear localization follows binding of its ligand SDF-1 and occurs in metastatic but not primary renal cell carcinoma. *Oncol Rep* 22, 1333-1339.

Wang, X., Kruithof-de Julio, M., Economides, K. D., Walker, D., Yu, H., Halili, M. V., Hu, Y. P., Price, S. M., Abate-Shen, C., and Shen, M. M. (2009c). A luminal epithelial stem cell that is a cell of origin for prostate cancer. *Nature* 461, 495-500.

Wegner, S. A., Ehrenberg, P. K., Chang, G., Dayhoff, D. E., Sleeker, A. L., and Michael, N. L. (1998). Genomic organization and functional characterization of the chemokine receptor CXCR4, a major entry co-receptor for human immunodeficiency virus type 1. *J Biol Chem* 273, 4754-4760.

Weidner, N., Carroll, P. R., Flax, J., Blumenfeld, W., and Folkman, J. (1993). Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive prostate carcinoma. *Am J Pathol* 143, 401-409.

Weinstat-Saslow, D. L., Zabrenetzky, V. S., VanHoutte, K., Frazier, W. A., Roberts, D. D., and Steeg, P. S. (1994). Transfection of thrombospondin 1 complementary DNA into a human breast carcinoma cell line reduces primary tumor growth, metastatic potential, and angiogenesis. *Cancer Res* 54, 6504-6511.

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.

Wils, J., Blijham, G. H., Wagener, T., De Greve, J., Jansen, R. L., Kok, T. C., Nortier, J. W., Bleiberg, H., Couvreur, M. L., Genicot, B., and Baron, B. (2003). High-dose 5-fluorouracil plus low dose methotrexate plus or minus low-dose PALA in advanced colorectal cancer: a randomised phase II-III trial of the EORTC Gastrointestinal Group. *Eur J Cancer* 39, 346-352.

Wong, H. Y., Burghoorn, J. A., Van Leeuwen, M., De Ruiter, P. E., Schippers, E., Blok, L. J., Li, K. W., Dekker, H. L., De Jong, L., Trapman, J., *et al.* (2004). Phosphorylation of androgen receptor isoforms. *Biochem J* 383, 267-276.

Wong, Y. N., Mitra, N., Hudes, G., Localio, R., Schwartz, J. S., Wan, F., Montagnet, C., and Armstrong, K. (2006). Survival associated with treatment vs observation of localized prostate cancer in elderly men. *JAMA* 296, 2683-2693.

Wu, B., Chien, E. Y., Mol, C. D., Fenalti, G., Liu, W., Katritch, V., Abagyan, R., Brooun, A., Wells, P., Bi, F. C., *et al.* (2010). Structures of the CXCR4 chemokine GPCR with small-molecule and cyclic peptide antagonists. *Science* 330, 1066-1071.

Wu, P. C., Yang, L. C., Kuo, H. K., Huang, C. C., Tsai, C. L., Lin, P. R., Shin, S. J., and Tai, M. H. (2005). Inhibition of corneal angiogenesis by local application of vasostatin. *Mol Vis* 11, 28-35.

Wu, Y., and Zhou, B. P. (2008). New insights of epithelial-mesenchymal transition in cancer metastasis. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 40, 643-650.

Xin, L., Lawson, D. A., and Witte, O. N. (2005). The Sca-1 cell surface marker enriches for a prostate-regenerating cell subpopulation that can initiate prostate tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 6942-6947.

Xu, K., Shimelis, H., Linn, D. E., Jiang, R., Yang, X., Sun, F., Guo, Z., Chen, H., Li, W., Kong, X., *et al.* (2009). Regulation of androgen receptor transcriptional activity and specificity by RNF6-induced ubiquitination. *Cancer Cell* 15, 270-282.

Yamauchi, M., Imajoh-Ohmi, S., and Shibuya, M. (2007). Novel antiangiogenic pathway of thrombospondin-1 mediated by suppression of the cell cycle. *Cancer Sci* 98, 1491-1497.

Yan, G., Fukabori, Y., Nikolaropoulos, S., Wang, F., and McKeehan, W. L. (1992). Heparin-binding keratinocyte growth factor is a candidate stromal-to-epithelial-cell andromedin. *Mol Endocrinol* 6, 2123-2128.

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.

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

Young, G. D., and Murphy-Ullrich, J. E. (2004b). The tryptophan-rich motifs of the thrombospondin type 1 repeats bind VLAL motifs in the latent transforming growth factor-beta complex. *J Biol Chem* 279, 47633-47642.

Young, R. J., and Reed, M. W. (2012). Anti-angiogenic therapy: concept to clinic. *Microcirculation* 19, 115-125.

Yuan, T. C., Veeramani, S., and Lin, M. F. (2007). Neuroendocrine-like prostate cancer cells: neuroendocrine transdifferentiation of prostate adenocarcinoma cells. *Endocr Relat Cancer* 14, 531-547.

Zachary, I., Woll, P. J., and Rozengurt, E. (1987). A role for neuropeptides in the control of cell proliferation. *Dev Biol* 124, 295-308.

Zagzag, D., Krishnamachary, B., Yee, H., Okuyama, H., Chiriboga, L., Ali, M. A., Melamed, J., and Semenza, G. L. (2005). Stromal cell-derived factor-1alpha and CXCR4 expression in hemangioblastoma and clear cell-renal cell carcinoma: von Hippel-Lindau loss-of-function induces expression of a ligand and its receptor. *Cancer Res* 65, 6178-6188.

Zenzmaier, C., Untergasser, G., and Berger, P. (2008). Aging of the prostate epithelial stem/progenitor cell. *Exp Gerontol* 43, 981-985.

Zhang, H., Akman, H. O., Smith, E. L., Zhao, J., Murphy-Ullrich, J. E., and Batuman, O. A. (2003). Cellular response to hypoxia involves signaling via Smad proteins. *Blood* 101, 2253-2260.

Zhang, M., Magit, D., and Sager, R. (1997). Expression of maspin in prostate cells is regulated by a positive ets element and a negative hormonal responsive element site recognized by androgen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 5673-5678.

- Zhang, S., Qi, L., Li, M., Zhang, D., Xu, S., Wang, N., and Sun, B. (2008). Chemokine CXCL12 and its receptor CXCR4 expression are associated with perineural invasion of prostate cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 27, 62.
- Zhang, X., Galardi, E., Duquette, M., Delic, M., Lawler, J., and Parangi, S. (2005). Antiangiogenic treatment with the three thrombospondin-1 type 1 repeats recombinant protein in an orthotopic human pancreatic cancer model. *Clin Cancer Res* 11, 2337-2344.
- Zhang, X., and Lawler, J. (2007). Thrombospondin-based antiangiogenic therapy. *Microvasc Res* 74, 90-99.
- Zhang, X. F., Wang, J. F., Matczak, E., Proper, J. A., and Groopman, J. E. (2001). Janus kinase 2 is involved in stromal cell-derived factor-1 α -induced tyrosine phosphorylation of focal adhesion proteins and migration of hematopoietic progenitor cells. *Blood* 97, 3342-3348.
- Zhao, X. Y., Boyle, B., Krishnan, A. V., Navone, N. M., Peehl, D. M., and Feldman, D. (1999). Two mutations identified in the androgen receptor of the new human prostate cancer cell line MDA PCa 2a. *J Urol* 162, 2192-2199.
- Zhou, Y., Kurihara, T., Ryseck, R. P., Yang, Y., Ryan, C., Loy, J., Warr, G., and Bravo, R. (1998). Impaired macrophage function and enhanced T cell-dependent immune response in mice lacking CCR5, the mouse homologue of the major HIV-1 coreceptor. *J Immunol* 160, 4018-4025.
- Zhou, Z. X., Sar, M., Simental, J. A., Lane, M. V., and Wilson, E. M. (1994). A ligand-dependent bipartite nuclear targeting signal in the human androgen receptor. Requirement for the DNA-binding domain and modulation by NH₂-terminal and carboxyl-terminal sequences. *J Biol Chem* 269, 13115-13123.
- Zhu, Y. S. (2005). Molecular Basis of Steroid Action in the Prostate. *Cellscience* 1, 27-55.